

A REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO NA  
CLÍNICA E NA EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR

ALINE FAGUNDES DA SILVA

Tese submetida para obtenção do título de Doutor  
Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientação: Dr<sup>a</sup> Keyla Belizia Feldman Marzochi  
Dr. Armando de Oliveira Schubach

Rio de Janeiro  
2007

Título do Trabalho: A REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO NA CLÍNICA E NA EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Autor: ALINE FAGUNDES DA SILVA

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Examinadores:

Professor: \_\_\_\_\_

Professor \_\_\_\_\_

Professor \_\_\_\_\_

Orientação: Dr<sup>a</sup> Keyla Belizia Feldman Marzochi  
Dr. Armando de Oliveira Schubach

Rio de Janeiro  
2007

Silva, Aline Fagundes da  
A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar/  
Aline Fagundes da Silva. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-IPEC/FIOCRUZ, 2007.

153 p. + anexos, il., tab.

Tese. Doutorado em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS/FIOCRUZ, 2007. Orientadores: Keyla Belizia Feldman Marzochi/Armando de Oliveira Schubach.

1. Leishmaniose Tegumentar. 2. Teste de Montenegro. 3. Reação Intradérmica de Montenegro. 4. Diagnóstico. 5. Epidemiologia. 6. PCR

*Ofereço este trabalho*

*a DEUS.*

*E àqueles que tornaram tudo possível: minha família, meus orientadores, os participantes voluntários pacientes e sadios, meus alunos, meus colegas de laboratório e de pós-graduação, a FIOCRUZ e todos a quem, como funcionária pública, tenho o dever de servir.*



Fonte: internet (autor não identificado)

“Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever.”

(Mohandas Karamchand "Mahatma" Gandhi (1869-10-02 – 1948-01-30))

## AGRADECIMENTOS

Toda e qualquer falha deste trabalho deve ser creditada exclusivamente à autora do mesmo. Todos os méritos, porém, têm que ser divididos com todos aqueles que participaram e fizeram o melhor de si por sua realização, de todas as formas possíveis. A todos, meus agradecimentos...

Aos meus mais-que-orientadores, mestres e amigos Keyla B. F. Marzochi e Mauro C.A. Marzochi, por tornarem possível não só este trabalho, mas toda a minha carreira e meu crescimento profissional, e, mais ainda, pela amizade e respeito que sempre me tiveram.

Ao Dr. Armando Schubach, orientador, amigo, coordenador e inspirador, me ensinando como fazer tudo ao mesmo tempo e mais alguma coisa (ainda tenho muito que aprender!!)

À coordenação do Curso de Pós- Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ, em especial a Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Simões Villas- Boas e a Dr<sup>a</sup> Thereza Cristina dos Santos, pela qualidade do Curso e acolhimento e incentivo a este trabalho de tese.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- IPEC/Serviço de Parasitologia, pela acolhida e incentivo à realização deste trabalho

Ao Centro de referência em Leishmanioses- CRLeish/IPEC, pela amizade, carinho, paciência e respeito nestes anos de convivência.

Ao Dr. Octavio Fernandes e sua equipe, pela acolhida, ensinamentos, confiança e respeito que demonstrou por mim e por meu trabalho. Aqui reitero minha admiração e carinho. E aos demais amigos do Depto. de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, agradeço pelo carinho, amizade e colaboração com o Estudo I.

Aos professores que participaram de diversos momentos do processo regular de avaliação e acompanhamento deste trabalho: Dr<sup>a</sup> Maria José de Andrada Serpa/IPEC, Dr<sup>a</sup> Rachel Pacheco/IOC, Dr<sup>a</sup> Sonia Lambert Passos/IPEC e Dr<sup>a</sup> Fátima Conceição Silva/IOC

À “Equipe PCR” (CRLeish/IPEC) \_ Patrícia, Liliane, Cíntia, Alessandra, Vivian, Fernando e Tatiana \_ sem a qual este trabalho não teria sido possível, por sua amizade e dedicação.

Ao Prof<sup>o</sup> Maurício de Andrade Perez, pelo apoio estatístico e amizade e a DR<sup>a</sup> Sônia R. Lambert Passos, pela amizade e ensinamentos em epidemiologia.

À Dr<sup>a</sup> Rachel Pacheco e sua equipe, pelo carinho, amizade e colaboração com o Estudo II

Ao Ministério do Exército - Comando Militar do Sul, por ter tornado este trabalho possível, recebendo a equipe com máxima consideração e respeito.

À Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde do Brasil, e à então Coordenação Regional da Fundação Nacional de Saúde do Rio Grande do Sul, particularmente a Isabel Michielin Nunes e Carlos Francisco Ferreira, por todo o apoio ao Estudo I.

À Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro, particularmente a Patrícia Ganzenmuller, pelo compartilhamento de informações do banco de dados da SES.

À Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, pelo apoio ao Estudo II.

A BIOMANGUINHOS®, FIOCRUZ, pela produção e controle de qualidade dos antígenos utilizados no Estudo I.

A Todos os colegas da turma 2003 da Pós- Graduação em Vigilância Sanitária, pela amizade e maravilhosa convivência.

E àqueles que me apoiaram em minhas escolhas profissionais e em minha vida até hoje, particularmente meus pais, Alírio e Elecy e meu irmão Alírio Jr.

## RESUMO

A pesquisa consistiu da avaliação da Reação Intradérmica de Montenegro - IDRMM - como instrumento para inquéritos epidemiológicos e diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA, em duas populações, respectivamente, 400 adultos sadios (Estudo I) e 302 pacientes suspeitos de LTA (Estudo II). O Estudo I foi realizado em região considerada indene de LTA, em Santa Maria, Rio Grande do Sul, e visou a comparação entre a resposta ao antígeno de Montenegro e aos preservativos timerosal e fenol, analisando, entre outros, parâmetros como inocuidade, especificidade e padronização clínica do preservativo, as respostas após 48 horas e em torno de 2 semanas após a aplicação e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em casos positivos ao antígeno. O Estudo II, realizado no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- IPEC/FIOCRUZ envolveu, entre outros aspectos, a comparação entre o comportamento da IDRMM e os testes de diagnóstico para detecção de *Leishmania*, bem como o estabelecimento de protocolo de padronização clínica da técnica de aplicação do teste e leitura da reação.

Os resultados mostraram que a utilização do timerosal como veículo do Teste de Montenegro em voluntários sadios foi responsável por 12% de falso positivos ao teste. No entanto, cerca de 29,5 % dos 203 voluntários sadios testados foram IDRMM- positivos e 1 dos 151 voluntários testados foi positivo à PCR, evidenciando infecção subclínica por *Leishmania* na área do Estudo I. Foram evidenciadas reações tardias em 4,5 % dos indivíduos sadios avaliados, mas nenhum dos pacientes apresentou tais reações. O Teste de Montenegro pode ser considerado confortável e seguro para indivíduos sadios e pacientes com LTA e suspeitos, não tendo sido verificadas reações adversas sistêmicas e tendo sido as reações locais discretas e presentes em 21,5 % e 11,2 % dos pacientes, respectivamente. Verificou-se que o método de leitura da IDRMM por meio do decalque em papel deve ser usado como alternativa à leitura direta, desde que realizado por profissional obedecendo protocolo padronizado. Entre os métodos de diagnóstico da LTA avaliados no Estudo II, A PCR foi o mais sensível (92,3%), superando a cultura (78 %), a histopatologia (40%) e o *imprint* (24 %). A co-positividade IDRMM - PCR foi de 71,4% e a acurácia de 81,3 %. O conjunto dos resultados encontrados reforça a constatação de que a IDRMM é o melhor instrumento para inquéritos de LTA, e, como método diagnóstico, apresenta sensibilidade de 89 %, especificidade de 71,4%, valor preditivo positivo de 68,7% e valor preditivo negativo de 90,3 %



## ABSTRACT

The research consisted of the evaluation of Montenegro skin test- MST- as an instrument for epidemiological surveys and diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis- ATL in two populations, respectively, 400 healthy adults (Study I) and 302 ATL suspicious patients (Study II). The Study I was performed in an ATL non endemic area, in Santa Maria, Rio Grande do Sul, and it evaluates MST positivity and the preservatives timerosal and phenol, analyzing, among other, parameters as innocuousness, specificity and clinical standardization of the preservative, the reactions after 48 hours and around 2 weeks after the application and the PCR reaction in positive cases to the antigen. The Study II, developed at the Institute of Clinical Research Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ involved, among other aspects, the comparison between the MST response and the leishmaniasis diagnostic tests, as well as the establishment of protocol of clinical standardization of the MST. The results showed that the use of the timerosal as vehicle of MST in healthy volunteers was responsible for 12% - of false positive results to the test. However, about 29,5% of the 203 healthy volunteers tested were MST - positive and 1 of the 151 tested volunteers were PCR- positive, evidencing subclinical infection for *Leishmania* in the area of Study I. Late reactions were evidenced in 4,5% of the healthy individuals, but none of the patients presented such reactions. MST can be considered comfortable and safe for healthy volunteers and ATL patients, not having been verified systemic adverse reactions and having been the local reactions presents in 21,5% and 11,2% of the two groups, respectively. It was verified that the method of MST reading of through the paper should be used as alternative to the direct reading, since accomplished by professional obeying standardized protocol. Among the methods of ATL diagnosis in the Study II, PCR was the most sensitive (92,3%), overcoming culture (78%), histopathology (40%) and imprint (24%). The co-positivity MST-PCR was of 71,4% and the agreement of 81,3%. These results reinforces that MST is the best instrument for surveys in ATL endemic areas and, as method of diagnosis, it presents sensitivity of 89%, specificity of 71,4%, predictive positive value of 68,7% and predictive positive value of 90,3 %.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida	26
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária	32
bP - pares de bases	37
CGLAB- Coordenação geral de laboratórios	53
CPPI - Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos	29
CRLEISH - Centro de Referência em Leishmanioses	19
DNA - ácido desoxirribonucleico	35
EDTA - ácido etilenodiaminotrissódico	51
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz	19
HIV- vírus da imunodeficiência humana	26
HTLV- vírus linfotrópico humano	27
IDRM - Intradermorreação de Montenegro	19
IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas	19
KDNA - DNA do cinetoplasto	36
LT - Leishmaniose Tegumentar	38
LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana	20
ORL - otorrinolaringológico	50
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase	21
PPD - derivado protéico purificado.	19
RDC- Resolução da Diretoria Colegiada	32
SPSS - Statistical package for Social Sciences	50
SUS - Sistema Único de Saúde	80
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro	47
VISA - Vigilância Sanitária	19

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Estudo I- Características dos voluntários distribuídos nos grupos segundo o teste intradérmico recebido.....	62
Tabela 2: Estudo I - Respostas dos voluntários aos testes e retestes, de acordo com o reativo utilizado em seu grupo .....	63
Tabela 3: Estudo I- Comparação entre as médias das endurações nos voluntários testados com antígeno fenolado ou mertiolatado .....	64
Tabela 4: Estudo I- Frequência de hipersensibilidade ao timerosal ou ao fenol na população sadia estudada. ....	67
Tabela 5: Estudo I- Número de voluntários sadios apresentando reações locais ou sistêmicas aos testes intradérmicos realizados .....	67
Tabela 6: Estudo I- Associação entre a positividade aos testes intradérmicos e as variáveis estudadas .....	69
Tabela 7: Estudo I- Aparecimento de Reação Tardia, entre 10 a 15 dias após a realização de IDRМ, em indivíduos negativos na leitura após 48 horas.....	70
Tabela 8: Presença de cicatrizes cutâneas nos voluntários sadios reavaliados.....	71
Tabela 9: Estudo II - Procedência dos pacientes estudados, de acordo com o grupo de diagnóstico.....	77
Tabela 10: Estudo II- Localização das lesões mucosas e mucocutâneas nos pacientes com LTA .....	83
Tabela 11: Estudo II- Métodos de diagnóstico laboratorial efetuados em pacientes com LTA .....	84
Tabela 12: Estudo II - Diagnósticos dos pacientes pertencentes ao grupo NLTA...	85
Tabela 13: Estudo II- Distribuição dos pacientes do grupo com diagnóstico não definido (NDef), de acordo com o desfecho do caso .....	86
Tabela 14: Estudo II- Comparação entre as variáveis clínicas consideradas no protocolo de aplicação e o resultado final do Teste de Montenegro. ....	88
Tabela 15: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração, em segundos, e o grau de conforto referido à aplicação da IDRМ.....	89
Tabela 16: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de vazamento do antígeno no local da aplicação .....	89

Tabela 17: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de sangramento no local da aplicação .....	89
Tabela 18: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de reações locais na leitura de 30 minutos.....	90
Tabela 19: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de reações locais na leitura de 48 horas .....	90
Tabela 20: Estudo II- Comparação dos resultados da IDRМ, de acordo com as medidas realizadas no local da aplicação e no papel decalcado.....	91
Tabela 21: Resultado da IDRМ no grupo de pacientes NLTA, de acordo com o diagnóstico etiológico confirmado .....	94
Tabela 22: Estudo II- Número de pacientes e tipos de reações locais ao Teste de Montenegro após 30 minutos da aplicação do teste, por grupo de pacientes .....	96
Tabela 23: Número e tipo de reações locais observadas na leitura 48 horas após a aplicação do Teste de Montenegro, por grupo de pacientes .....	98
Tabela 24: Comparação entre o tamanho das endurações verificadas à IDRМ, nos 3 grupos de pacientes .....	101
Tabela 25: Comparação entre o tamanho das endurações da IDRМ, de acordo com a residência dos pacientes, em área endêmica ou não para LTA.....	103
Tabela 26: Resultados da IDRМ e dos exames de diagnóstico etiológico para LTA entre os pacientes do grupo LTA, cujo teste foi realizado no IPEC/CRLeish.....	114
Tabela 27: Avaliação da IDRМ entre pacientes dos grupos LTA e NLTA. ....	115
Tabela 28: Validação da IDRМ em pacientes dos grupos LTA e NLTA.....	115
Tabela 29: Rendimento da extração de DNA de biópsias: com os kits DNazol® e Genomic Prep®, conforme protocolo de padronização da extração .....	118
Tabela 30: Concentrações de DNA de cultura axênica de <i>Leishmania braziliensis</i> utilizadas na avaliação do limiar de detecção da PCR .....	119
Tabela 31: Resultados obtidos entre duas reações de PCR, com as mesmas amostras em tempos diferentes .....	120
Tabela 32: Co-positividade entre a PCR e os outros exames de diagnóstico etiológico para LTA realizados nos pacientes.....	125

<b>Tabela 33: Taxas de positividade da PCR nos pacientes com LTA ou com outro diagnóstico etiológico (NLTA).....</b>	<b>126</b>
<b>Tabela 34: Avaliação da PCR nos pacientes com LTA ou com outro diagnóstico etiológico (NLTA).....</b>	<b>126</b>
<b>Tabela 35: Resultados da IDRM e da PCR nos pacientes do grupo NDef que realizaram Teste de Montenegro e PCR no IPEC.....</b>	<b>129</b>
<b>Tabela 36: Resultados da PCR no grupo NDef, de acordo com o desfecho do caso. ....</b>	<b>130</b>
<b>Tabela 37: Estudo II- Sensibilidade dos exames de diagnóstico etiológico realizados nos pacientes confirmados como LTA, incluindo os pacientes diagnosticados pela PCR.....</b>	<b>132</b>
<b>Tabela 38: Resultados da IDRM e da PCR no grupo de pacientes submetidos a ambos os exames, independente do diagnóstico de certeza dos pacientes.....</b>	<b>133</b>
<b>Tabela 39: Resultados da IDRM nos pacientes dos grupos LTA e NLTA submetidos à IDRM e à PCR .....</b>	<b>134</b>
<b>Tabela 40: Resultados da PCR nos pacientes dos grupos LTA e NLTA submetidos à IDRM e à PCR.....</b>	<b>134</b>
<b>Tabela 41: Desempenho da IDRM e da PCR, com base nos dados das tabelas 38 e 39 .....</b>	<b>134</b>
<b>Tabela 42: Avaliação da IDRM e da PCR quando utilizadas em série ou em paralelo, com prevalência de LTA de 87 % .....</b>	<b>135</b>

## Lista de ilustrações

Figura 1: Estudo I- Esquema experimental para realização da Etapa I.....	46
Figura 2: Estudo I- Mapa localizando a área de estudo e procedência dos voluntários. .....	46
Figura 3: Estudo I - Esquema de avaliação clínica e laboratorial dos indivíduos sadios.....	50
Figura 4: Estudo II - Esquema de avaliação clínica e laboratorial em casuística hospitalar.....	52
Figura 5: Estudo II - Esquema de fracionamento de biópsias para exames diagnósticos.....	54
Figura 6 Estudo II - Esquema sintetizado dos protocolos para detecção molecular de <i>Leishmania</i> .....	59
Figura 7- Estudo II- Esquema da análise dos resultados.....	61
Figura 8: Estudo I- Distribuição dos diâmetros das endurações para os indivíduos sadios testados com antígenos fenolado e mertiolatado.....	65
Figura 9: Estudo I- Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em indivíduos assintomáticos..	73
Figura 10: Estudo II - Distribuição dos pacientes segundo diagnóstico e local de realização do Teste de Montenegro.....	76
Figura 11: Estudo II- Distribuição etária dos pacientes estudados, por grupo de diagnóstico. Valores expressos em porcentagem*.....	79
Figura 12: Estudo II- Pacientes estudados, por sexo e grupo de diagnóstico. Valores expressos em porcentagem*.....	80
Figura 13: Estudo II- Distribuição dos pacientes com LTA segundo tempo de história clínica, em meses*.....	81
Figura 14: Estudo II- Distribuição dos pacientes de LTA segundo forma clínica da doença.....	82
Figura 15: Estudo II- Distribuição dos pacientes com LTA cutânea segundo o número de lesões.....	83
Figura 16: Estudo II- Resultados da IDRm de acordo com o grupo de pacientes estudados no Estudo II.....	93

Figura 17: Estudo II- Ocorrência de reações locais após 30 minutos da aplicação do teste, por grupo de pacientes .....	96
Figura 18: Estudo II- Resultados da IDRМ e ocorrência de reações locais após 30 minutos da aplicação do teste* .....	97
Figura 19: Estudo II- Ocorrência de reações locais (exceto enduração após 48 horas da aplicação da IDRМ, por grupo de pacientes.....	98
Figura 20: Estudo II- Resultados da IDRМ e presença ou ausência de reações locais associadas ou não à enduração na leitura após 48 horas da aplicação do Teste de Montenegro. ....	99
Figura 21: Estudo II- Distribuição dos diâmetros das endurações nos três grupos de pacientes. ....	102
Figura 22: Estudo II- Distribuição dos 3 grupos de pacientes de acordo com a residência ou não em áreas endêmicas de LTA.....	103
Figura 23: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com a residência dos pacientes, em área endêmica ou não de LTA .....	104
Figura 24: Estudo II- Porcentagem de pacientes IDRМ (+) de acordo com o grupo e a faixa etária (em anos) dos pacientes estudados .....	106
Figura 25: Estudo II- porcentagem de pacientes IDRМ (+) de acordo com o grupo e o sexo. ....	107
Figura 26: Estudo II- Resultados da IDRМ e histórico de alergias.....	108
Figura 27: Estudo II- Resultados da IDRМ e histórico de vacinações entre os pacientes .....	109
Figura 28: Estudo II- Resultados da IDRМ e ocorrência de enfermidades associadas ao diagnóstico principal dos pacientes.....	110
Figura 29: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com o tempo de evolução da LTA, em meses.....	111
Figura 30: Estudo II- Resultados da IDRМ de acordo com a forma clínica apresentada pelos pacientes do grupo LTA.....	112
Figura 31: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com o número de lesões apresentadas pelos pacientes de LTA do Estudo II.....	113
Figura 32: Estudo II- Determinação do limiar de detecção da PCR com DNA de cultura de <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	119

Figura 33: Estudo II- Número de pacientes biopsiados por local de realização do Teste de Montenegro e grupo de pacientes .....	121
Figura 34: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com os grupos de pacientes estudados.....	121
Figura 35: Estudo II: Resultados da PCR de acordo com a residência ou não em área endêmica de LTA.....	122
Figura 36: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com o tempo de evolução, em meses, da LTA .....	123
Figura 37: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com a forma clínica de LTA apresentada.....	124
Figura 38: Estudo II- Resultados da PCR, de acordo com o número de lesões por LTA .....	125



# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Revisão da literatura .....	23
1.1.1	Considerações gerais .....	23
1.1.2	A Resposta à IDRМ na Clínica .....	25
1.1.3	O Antígeno para IDRМ.....	28
1.1.4	Os preservantes utilizados na composição do antígeno para IDRМ.....	30
1.1.5	A IDRМ e as ações de Vigilância Sanitária .....	31
1.1.6	A IDRМ e os exames de diagnóstico etiológico .....	34
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	Objetivo Geral .....	43
2.2	Objetivos Específicos.....	43
3	METODOLOGIA.....	45
3.1	Estudo I - Avaliação da IDRМ em indivíduos sadios .....	45
3.1.1	Aspectos éticos .....	45
3.1.2	População de estudo .....	45
3.1.3	Amostra e randomização dos voluntários.....	47
3.1.4	Procedência do antígeno e das soluções veículo empregadas .....	47
3.1.5	Entrevista individual.....	47
3.1.6	Procedimentos de mascaramento.....	48
3.1.7	Aplicação dos testes e Leitura dos resultados .....	48
3.1.8	Reteste .....	49
3.1.9	Acompanhamento para observação de reações do “tipo tardio” .....	49
3.1.10	Análise estatística .....	50
3.1.11	Reavaliação clínica.....	50
3.1.12	Pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> no creme leucocitário dos indivíduos reavaliados – Polimerase Chain Reaction .....	51
3.2	Estudo II – Avaliação da IDRМ em pacientes .....	52
3.2.1	Aspectos éticos .....	52
3.2.2	População de estudo .....	53
3.2.3	Antígeno utilizado .....	53
3.2.4	Entrevista individual.....	53
3.2.5	Coleta de espécimes clínicos para diagnóstico.....	53
3.2.6	Padronização clínica da IDRМ.....	55
3.2.7	Realização dos testes de detecção molecular nas amostras clínicas.....	56
3.2.8	Plano de análise dos resultados .....	59
4	Resultados e Discussão.....	62
4.1	Estudo I - Avaliação da IDRМ em indivíduos sadios .....	62
4.1.1	Randomização e comparabilidade dos grupos de estudo .....	62
4.1.2	Positividade aos testes intradérmicos nos indivíduos sadios.....	63
4.1.3	Tamanho das endurações frente aos antígenos mertiolatado e fenolado nos indivíduos sadios .....	64
4.1.4	Reações positivas às salinas mertiolatada ou fenolada.....	65
4.1.5	Reações observadas nos indivíduos sadios – efeitos adversos.....	67
4.1.6	Positividade à IDRМ e as variáveis estudadas .....	68
4.1.7	Reações tardias após a leitura em 48 horas .....	69
4.1.8	Reavaliação clínica e laboratorial dos indivíduos testados .....	71
4.2	Estudo II- Avaliação da IDRМ em pacientes.....	75
4.2.1	Constituição dos grupos de pacientes conforme caracterização da etiologia da doença	75
4.2.2	Perfil clínico-epidemiológico segundo os grupos de pacientes.....	76

4.2.3	Caracterização dos pacientes com LTA .....	80
4.2.4	Caracterização dos pacientes do grupo NLTA conforme etiologia.....	84
4.2.5	Caracterização dos pacientes do grupo NDef.....	86
4.2.6	Padronização clínica da técnica do Teste Intradérmico de Montenegro entre pacientes com ou sem LTA .....	87
4.2.7	A IDRm e aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes .....	92
4.2.8	A IDRm e o diagnóstico parasitológico de LTA .....	114
4.2.9	Validação estatística da IDRm.....	114
4.2.10	Interpretação da IDRm no grupo NDef.....	116
4.2.11	A PCR no sangue periférico e em tecido.....	117
4.2.12	Caracterização dos pacientes submetidos à biópsia com realização da PCR .	120
4.2.13	Validação estatística da PCR.....	125
4.2.14	PCR em pacientes sem diagnóstico etiológico de LTA .....	127
4.2.15	Interpretação da PCR nos pacientes do grupo NDef.....	129
4.2.16	IDRM e PCR: co-positividade e co-negatividade, avaliação do uso em serie e em paralelo .....	132
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
6	CONCLUSÕES.....	138
7	Referências Bibliográficas.....	140
8	ANEXOS .....	153
8.1	ANEXO I- Parecer da comissão de ética- estudo I.....	153
8.2	ANEXO II- Rotina Clínica Dos Pacientes Atendidos No Crleish .....	153
8.3	ANEXO III- Antígeno Utilizado .....	153
8.4	ANEXO IV- Ficha de aplicação da IDRm .....	153
8.5	ANEXO V: Folder Sobre A Idrm Para Os Pacientes.....	153
8.6	ANEXO VI: Ficha para leitura da IDRm.....	153
8.7	ANEXO VII- artigo publicado - Acta Tropica.....	153
8.8	ANEXO VIII- Artigo submetido - Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.....	153
8.9	ANEXO IX- Artigo submetido - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz ...	153
8.10	ANEXO X - Protocolo Padronizado De Aplicação E Leitura Da IDRm .....	153

## 1 INTRODUÇÃO

O Teste de Montenegro é utilizado desde a década de 20, sendo considerado extremamente sensível e específico, segundo os padrões de então, para o diagnóstico da leishmaniose (MONTENEGRO, 1926; SALLES- GOMES, 1939; LOPES e LAENDER, 1945). A facilidade de execução, a alta sensibilidade e o baixo custo, fizeram com que seu uso fosse amplamente difundido. Assim, esse teste, também chamado de Reação Intradérmica de Montenegro ou Intradermorreação de Montenegro (IDRM), se estabeleceu como principal exame de rotina, no Brasil e no mundo (WHO, 1990; MARZOCHI, 1992; BRASIL., 2000a; GONTIJO e CARVALHO MD MDE, 2003). Pode-se dizer que, até o aparecimento dos métodos de detecção molecular, nenhum teste complementar era tão sensível para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar quanto a IDRM, a qual, contudo, persiste como o mais prático. Além disso, sendo um teste de natureza alérgica e de uso "in vivo", requer que sua produção seja cuidadosamente padronizada e controlada, bem como seus eventuais efeitos adversos devidamente conhecidos nos indivíduos testados. Porém, desconhecem-se ainda os determinantes antigênicos responsáveis pela reação de hipersensibilidade tardia revelada pelo teste, e está longe a padronização de um antígeno purificado, ou semi-purificado, à semelhança do antígeno protéico purificado (PPD) para o diagnóstico da tuberculose.

A IDRM é alvo da ação da Vigilância Sanitária (VISA) nas suas diversas etapas de produção e aplicação, considerando que a ação da VISA compreende, em seu sentido mais abrangente, *“um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”* (Lei 8080). Análise da literatura científica e das normas oficiais para produção, aplicação e interpretação da IDRM mostra que muitos estudos ainda necessitam ser realizados.

Esta pesquisa visa a acrescentar informações capazes de ampliar o entendimento do Teste de Montenegro e melhorar sua interpretação. Desde 1994, as equipes do Centro de Referência para Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (CRLeish-IPEC-FIOCRUZ) e de Biomanguinhos vêm se dedicando a repadronizar o antígeno de Montenegro quanto a seus componentes inespecíficos e

determinantes antigênicos e a estudar a especificidade e o valor do teste para diagnóstico e inquéritos epidemiológicos.

Essa linha de investigação é decorrente do encontro de uma alta taxa de positividade (52,4%) ao antígeno de Montenegro preservado com timerosal (*sin.* tiomersal ou mertiolate) no Rio de Janeiro, em indivíduos saudáveis, sem história de doença anterior. A seguir, em estudo de fase I de vacina anti-LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana), no mesmo município, verificou-se a positividade do teste de Montenegro em indivíduos que receberam apenas o veículo mertiolatado como controle. Algumas hipóteses, como reatividade cruzada com outros antígenos parasitários e reação alérgica ao timerosal contido na salina utilizada como placebo, foram aventadas para explicar tais resultados (MARZOCHI, MARZOCHI et al., 1998)

Após os inquéritos no Rio de Janeiro, testes intradérmicos utilizando antígeno de Montenegro mertiolatado e salina com timerosal a 1:10000 como controle foram realizados em diferentes locais do País. O inquérito realizado em Manaus, em 187 militares do sexo masculino (164 indivíduos sadios, 18 ex-pacientes de leishmaniose tegumentar e cinco indivíduos com lesões ativas da doença) mostrou a prevalência de cerca de 86% de positividade ao teste. Dentre os positivos à IDRM, 51% apresentaram positividade concomitante ao teste-controle com salina mertiolatada. Neste estudo, foi identificado o primeiro caso de reação cutânea imediata e generalizada à IDRM, provavelmente pelo timerosal, presente como preservativo do antígeno (FAGUNDES, MARZOCHI et al., 2003).

Outro inquérito realizado pelos mesmos pesquisadores em população civil, incluindo 75 indivíduos assintomáticos, 41 ex-pacientes de leishmaniose tegumentar e cinco indivíduos com lesões sugestivas de leishmaniose (negativos ao diagnóstico parasitológico), na área endêmica de Barra do Gravatá (município de Araçuaí, Minas Gerais), revelou 21% de positividade concomitante à IDRM e ao teste controle com salina mertiolatada (dados não publicados).

Diante dos resultados em áreas endêmicas, e admitindo a participação do caráter alergênico do timerosal, foi realizado um estudo piloto em área não endêmica (Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul), visando a uma avaliação preliminar da alergia à salina mertiolatada e, paralelamente, testar a utilização da salina fenolada a 0,4% como veículo da IDRM. Foram testados 46 indivíduos, de ambos os sexos,

funcionários de serviços de Saúde municipais. A positividade concomitante à IDRMM e ao teste com salina mertiolatada foi de 13%. No entanto, 39% dos indivíduos submetidos concomitantemente aos antígenos de Montenegro mertiolatado e fenolado, foram positivos a ambos os testes. Estes resultados reforçaram a nossa proposição de uma avaliação em larga escala dos antígenos mertiolatado e fenolado e levaram à busca de evidências de infecção subclínica em voluntários residentes em áreas consideradas não endêmicas de leishmanioses.

Os trabalhos acerca da uniformização do teste de Montenegro tiveram seu foco na padronização do antígeno em relação à sua concentração e, apenas recentemente, ao preservante utilizado (ROTBERG, 1952; MELO, MAYRINK et al., 1977; WEIGLE, VALDERRAMA et al., 1991; DA COSTA, DE TOLEDO et al., 1996; ARANA, ROCA et al., 1999; SILVA, 1999). Mas, considerando a complexidade do teste, não facilmente percebida atrás de sua aparente simplicidade técnica, para considerá-lo padronizado deveríamos ter controle sobre as diferentes etapas de sua realização: composição do produto, metodologia de produção, estabelecimento dos protocolos de aplicação e leitura da reação, definição de indicações precisas para a sua realização e critérios de interpretação dos seus resultados. Em vários dos aspectos citados as informações existentes são incompletas ou, quando existentes, não podem ser aplicadas à situação das leishmanioses no Brasil. Além disso, são inexistentes na literatura estudos controlados acerca de efeitos adversos ao teste de Montenegro considerando sua invasividade e seu potencial de provocar reações adversas.

A comparação entre os resultados da IDRMM e dos exames parasitológicos recentemente desenvolvidos permite orientar a indicação clínica sobre um teste diagnóstico preferencial, como também a obtenção de informações clínicas importantes para os estudos sobre mecanismos imunológicos associados às leishmanioses, sua cura ou complicações. Neste sentido, os resultados apresentados na literatura, bem como os achados de nosso grupo, mostraram ser fundamental a avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em paralelo à IDRMM, em diferentes grupos de pacientes e voluntários. Ainda que, por sua complexidade, dificilmente a PCR poderá estar rotineiramente acessível fora de laboratórios de referência ou do nível terciário de atendimento, é fundamental a padronização e

otimização desta técnica considerando sua potencial utilidade em casos clínicos não esclarecidos por outros métodos, já que é o mais sensível disponível atualmente. Além disso, ao lado da IDRM, a PCR é o instrumento de escolha para estudo de infecção subclínica na LTA, uma vez que a resposta humoral não é reveladora em indivíduos assintomáticos.

Desde o desenvolvimento da IDRM, na segunda década do século passado, muita coisa mudou em relação à epidemiologia das leishmanioses, às outras ferramentas diagnósticas disponíveis para a doença e às exigências regulatórias para produtos e serviços de saúde. No entanto, vale ressaltar que o teste de Montenegro é, basicamente, o mesmo desde seu desenvolvimento há mais de 85 anos, bem como sua interpretação tem sido realizada considerando-se padrões epidemiológicos clássicos, o que pode continuar correto. Contudo, a revisão da literatura pertinente mostra que é necessário não apenas padronizá-lo segundo conceitos presentes de controle de qualidade em saúde, mas também situar a IDRM no contexto atual das leishmanioses, o qual inclui a urbanização da doença e a sobreposição de áreas endêmicas de leishmanioses com outras infecções, entre outros aspectos. Destacamos, no entanto, que alguns fatores permanecem inalterados no tempo em relação à doença, principalmente sua associação a populações pobres e de países não desenvolvidos e as dificuldades para o diagnóstico etiológico e o tratamento. Tais fatores tornam ainda mais relevante o estudo do teste, o mais utilizado e largamente aceito em diferentes países, como ferramenta diagnóstica para a LTA.

Com a presente pesquisa, pretende-se acrescentar informações capazes de contribuir para algumas mudanças necessárias na utilização e valorização da IDRM. Sua metodologia incluiu dois estudos (I e II) independentes, porém complementares, baseados nas exigências científicas e regulatórias para a inclusão de um teste diagnóstico no mercado, bem como nas mudanças pelas quais a situação epidemiológica das leishmanioses está passando. Espera-se, assim, que este trabalho ajude na interpretação do teste diagnóstico em questão, à luz do conhecimento científico disponível a respeito, contribuindo para a melhoria do atendimento aos pacientes de leishmanioses, tão complexo em seus diferentes aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais, e, sobretudo, considerando o contexto de demandas em Saúde do nosso país.

## 1.1 Revisão da literatura

### 1.1.1 Considerações gerais

Embora as pesquisas e os investimentos em leishmanioses tenham aumentado significativamente nos últimos anos, o número de casos vem crescendo, e estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de aquisição de leishmanioses no mundo (DESJEUX, 2001; GOLDRICK, 2004; ALVAR, YACTAYO et al., 2006; SHAW, 2007). De acordo com o Ministério da Saúde, no período de 2001 a 2006 foram confirmados 182.091 casos de Leishmaniose tegumentar, distribuídos nos 27 estados brasileiros, e 4.333 casos de leishmaniose visceral, distribuídos por 24 estados (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>).

Além disso, em áreas endêmicas, sobretudo, sabe-se que, além dos doentes contabilizados, existem os infectados pela *Leishmania* que não, necessariamente, manifestarão a doença, mas poderão desenvolver uma resposta imunológica específica ao parasito, traduzida, principalmente, por positividade a testes específicos de hipersensibilidade retardada (GUERRA, FURTADO et al., 1985; SOLBACH e LASKAY, 2000; DE ALMEIDA, VILHENA et al., 2003; RIVAS, MORENO et al., 2004; VANLOUBBEECK e JONES, 2004). Assim, a IDR, que é o teste mais utilizado para o diagnóstico rotineiro nos pacientes suspeitos de LTA no Brasil e no mundo, também o é para inquéritos epidemiológicos, pelas mesmas razões: alta sensibilidade, facilidade de aplicação e baixo custo. Essa dupla indicação, porém, representa ao mesmo tempo vantagem e desvantagem - por não distinguir isoladamente doença de infecção. Além disso, pode permanecer positiva após a cura clínica.

O teste consiste na inoculação, por via intradérmica, de 0,1 mL de antígeno de *Leishmania* (leishmanina), normalmente na face anterior do antebraço do indivíduo a ser examinado. A reação é considerada positiva se, na leitura feita 48 horas após a aplicação, detectar-se endurecimento no local com mais de 5 milímetros de diâmetro.

Normalmente, a IDR é lida 48 horas após a aplicação, através da medida da área endurecida no local da aplicação, similarmente à leitura do teste tuberculínico. Essa leitura exige, portanto, o contato aplicador-paciente, seja em se tratando de paciente hospitalar ou de visitas domiciliares nos inquéritos epidemiológicos de

campo, não ficando registro comprobatório do tamanho da endureção formada ou sua ausência, exceto a anotação do resultado da leitura.

BEARMAN, KLEINMAN et al (1964) apud SOKAL (1975) mostraram a grande variabilidade entre observadores existente quando o teste tuberculínico é lido diretamente no braço do paciente, por palpação. Baseado nos estudos de Bearman, SOKAL (1975) propôs a metodologia de demarcação da área endurecida com caneta esferográfica, sugerindo assim poderia ser realizada por qualquer profissional treinado, reduzindo a variação entre observadores. Essa metodologia foi logo incorporada à IDRM sem que fossem realizados, no entanto, estudos comparativos entre as medidas efetuadas pelas duas metodologias (palpação e demarcação por caneta esferográfica). Na prática, ainda hoje, a leitura deste teste costuma ser feita pela medida direta na pele do tamanho da endureção, após 48 a 72 horas de sua aplicação.

Posteriormente, passou-se a documentar a reação por meio da aposição do papel umedecido em álcool sobre o contorno da endureção desenhado com caneta esferográfica, no braço do paciente, produzindo assim um decalque do local da aplicação do teste. Esse papel decalcado funciona como registro permanente do resultado da IDRM, e o decalque do contorno da endureção pode também ser medido. Embora, normalmente, se refira ao método de Sokal como aquele que envolve a demarcação e decalque da área endurecida obtida à IDRM, o método original não propunha o decalque em papel do resultado nem a medida deste no próprio papel.

A IDRM é considerada de alto valor como indicador de infecção por *Leishmania*, com sensibilidade de 86,4 a 100% e, quando associada à presença de lesão tegumentar suspeita, constitui o principal exame confirmatório indicado para uso na rede de saúde, já que (a): a pouca quantidade de parasitos nas lesões dificulta o diagnóstico de certeza e (b): os exames parasitológicos e de detecção molecular da *Leishmania* ainda têm utilização restrita pelo alto custo e complexidade técnica (MARZOCHI, 1992; BRASIL., 2000b; GONTIJO e CARVALHO MD MDE, 2003; BRASIL., 2006) . Por outro lado, o Teste de Montenegro, descrito e utilizado desde 1926, ainda apresenta vários pontos a serem esclarecidos, particularmente os determinantes antigênicos responsáveis por sua capacidade de indução imunológica e os fatores inespecíficos intervenientes nesse resultado. Ainda assim, vários estudos



continuam apontando a utilidade da IDRM no diagnóstico das leishmanioses (CUBA CUBA, MARSDEN et al., 1980; FURTADO, 1980; OLIVEIRA-NETO, PIRMEZ et al., 1988; SESSA, FALQUETO et al., 1991) e em estudos epidemiológicos (WEIGLE, ESCOBAR et al., 1993; PASSOS, BARRETO et al., 2000; FOLLADOR, ARAUJO et al., 2002; ANDRADE, BRITO et al., 2005; BEN SALAH, LOUZIR et al., 2005; FELICIANGELI, DELGADO et al., 2005; MANZUR e BARI, 2006) .

### **1.1.2 A Resposta à IDRM na Clínica**

A LTA pode cursar com uma grande variedade de formas clínicas e a resposta à IDRM apresenta algumas peculiaridades relacionadas a elas, aspectos revisados de forma bastante abrangente por Marsden (MARSDEN, 1985) e Marzochi (MARZOCHI, 1992; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994). Os pacientes da forma cutânea clássica normalmente apresentam resposta positiva, iniciando cerca de 40 dias após a infecção e permanecendo mesmo após o tratamento. Por outro lado, pacientes da forma difusa da LTA apresentam teste de Montenegro negativo.

Já na década de 40, Pessoa e Pestana demonstraram a associação entre intensidade da IDRM, tempo de doença e presença de lesões mucosas, bem como a permanência da positividade da reação em indivíduos curados (PESSOA e PESTANA, 1940). Tais autores concluíram também que a alergia aos antígenos de *Leishmania* deveria permanecer por toda a vida do indivíduo. Desde então, a IDRM tem sido também utilizada como ferramenta importante no diagnóstico retrospectivo das leishmanioses. No entanto, em indivíduos com história pregressa de LTA, uma IDRM positiva poderá não ter valor diagnóstico caso o paciente apresente nova úlcera sugestiva na pele.

A multiplicidade de manifestações clínicas na leishmaniose tegumentar exige que o clínico esteja atento para o diagnóstico diferencial com uma série de outras nosologias, como úlceras vasculares, lesões de etiologia bacteriana, micótica, tuberculosa, por hanseníase, neoplásicas e auto-imunes. No Rio de Janeiro, atualmente, o principal diagnóstico diferencial é a esporotricose, que, desde 1998, vem ocorrendo de forma epidêmica- endêmica, muitas vezes em áreas superpostas às de leishmanioses (DE LIMA BARROS, SCHUBACH et al., 2001; BARROS, SCHUBACH ADE et al., 2004; DE LIMA BARROS, SCHUBACH et al., 2005). No entanto, os estudos acerca da especificidade do teste foram realizados principalmente

nos anos 40, e consistiram na avaliação da resposta entre portadores de “boubá” (LOPES e LAENDER, 1945), blastomicose (Almeida & Lacaz, 1941 *apud* Furtado, 1980), pênfigo (CAMPOS, 1943) , hanseníase (Arantes, 1941 *apud* Furtado, 1980), tuberculose (ROTBERG, 1952) , todos esses com resposta 100% negativa. Na tuberculose, Correa (1941) encontrou respostas negativas nos 65 casos de forma pulmonar examinados, e positivas nos 12 pacientes de forma ganglionar testados; estes resultados, porém, não foram reproduzidos depois.

Daí então passou-se a considerar a IDRMM como 100% específica para o diagnóstico da LTA. Destaca-se, no entanto, a verificação recente, em estudo realizado no IPEC, de pacientes com esporotricose e IDRMM positiva, sem registro prévio na literatura de reatividade cruzada entre *Leishmania sp.* e *Sporothrix schenckii* e sem ocorrência de co-infecção clínica com LTA (DE LIMA BARROS, SCHUBACH et al., 2005).

Atualmente, várias questões devem ser retomadas ou consideradas acerca da utilização e interpretação da IDRMM em diferentes situações clínicas. Os estudos sobre a capacidade sensibilizante do teste têm mostrado resultados discordantes e, aparentemente, essa capacidade dependeria dos antígenos utilizados e do intervalo de aplicação entre esses testes (WEIGLE, VALDERRAMA et al., 1991; NASCIMENTO, ALCANTARA-NEVES et al., 1993; JOSE, DA SILVA et al., 2001; SATTI, EL HASSAN et al., 2002; DE LUCA, MAYRINK et al., 2003). Até mesmo há que se considerar o prazo de leitura da resposta intradérmica. Embora seja, classicamente, preconizada a leitura da reação após 48 horas da aplicação do teste, Rabello et al (1945) relataram, em casos suspeitos de LTA, mas negativos à leitura da IDRMM após 48 horas, o aparecimento de reação local no ponto de inoculação do antígeno de Montenegro cerca de dez dias após a aplicação (“reações tardias”), e que tais reações foram morfológicamente indiferenciáveis da resposta positiva à IDRMM em 48 horas.

Da mesma forma, dificilmente encontramos estudos focalizando o caráter específico da resposta imunológica de determinadas populações (crianças, idosos, gestantes ou sob outras condições) e, apesar da importância crescente da co-infecção *Leishmania*- HIV, ainda não existe um consenso sobre o comportamento do referido teste em indivíduos com AIDS suspeitos de co-morbidade por LTA ou co-infectados

por *Leishmania* (sem apresentação clinicamente manifesta), nem sobre a resposta à IDRМ em pacientes de LТА portadores de outras co-morbidades infecciosas ou não. A avaliação ou reavaliação desse aspecto é particularmente importante considerando que a clientela de nossas Unidades de Saúde pode, com alguma frequência, apresentar associadamente doenças crônico-degenerativas como diabetes, hipertensão, doenças auto-imunes, câncer etc, ou outros processos infecciosos endêmicos, principalmente de curso crônico ou sub-agudo como HTLV, doença de Chagas, tuberculose, hanseníase, diferentes micoses, sífilis e outros. São essas co-morbidades que podem, aliás, representar fatores importantes de piora de prognóstico, particularmente quanto a problemas com a terapêutica da leishmaniose tegumentar.

Por outro lado, a frequência de indivíduos respondedores ao teste de Montenegro sem antecedentes ou presença de leishmanioses, tanto em áreas de doença visceral quanto de tegumentar, varia nas diferentes populações estudadas, desde valores baixos como 5 a 8% até cerca de 70% (ASTON e THORLEY, 1970; GUERRA, FURTADO et al., 1985; SOUZA, SABROZA et al., 1992; ARBAJI, GRADONI et al., 1993; MARTY, LELIEVRE et al., 1994; COIMBRA JUNIOR, SANTOS et al., 1996) .

Contudo, não se pode dizer se essas taxas diferenciadas equivaleriam a graus ou níveis de endemicidade (presença atual ou anterior de doentes) sem a realização de estudos clínico-epidemiológicos complexos, envolvendo a comparação entre diferentes padrões imunológicos locais de resposta à IDRМ com e sem manifestação clínica de leishmaniose.

No entanto, deve ser considerado que indivíduos sadios, com IDRМ positiva, de áreas endêmicas, tenham sido infectados e desenvolvido imunidade específica com ou sem expressão clínica; estes últimos, porém, permanecendo também com infecção subclínica. Esta possibilidade explica a ocorrência de isolamento de *Leishmania* em cicatrizes de leishmaniose tratada, bem como a recidiva da doença associada a traumas nas cicatrizes. Espera-se também que indivíduos vacinados contra *Leishmania* possam apresentar IDRМ positiva e não desenvolver doença (MAYRINK, WILLIAMS et al., 1985; CASTES, BLACKWELL et al., 1994; ARMIJOS,

WEIGEL et al., 1998; DE LUCA, MAYRINK et al., 1999; DE LUCA, MAYRINK et al., 2001).

Contudo, pode ocorrer outra questão, qual seja, a interpretação da positividade à IDRМ em indivíduos com história pregressa de leishmaniose e que apresentam nova úlcera cutânea sugestiva, ou desenvolvam lesão mucosa. Embora considere-se que a resposta à IDRМ possa permanecer positiva por toda a vida do indivíduo, estudos prospectivos mostraram que, cerca de 5 anos após o teste inicial, pode ocorrer negatização da IDRМ em torno de 50% dos indivíduos inicialmente positivos, conforme demonstrado por Mayrink et al (1976) e Marzochi et al (1980).

E ainda, podemos questionar sobre qual seria a intensidade da resposta esperada ao teste diante de: casos de (a) evolução da forma cutânea para a forma mucosa, (b) reativação clínica, (c) desenvolvimento de LTA em indivíduos imunossuprimidos; bem como sobre (e) a valorização da IDRМ nesses casos e (f) se a resposta positiva à IDRМ indicaria melhor prognóstico.

Admitimos também que deva ser mais bem estudada a validade do teste entre pacientes com lesões suspeitas de LTA residentes em áreas endêmicas e naqueles que nelas se infectaram sem que ali residam, ou seja, definir qual a probabilidade do teste ser previamente positivo ou negativo entre casos suspeitos de LTA residentes em áreas endêmicas ou visitantes casuais destes locais. E, em função disso, a eventual diferença de interpretação da positividade da IDRМ em pacientes suspeitos de LTA procedentes de área endêmica e não endêmica.

### **1.1.3 O Antígeno para IDRМ**

A resposta a várias das questões consideradas anteriormente é dificultada, entre outros aspectos, pela inexistência de um antígeno padrão para o teste de Montenegro e, também, por diferenças nos métodos de leitura e de realização do mesmo.

A idéia de que a IDRМ era gênero-específica levou os pesquisadores à utilização de antígenos de diferentes espécies e cepas do parasito (IMPERATO e DIAKITE, 1969; FURTADO, 1980; BADARO, PEDRAL-SAMPAIO et al., 1990; ALIMOHAMMADIAN, KIVANJAH et al., 1993; ABRAMSON, DIETZE et al., 1995; AKUFFO, DARCE et al., 1995; DA COSTA, DE TOLEDO et al., 1996; AGWALE, DUHLINSKA et al., 1998; ARANA, ROCA et al., 1999) . Os tipos de antígeno e os

processos de produção também foram modificados ao longo do tempo (SALLES-GOMES, 1939; ROTBERG, 1952; SHAW e LAINSON, 1975; MELO, MAYRINK et al., 1977). No Brasil, na década de 50, foi proposta a produção da leishmanina por sonicação (CORRÊA e AMATO NETO, 1958) e essa técnica vem sendo utilizada, com algumas modificações, até os dias atuais. Por essa mesma época, alguns outros estudos realizados no Brasil, na tentativa de padronização do teste, resultaram na descoberta da relação entre a potência do reativo e a concentração antigênica do mesmo (ROTBERG, 1952), com uma decorrente padronização da concentração em 40 microgramas de antígeno protéico/mL da solução antigênica (MELO, MAYRINK et al., 1977), que é utilizada na grande maioria dos reativos produzidos desde então. Apesar da relativa homogeneização deste parâmetro, os antígenos utilizados são, em geral, diferentes entre si.

Os antígenos mais utilizados atualmente constituem extratos semiparticulados de diferentes espécies de *Leishmania*, diluídos em solução salina contendo timerosal a 1:10000 ou fenol a 0,4%, como preservantes, e acondicionados em frascos multidose (de 10 a 50 doses de 0,1 mL/ frasco). O uso de frascos multidose faz com que não possamos utilizar de rotina antígenos sem preservativos, sob risco de contaminação da suspensão antigênica.

No Brasil, a FIOCRUZ, a partir de 1992, produziu e distribuiu para a Rede Pública de Saúde, antígeno de Montenegro, cepa referência PH8 (IFLA/BR/1967/PH8) de *Leishmania amazonensis*, obtido por sonicação, com 40 microgramas de antígeno proteico/ mL, preservado inicialmente com timerosal a 1:10.000 e, posteriormente (após os resultados iniciais do Estudo I desta pesquisa), com fenol a 0,4%. A produção, entretanto, foi interrompida mais recentemente. Outros produtores de antígeno de *Leishmania* no Brasil são: a Universidade Federal de Minas Gerais, contendo timerosal, e o Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI) do Paraná, o qual recentemente passou a fornecer antígeno para a Rede Pública, produzido também com a cepa PH8 e tendo o fenol como preservante. No exterior, o Instituto de Saúde de Roma produz leishmanina com promastigotas de *Leishmania major*, preservadas com fenol. O Instituto Pasteur do Irã produz um antígeno (cepa de *Leishmania major*) que a Organização Mundial de Saúde

tentou padronizar como referência, o qual, em avaliação comparativa realizada no Brasil, não apresentou bons resultados (ABRAMSON, DIETZE et al., 1995) .

#### **1.1.4 Os preservantes utilizados na composição do antígeno para IDRM**

A partir da década de 70, o uso do fenol como preservante foi parcialmente abolido após as observações, por Imperato e Diakite (1969), da ocorrência de cerca de 5% de reações locais (enduração/ eritema) à salina fenolada em indivíduos testados concomitantemente com antígeno de Montenegro fenolado e salina fenolada controle. Outros estudos (IMPERATO, FOFANA et al., 1974) , utilizando o antígeno com timerosal, mostraram a ausência dessas reações ao veículo isolado, recomendando a utilização dos antígenos mertiolatados.

Contudo, os efeitos sensibilizantes e alergênicos do timerosal começaram a ser referidos na mesma década de 70 (MIZUTANI, 1973; HANSSON e MOLLER, 1974; MACKENZIE e VLAHCEVIC, 1974) e, em 1975, o timerosal estaria entre os alérgenos considerados mais freqüentes na América do Norte (EDITORIAL, 1975) . Forstrom et al (1980) realizaram testes epicutâneos e intradérmicos com timerosal a 1:1000 e encontraram positividade, com reação local no ponto de inoculação intradérmica do timerosal, três vezes maior entre militares saudáveis do que entre pacientes com eczema; sugeriram a possível sensibilização ao timerosal por vacinação recebida previamente e a substituição deste preservativo nas vacinas em uso. MARZOCHI et al (1998), em estudo duplo-cego para avaliação de vacina anti-*Leishmania* preservada com timerosal, demonstraram que 8 de 12 (66,6%) voluntários militares sadios que receberam apenas o placebo representado pelo timerosal a 1:10000, apresentaram teste intradérmico positivo quando testados com antígeno de Montenegro mertiolatado, embora não apresentassem história de exposição natural ou vacinal à *Leishmania*.

Pesquisas posteriores demonstraram que o timerosal é capaz de induzir hipersensibilidade tardia do tipo IV (LEBREC, BACHOT et al., 1999; WESTPHAL, SCHNUCH et al., 2000; BAUER, GEIER et al., 2002) e que indivíduos submetidos a teste intradérmico com salina preservada com timerosal a 1:10000 podem apresentar reação cutânea local morfológicamente idêntica ao teste de Montenegro positivo com antígeno mertiolatado (MARZOCHI, MARZOCHI et al., 1998; SILVA, 1999) . Tais achados sugeriram que a resposta ao timerosal contido no antígeno de Montenegro

(e talvez como preservativo de outros antígenos intradérmicos) possa atuar como fator de confusão na interpretação da resposta ao Teste de Montenegro (Silva, 1999), não tendo sido possível discriminar, num indivíduo com hipersensibilidade tardia ao timerosal, se a resposta de hipersensibilidade apresentada foi devida ao antígeno ou ao veículo utilizado.

A frequência de hipersensibilidade tardia ao timerosal, de acordo com diferentes relatos e áreas estudadas, tem variado entre 1% e 25% (COX e FORSYTH, 1988; SEIDENARI, MANZINI et al., 1989; SEAL, FICKER et al., 1991). Aparentemente, militares jovens e profissionais de saúde apresentam uma prevalência maior de hipersensibilidade que a população em geral (FORSTROM, HANNUKSELA et al., 1980; SEIDENARI, MANZINI et al., 1989).

Devido ao aparecimento de reações ao timerosal em vacinas e outros reativos diagnósticos, bem como à presença de mercúrio na composição desta substância, a Associação Americana de Pediatria e o Centro Americano de Controle de Doenças estabeleceram como meta a eliminação do timerosal das vacinas para uso em crianças existentes no mercado americano, a partir de 1999. No entanto, diferentes vacinas utilizadas atualmente ainda contêm timerosal, como diversas vacinas anti tetânicas comercializadas e a vacina contra gripe, recentemente introduzida na população brasileira de idosos (<http://www.fda.gov/cber/vaccine/thimerosal.htm#t2>).

### **1.1.5 A IDRM e as ações de Vigilância Sanitária**

O Decreto nº. 79094, de 05 de janeiro de 1977 (Presidência da República) vem regulamentar a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Essa regulamentação abrange não só a etapa de fabricação dos referidos produtos, mas ainda as etapas de embalagem, importação e exportação e armazenamento dos mesmos (Art. 1º). Além disso, o Artigo 7º prevê que, "... Quando verificado que determinado produto, até então considerado útil, é nocivo à saúde ou não preenche os requisitos estabelecidos, o órgão de vigilância sanitária competente do Ministério da Saúde exigirá a modificação devida na fórmula de composição e nos dizeres dos rótulos, das bulas e embalagens, sob pena de cancelamento do registro e da apreensão do produto em todo o território nacional."

Em suas disposições preliminares, define Medicamento como: "... II - Medicamento - Produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico" e produto Correlato como "IV - Correlato - Substância, produto, aparelho ou acessório não enquadrado nos conceitos anteriores, cujo uso ou aplicação esteja ligado à defesa e proteção da saúde individual ou coletiva, à higiene pessoal ou de ambientes, ou a fins diagnósticos e analíticos, os cosméticos e perfumes, e, ainda, os produtos dietéticos, óticos, de acústica médica, odontológicos e veterinários".

A regulamentação para a produção de antígenos para testes cutâneos encontra-se descrita no Regulamento técnico anexo à RDC 233 da ANVISA (Resolução RDC nº. 233, de 17 de agosto de 2005, disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18266&word=>)

Dos antígenos de Montenegro produzidos no Brasil, dois apresentam registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), instância máxima do sistema VISA no país. Apesar de se tratar de produto biológico, tecnicamente elaborado, injetável e destinado ao diagnóstico, ambos os produtos foram registrados na categoria de Produtos Correlatos para a Saúde, bem como o antígeno para teste tuberculínico (site ANVISA). O registro do antígeno produzido pelo CPPI-PR está publicado na Resolução nº. 1531, de 24 de setembro de 2004 e a FIOCRUZ- RJ obteve a revalidação do registro para a produção do antígeno de Montenegro Leishmaniose BioManguinhos®, através da Resolução Nº 2130, DE 7 DE JULHO DE 2006.

O registro na ANVISA como Medicamento implica o cumprimento de normas de fabricação muito mais abrangentes (RDC210) do que as exigidas para a fabricação e registro de produtos Correlatos (RDC 185). Exigências diferenciadas devem-se, particularmente, às percepções de risco diferentes relacionadas a cada uma das classes de produtos. No entanto, considerando o teste de Montenegro sob diversos aspectos e sua complexidade, verifica-se que existe um risco a ser considerado associado à produção e aplicação desse produto, que justificaria seu enquadramento como Medicamento e não como produto Correlato.

A área de abrangência da VISA inclui ainda a "normalização e controle de serviços direta ou indiretamente relacionados com a saúde, prestados direta ou indiretamente, pelo Estado e pelo setor privado..." (Costa, E.A, 2000). Curiosamente,



não encontramos documentação abrangendo normas para a correta aplicação e interpretação de testes intradérmicos. E a RDC 302, que regulamenta o funcionamento de laboratórios clínicos, também não inclui capítulo ou tópico a respeito. Considerando a importância da instrumentalização legal para a ação da VISA, fica evidente que os sujeitos (pacientes e profissionais da saúde) encontram-se desprotegidos quanto aos seus direitos e obrigações.

Em relação ao conceito de Risco e às diferentes percepções do mesmo por pacientes e profissionais de saúde, poucos estudos são feitos relativos à análise do paciente e do profissional envolvido na aplicação do teste intradérmico, quer para alergia imediata ou tardia. Riscos associados à aplicação de testes intradérmicos incluem desde reação atípica localizada no ponto de aplicação (vesículas) a problemas de contaminação do produto aplicado levando a infecções locais e febre (pela presença de pirogênios e bactérias), manifestação alérgica inespecífica a diferentes produtos do teste, podendo levar a reação sistêmica imediata (Fagundes et al, 2003) e mesmo reações fatais (LOCKEY, BENEDICT et al., 1987; LOCKEY, TURKELTAUB et al., 1988).

A avaliação de produtos e serviços para a saúde pode ser realizada pela análise de uma série de atributos do mesmo, conforme o modelo proposto por Donabedian em 1990 (apud (ROZENFELD, 2000): eficácia, efetividade, eficiência, otimização, aceitabilidade, legitimidade e equidade. Particularmente, em relação à aceitabilidade da IDRМ pelo paciente, muito pouco foi feito. TARNOW e KING (2004) avaliaram a percepção de conforto pelo paciente que recebe um teste intradérmico e pelo profissional que o aplica em relação a melhor posição da agulha para a aplicação do teste. No entanto, os autores não utilizaram antígenos padrão e sim aplicaram injeções intradérmicas de solução salina estéril.

Considerando as características da IDRМ que, diferentemente de outros exames complementares para a leishmaniose, exige a participação ativa do paciente para a correta aplicação e interpretação do teste quanto a comparecimento no dia da leitura e não manipulação do local da aplicação, p. ex, faz-se necessário a inclusão de pesquisa qualitativa e social para a melhor avaliação dos atributos considerados citados. Esta pesquisa, incluindo a análise de como o paciente percebe o risco associado ao teste, pode trazer informações para uma abordagem mais criteriosa e

segura do paciente e para a identificação de conceitos a serem divulgados por meio de práticas de educação e informação em Saúde, melhor qualificando o atendimento nas Unidades de Saúde.

### **1.1.6 A IDRM e os exames de diagnóstico etiológico**

Quando um paciente procura uma unidade de saúde com lesão sugestiva de leishmaniose, comumente a IDRM é o primeiro exame complementar a ser solicitado. E, na maioria das áreas endêmicas do Brasil, se esse paciente apresentar uma IDRM positiva, será notificado e ali tratado ou referenciado para o tratamento como LTA. Ou seja, embora sendo um exame de natureza imunológica, vem sendo utilizado em substituição ao diagnóstico etiológico, diagnóstico “de certeza” da infecção.

O diagnóstico etiológico da LTA é realizado através de exames parasitológicos, a partir de material obtido por biópsia ou escarificação da lesão ou de lesões que o paciente apresenta. Os exames mais utilizados, a partir dos fragmentos de biópsia, são: o exame direto, para a visualização de leishmanias, o cultivo *in vitro* e a avaliação histopatológica.

Vários fatores contribuem para que o diagnóstico etiológico não esteja disponível a muitas unidades de saúde da Rede de Assistência, incluindo a necessidade de experiência dos profissionais envolvidos no diagnóstico, já que a realização de biópsias é procedimento invasivo, que requer ambiente hospitalar e profissional médico para sua realização. Além disso, a visualização direta, o cultivo do parasito e a análise histopatológica dos materiais obtidos demandam tempo, estrutura laboratorial complexa e diversos tipos de profissionais treinados para obtenção do diagnóstico etiológico. Essa indisponibilidade do diagnóstico etiológico faz com que o paciente venha a ser tratado somente com o resultado da IDRM ou às vezes somente por critério clínico.

Na prática assistencial, a IDRM positiva em um paciente com suspeita clínica de LTA pode ser facilmente interpretada como resposta imune específica a antígenos do parasito. No entanto, o sucesso do diagnóstico de certeza depende de diferentes fatores como a espécie de *Leishmania* causadora da doença, a forma clínica, o tempo de evolução da lesão e outras variáveis. Além disso, os procedimentos de diagnóstico não são automatizáveis e, conseqüentemente, são de difícil padronização e descentralização.

Dessa forma, a sensibilidade do diagnóstico etiológico varia enormemente, sendo assim freqüente a ocorrência de pacientes com clínica sugestiva de LTA, IDRM positiva e diagnóstico etiológico negativo ou inconclusivo (HENDRICKS e WRIGHT, 1979; SALINAS, VALDERRAMA et al., 1989; BAHAMDAN, KHAN et al., 1996; ROMERO, SAMPAIO et al., 1999; RAMIREZ, AGUDELO et al., 2000). Nestes casos, impõe-se a avaliação do diagnóstico com novas ferramentas para determinação etiológica, de mais fácil padronização e semi-automatização ou automatização.

Vários estudos têm mostrado o valor de técnicas moleculares para diagnóstico etiológico (RODGERS, POPPER et al., 1990; DEGRAVE, FERNANDES et al., 1994; ASHFORD, BOZZA et al., 1995; WILSON, 1995; BELLI, RODRIGUEZ et al., 1998; SCHUBACH, HADDAD et al., 1998a; PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999), assim como para avaliação prognóstica e terapêutica das leishmanioses (OSMAN, KAGER et al., 1997; LACHAUD, DEREURE et al., 2000; CASCIO, CALATTINI et al., 2002) , sendo o encontro do DNA parasitário associado à presença de parasitos viáveis no hospedeiro, os quais, porém, também podem ser encontrados em infecções subclínicas. Considerando tais argumentos, espera-se que a utilização de métodos de detecção molecular de *Leishmania* possa auxiliar na diferenciação entre indivíduos IDRM-positivos que se mantenham parasitados e aqueles que tenham desenvolvido resposta imunológica pós- exposição à *Leishmania* em área endêmica, ou a seus antígenos, por ação vacinal.

Entre as técnicas moleculares, destaca-se a reação em cadeia da polimerase-PCR (polimerase chain reaction), que consiste na amplificação, *in vitro*, de moléculas ou fragmentos moleculares (seqüências) de ácidos nucleicos, mais comumente DNA. Essa reação ocorre em um termociclador, instrumento que incuba os reativos em ciclos programáveis de temperaturas, nos quais as diferentes etapas da reação ocorrem.

Após ser extraído da amostra a ser analisada, o DNA alvo é adicionado aos reagentes específicos e a solução é aquecida a 95° C para que a fita dupla seja desnaturada, separando-se em duas fitas simples. O DNA é desnaturado por cerca de 5 minutos, mas, em alguns tipos de PCR, como o "hot start", a reação precisa ser mantida a 95° C por aproximadamente 15 minutos. A seguir, a reação é resfriada, em torno de 50°C, o que leva a uma renaturação da fita dupla. No entanto, no tubo de

reação, estão presentes seqüências iniciadoras (“primers”) especificamente sintetizadas para reconhecer a seqüência de DNA a ser amplificada e ligar-se a ela. Formam-se então moléculas compostas de uma fita simples do DNA original e um fragmento iniciador, o qual será estendido com a adição de nucleotídeos por uma polimerase termorresistente. Esse ciclo de temperaturas é repetido diversas vezes, levando à amplificação exponencial da seqüência de DNA reconhecida pelo fragmento iniciador. Desse modo, ocorre uma amplificação específica, sendo a especificidade da reação ditada pelo iniciador adicionado (SAIKI, BUGAWAN et al., 1986; LOUIE, LOUIE et al., 2000) . A revelação da reação se dá normalmente por eletroforese do produto amplificado em agarose, de forma a ser visualizada, no gel, a banda correspondente ao produto amplificado, cujo tamanho é definido para cada iniciador utilizado.

Esse esquema geral de reação foi altamente desenvolvido e diversificado, levando a uma grande variedade de sistemas de PCR, de acordo com o DNA a ser amplificado e o tipo de organismo estudado, entre outras variáveis. Diferentes sistemas de PCR são utilizados para diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, sendo alguns já utilizados na rotina diagnóstica hospitalar (LOUIE, LOUIE et al., 2000) . Para as leishmanioses, no entanto, ainda não existe um sistema diagnóstico baseado na PCR em uso na rotina laboratorial, apesar da multiplicidade de primers e sistemas de amplificação existentes (WEISS, 1995; MORGAN, 2000; SCHALLIG e OSKAM, 2002) . A capacidade de detecção desses sistemas também varia bastante, desde 1 fentograma de DNA (SMYTH, GHOSH et al., 1992) até 10 parasitos (PIARROUX, AZAIEZ et al., 1993) .

Mais comumente, o alvo utilizado em experimentos de PCR nas leishmanioses são seqüências do DNA do cinetoplasto (KDNA). O cinetoplasto é uma organela celular característica da ordem *Kinetoplastida*, constituído de uma rede concatenada de moléculas de DNA dividida em dois grupos: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos ocorrem em cerca de 20 a 50 cópias por cinetoplasto (portanto, 20 a 50 cópias / parasito) e são moléculas de DNA circulares bastante homogêneas, com cerca de 20 a 35 kilobases. Estão associados à codificação de proteínas para produção de energia. Os minicírculos, por sua vez, encontram-se em cerca de 10.000 cópias por cinetoplasto, sendo bastante heterogêneos, podendo variar de 0,5 a 1,5 kilobase de

tamanho. Neles estão contidas seqüências associadas à diferenciação de espécies (BREWSTER, ASLETT et al., 1998; BREWSTER e BARKER, 2002).

Os minicírculos são divididos em classes, as quais podem conter seqüências extremamente conservadas entre diferentes grupos taxonômicos dentro dos tripanossomatídeos (WEISS, 1995; YURCHENKO, MERZLYAK et al., 1999; BREWSTER e BARKER, 2002). Um minicírculo de *Leishmania*, por exemplo, possui uma região conservada de cerca de 200 pares de bases (bp), a qual contém três blocos de seqüências altamente conservadas, denominados CSB-1, CSB-2 e CSB-3. Nessa região conservada encontra-se a origem de replicação do minicírculo e, no bloco CSB-3, está uma seqüência, denominada seqüência universal do minicírculo, a qual ocorre em todas as espécies de *Leishmania*. Por outro lado, ainda dentro do gênero *Leishmania*, alguns minicírculos apresentam seqüências espécie-específicas (BRENIERE, TELLERIA et al., 1999; BREWSTER e BARKER, 2002) .

Considerando-se diferentes características das leishmanioses, como a multiplicidade de manifestações clínicas e o grande número de parasitos causadores, foram desenvolvidas técnicas de PCR específicas para cada situação clínico-epidemiológica. Através da utilização da seqüência corretamente escolhida como iniciadora numa PCR, é possível amplificar parasitos pertencentes a qualquer espécie do gênero *Leishmania* (RODGERS, POPPER et al., 1990; BHATTACHARYYA, DAS et al., 1996; PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; DE OLIVEIRA, BAFICA et al., 2003), a espécies dentro de um determinado complexo (DE BRUIJN e BARKER, 1992), ou pertencentes a uma única espécie (ANDRESEN, GAAFAR et al., 1996) .

Iniciadores gênero-específicos foram desenvolvidos por RODGERS et al (1990) e por BHATTACHARYYA et al (1996), na Índia, sendo os primeiros (denominados 13 A e 13 B) os mais utilizados até os dias atuais, inclusive no Brasil (LASKAY, MIKO et al., 1995; SCHUBACH, HADDAD et al., 1998a; PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; COUTINHO, PIRMEZ et al., 2002; DE OLIVEIRA, BAFICA et al., 2003; MENDONCA, DE BRITO et al., 2004b). Eles se ligam à origem de replicação do DNA dos minicírculos, contida em sua região conservada, e originam, após a amplificação, um fragmento de DNA de cerca de 120 pares de bases, para todas as espécies de *Leishmania* testadas.

DE BRUJIN E BARKER (1992) , após sequenciamento de KDNA de diferentes espécies do subgênero *Viannia*, desenvolveram um par de primers que amplifica especificamente DNA de espécies do complexo *braziliensis*, com limiar de detecção de menos de 1 fentograma de KDNA de culturas axênicas. Testando esses primers em material clínico (biópsias) de pacientes sul-americanos (DE BRUJIN, LABRADA et al., 1993) e animais reservatórios, foi demonstrada alta sensibilidade e especificidade do par de primers (chamados B1 e B2), os quais vêm sendo utilizados por diferentes autores (ISAZA, ARBOLEDA et al., 2002; MIMORI, MATSUMOTO et al., 2002; RODRIGUES, FELINTO DE BRITO et al., 2002).

Para o diagnóstico clínico da leishmaniose tegumentar (LT) humana, busca-se amplificar preferencialmente o DNA presente em biópsias das lesões, quer congeladas (ANDRESEN, GAAFAR et al., 1996; PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999), ou emblocadas em parafina. (LASKAY, MIKO et al., 1995). A sensibilidade da PCR pode variar com o modo de acondicionamento das biópsias, o tipo de lesão existente, o parasito causador, o tempo de duração da doença e o primer utilizado. O local da coleta da biópsia também pode influenciar a sensibilidade da PCR, conforme mostrou RAMIREZ et al. (2000) na Colômbia.

LASKAY et al (1995) testaram os primers gênero-específicos 13 A e 13 B em biópsias parafinadas dos seguintes grupos de doentes: 17 pacientes com LT diagnosticados parasitologicamente (*L. aethiopica*), 40 pacientes clinicamente suspeitos, porém sem diagnóstico parasitológico e 18 portadores de outras doenças. Encontraram 100% de sensibilidade nos pacientes diagnosticados parasitologicamente e 31,8% de positividade entre os pacientes com clínica e histopatologia sugestivas, porém sem visualização de parasitos. Nenhuma amplificação foi observada nos controles, sendo o limiar de detecção deste sistema de 1 parasito.

Utilizando os mesmos primers, em protocolo padronizado por DEGRAVE et al (1994), PIRMEZ et al (1999) testaram biópsias congeladas de 216 pacientes de LTA do Rio de Janeiro (184 com lesões cutâneas e 24 com doença mucosa) e de 14 pacientes com outras doenças atendidos no mesmo ambulatório de leishmaniose. A PCR foi comparada ao conjunto padrão de métodos de diagnóstico parasitológico (histopatologia, *imprint* e cultura), correspondendo o controle positivo a 10

fontogramas de DNA de *Leishmania* (*Viannia*). A PCR mostrou-se positiva em 94% dos pacientes de LTA, sendo significativamente maior do que a positividade do conjunto de métodos de diagnóstico parasitológico padrão (62%). Na LTA cutânea, a positividade chegou a 100%. Comparando-se a PCR a cada um daqueles métodos, a sensibilidade da PCR foi ainda significativamente maior. Nenhuma das amostras controles apresentou amplificação. A PCR não foi comparada a parâmetros clínicos dos pacientes como tempo de evolução da lesão, resposta terapêutica e comportamento da IDR, embora 9 dos 14 pacientes com outras doenças tenham apresentado IDR positiva.

ROMERO *et al* (2001) testaram a PCR gênero-específica em 35 pacientes com LTA causada por *L. guyanensis* na Amazônia e encontraram a mesma sensibilidade de 100% obtida na área de *L. braziliensis* por PIRMEZ *et al* (1999). Naquele trabalho, no entanto, o imprint apresentou a mesma sensibilidade da PCR, com mais rapidez e baixo custo. Posteriormente, estudo realizado na Bahia (DE OLIVEIRA, BAFICA *et al.*, 2003), detectou também 100% de sensibilidade da PCR em 50 pacientes com leishmaniose confirmada parasitologicamente, com 100% de especificidade. Em Pernambuco, RODRIGUES *et al* (2002) compararam a PCR gênero-específica e a PCR utilizando os primers descritos por DE BRUJIN E BARKER (1992) para *Leishmania* (*Viannia*), entre si e com os métodos de diagnóstico parasitológico tradicionais. Ambas as reações foram mais sensíveis do que os outros métodos parasitológicos, tendo a PCR gênero-específica 88% de sensibilidade, e a PCR subgênero-específica, 95% de sensibilidade.

Em São Paulo, MEDEIROS *et al* (2002) compararam a PCR com a histopatologia em 54 biópsias, encontrando 81% (n= 44) de sensibilidade. No entanto, os 10 pacientes negativos à PCR apresentaram IDR positiva e em cinco desses foram detectadas amastigotas no exame histopatológico. MARQUES *et al* (2001) compararam a PCR com o diagnóstico parasitológico e a IDR em pacientes de Minas Gerais, utilizando diferentes esquemas de conservação das biópsias - etanol ou congelamento a -20°C - e de extração do DNA. Nenhum dos protocolos afetou a sensibilidade da PCR, que variou de 73 a 82%. A sensibilidade da PCR foi de 100% em pacientes com exame parasitológico e IDR positivos e 97% em pacientes com exame parasitológico positivo e IDR negativa. No entanto, 60% dos pacientes com

IDRM positiva e exame parasitológico negativo e 19% (n=6) dos pacientes clinicamente suspeitos com IDRM e parasitológico negativos, apresentaram PCR positiva. Dos seis pacientes, 3 tornaram-se positivos, posteriormente, no exame parasitológico, mas 3 permaneceram negativos.

Considerando-se os registros da literatura e as taxas normalmente encontradas de sensibilidade e especificidade da PCR, a hipótese de resultados falso-positivos torna-se remota em experimentos nos quais os controles da reação forem cuidadosamente realizados. De qualquer forma, a sensibilidade da PCR, nos diferentes estudos realizados em biópsias humanas, é significativamente maior do que a do diagnóstico parasitológico, estando em torno de 100%, em comparação a cerca de 60% para os outros exames (DE BRUJIN, LABRADA et al., 1993; PIARROUX, GAMBARELLI et al., 1994; MATHIS e DEPLAZES, 1995; PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; MIMORI, MATSUMOTO et al., 2002; CULHA, UZUN et al., 2006) .

Todavia, considerando-se ainda os resultados apresentados pelos diferentes autores, observa-se que são necessários mais estudos para avaliar comparativamente a PCR e a IDRM, buscando compreender o significado diagnóstico destes testes, isoladamente e em associação.

A demonstração da persistência de *Leishmania* viável em cicatrizes de indivíduos clinicamente curados foi realizada, no Brasil, por SCHUBACH et al (SCHUBACH, HADDAD et al., 1998b; SCHUBACH, MARZOCHI et al., 1998) pelo encontro de DNA de *Leishmania*, utilizando os primers gênero-específicos, em cicatrizes de 20 ex-doentes do Rio de Janeiro após 8 anos de tratamento. A hibridização do produto amplificado com sondas moleculares, descritas por DEGRAVE et al (1994) e por FERNANDES et al (1996), mostrou que o parasito era do subgênero *Viannia*, o mesmo causador da leishmaniose tegumentar nesse Estado. Um dos pacientes, além da positividade à PCR apresentou isolamento de *L. braziliensis in vitro* a partir de biópsia da cicatriz.

Os resultados de SCHUBACH, HADDAD et al. (1998b) foram repetidos posteriormente por MENDONÇA et al. (2004a), que estudaram por métodos parasitológicos e pela PCR biópsias de cicatrizes de 32 ex-pacientes com LTA que haviam sido diagnosticados parasitologicamente durante a doença e 31 pacientes



com cicatrizes de outras etiologias como grupo controle. A PCR utilizada foi específica para o subgênero *Viannia* - B1 e B2 - e foram usados como controle 10 fentogramas de DNA de formas promastigotas de *L. braziliensis*. A sensibilidade encontrada foi de 93,7% e nenhum dos 31 controles apresentou amplificação. Os expacientes, cujas cicatrizes foram positivas à PCR, tiveram as biópsias de cicatrizes inoculadas em meio de cultura e em animais de experimentação, sendo que em 3 resultaram infecção dos animais e isolamento *in vitro*. Estes resultados confirmaram que, nesses casos, o encontro do DNA parasitário estava associado à presença de parasitas viáveis no hospedeiro. Também foi observado por TARLETON E ZANG (1999), trabalhando com KDNA de *Trypanosoma cruzi*, que o KDNA se degrada em dois dias quando inoculado, livre de células, na corrente sanguínea de camundongos. Portanto, caso não existam células viáveis albergando o KDNA, o mesmo seria destruído rapidamente, não se tornando alvo para amplificação.

Se nos pacientes com LTA confirmada parasitologicamente o valor da PCR encontra-se estabelecido, dúvidas ainda existem sobre o valor desta mesma técnica em indivíduos IDRMs positivos, de área endêmica, sem diagnóstico etiológico definido (COUTINHO, PIRMEZ et al., 2002; MARTIN-SANCHEZ, PINEDA et al., 2004; DE OLIVEIRA CAMERA, JUNGER et al., 2006). Diferentemente da IDRMs, o encontro de uma PCR positiva numa biópsia de paciente de área endêmica para LTA pode ser extremamente útil como ferramenta confirmatória para os casos não resolvidos pelos métodos tradicionais, desde que se tenha estabelecido o verdadeiro valor desta técnica em casos bem definidos de pacientes e controles, residentes nessas áreas. Isto porque, como acontece com a IDRMs, a PCR pode ser positiva em pessoas com infecção subclínica por *Leishmania*.

Entretanto, nessas condições, os estudos acerca do comportamento da PCR em indivíduos sadios como indicador de infecção subclínica humana por *Leishmania* (*Viannia*), são pouco freqüentes. Considerando a ausência de lesões, o material para busca de DNA para amplificação é, preferencialmente, o sangue periférico, e avaliações comparativas da PCR com a IDRMs, o indicador ainda mais confiável de resposta imune na LTA, são praticamente inexistentes.

BELLI *et al* (1998) desenvolveram uma PCR multiplex na qual são adicionados primers gênero-específicos e primers específicos para *L. braziliensis*, na mesma reação.

O produto amplificado revelava duas bandas no gel, ao invés da banda única revelada pelas PCRs tradicionais. Esses primers amplificaram DNA de *L. braziliensis* no sangue periférico de 3 pacientes cujas biópsias foram positivas à mesma PCR e ao diagnóstico tradicional. COUTINHO et al (2002), no Rio de Janeiro, avaliaram prospectivamente 300 indivíduos, incluindo pacientes com LTA ativa, ex-pacientes clinicamente curados e moradores de áreas endêmicas sem sinais e sintomas de leishmanioses, a partir da coleta de sangue periférico para PCR com primers gênero-específicos. A PCR foi positiva em 25% dos pacientes com doença ativa, 25% dos pacientes clinicamente curados e 30% dos moradores de área endêmica com IDRMM positiva.

Admitindo a expansão das leishmanioses no mundo, sobretudo em condições sócio-econômicas deficientes que caracterizam a grande maioria das áreas endêmicas, bem como o custo e a complexidade de execução de um conjunto de diagnósticos para as leishmanioses, fica evidente que, por enquanto, o Teste de Montenegro continuará a ser o principal método utilizado na rotina diagnóstica desta doença, devendo ser empregados esforços no sentido de melhor conhecê-lo e aprimorá-lo.

Ao mesmo tempo, vêm-se desenvolvendo cada vez mais diferentes testes diagnósticos, particularmente aqueles utilizando métodos moleculares. São, portanto, necessários maiores estudos para se avaliar comparativamente o comportamento da IDRMM e da PCR, em pacientes com LTA, ex-pacientes e em indivíduos sadios residentes ou não em áreas endêmicas, considerando-se aspectos como tempo de moradia, faixa etária, sexo, ocupação, persistência parasitária após a cura terapêutica, relação com tempo de evolução da doença pré-tratamento, forma clínica, resposta terapêutica e outros.

Todos esses parâmetros são, porém, muito difíceis de avaliar, seja no processo de rotina da atenção a pacientes, seja em trabalhos de campo, por envolverem uma logística multiprofissional e interdisciplinar bastante complexa na prática, além de outros diversificados aspectos de tecnologias de estrutura e função.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o Teste Intradérmico de Montenegro em inquéritos epidemiológicos e para diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana, analisando, em indivíduos saudáveis e pacientes suspeitos de LTA, respectivamente, tipos de resposta local, alergia aos veículos, efeitos adversos, acurácia e correlação com testes moleculares.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1) Comparar a resposta local ao antígeno de Montenegro mertiolatado a 1:10000 com a resposta ao antígeno fenolado a 0,4%, em indivíduos saudáveis.
- 2) Comparar a resposta local ao teste intradérmico de Montenegro mertiolatado a 1:10000 e fenolado a 0,4% com as respostas obtidas aos respectivos conservantes, em indivíduos saudáveis.
- 3) Avaliar a resposta local apenas às soluções veículo, salina mertiolatada a 1:10000 e salina fenolada a 0,4%, considerando a frequência e o tipo de reações, em indivíduos saudáveis.
- 4) Comparar a medida da endureção do teste de Montenegro verificada na pele com a realizada no decalque em papel do local da aplicação, em pacientes com LTA ou outras doenças.
- 5) Avaliar a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos locais e sistêmicos associados ao teste de Montenegro, em indivíduos saudáveis e pacientes com LTA e diagnósticos diferenciais.
- 6) Verificar a possibilidade de ocorrência de “reações tardias” ao teste de Montenegro, em indivíduos saudáveis e pacientes com LTA e diagnósticos diferenciais.
- 7) Investigar, através dos testes moleculares para detecção de *Leishmania*, a possibilidade de infecção subclínica por esse parasito, em indivíduos saudáveis.
- 8) Verificar a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo do teste de Montenegro com antígeno fenolado, em pacientes sob investigação diagnóstica para leishmaniose e diagnósticos diferenciais.

- 9) Investigar a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo dos testes moleculares para detecção de *Leishmania*, em pacientes sob investigação diagnóstica para leishmaniose e diagnósticos diferenciais.
- 10) Comparar os resultados dos testes moleculares para detecção de *Leishmania* com os resultados do teste de Montenegro, em pacientes com LTA e diagnósticos diferenciais.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Estudo I - Avaliação da IDRM em indivíduos sadios**

Definição: Ensaio clínico de avaliação de teste diagnóstico, tendo como objetivo geral a comparação da resposta ao antígeno de Montenegro e aos preservativos timerosal e fenol, em indivíduos potencialmente não expostos à infecção por *Leishmania*, analisando parâmetros como inocuidade, especificidade e padronização clínica do preservativo utilizado no teste, entre outros. Um esquema experimental sintetizado é apresentado na Figura 1.

##### **3.1.1 Aspectos éticos**

Todas as etapas do Estudo I foram delineadas de acordo com as normas do Ministério da Saúde, Brasil (Resolução 196/96 - Conselho Nacional de Saúde, 1996, disponível em <http://www.datasus.gov.br/conselho/resol96/RES19696.htm>), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ (Anexo I). O protocolo foi aprovado também pela Divisão de Saúde do Exército e concedida autorização pelo Ministério do Exército para a realização do trabalho.

##### **3.1.2 População de estudo**

A pesquisa foi realizada em Santa Maria, Rio Grande do Sul (Latitude - 29,80; Longitude. - 53,91), e os voluntários eram, em sua maioria, procedentes do mesmo município, com idades entre 18 e 20 anos e todos do sexo masculino. A Figura 2 localiza a área de estudo e os municípios com maior número de voluntários incluídos. Nenhum voluntário apresentava história de viagem a áreas endêmicas de leishmanioses, nem era natural de outro estado do Brasil. Para o estudo foram selecionados 400 voluntários.

Foram excluídos os indivíduos sabidamente alérgicos a algum dos diluentes utilizados (salina contendo fenol a 0,4% e salina contendo Timerosal a 1:10000) e aqueles que apresentaram qualquer sinal ou sintoma clínico de qualquer afecção no momento de realização do teste.

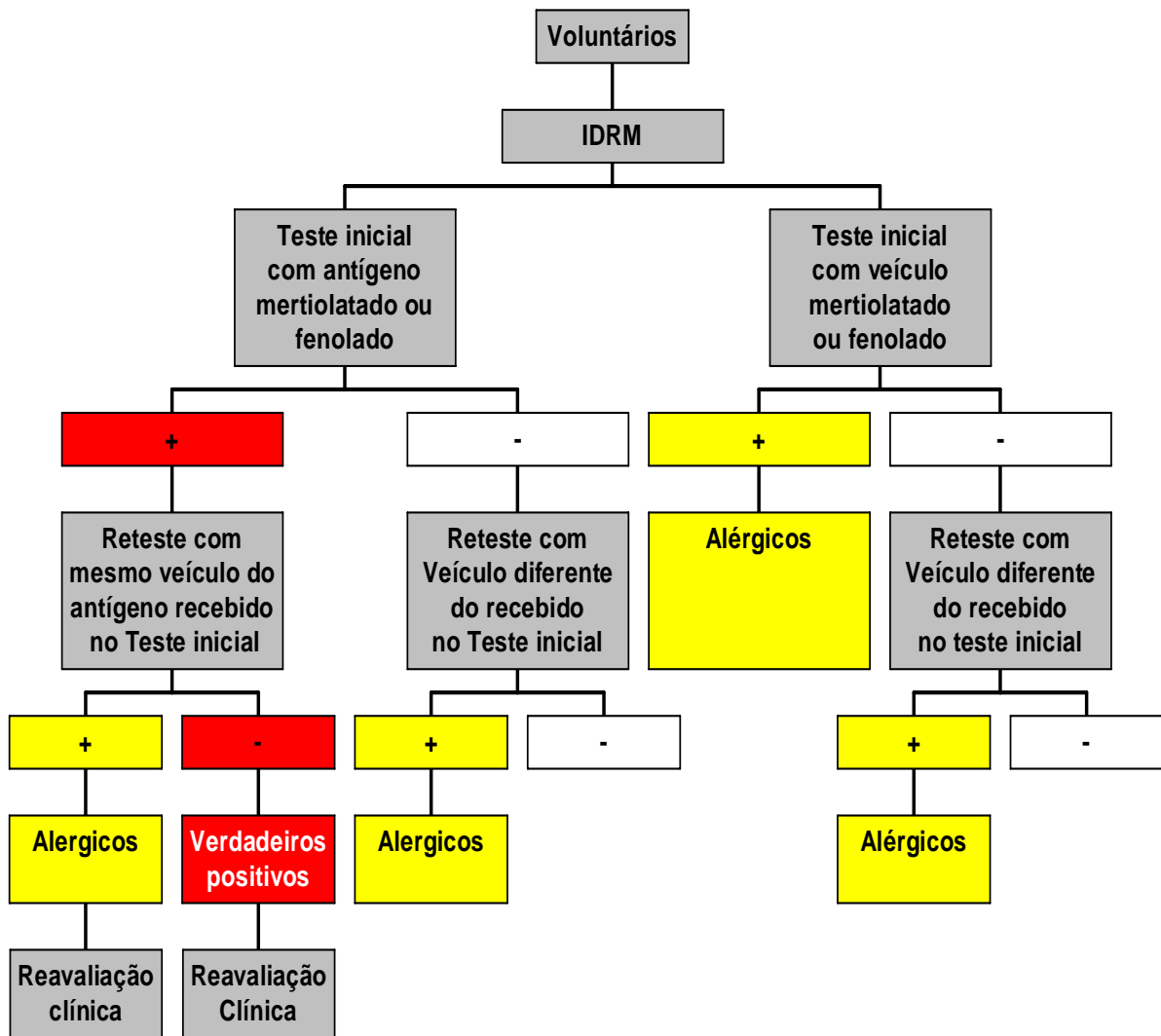


Figura 1: Estudo I- Esquema experimental para realização da Etapa I

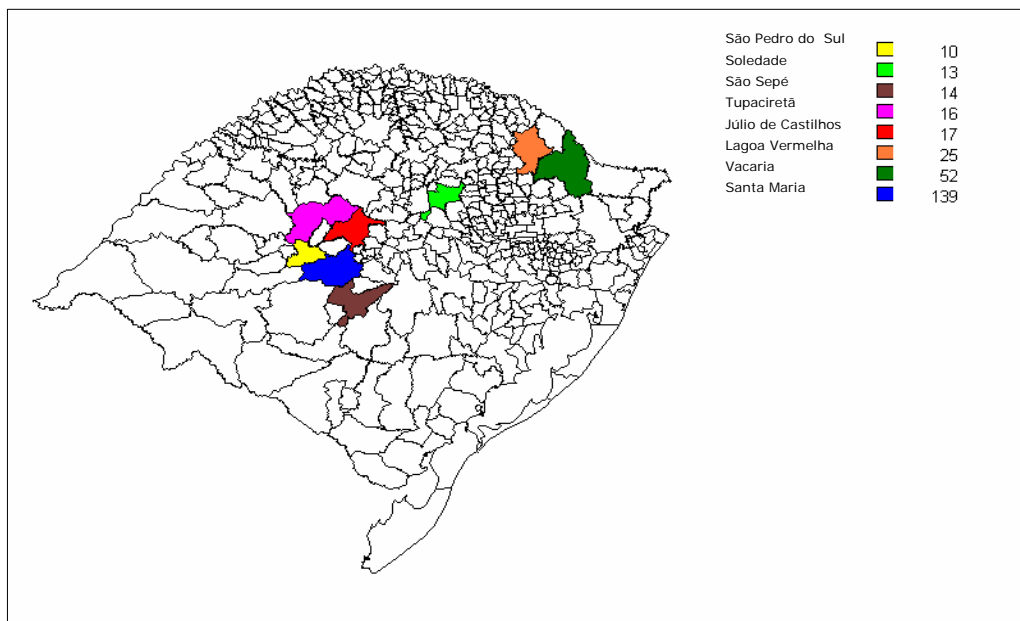


Figura 2: Estudo I- Mapa localizando a área de estudo e procedência dos voluntários.

### **3.1.3 Amostra e randomização dos voluntários**

O tamanho da amostra, 100 pessoas/grupo, foi calculado de acordo com o pacote EPI-Info (Programa Statcalc-EPIINFO versão 6.0) para um poder estatístico de 85% na capacidade de discriminar diferenças de 15% entre a frequência esperada de alérgicos à salina fenolada, considerada de 5 % (Imperato e Diakité, 1969), e à salina mertiolatada, calculada em torno de 20% por estudos anteriores do grupo de pesquisa do Centro de Referência em Leishmanioses- CRLeish do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro chagas- IPEC/FIOCRUZ (dados não publicados)

Os indivíduos selecionados foram aleatoriamente alocados em 4 grupos, um para cada formulação a ser utilizada. A alocação de cada indivíduo deu-se de acordo com lista randomizada, codificada por observador externo (Departamento de Saúde Coletiva- UFRJ), e os voluntários foram distribuídos por ordem de chegada ao local dos testes.

### **3.1.4 Procedência do antígeno e das soluções veículo empregadas**

Todas as formulações foram produzidas pelo Laboratório de Reativos para Diagnóstico - Biomanguinhos/FIOCRUZ, seguindo os controles de qualidade rotineiramente utilizados para o antígeno FIOCRUZ® padrão, distribuído à época para a rede pública. Como antígeno padrão, utilizou-se a cepa referência PH8 de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), tendo sido um mesmo lote de suspensão parasitária fracionado em duas partes e ressuspenso para a concentração de 40 microgramas de antígeno protéico/ ml, uma parte em salina fisiológica acrescida de fenol a 0,4% e outra em salina fisiológica com timerosal a 1:10000. A partir do mesmo lote de solução salina, utilizada para a suspensão e conservação dos antígenos, foram produzidas as soluções controle: salina fenolada a 0,4%, salina a 1:10000 e salina sem conservante.

### **3.1.5 Entrevista individual**

Cada voluntário foi entrevistado para preenchimento de um questionário clínico-epidemiológico padronizado, visando à coleta das seguintes informações: procedência, ocupação anterior e tempo de ocupação, histórico vacinal nos últimos 2

anos, viagens e incursões a matas, testes cutâneos realizados, histórico de alergias/doenças alérgicas, doenças crônicas, medicamentos de uso rotineiro e outros medicamentos em uso.

### **3.1.6 Procedimentos de mascaramento**

A codificação das formulações utilizadas foi previamente realizada por observador não relacionado ao processo de produção e aplicação dos mesmos e não participante da pesquisa (Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, FIOCRUZ). Assim, os investigadores de campo que aplicaram a IDRМ, de modo duplo-cego, tinham conhecimento apenas do código de cada formulação injetada em cada indivíduo. Previu-se que a abertura de código no campo ocorreria somente após todos os resultados terem sido obtidos, exceto diante de eventual ocorrência de efeito adverso sério.

### **3.1.7 Aplicação dos testes e Leitura dos resultados**

Cada voluntário recebeu, na face anterior do antebraço direito, uma injeção de 0,1ml de uma das quatro formulações, conforme o grupo de alocação (Figura 1). Foram utilizadas seringas hipodérmicas, com agulha 13 X 6,5 mm. Para minimizar os erros individuais, os testes foram realizados por dois aplicadores, uniformemente treinados, os quais realizaram o mesmo número de testes.

Todos os indivíduos foram mantidos em observação nos primeiros 30 minutos após a aplicação da IDRМ, para verificação de reações imediatas. Após 48 horas, o local de cada aplicação foi examinado para verificar a existência de endureção. Eventuais áreas endurecidas foram medidas com régua milimetrada e os seus contornos marcados com caneta esferográfica (SOKAL, 1975) e decalcados em papel umedecido. Foi considerada positiva qualquer endureção maior ou igual a 5 mm de diâmetro.

As leituras e medidas foram realizadas de forma independente por dois observadores: um deles fez a marcação com caneta esferográfica e medição da endureção no local do inóculo do teste, seguindo-se a aposição em papel; o outro efetuou as medidas do desenho gravado no papel. Avaliou-se, a seguir, a concordância entre as leituras



No momento da leitura foram observadas, no local do teste, além da endureção, característica da hipersensibilidade retardada, a presença e/ou relato, pelos voluntários de prurido, dor, eritema, edema, bolhas, e também manifestações sistêmicas como febre, urticária e outros sinais ou sintomas gerais, conforme ficha específica. Após a abertura dos códigos, cada voluntário foi informado da natureza do reativo recebido e do significado do resultado de seu teste, bem como orientado nos casos de alergia ou positividade a algum dos reativos recebidos.

### **3.1.8 Reteste**

Sete dias após os resultados do primeiro teste, os voluntários foram novamente testados, no antebraço esquerdo, de acordo com o esquema experimental (Figura 1). Os positivos no teste com antígeno receberam a aplicação de solução salina contendo o mesmo conservante; os positivos no teste sem antígeno receberam apenas solução salina fisiológica, sem conservantes; os negativos no primeiro teste com antígeno receberam a aplicação de solução salina contendo o conservante não utilizado no teste inicial.

O reteste visou discriminar, entre os positivos à IDRМ, uma eventual resposta alérgica ao veículo timerosal ou fenol, tendo a solução salina fisiológica como controle. Para os negativos à IDRМ, o reteste funcionou como um teste alérgico ao outro veículo alternativo.

A não concomitância da aplicação de teste controle contendo apenas o mesmo veículo no momento da aplicação da IDRМ pretendeu evitar possível aumento do estímulo antigênico do timerosal com possível ocorrência de respostas falso-positivas e potencialização das respostas (SILVA, 1999; DUARTE, LAZZARINI et al., 2002), bem como, eventualmente, do fenol. As leituras e o acompanhamento dos resultados dos retestes foram realizados segundo os mesmos procedimentos para a primeira aplicação.

### **3.1.9 Acompanhamento para observação de reações do “tipo tardio”**

Todos os indivíduos submetidos à IDRМ, com qualquer das formulações, foram reexaminados entre 10 e 15 dias após a leitura dos resultados do primeiro teste. As alterações no local da aplicação foram observadas, medidas e decalcadas em papel, conforme descrito para as leituras em 48 horas.

### 3.1.10 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os pacotes Epiinfo (versão 6,0) e SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows. Sendo o ensaio realizado em área considerada indene para *Leishmania*, esperava-se que a frequência de resposta a cada antígeno testado fosse idêntica à da sua salina correspondente, indicando o grau de resposta alérgica a algum dos dois diluentes.

### 3.1.11 Reavaliação clínica

O esquema da etapa de reavaliação clínica e do estudo laboratorial encontra-se na Figura 3.

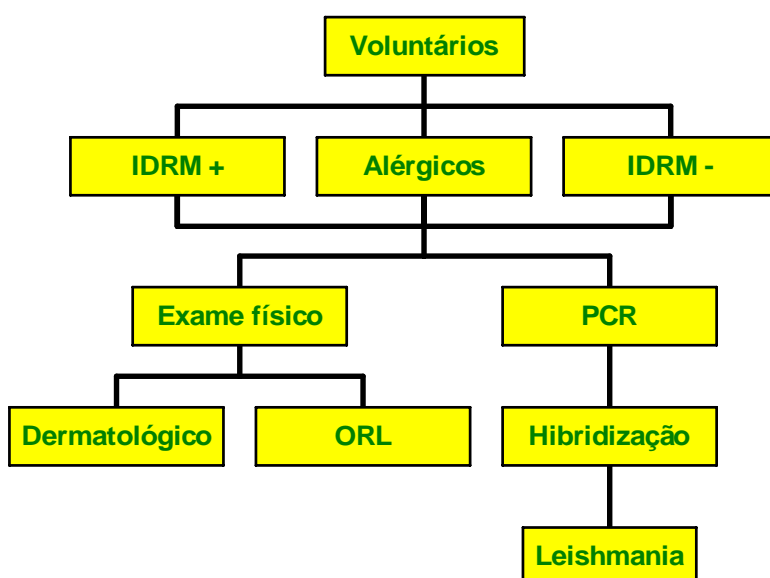


Figura 3: Estudo I - Esquema de avaliação clínica e laboratorial dos indivíduos saudáveis

A reavaliação clínica foi realizada após os resultados da IDRM, em todos os voluntários positivos aos antígenos utilizados e em um grupo controle, composto de indivíduos alérgicos ao timerosal ou ao fenol (sem exposição ao antígeno de *Leishmania* e indivíduos negativos a todos os reativos utilizados). O exame clínico consistiu de avaliação clínica geral, bem como dermatológica e otorrinolaringológica, visando à pesquisa de lesões mucosas e cicatrizes sugestivas de leishmaniose progressa, tendo sido, no entanto, anotadas a eventual presença de cicatrizes de outra natureza.

### 3.1.12 Pesquisa de DNA de *Leishmania* no creme leucocitário dos indivíduos reavaliados - Polymerase Chain Reaction

De cada um dos voluntários reavaliados foram coletados 3 ml de sangue venoso, por sistema VACUTAINER® com EDTA, para extração de DNA. O sangue foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e o creme leucocitário foi separado com pipeta Pasteur descartável, sendo conservado a -20 °C até o uso. Cem microlitros do creme leucocitário foram submetidos ao processo de extração de DNA com kit DNAzol® (Gibco BRL), e o DNA extraído foi lavado com etanol a 95%, de acordo com as instruções do fabricante do kit. Para a PCR, 1 µL de solução de DNA de cada amostra foi utilizada em um ensaio "hot start", com primers que amplificam a região conservada da molécula de minicírculo, presente em todas as espécies de *Leishmania* (RODGERS, POPPER et al., 1990). Essa amplificação dá origem a um produto de cerca de 120 pares de bases, que é visualizado sob luz ultravioleta, após a aplicação da amostra em eletroforese em gel de agarose e coloração do gel com brometo de etídio.

A mistura de reação constituiu-se de 100 nanogramas de cada primer (5'- (G/C) (G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC & 5'GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA), di-Nucleotídeos Trifosfato (dNTPs) a 200 milimolar, (Pharmacia), 2,5 unidades de enzima Taq Polimerase (Amplitaq Gold, Perkin- Elmer, Norwalk, Conn.) e 1,5 milimolar de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>), perfazendo um volume final de 50 microlitros. A mistura foi incubada em um termociclador Perkin-Elmer 900 e o programa de amplificação foi de 1 ciclo de 94°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

Em cada experimento de amplificação foram adicionadas uma amostra controle negativa - sem DNA- e uma amostra controle positiva- com 10 picogramas de DNA extraído de cultura axênica de *Leishmania braziliensis*.

Após a PCR e a revelação dos produtos amplificados, os géis de agarose foram submetidos a transferência para membrana de nylon em solução de NaOH 0.4 N e as membranas hibridizadas com sondas específicas para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, como descrito por (DEGRAVE, FERNANDES et al., ; FERNANDES, CATANHO et al., 1999)

### 3.2 Estudo II - Avaliação da IDRM em pacientes

Definição: Ensaio de avaliação de teste diagnóstico tendo como objetivo geral a avaliação do Teste Intradérmico de Montenegro em casuística hospitalar e a comparação entre o comportamento da IDRM frente aos testes moleculares para detecção de *Leishmania* e a exames utilizados na rotina diagnóstica da LTA, incluindo exame direto, histopatologia e isolamento em cultura.

A Figura 4 apresenta um esquema sintetizado do Estudo II

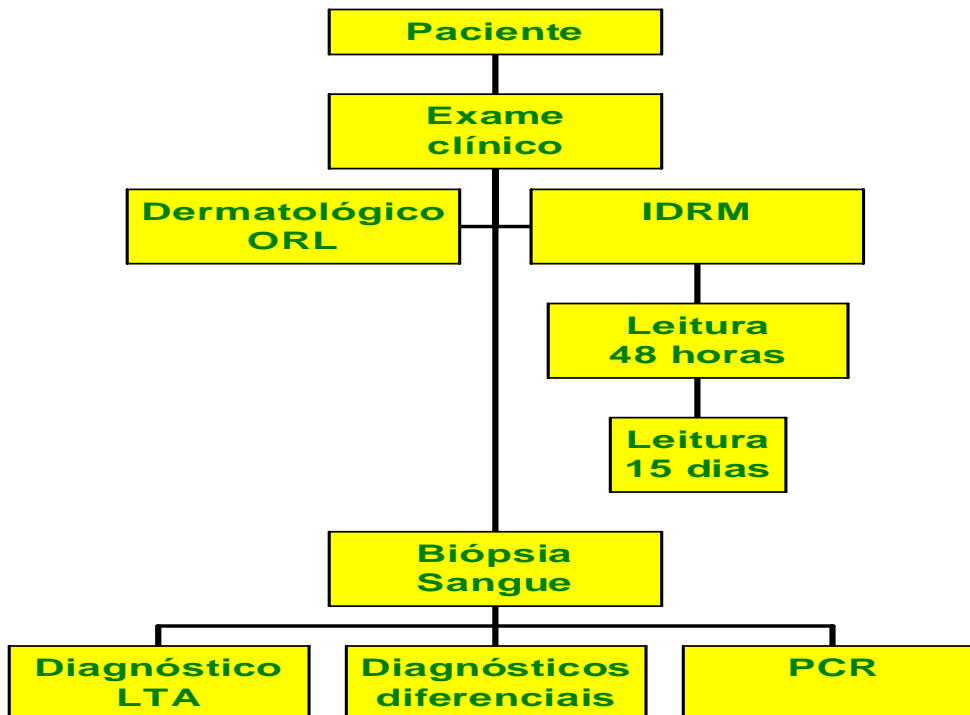


Figura 4: Estudo II - Esquema de avaliação clínica e laboratorial em casuística hospitalar

#### 3.2.1 Aspectos éticos

A rotina de atendimento dos pacientes (Anexo II) incluindo a obtenção de espécimes clínicos para os estudos e a realização de Teste de Montenegro, foi previamente submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC/FIOCRUZ, constituindo o projeto: “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz”, aprovado no CEP/IPEC sob o número 0016.0.009-02. Este projeto, especificamente, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC, sob o número 0024.0.009.000-04, e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a realização de quaisquer das etapas do mesmo.

### **3.2.2 População de estudo**

Foram incluídos os 302 pacientes encaminhados ao atendimento clínico do CRLeish-IPEC/FIOCRUZ com suspeita de LTA no período de 21 de março de 2005 a 21 de março de 2006, que consentiram participar voluntariamente da pesquisa e que foram submetidos ao protocolo padrão de rotina clínica específica. Foram excluídos os pacientes sabidamente alérgicos a fenol, preservativo do antígeno a ser utilizado, e os que não puderam consentir em participar voluntariamente da pesquisa.

Os pacientes cuja IDRМ foi realizada por profissional não participante da equipe do projeto também foram excluídos do estudo específico de padronização do teste. No entanto, casos biopsiados foram incluídos na avaliação da PCR e os resultados da IDRМ não foram considerados.

### **3.2.3 Antígeno utilizado**

Foi utilizado o antígeno distribuído pela Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) para toda a Rede Pública de Saúde do Brasil e utilizado na rotina diagnóstica do IPEC. O antígeno é produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos - CPPI, Estado do Paraná, contendo 40 µg de nitrogênio protéico/ mL de suspensão de 10<sup>7</sup> promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Anexo III)

### **3.2.4 Entrevista individual**

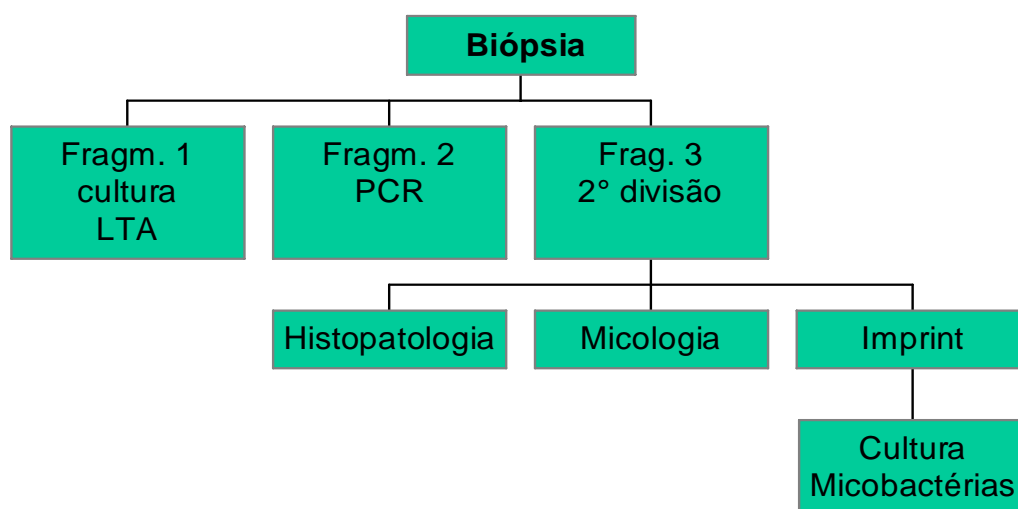
Após a consulta médica, cada paciente, uma vez submetido à IDRМ, foi entrevistado para preenchimento de questionário clínico-epidemiológico padronizado, visando à coleta das seguintes informações: procedência, ocupação anterior e duração da ocupação, histórico vacinal nos últimos 2 anos, viagens e incursões a matas, testes cutâneos realizados, histórico de alergias/doenças alérgicas, doenças crônicas, medicamentos de uso rotineiro e outros medicamentos em uso.

### **3.2.5 Coleta de espécimes clínicos para diagnóstico.**

Integrando-se à rotina do CRLeish, segundo a qual, após o atendimento médico, cada paciente é encaminhado para coleta de sangue periférico e biópsia da(s) lesão(ões) sugestiva(s) de leishmaniose, sob indicação do médico responsável, as

amostras de sangue foram encaminhadas para exames laboratoriais, de acordo com o protocolo de diagnóstico com base na suspeita de LTA e de diagnósticos diferenciais.

De acordo com a mesma rotina, as biópsias foram subdivididas em fragmentos para o diagnóstico das leishmanioses e, quando indicado clinicamente, para diagnóstico de outros agentes, conforme referido na Figura 5. Um fragmento foi utilizado para *imprint*, outro para cultura e outro, ainda, para histopatologia, visando, respectivamente, a busca de evidência direta do agente, o isolamento da *Leishmania* e a avaliação histopatológica das lesões.



**Figura 5: Estudo II - Esquema de fracionamento de biópsias para exames diagnósticos.**

Para este estudo, além da atenção de rotina, incluindo o diagnóstico parasitológico (Figura 4), foram coletados 3 mL de sangue venoso em tubo VACUTAINER® contendo EDTA, centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm e o creme leucocitário, separado com pipeta Pasteur descartável, foi conservado a -20 °C, até a extração de DNA. Um fragmento da mesma biópsia coletada para rotina foi acondicionado em tubo tipo eppendorf seco e mantido a -20 °C, até o momento de extração do DNA. O tubo com sangue e o fragmento de biópsia foram processados no Serviço de Parasitologia (Departamento de Microimunoparasitologia, IPEC) para a PCR.

### **3.2.6 Padronização clínica da IDR**

#### **3.2.6.1 Padronização da aplicação do teste**

O teste foi realizado por dois profissionais de enfermagem apropriadamente treinados para padronização dos procedimentos de aplicação e leitura dos testes intradérmicos.

Para a aplicação, foi utilizada seringa hipodérmica tipo insulina, descartável, com agulha 13 x 6,5, injetando-se por via intradérmica 0,1 mL de suspensão antigênica na face anterior do antebraço esquerdo, após assepsia local com álcool a 70%. A agulha foi introduzida com o bisel para cima, de acordo com Tarnow e King (2004), tendo sido anotados, em ficha específica (Anexo IV), a formação de pápula, o tempo de aplicação da injeção, o conforto da aplicação (referido pelo paciente) e o eventual vazamento do líquido injetado e/ou sangramento pelo orifício de introdução da agulha.

Após a aplicação, os pacientes permaneciam em observação por 30 minutos para verificação de possível aparecimento de reações locais e sistêmicas ao teste (FAGUNDES, MARZOCHI et al., 2003): edema, eritema, prurido, urticária e outros sinais e sintomas. Após esse período, eram revistos e liberados com instruções para retornar, 48 horas após a aplicação, para a leitura dos testes. Durante o tempo de observação, os pacientes eram entrevistados sobre a percepção de conforto acerca do teste, respondendo a pergunta: “Considerou o teste confortável, pouco confortável, desconfortável ou altamente desconfortável?”

Visando facilitar a compreensão do paciente acerca da IDR e da necessidade do seu retorno para a leitura do resultado, foi elaborado um folheto explicativo (Anexo V), distribuído aos pacientes enquanto aguardavam a realização do exame.

#### **3.2.6.2 Leitura do teste**

A leitura dos resultados nos pacientes, após 48 horas da aplicação do teste, foi também realizada de duas formas, direta e indireta, para comparação. Assim, depois de delimitar-se com caneta esferográfica o contorno na pele da área endurecida, caso presente, efetuaram-se as leituras: a) pela medida na pele, do maior diâmetro da área contornada (SOKAL, 1975), e b) pela medida no papel umedecido com álcool, do maior diâmetro do contorno gravado por sua aposição sobre a área delimitada. Como avaliação da concordância das medições, as leituras e medidas foram

realizadas de forma independente por dois observadores: (a) um deles fez a leitura direta da medida na pele do paciente, e (b) o outro efetuou a medida indireta- do desenho gravado no papel.

Os resultados do Teste de Montenegro foram analisados com base na medida obtida diretamente na pele do paciente. As medidas anotadas da leitura direta e indireta foram comparadas posteriormente.

No momento da leitura também foram verificadas, além da enduração característica da hipersensibilidade retardada, a presença e/ou relato no local da aplicação de: prurido, dor, eritema, edema, bolha e/ou flictena; e manifestações sistêmicas como febre, urticária ou outras alterações gerais. As observações, juntamente com os resultados da IDRMM, foram armazenadas em ficha específica (Anexo VI) e repassadas ao clínico responsável pelo atendimento aos pacientes.

### **3.2.6.3 Acompanhamento dos pacientes para observação de reações do “tipo tardio”**

Todos os pacientes submetidos à IDRMM foram revistos após 15 dias da aplicação, e submetidos à mesma abordagem relativa à leitura em 48 horas, acima descrita, sendo também, da mesma forma, verificadas e registradas a presença ou ausência de alterações no local do teste e sistêmicas.

## **3.2.7 Realização dos testes de detecção molecular nas amostras clínicas**

### **3.2.7.1 Obtenção de DNA de culturas axênicas de *Leishmania* para controle**

Culturas na fase estacionária de cepas referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), crescidas em 50 mL de meio Schneider suplementado com 10 % de soro fetal bovino, foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 min e o *pellet* resultante submetido à extração de DNA com o kit DNAzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi ressuspensão em volume de 20 microlitros, quantificado em biofotômetro (Eppendorf) e em gel de agarose a 1,% e estocado a -20 ° C até o uso como controle nos experimentos de PCR.



### **3.2.7.2 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase com o DNA de culturas**

Os DNAs extraídos das culturas de *Leishmania* foram submetidos à PCR de acordo com o descrito no Estudo I. A fim de identificar o limiar de detecção da PCR, ou seja, a quantidade mínima necessária de DNA de *Leishmania* na mistura de reação para que a amplificação ocorra, foi feita uma diluição, a partir do DNA de *L. braziliensis* extraído anteriormente e quantificado, de 1:10 até 1: 100.000.000, e realizada a PCR, com revelação em corrida em gel de agarose a 1,5% e coloração em brometo de etídio por 20 min. A sensibilidade da PCR correspondeu à última concentração na qual foi possível a visualização da banda de 120 bp em gel de agarose.

### **3.2.7.3 Extração de DNA de amostras clínicas**

Para a extração do DNA do creme leucocitário obtido dos pacientes foram comparados os kits Puregene® (GENTRA) e DNAzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções dos fabricantes, em dez amostras controles de sangue processadas em paralelo com os dois kits. A escolha do kit a ser utilizado foi feita após corrida eletroforética do DNA extraído em gel de agarose a 1% e verificação da presença de banda após coloração por brometo de etídeo e visualização sob luz ultravioleta. O kit que revelou mais amostras apresentando banda compatível com DNA em bom estado, foi escolhido para ser utilizado com as amostras do projeto.

Para a extração de DNA das biópsias comparou-se dois kits de extração, o kit DNAzol® (Invitrogen) e o Kit Genomic prep® para tecido (Amersham Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas 12 amostras estocadas a seco a -20°C no Serviço de Parasitologia do CRLeish. Após a extração, os DNAs resultantes foram ressuspensos em 20 microlitros (kit DNAzol®) ou 50 microlitros (kit Genomic Prep®), quantificados em biofotômetro (Eppendorf) e submetidos à PCR nas mesmas condições da PCR com culturas de *Leishmania*. O kit que apresentou o melhor rendimento em relação à quantidade de material extraído e em resultados da PCR foi escolhido para o futuro processamento das amostras clínicas subsequentes.

O kit DNAzol® foi utilizado segundo o mesmo protocolo do Estudo I, enquanto o protocolo do kit Genomic Prep® incluiu: lise das células por incubação em solução de lise mais 10 mG/mL de proteinase K, em banho- maria a 95°C por 3

horas; incubação por RNase por 30 minutos a 37°C; centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos; transferência do sobrenadante para outro tubo e incubação com solução de precipitação de proteínas; nova centrifugação, com precipitação do DNA no sobrenadante com isopropanol absoluto e duas lavagens do precipitado com etanol a 70%. O DNA extraído, após secagem em temperatura ambiente, foi ressuspensão em 25 µL de solução de hidratação e armazenado por 24 horas em geladeira, sendo, após esse período, quantificado por espectrofotometria e eletroforese em agarose, conforme o DNA do creme leucocitário.

Cada extração de DNA de sangue e de biópsias incluiu de 8 a 10 amostras sendo sempre uma amostra controle, sem DNA.

#### **3.2.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR do material extraído das amostras clínicas foi realizada de acordo com o descrito no Estudo I, com as seguintes modificações: o volume de DNA por tubo de reação foi de 5 microlitros, num volume final de 25 microlitros por tubo. Após a PCR, os produtos amplificados foram revelados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio. Os géis de agarose foram então fotografados em sistema digital KODAK e armazenados em meio digital.

Em cada experimento de amplificação foram adicionadas uma amostra controle negativa, sem DNA, e uma amostra controle positiva, com 10 picogramas de DNA extraído de uma cultura axênica de *Leishmania braziliensis*. Foram realizadas duas amplificações para cada amostra e, diante de resultados discordantes, repetia-se a PCR, sendo considerado como resultado final aquele repetido em dois experimentos. Todas as amostras negativas à PCR foram também re-amplificadas, com a adição de 1 microlitro de solução de DNA extraído de cultura axênica de *Leishmania*, para verificação da presença de inibidores da PCR.

A Figura 6 resume o protocolo de diagnóstico molecular utilizado. Os testes de detecção molecular foram realizados de forma independente do resultado da IDR e de outros exames integrantes da rotina diagnóstica dos pacientes.

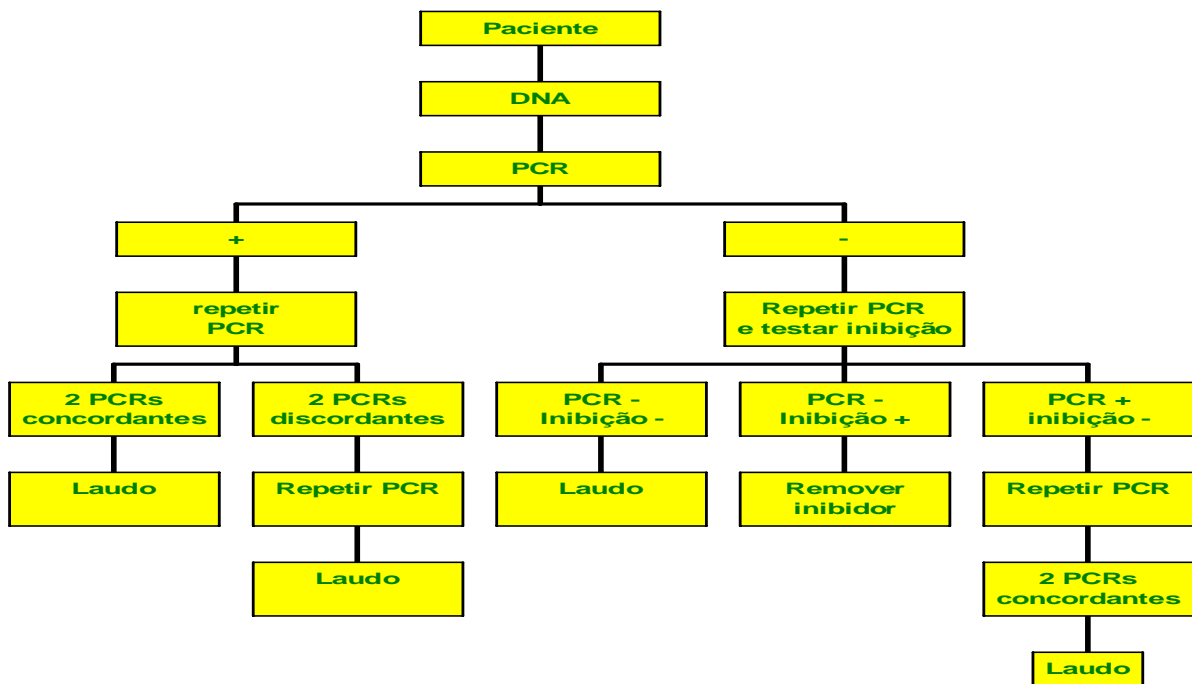


Figura 6 Estudo II - Esquema sintetizado dos protocolos para detecção molecular de *Leishmania*.

### 3.2.8 Plano de análise dos resultados

- **Correlações entre a IDRM e: variáveis definidas para a população de estudo; métodos de diagnóstico parasitológico; PCR.**

Para a análise dos resultados, foi construído e alimentado um banco de dados em SPSS 11.0 contendo, de cada paciente, os dados de identificação: idade, sexo e local de residência/procedência; as informações referentes a aspectos clínicos: presença e características da lesão cutânea, presença e características de lesão mucosa, tempo de evolução da doença até o diagnóstico, número de lesões, presença de outros sinais e sintomas; e os dados relativos à confirmação do diagnóstico referente aos seguintes resultados: da IDRM, dos exames de diagnóstico molecular, dos exames parasitológicos para leishmaniose, de outros exames para diagnóstico etiológico e do teste terapêutico para leishmaniose, quando realizado.

Em relação ao estudo da resposta à IDRM correlacionada à procedência dos pacientes, as localidades de onde vieram foram classificadas como endêmicas ou não para LTA. Essa classificação foi realizada com o auxílio do banco de dados sobre leishmanioses do CRLeish/ IPEC e da Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Considerou-se como área não endêmica aquela que notificou menos de cinco casos de leishmanioses nos últimos 10 anos.

A análise dos resultados da IDRM e dos testes moleculares foi realizada em função da situação clínico-epidemiológica dos pacientes, empregando os pacotes Epi-info e Spss 11.0. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Para a comparação de proporções relacionadas às variáveis dicotômicas, foram utilizados o teste qui quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e o teste exato de Fischer. A análise das variáveis contínuas foi realizada após análise da distribuição por meio de histograma e boxplot, tendo sido escolhido o teste paramétrico de Mann-Whitney para comparação de médias entre dois grupos independentes. Quando a comparação envolvia 3 ou mais grupos, foi utilizado o teste Kruskal Wallis.

A sensibilidade, especificidade e valores preditivos da IDRM e PCR foram calculados com o programa Epi-table, do pacote EPI-INFO 6.0. A concordância entre a PCR 1 e PCR 2, para estudo da repetibilidade do teste, foi avaliada através do índice Kappa, com o mesmo programa, e interpretada de acordo com (LANDIS e KOCH, 1977).

Definiu-se como pacientes com leishmaniose confirmada parasitologicamente - qualquer paciente com exame parasitológico positivo para leishmaniose, ou seja, cujo exame de biópsia permitiu visualização de formas amastigotas no exame direto e/ou pela histopatologia e/ou isolamento de *Leishmania* in vitro; pacientes com outras doenças confirmadas- qualquer paciente, admitido com suspeita de LTA, mas que teve confirmação clínica ou laboratorial de outra doença; pacientes sem confirmação diagnóstica - qualquer paciente admitido com suspeita de LTA, mas que não teve confirmação clínica ou laboratorial de LTA ou de outra etiologia. Também se incluíram neste grupo os pacientes submetidos ao teste terapêutico para LTA, correspondentes aqueles que, embora com todos os exames negativos para LTA, apresentavam uma suspeita clínica fortemente sugestiva da doença, tendo sido submetidos pelo clínico assistente ao tratamento de Leishmanioses.

O plano de análise dos resultados encontra-se resumido na Figura 7:

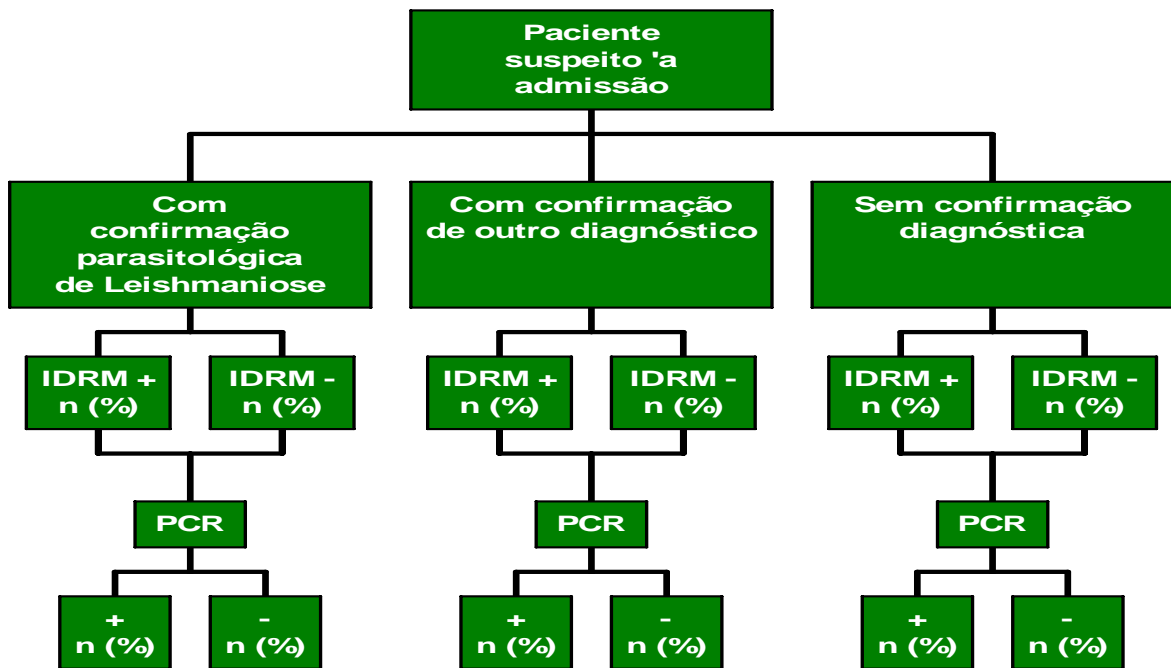


Figura 7- Estudo II- Esquema da análise dos resultados.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Estudo I - Avaliação da IDRM em indivíduos sadios

#### 4.1.1 Randomização e comparabilidade dos grupos de estudo

Os voluntários foram divididos em grupos, de acordo com o reativo recebido no primeiro teste, a saber: grupo I- antígeno FIOCRUZ® mertiolatado (N=102); grupo II- antígeno FIOCRUZ® fenolado (N=101); grupo III- salina mertiolatada a 1:10000 (N=97); grupo IV- salina fenolada a 0,4 % (N=100).

A Tabela 1 mostra o resultado da randomização dos voluntários nos 4 grupos amostrais, considerando a distribuição por idade, local de procedência e histórico vacinal nos últimos 2 anos. Como demonstrado, a randomização possibilitou a homogeneidade dos grupos estudados e a comparabilidade de resultados entre os voluntários, não tendo havido diferença significativa entre os mesmos ( $p > 0,5$ , teste  $\chi^2$  de Pearson). A grande homogeneidade da população estudada é importante para aumentar a validade interna de um estudo epidemiológico, parâmetro esse altamente relevante para estudos de inocuidade e segurança, como o realizado.

**Tabela 1: Estudo I- Características dos voluntários distribuídos nos grupos segundo o teste intradérmico recebido**

Variáveis	Grupos <sup>(1)</sup>				Total	p
	I	II	III	IV		
Idade média	18,43	18,39	18,43	18,45	-	0,86
Procedência (N):						
De Santa Maria	34	40	28	37	139	0,41
De outras cidades	68	61	69	63	261	
Vacinados nos últimos 2 anos (N)	76	73	73	74	296	0,96
Não vacinados nos últimos 2 anos (N)	26	28	24	26	104	

<sup>(1)</sup>- Reativos para cada grupo: I- antígeno FIOCRUZ® mertiolatado; II- antígeno FIOCRUZ® fenolado; III- salina merthiolatada a 1:10000; IV- salina fenolada a 0,4 %;

#### 4.1.2 Positividade aos testes intradérmicos nos indivíduos sadios

A Tabela II resume os resultados encontrados nos voluntários, de acordo com os reativos recebidos por grupo e os testes realizados.

Dos 400 voluntários inicialmente incluídos no estudo, 203 receberam antígeno de Montenegro, mertiolatado (n=102) ou fenolado (n= 101). Os outros 197 receberam salina mertiolatada (n=97) e salina fenolada (n=100). Oitenta e sete voluntários tiveram uma reação positiva a algum dos reativos utilizados e 313 foram negativos. No reteste, foram incluídos 340 (85%) voluntários, procedentes dos 4 grupos de estudo.

**Tabela 2: Estudo I - Respostas dos voluntários aos testes e retestes, de acordo com o reativo utilizado em seu grupo**

<i>Grupos/ reativo utilizado</i>	<i>Resultado Teste</i>	<i>No. de voluntários</i>	<i>No. de retestados utilizado</i>	<i>voluntários / reativo</i>	<i>Resultados do Reteste</i>
I - Antígeno mertiolatado	Positivos	42	41 /	salina mertiolatada	Positivos - 13 Negativos - 28
	Negativos	60	50 /	salina fenolada	Positivos - 3 Negativos - 47
II - Antígeno fenolado	Positivos	36	33 /	salina fenolada	Positivos - 1 Negativos - 32
	Negativos	65	51 /	salina mertiolatada	Positivos - 5 Negativos - 46
III - Salina mertiolatada	Positivos	9	9 /	soro fisiológico	Positivos - 0 Negativos - 9
	Negativos	88	75 /	salina fenolada	Positivos - 0 Negativos - 75
IV - Salina fenolada	Positivos	0	-		-
	Negativos	100	81 /	salina mertiolatada	Positivos - 14 Negativos - 67
Total		400	340		

Foram considerados verdadeiros positivos à IDRМ, os 28 negativos ao reteste no grupo I e os 32 negativos ao reteste no grupo II, totalizando 60 em 203 indivíduos (29,5%).

O percentual de positivos a casa um dos antígenos foi de 27,4 % (antígeno mertiolatado) e 32,0% (antígeno fenolado). Logo, em média, 29,5 % dos voluntários testados com antígeno fenolado ou mertiolatado (60 indivíduos positivos entre 203 testados com os dois antígenos) foram positivos. Foram indiferenciáveis as respostas clínicas locais aos antígenos de Montenegro mertiolatado ou fenolado, bem como aos veículos mertiolatado ou fenolado aplicados isoladamente.

#### 4.1.3 Tamanho das endurações frente aos antígenos mertiolatado e fenolado nos indivíduos sadios

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho das endurações produzidas pelos dois antígenos, como visto na Tabela 3, embora a média do tamanho da IDRМ com o antígeno mertiolatado tenha sido maior (teste Mann-Whitney,  $p = 0,338$ ). A figura 8 resume a distribuição dos diâmetros das endurações para cada grupo de voluntários no primeiro teste realizado.

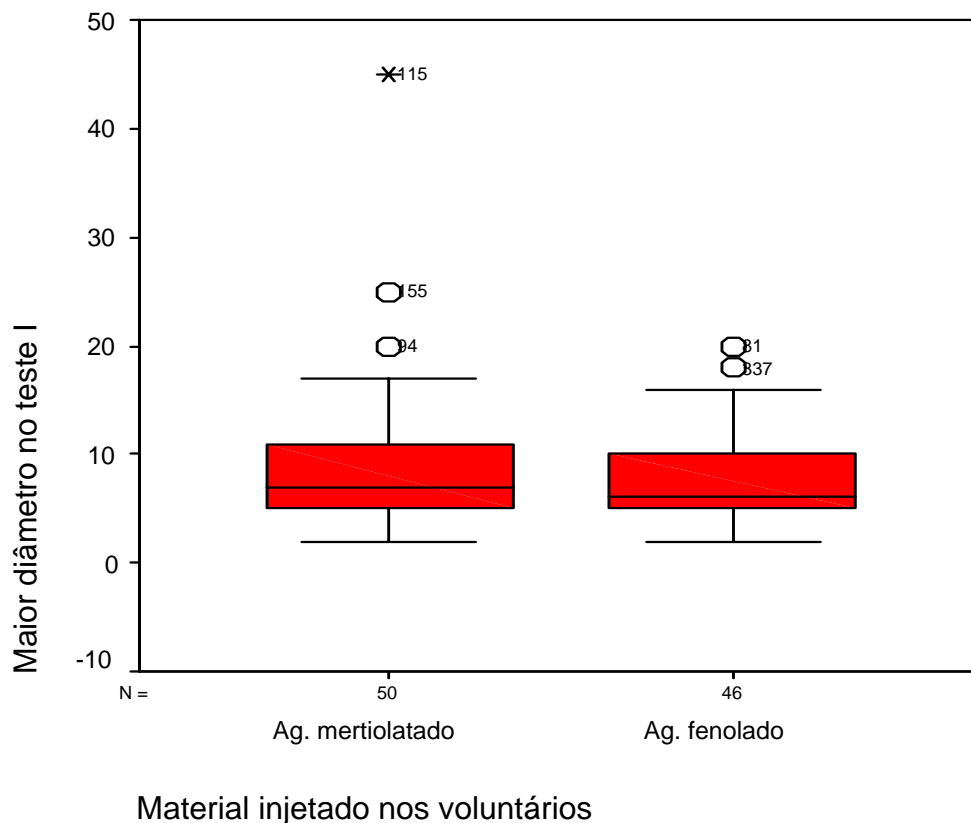
**Tabela 3: Estudo I- Comparação entre as médias das endurações nos voluntários testados com antígeno fenolado ou mertiolatado**

Grupo / reativo utilizado		N	Mínima	Máxima	Média (IC 95%)	Desvio padrão	$p$
I-	Antígeno mertiolatado	50	2	45	8,86 (6,89-10,83)	6,916	0,338
II-	Antígeno Fenolado	46	2	20	7,50 (6,23- 8,77)	4,293	

Em relação à distribuição dos diâmetros das endurações, podemos considerar que os antígenos mertiolatado e fenolado comportaram-se de forma similar em relação à potência, ou seja, à intensidade da reação apresentada pelos voluntários.



Destaca-se que essa análise só foi possível por se tratar de população extremamente homogênea, conforme anteriormente mostrado.



**Figura 8: Estudo I- Distribuição dos diâmetros das endurações para os indivíduos sadios testados com antígenos fenolado e mertiolatado**

#### 4.1.4 Reações positivas às salinas mertiolatada ou fenolada

Em relação aos voluntários que receberam salina mertiolatada ou fenolada no primeiro teste (pertencentes aos grupos III e IV), 9 de 97 voluntários testados com salina mertiolatada foram positivos, enquanto nenhum dos 100 voluntários foi positivo ao primeiro teste com a salina fenolada (Tabela 2). Assim sendo, na população submetida ao teste inicial com os veículos apenas, a hipersensibilidade ao timerosal ocorreu na taxa de 9,27 %. A reação cutânea local a esse produto foi também morfológicamente idêntica a uma resposta positiva padrão ao antígeno de *Leishmania*, quer mertiolatado ou fenolado.

No segundo teste, foram considerados alérgicos ao timerosal os 13/41 positivos ao reteste com salina mertiolatada no grupo I, os 14/81 no grupo IV e os 5/51 no grupo II, perfazendo 41 indivíduos. Os 9 voluntários do grupo III positivos

ao teste inicial com salina mertiolatada foram retestados com soro fisiológico e foram todos negativos. Foram considerados alérgicos ao fenol 4 voluntários positivos ao reteste (4,8%), sendo 1/33 do grupo II e 3/50 do grupo I (Tabela 2).

A positividade ao timerosal e ao fenol foi comparada entre os 257 voluntários que receberam cada conservante uma única vez e os que receberam mertiolate ou fenol duas vezes, para verificar se o timerosal ou o fenol poderiam apresentar efeito sensibilizante da primeira aplicação sobre a segunda, o que poderia ser verificado se a positividade no grupo que recebeu cada reativo duas vezes fosse maior do que no que recebeu apenas uma vez.

Dos 125 negativos que receberam salina mertiolatada no reteste, 19 foram positivos (15,2%) e dos 132 que receberam salina fenolada, 3 foram positivos (2,2%) (Tabela 2). Dos voluntários que receberam antígenos no teste inicial e foram positivos, 41 receberam salina mertiolatada no reteste e 13 foram positivos (31,7%), enquanto 33 receberam salina fenolada e 1 foi positivo (3,0%). A proporção de positivos ao reteste entre os que receberam timerosal ou fenol duas vezes foi significativamente maior do que entre os que receberam o conservante uma única vez ( $\chi^2= 6,22$ ,  $p < 0,05$  para o timerosal e  $\chi^2= 4,98$ ,  $p < 0,05$  para o fenol), mostrando que ambos os compostos podem sensibilizar os voluntários, quando aplicados mais de uma vez.

No total de testes e retestes, 331 voluntários receberam salina mertiolatada e 326 receberam salina fenolada. Assim sendo, a positividade ao timerosal foi de 41/331 voluntários, ou seja 12,38 %. A positividade ao fenol foi de 4/326 voluntários, ou seja, 1,2%. A diferença na proporção de positivos aos dois compostos é estatisticamente significante ( $p= 0,0001$ , teste  $\chi^2$  de Pearson). A alta taxa de hipersensibilidade ao timerosal encontrada neste estudo confirma achados anteriores mostrando a capacidade do timerosal em estimular reações de hipersensibilidade do tipo 4 (LEBREC, BACHOT et al., 1999) e, curiosamente, numa frequência mais elevada entre militares jovens (FORSTROM, HANNUKSELA et al., 1980), possivelmente devido ao maior número de vacinas que a população militar recebe durante a vida adulta. O aumento da cobertura vacinal da população, aliás, pode estar envolvido na hipersensibilização a este produto, já que muitas vacinas

produzidas até os dias de hoje ainda contem timerosal (<http://www.fda.gov/cber/vaccine/thimerosal.htm#t2>).

**Tabela 4: Estudo I- Frequência de hipersensibilidade ao timerosal ou ao fenol na população sadia estudada.**

Grupo/ utilizado	reativo	Voluntários (Diâmetro $\geq 5$ mm)		Total positivos/ n <sup>o</sup> testes	(%)
		Teste Inicial (n <sup>o</sup> )	Reteste (n <sup>o</sup> )		
III mertiolatada	-Salina	9	32	41/ 331	12,4
IV - Salina fenolada		0	4	4/ 326	1,2

#### 4.1.5 Reações observadas nos indivíduos sadios - efeitos adversos

Entre os voluntários sadios, o timerosal também esteve associado a um maior aparecimento de eritema e edema no local do teste intradérmico (Teste  $\chi^2$  de Pearson= 3,75,  $p < 0,05$ ), embora nenhum efeito adverso expressivo local e nenhuma manifestação sistêmica tenham sido associados ao teste de Montenegro, independentemente do veículo, nem com os dois veículos utilizados isoladamente (Tabela 5). Não encontramos na literatura estudo sistematizado para investigação de efeitos adversos á IDR.M.

**Tabela 5: Estudo I- Número de voluntários sadios apresentando reações locais ou sistêmicas aos testes intradérmicos realizados**

Reações locais/ sistêmicas			Grupos <sup>(1)</sup>				
			I	II	III	IV	Total
Edema/eritema (s/enduração)	local	Teste inicial	5	2	3	0	10
		Reteste	0	1	0	4	5
Prurido local		Teste inicial	29	29	17	1	76
		Reteste	3	3	0	5	11
Dor e/ou lesão bolhosa local, febre, urticária,		Teste inicial	0	0	0	0	0
		Reteste	0	0	0	0	0

(1) I- antígeno mertiolatado; II- antígeno fenolado; III- salina mertiolatada a 1:10000; IV- salina fenolada a 0,4 %

O aparecimento de prurido local esteve associado ao recebimento de antígeno de *Leishmania* no teste inicial, quer em salina fenolada ou mertiolatada (Teste  $\chi^2$  de Pearson= 33,27,  $p < 0,0001$ ). O prurido local foi discreto e ocorreu em 29 de 102 voluntários testados com antígeno mertiolatado (28,4%) e em 29 dos 101 testados com antígeno fenolado (28,7%). Ao reteste, todas as reações observadas ocorreram apenas nos voluntários que receberam a salina mertiolatada.

A alta positividade ao timerosal encontrada na população estudada, bem como a morfologia da reação local observada frente ao antígeno de *Leishmania* e ao timerosal aplicado isoladamente enfatiza a necessidade da retirada deste composto da fabricação de antígenos para teste intradérmico. Além disso, apesar do teste ter sido considerado seguro e bem aceito pelos voluntários participantes, o timerosal esteve mais associado com a ocorrência de reações locais diferentes de enduração, quer no teste inicial ou no reteste.

Decorrentes destas observações, os dados do Estudo I foram encaminhados aos produtores do antígeno de Montenegro FIOCRUZ antes mesmo de sua publicação, considerando tratar-se de um problema de Saúde Pública a ser resolvido. Os produtores do antígeno trocaram o conservante utilizado (de timerosal para fenol) e encaminharam à ANVISA documentação para o registro do antígeno com o novo preservativo. A seguir, foram publicados (Anexo VII)

#### **4.1.6 Positividade à IDRM e as variáveis estudadas**

Descartados os voluntários caracterizados como alérgicos ao timerosal ou ao fenol, cerca de 30 % dos voluntários testados com antígeno de Montenegro mostraram-se positivos. A positividade à IDRM em voluntários sem sintomatologia ou histórico anterior de leishmanioses e viagens a áreas sabidamente endêmicas da doença sugere contato com o parasito na própria área estudada, ou em suas imediações. Visando afastar outros possíveis fatores de confusão, avaliamos a associação da positividade ao teste nos voluntários com o histórico de recebimento de vacinas, alergia, utilização de medicamentos e realização de testes anteriores, a fim de verificar se essas variáveis poderiam estar influenciando o aparecimento de uma resposta positiva à IDRM.

No entanto, a positividade à IDRM não se associou ao recebimento de vacinas pelos voluntários dos quatro grupos estudados, nem a presença ou antecedentes de

doenças alérgicas, uso prévio de medicamentos ou realização de testes intradérmicos anteriores, conforme os dados da Tabela 6. As diferenças estatísticas entre as proporções não foram significativas, de acordo com o teste  $\chi^2$  de Fischer.

**Tabela 6: Estudo I- Associação entre a positividade aos testes intradérmicos e as variáveis estudadas**

Variáveis	Teste Inicial (n=400)			Reteste (n=340)			
	+	-	p	+	-	p	
Vacinação prévia	Sim	65	231	1.000	30	223	0.230
	Não	22	82		6	81	
História de alergias	Sim	20	59	0.446	8	59	0.238
	Não	67	254		28	245	
Uso prévio de medicamentos	Sim	8	46	0.217	4	41	1.000
	Não	267	79		32	263	
Uso tópico de Timerosal	Sim	77	269	0.745	32	260	0.800
	Não	10	43		4	44	

#### 4.1.7 Reações tardias após a leitura em 48 horas

No presente estudo, foi evidenciado que 4,5% dos voluntários sadios, testados com antígeno de *Leishmania* e negativos à leitura de 48 horas, apresentaram após 10 dias desta leitura, uma reação local compatível clinicamente com resposta positiva à IDR (Tabela 7).

O acompanhamento dos voluntários na área permitiu avaliá-los novamente, após 10 a 15 dias da aplicação dos testes intradérmicos tanto com os antígenos quanto com os veículos apenas. O interesse em aprofundarmos essa observação, através de metodologia desenhada especificamente, deve-se ao achado anterior de nosso grupo de pesquisa durante estudo de Fase I de vacina anti-*Leishmania* em voluntários *militares* sadios.

Ressaltamos que essa chamada “reação tardia”, nunca fora descrita em indivíduos sadios e que, neste estudo, ocorreu apenas em voluntários testados com antígeno, sugerindo resposta específica a antígenos de *Leishmania*. No entanto, foi

significativamente mais freqüente naqueles que receberam antígeno mertiolatado em comparação ao fenolado ( $p= 0,0000$ , teste  $\chi^2$  e exato de Fischer ) (Tabela 7).

**Tabela 7: Estudo I- Aparecimento de Reação Tardia, entre 10 a 15 dias após a realização de IDRМ, em indivíduos negativos na leitura após 48 horas.**

Presença de Grupos <sup>(1)</sup> (%)	"Reação Tardia"				
	I	II	III	IV	Total
Negativo	49 (81,6)	62 (95,3)	88 (100)	100 (100)	299 (95,5)
Positivo	11(18,3)	3 (4,6)	0 (0)	0 (0)	14 (4,5)
Total	60 (100)	65 (100)	88 (100)	100 (100)	313 (100)

. (1) I- antígeno mertiolatado; II- antígeno fenolado; III- salina mertiolatada a 1:10000; IV- salina fenolada a 0,4 %;

Fica difícil afirmar que a ocorrência dessa reação entre 1 a 2 semanas após a aplicação do antígeno represente positividade á IDRМ e, portanto, possível exposição prévia a *Leishmania* ou infecção subclínica. Poder-se- ia considerar, neste estudo, que a reação tardia observada estivesse eventualmente associada a vacinas contendo timerosal, recebidas pelos voluntários na semana posterior à aplicação da IDRМ, devido ao predomínio de voluntários do grupo I apresentando reação tardia. No entanto, merece destaque o fato de que os voluntários que receberam apenas salina mertiolatada ou fenolada não apresentaram reação tardia, sugerindo que esta reação esteja associada de alguma forma à resposta imunológica frente à *Leishmania*. Além disso, a proporção de voluntários sadios apresentando reação tardia ao antígeno fenolado (4,6%) foi, curiosamente, similar à descrita por Rabello et al (1945) (5%) em pacientes suspeitos de LTA testados com antígeno de Montenegro fenolado.

Esses resultados encontram-se submetidos a publicação (Anexo VIII)

## 4.1.8 Reavaliação clínica e laboratorial dos indivíduos testados

### 4.1.8.1 Aspectos clínicos

A reavaliação clínica incluiu um total de 151 voluntários, correspondentes a: 60 positivos aos antígenos de Montenegro com timerosal e fenol, 4 positivos ao antígeno mertiolatado no primeiro teste e não retestados, 22 alérgicos ao timerosal ou fenol (dos grupos I e II) e 65 voluntários totalmente negativos (dos 4 grupos estudados).

Esta etapa, seguinte à verificação dos resultados da IDRМ em área supostamente indene de LTA, envolveu a busca minuciosa de sinais/sintomas, atuais ou progressos, de leishmanioses, os quais pudessem justificar a positividade encontrada à IDRМ.

Ao exame clínico geral e dermatológico não foram evidenciadas cicatrizes sugestivas de leishmaniose tegumentar nem alteração compatível com leishmaniose visceral em nenhum dos voluntários examinados. Ao exame otorrinolaringológico, não se verificou nenhuma alteração ou lesão em mucosas da cavidade oral e vias aéreas altas.

A observação de cicatrizes não sugestivas de LTA em 83 dos 151 voluntários examinados (Tabela 8) não foi associada à positividade a IDRМ ( $\chi^2= 0,058$ , Teste de Pearson,  $p= 0,869$ ).

**Tabela 8: Presença de cicatrizes cutâneas nos voluntários sadios reavaliados**

Resultado da IDRМ	Presença de cicatriz cutânea		Total
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
<i>Positivo</i>	35 (53,8%)	30 (46,15%)	65 (100)
<i>Negativo</i>	48 (55,81%)	38 (44,18%)	86 (100)
<i>Total</i>	83 (54,96%)	68 (45,03%)	151 (100)

O número de cicatrizes verificadas variou de 1 a 5, localizadas principalmente nos membros inferiores e superiores, e relacionadas pelos voluntários à ocorrência de traumas locais. Embora eles relatassem episódios de caçadas e pescarias em regiões silvestres da área de estudo, negaram que as cicatrizes estivessem associadas a picadas de insetos.

#### 4.1.8.2 Aspectos laboratoriais

Visando ampliar a avaliação da infecção subclínica, embora sabendo-se da baixa possibilidade de sorologia positiva para antígenos de *Leishmania*, infectados e mesmo doentes, foram realizados nos mesmos grupos de voluntários acima referidos, testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA. Nenhum voluntário apresentou anticorpos anti - *Leishmania*.

Para eliminar mais alguns possíveis fatores de confusão, os 151 voluntários foram também submetidos às sorologias para *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, agentes comumente presentes na área de estudo, acrescentando-se, no caso do *T. cruzi*, a similaridade com *Leishmania* (ambos da família *Trypanosomatidae*) com reatividade cruzada na sorologia. Além disso, antígenos de *T. cruzi* podem induzir resposta imediata local em pacientes com leishmaniose (SHAW e LAINSON, 1975). Dos 151 voluntários, 75% apresentaram anticorpos anti *T. gondii* e 3,3% apresentaram anticorpos anti *T. cruzi*, positividade esperada para a área de estudo.

A positividade sorológica ao *T. gondii* e ao *T. cruzi* não se associaram à positividade da IDR (  $\chi^2= 0,058$ , Teste de Pearson ,  $p= 0,869$ ).

#### 4.1.8.3 Presença de DNA de *Leishmania* nos voluntários examinados

Considerando a possibilidade de infecção subclínica na área de estudo e a inexistência de evidências de reatividade cruzada que pudessem explicar a positividade à IDR, os 151 voluntários sadios foram examinados para detecção de DNA de *Leishmania* pela PCR em sangue periférico.

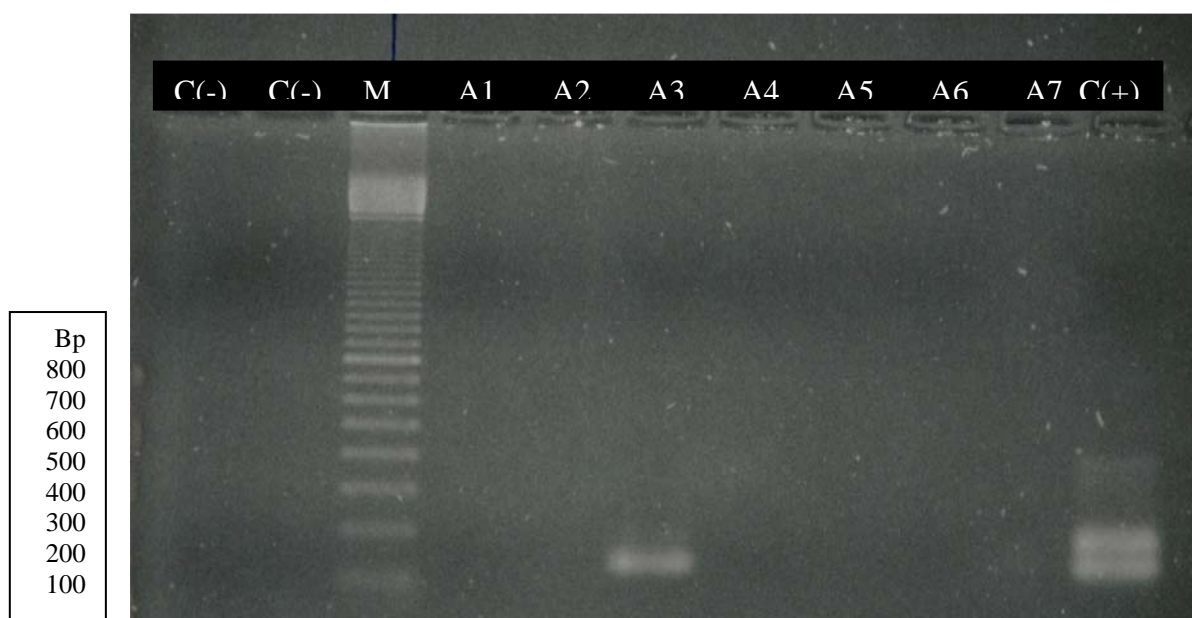
Na avaliação pela PCR, foi evidenciada a presença de DNA de *Leishmania* (*Viannia*) em um voluntário, positivo à IDR com antígeno mertiolatado (Figura 8). O DNA obtido foi transferido para membrana de nitrocelulose e hibridizado com sondas subgênero- específicas, tendo sido identificado como pertencente a *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

O voluntário positivo era natural da área de estudo e não possuía história de viagens ou moradia em áreas endêmicas de leishmanioses. Também não apresentava história ou presença de alergias/doenças alérgicas. No entanto referiu atividades de caça e acampamento em região de mata localizada dentro da área de estudo (município de Santa Maria).



Considerando os 60 indivíduos positivos aos testes com antígeno de Montenegro (Tabela 2) submetidos à PCR, a positividade desta reação foi de 1/60 indivíduos (1,6 %). Na ocasião, conforme já referido, a região de estudo era considerada indene em relação à LTA.

O encontro da PCR positiva na área de estudo foi submetido a publicação (Anexo IX)



**Figura 9: Estudo I- Detecção de DNA de *Leishmania* em indivíduos assintomáticos.**

As taxas de positividade encontradas, juntamente com este caso positivo à PCR, sugeriam fortemente a possibilidade de doença na região, ou em fase de instalação, representada pelo predomínio de casos subclínicos, uma vez que, como de regra nas doenças infecciosas, a doença costuma ser a ponta do “iceberg” de uma base, certamente variável, de casos assintomáticos. No caso da LTA e de outros processos infecciosos nos quais a cura clínica pode se dar espontaneamente, os primeiros casos notificados se sucedem a períodos mais ou menos longos de silêncio epidemiológico da doença.

Assim é que, seguindo-se ao achado que consideramos indicativo da doença na região, entramos em contato com a Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande

do Sul para que fossem atentos a possível surgimento de casos eventualmente suspeitos de leishmaniose cutânea ou mucosa. Dessa forma, foram diagnosticados posteriormente, por análise histopatológica, os primeiros casos de LTA no Rio Grande do Sul e, de 2001 a 2006, de acordo com o SINAN WEB (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>), o Rio Grande do Sul notificou 17 casos autóctones confirmados por histopatologia.

Estes achados corroboraram os dados deste estudo, não somente a validade da PCR positiva como indicadora de infecção subclínica, como também a relevância das taxas de positividade à IDRMM encontradas, as quais, excluídos os alérgicos ao veículo da reação, deverão estar associadas à presença do parasito na área de estudo.

Deve, por consequência das presentes observações, ser considerado que, em inquéritos epidemiológicos de LTA, estudos amostrais com IDRMM e PCR representam ferramentas úteis na Vigilância, cujas relações de associação para definição de graus de risco de transmissão envolvendo infecção e doença, merecem vir a ser estudadas. Especificamente em relação à PCR, como desdobramento desta pesquisa, estudos estão em andamento buscando o encontro do DNA de *Leishmania* em outras populações do Rio Grande do Sul, incluindo animais domésticos.

Em relação à IDRMM, convém ainda destacar que o Estudo I permitiu identificar o melhor antígeno para o Teste de Montenegro, em relação ao preservativo utilizado e à segurança e inocuidade do teste, em adultos jovens e sadios.

## **4.2 Estudo II- Avaliação da IDRM em pacientes**

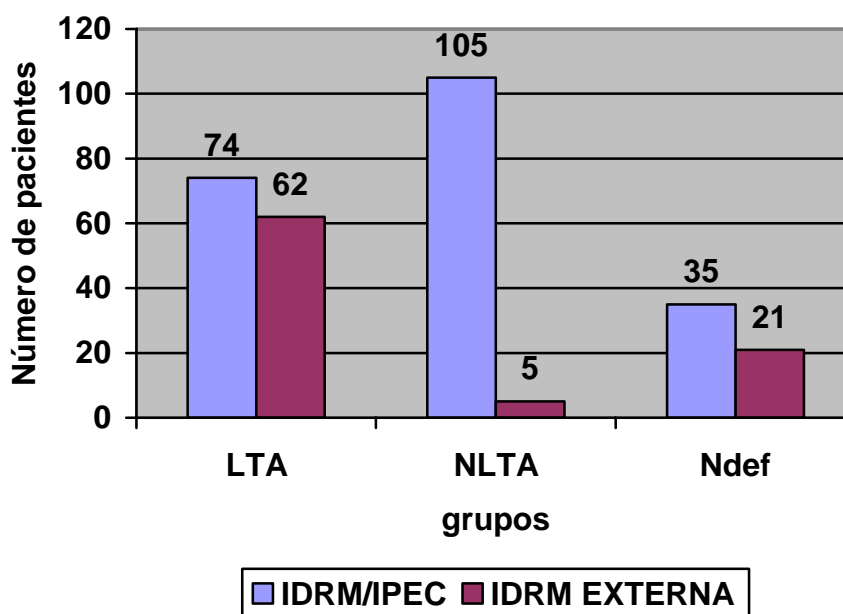
Conforme já considerado na Introdução como justificativa para o Estudo II, ancorada em determinações da vigilância Sanitária e outras, o devido uso da IDRM requeriria avaliações e não somente de natureza diagnóstica. Assim, os resultados deste estudo referem-se ao estabelecimento do melhor protocolo para a aplicação e leitura do teste de Montenegro, considerando avaliação de inocuidade e segurança, bem como a possível ocorrência de reações imediatas ou tardias em pacientes. Além disso, envolvem a comparação de seu valor diagnóstico com exames parasitológicos tradicionais e com a PCR.

Foram atendidos no IPEC 302 pacientes, no período de 21 de março de 2005 a 24 de março de 2006. Entretanto, para a análise específica do Teste de Montenegro (item 4.2.7) foram incluídos 214 pacientes que corresponderam àqueles cujo teste foi realizado pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os outros 88 pacientes, que não o realizaram no IPEC porque vieram referenciados pelo resultado do teste feito em outros setores da rede de saúde, participaram da rotina laboratorial e foram biopsiados, contribuindo para a avaliação da PCR.

### **4.2.1 Constituição dos grupos de pacientes conforme caracterização da etiologia da doença**

Após os resultados do diagnóstico etiológico pelos diferentes métodos utilizados, os 302 pacientes foram divididos nos seguintes grupos: (a) pacientes com leishmaniose tegumentar confirmada laboratorialmente (LTA) (N=136), (b) pacientes com outra etiologia confirmada clínica ou laboratorialmente (NLTA) (N=110) e (c) pacientes com diagnóstico não definido (NDef) (N=56).

A Figura 10 mostra o número de pacientes dos 3 grupos de estudo, de acordo com o local de realização do Teste de Montenegro.



**Figura 10: Estudo II - Distribuição dos pacientes segundo diagnóstico e local de realização do Teste de Montenegro**

#### 4.2.2 Perfil clínico-epidemiológico segundo os grupos de pacientes

Considerando que parte dos pacientes (88 casos) realizou Teste de Montenegro fora do IPEC, verificamos se este grupo diferiu clínica e epidemiologicamente do grupo cujo teste foi realizado internamente, para certificação da homogeneidade da casuística estudada e de que os pacientes que realizaram o teste no IPEC constituem-se uma amostra representativa de todos os atendidos no ambulatório. Não houve diferença de perfil clínico-epidemiológico entre os pacientes participantes cujo teste foi realizado pelo IPEC e os demais, quanto a procedência ( $\chi^2 = 6,442$ ,  $p = 0,092$ ), idade ( $\chi^2$  de Pearson = 1,772,  $p = 0,183$ ), sexo ( $\chi^2 = 6,442$ ,  $p = 0,092$ ), tempo de história clínica da LTA ( $\chi^2 = 6,442$ ,  $p = 0,092$ ), forma clínica de leishmaniose apresentada ( $\chi^2 = 6,442$ ,  $p = 0,092$ ) e número de lesões ( $\chi^2 = 6,442$ ,  $p = 0,092$ ).

##### 4.2.2.1 Descrição dos pacientes quanto a procedência

A distribuição dos pacientes segundo a procedência e o diagnóstico é apresentada na Tabela 9. Deve refletir, com grande sensibilidade, as áreas de maior ocorrência de LTA, uma vez que o CRLeish é um centro de referência aberto a pacientes de quaisquer procedências. Portanto, em geral, eles são encaminhados após avaliação inicial e apresentando clínica sugestiva. Porém, a demanda espontânea

também ocorre, sobretudo representada por pessoas que convivem com a doença em suas regiões de residência e que, a um sinal suspeito, procuram atendimento especializado. Por essa razão, a casuística estudada é procedente de alguns bairros do Rio de Janeiro e de vários municípios do Estado a distâncias diferenciadas do CRLeish.

**Tabela 9: Estudo II - Procedência dos pacientes estudados, de acordo com o grupo de diagnóstico**

<i>Procedência</i>	<i>Grupo (Nº/%)</i>			<i>Total</i>
	LTA	NLTA	NDef	
Campo Grande (RJ)	34 (25,0)	13 (11,8)	5 (10,4)	52 (17,6)
São Fidélis	18 (13,2)	13 (11,8)	10 (20,8)	41 (13,9)
Nova Iguaçu	14 (10,2)	12 (10,9)	6 (12,5)	32 (10,8)
Bangu (RJ)	13 (9,5)	10 (9,0)	3 (6,2)	26 (8,8)
Realengo (RJ)	6 (4,4)	4 (3,6)	1 (2,0)	11 (3,7)
Paracambi	5 (3,6)	0	0	5 (1,7)
Senador Camará (RJ)	3 (2,2)	1 (0,9)	1 (2,0)	5 (1,7)
Padre Miguel (RJ)	3 (2,2)	2 (1,8)	0	5 (1,7)
Mesquita	2 (1,4)	6 (5,4)	2 (4,1)	10 (3,4)
Seropédica	2 (1,4)	2 (1,8)	1 (2,0)	5 (1,7)
Itaguaí	2 (1,4)	2 (1,8)	0	4 (1,3)
Senador Vasconcelos (RJ)	2 (1,4)	0	0	2 (0,6)
Duque de Caxias	0	12 (10,9)	1 (2,0)	13 (4,4)
Belford Roxo	0	7 (6,3)	1 (2,0)	8 (2,7)
São João de Meriti	1 (0,7)	5 (4,5)	1 (2,0)	7 (2,3)
Nilópolis	0	5 (4,5)	1 (2,0)	6 (2,0)
Rio de Janeiro (outros municípios)	7 (5,1)	10 (9,0)	8 (16,6)	25 (8,5)
Rio de Janeiro (outros bairros)	24 (17,6)	6 (5,4)	7 (14,5)	103 (35,0)
<b>Total</b>	<b>136 (100)</b>	<b>110 (100)</b>	<b>48 (100)</b>	<b>294 (100)</b>

A Tabela 9 mostra que o bairro de Campo Grande, na capital do Estado, contribuiu com 17,6 % do total de pacientes atendidos e 25 % do total de pacientes

diagnosticados como LTA. Segue-se em frequência o município de São Fidélis, localizado na região noroeste do Estado do Rio, que contribuiu com 13,9 % dos pacientes estudados, mas se destacando pela maior proporção de pacientes do grupo de diagnóstico não definido (21 %). Tal fato pode ser explicado por se tratar de um município sensibilizado para a doença como área de transmissão recente, e em razão de diferentes treinamentos e capacitações realizados pela equipe do CRLeish que, além da difusão de informações pertinentes à LTA, coloca a disposição recursos para o diagnóstico e tratamento especializado dos pacientes.

Por outro lado, à medida que aumentem as iniciativas visando a descentralização dos serviços, o perfil dos pacientes referenciados deverá mudar, restringindo-se aos casos mais incomuns, enquanto a maioria será diagnosticada e tratada na proximidade de suas residências. É o que se espera com a capacitação da Rede Pública de Saúde, para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes evitando grandes deslocamentos.

#### **4.2.2.2 Descrição dos pacientes quanto a faixa etária**

A distribuição por idade dos 136 pacientes com LTA confirmada (Figura 11) mostra que a leishmaniose ocorreu em todas as faixas etárias, sendo 20 (14,7 %) deles menores de 15 anos. Tal perfil é compatível com a forma de transmissão domiciliar ou peridomiciliar da leishmaniose, conforme descrito em áreas periurbanas/urbanas de LTA (MARZOCHI, COUTINHO et al., 1980; SABROZA, 1981; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; AMPUERO, URDANETA et al., 2005). Entretanto, a análise da distribuição das idades dos pacientes dos 3 grupos de diagnóstico mostrou distribuição similar em comparação com o grupo NLTA, sendo a proporção etária diferente para o grupo com diagnóstico não definido ( $\chi^2$  de Pearson = 15,269,  $p = 0,018$ ).

No grupo NLTA, o diagnóstico mais frequente foi de esporotricose, cujo padrão de transmissão no Rio de Janeiro, de regra através de contato com o gato da casa, é também domiciliar (SCHUBACH, SCHUBACH, BARROS et al., 2005; SCHUBACH, SCHUBACH e BARROS, 2005)

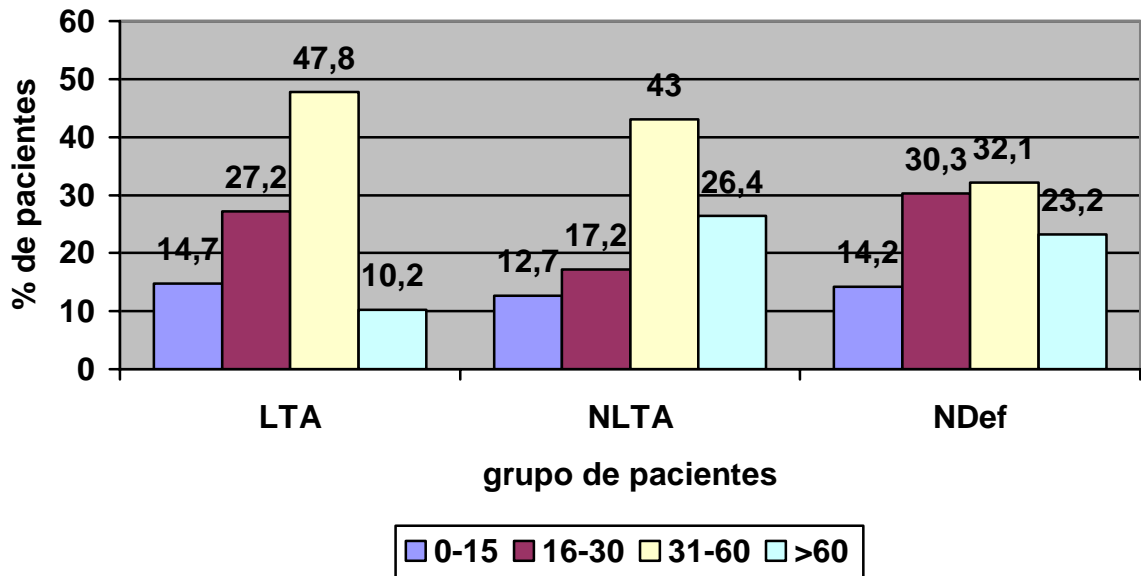


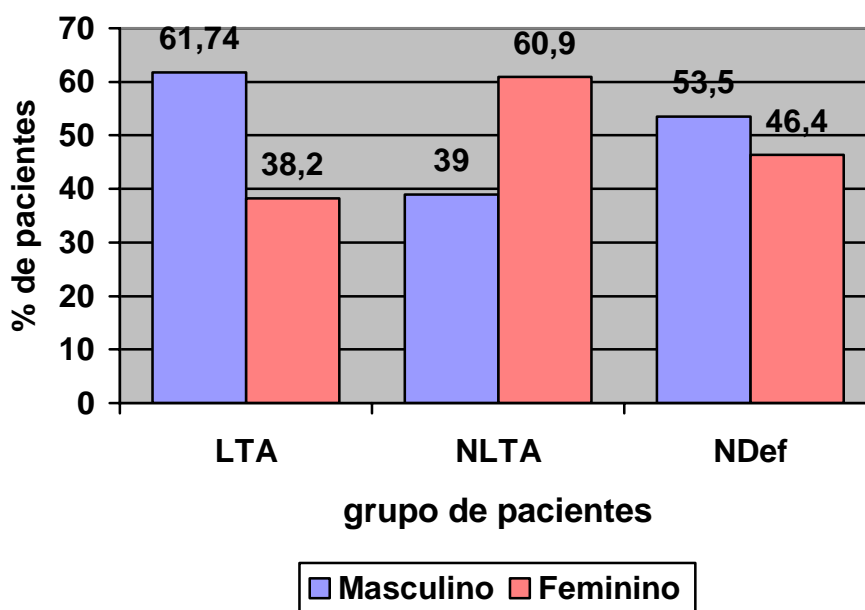
Figura 11: Estudo II- Distribuição etária dos pacientes estudados, por grupo de diagnóstico. Valores expressos em porcentagem\*.

\*Número de pacientes por grupo e faixa etária, em anos: LTA: 0-15= 20; 16-30=37; 31-60= 65; >60=14; NLTA: 0-15=14; 16-30=19; 31-60= 48; >60=29; NDef: 0-15=8; 16-30=17; 31-60= 18; >60=13

#### 4.2.2.3 Descrição dos pacientes segundo o sexo

Em relação ao sexo, predominaram significativamente os pacientes masculinos no grupo LTA ( $\chi^2 = 12,69$ ,  $p = 0,002$ ) (Figura 12) . Este perfil é também similar ao encontrado em áreas endêmicas de leishmanioses nas quais a doença costuma ser associada à atividade profissional (MARZOCHI, 1992; DESJEUX, 2001), e também foi observado após análise dos casos de LTA ocorridos no estado do Rio de Janeiro no período de 1995 a 2006 (Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, comunicação pessoal).

Entretanto, o predomínio do sexo masculino no grupo LTA em todas as faixas etárias, incluindo os menores de 15 anos, não poderia ser justificado pela atividade profissional. Considerando-se a hipótese de transmissão domiciliar e peridomiciliar no Rio de Janeiro, principalmente esta última, surgem duas questões: (a) maior possibilidade de permanência do sexo masculino na área peridomiciliar e (b) maior suscetibilidade do sexo masculino, provavelmente imunogenética, como costuma ocorrer com a maioria das doenças transmissíveis (MARZOCHI, CAMILLO-COURA et al., 1981b; a; GREEN, 1992; MARRIOTT e HUET-HUDSON, 2006).



**Figura 12: Estudo II- Pacientes estudados, por sexo e grupo de diagnóstico. Valores expressos em porcentagem\***

\*Número de pacientes, por sexo e grupo: LTA: masculino=84; feminino=52; NLTA: masculino=43;feminino=67;NDef: masculino=30;feminino=26.

### 4.2.3 Caracterização dos pacientes com LTA

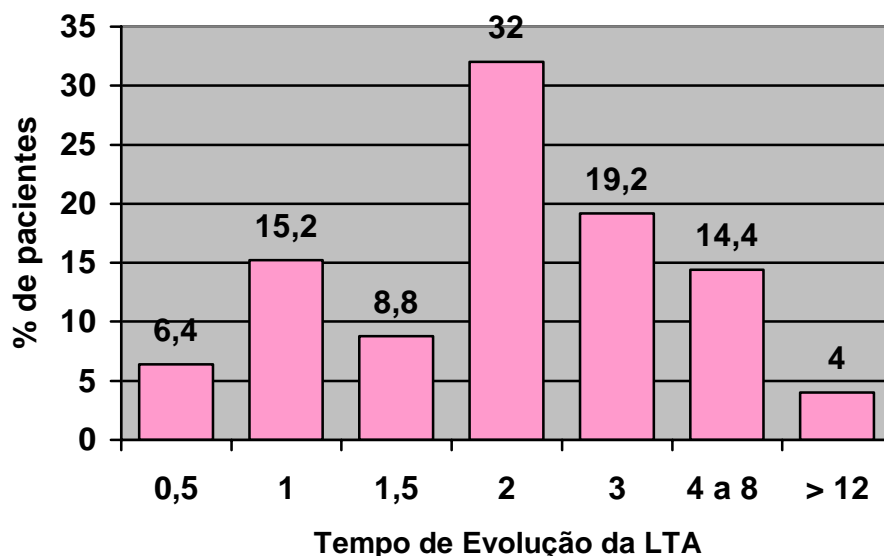
#### 4.2.3.1 Tempo de história clínica

O tempo referido do início da doença nos pacientes com LTA, do aparecimento da lesão até o atendimento no CRLeish, variou de 15 dias a 52 meses entre os 125 casos dos quais essa informação estava disponível (Figura 13). Trinta e oito pacientes (30,6%) foram atendidos antes que a doença completasse dois meses de evolução, talvez devido ao freqüente conhecimento prévio de sua existência, muitas vezes pela ocorrência de um ou mais de um caso na mesma residência. Ainda que em um contexto, onde se pressupõe a existência de atenção hierarquizada, incluindo centros de referência para atendimento e formação de pessoal pelo SUS, alguns pacientes permaneceram anos com leishmaniose não diagnosticada ou por vezes tratada erroneamente.

A maioria dos casos foi atendida com tempo de evolução entre 2 e 3 meses (51,6%). Contudo, a partir de 45 dias de história clínica os resultados dos exames parasitológicos e da IDRМ já seriam positivos, destacando-se que a sensibilidade do



diagnóstico parasitológico decresce com o aumento do tempo de evolução da doença, principalmente a partir do 3º mês de evolução.



**Figura 13: Estudo II- Distribuição dos pacientes com LTA segundo tempo de história clínica, em meses\*.**

\* Número de pacientes, por tempo de história clínica, em meses: 0,5=8; 1,0=19; 1,5=11; 2=40; 3=26; 4-8= 17; >12 meses= 5

#### **4.2.3.2 Distribuição dos pacientes de LTA segundo forma clínica e número de lesões**

Em relação ao grupo de pacientes com LTA (n=136), 120 (88,2%) apresentavam a forma cutânea da doença e 16 (11,7%) a forma mucocutânea (Figura 14). Este valor é mais elevado do que o encontrado em estudos anteriores envolvendo pacientes do Rio de Janeiro, do próprio IPEC (OLIVEIRA-NETO, PIRMEZ et al., 1988), onde, desde 1989, integrou-se à rotina clínica a realização do exame otorrinolaringológico sistemático de todos os pacientes atendidos com suspeita de LTA, mesmo que não apresentassem alterações em mucosa oral ou sintomatologia associada ao trato respiratório superior. Estudo recente, do mesmo autor, também realizado no IPEC (DE OLIVEIRA-NETO, MATTOS et al., 2000) mostrou resultados similares (12 %) aos observados nesta pesquisa.

Do total de 136 pacientes com a forma cutânea da LTA, 5 não tinham o registro do número de lesões. Dos 131 restantes, 60,3% (n=79) apresentavam lesão única. Entre os pacientes com mais de uma lesão - 40 % (n=52) - 13 apresentavam de

4 a 8 lesões e 9 (6,9%), mais de dez lesões, sendo 47 o número máximo de lesões observadas num mesmo paciente.

Entre os 16 pacientes com lesões mucosas/mucocutâneas, 12 apresentaram acometimento nasal, dos quais 8 com lesão única no nariz e 4 com acometimento associado ao de outras mucosas; dos 5 pacientes que apresentaram lesão em laringe, em dois esta localização foi isolada (Tabela 10). Além desses 16 pacientes com forma mucocutânea por LTA, outros 23 apresentaram lesões sugestivas na mucosa ao exame; no entanto, tais lesões não se confirmaram laboratorialmente como LTA.

Essas observações demonstram não somente a importância do otorrinolaringologista integrando a equipe multiprofissional na atenção à LTA e seus diagnósticos diferenciais, como a necessidade de profissionais de laboratório qualificados e equipados para a definição da diversidade etiológica, decorrendo o tratamento adequado.

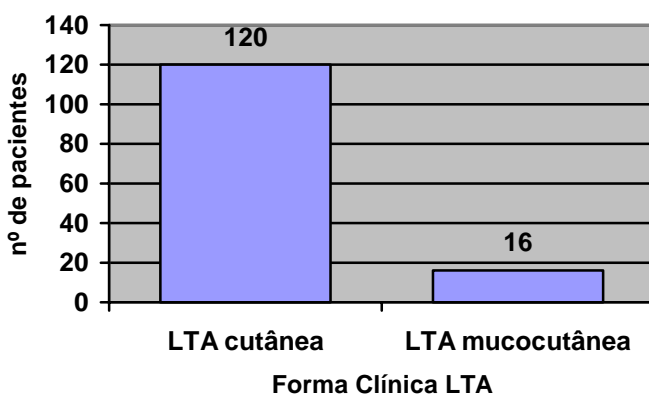
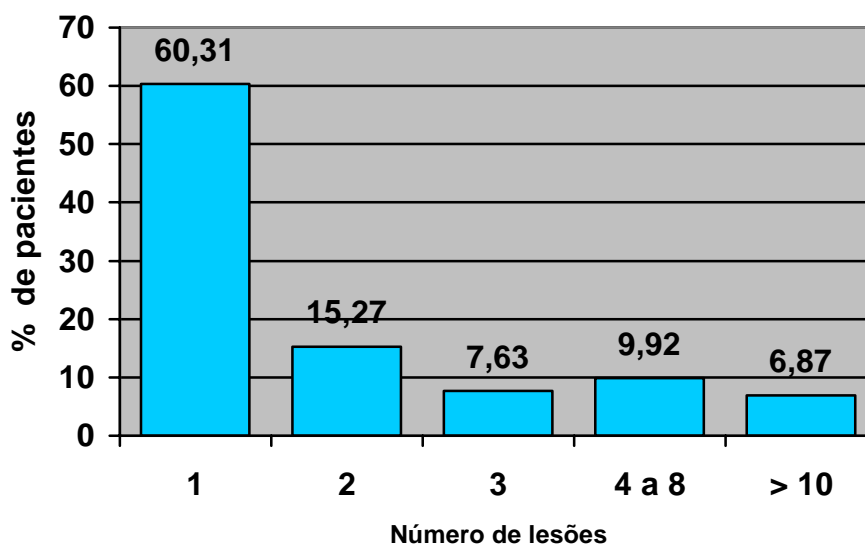


Figura 14: Estudo II- Distribuição dos pacientes de LTA segundo forma clínica da doença.

**Tabela 10: Estudo II- Localização das lesões mucosas e mucocutâneas nos pacientes com LTA**

Localização da lesão	Nº pacientes	%
Nariz	8	50,0
Boca	2	12,5
Laringe	2	12,5
Boca e nariz	1	6,2
Nariz, boca e laringe	1	6,2
Nariz e laringe	2	12,5
Total	16	100



**Figura 15: Estudo II- Distribuição dos pacientes com LTA cutânea segundo o número de lesões**

#### 4.2.3.3 Métodos de diagnóstico laboratorial

Foram 179 os pacientes submetidos à biópsia de lesão para realização de cultura, histopatologia e *imprint*, dos quais 136 tiveram o diagnóstico de LTA confirmado por um ou mais métodos. A positividade da cultura, associada ou não a outros métodos, alcançou 77,9 % entre os pacientes de LTA; este método, analisado isoladamente, constituiu-se o mais sensível, sendo positiva em 55 (40,7%) pacientes. A histopatologia foi positiva em 38,2 % dos pacientes, sendo que, isoladamente,

diagnosticou apenas 15, 5 %. O *imprint* contribuiu com a menor taxa de diagnóstico, 23,5 % (Tabela 11).

A sensibilidade desses métodos usuais de diagnóstico etiológico pode variar entre 22 % e 65 % (OLIVEIRA-NETO, PIRMEZ et al., 1988; ROMERO, SAMPAIO et al., 1999), de acordo com variáveis como tempo de evolução da doença, metodologias de coleta e de cultivo das biópsias, de coloração das lâminas de *imprint* etc. Em nosso estudo, a cultura mostrou uma sensibilidade bastante alta, diagnosticando quase 80 % dos pacientes de LTA. A adição da histopatologia e do *imprint* permitiu o diagnóstico dos 20 % restantes.

No entanto, apesar da utilização dos 3 métodos, ainda houve 34 pacientes sem confirmação diagnóstica de LTA nem de outras etiologias, tendo sido negativos aos 3 métodos parasitológicos empregados. Oito desses pacientes apresentavam uma clínica tão fortemente sugestiva que foram encaminhados para prova terapêutica de LTA. Espera-se que a adição da PCR na rotina diagnóstica possa auxiliar no esclarecimento desses casos não resolvidos pelos métodos tradicionais, considerando sua maior sensibilidade já evidenciada (PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; MEDEIROS, RODRIGUES et al., 2002; OLIVEIRA, NOVAIS et al., 2005; MARQUES, VOLPINI et al., 2006)

**Tabela 11: Estudo II- Métodos de diagnóstico laboratorial efetuados em pacientes com LTA**

<i>Exames de Diagnóstico</i>	<i>de N° positivos ao exame/ total de pacientes</i>	<i>Sensibilidade dos exames</i>
Cultura	106/136	77,9%
Histopatologia	52/136	38,2 %
Imprint	32/136	23,5 %

#### **4.2.4 Caracterização dos pacientes do grupo NLTA conforme etiologia**

A tabela 12 apresenta os diagnósticos diferenciais dos casos suspeitos de LTA caracterizados como grupo NLTA, estes também confirmados clínica e/ou laboratorialmente no IPEC.

Por motivos éticos, não foi realizada biópsia na maioria dos pacientes do grupo NLTA, pela não indicação deste procedimento para a confirmação etiológica, quando o diagnóstico podia ser feito pelo exame clínico associado ao laboratorial direto, e a dados epidemiológicos.

Entre os diagnósticos diferenciais cuja etiologia foi definida por exame de biópsia, os mais freqüentes foram de carcinoma epidermóide e de úlcera vascular.

**Tabela 12: Estudo II - Diagnósticos dos pacientes pertencentes ao grupo NLTA**

<i>Diagnóstico</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>%</i>
Esporotricose	42	38,1
Piodermite	28	25,4
Úlcera vascular	20	18,1
Carcinoma epidermóide	6	5,4
Lesão por trauma	3	2,7
Foliculite	2	1,8
Cisto epidérmico	1	0,9
Dermatofitose	1	0,9
Estrófulo	1	0,9
Granulomatose de Wegener	1	0,9
Hanseníase	1	0,9
Lêntigo solar	1	0,9
Micose por Tinea	1	0,9
Tuberculose	1	0,9
Unicólise	1	0,9
Total	110	100

Já a esporotricose, diagnosticada em cerca de 40 % dos pacientes encaminhados com suspeita de LTA, de regra sem requerer biópsia, confirma seu papel como principal doença a ser investigada entre os diagnósticos diferenciais da leishmaniose tegumentar no Rio de Janeiro. É possível que essa nosologia que, como já referimos, epidemiologicamente também se confunde com a LTA, especialmente na região sudeste do país por sua transmissão domiciliar e peridomiciliar (no caso,

através do gato, de regra), esteja presente, também, mas com baixas taxas de diagnóstico, em outros estados do país. E é importante saber descartá-la antes da realização de biópsia, que poderá ser dispensável.

#### 4.2.5 Caracterização dos pacientes do grupo NDef

O grupo NDef, de pacientes sem diagnóstico definido, correspondeu a 18,5 % da casuística total (56 pacientes). Incluiu aqueles cuja lesão cicatrizou antes da conclusão do diagnóstico (cura espontânea); os que não tiveram seu diagnóstico concluído por resultados negativos em todos os procedimentos realizados; os que abandonaram o atendimento antes da conclusão dos exames; e os que, apesar dos resultados negativos em todos os exames, apresentaram clínica e epidemiologia fortemente sugestivas de LTA a ponto de serem submetidos à prova terapêutica para leishmaniose (Tabela 13).

Embora todos os pacientes submetidos a teste terapêutico tenham apresentado cicatrização das lesões após o tratamento específico, não foram incluídos no grupo LTA porque, como dito acima, todos os exames de diagnóstico etiológico realizados foram negativos

**Tabela 13: Estudo II- Distribuição dos pacientes do grupo com diagnóstico não definido (NDef), de acordo com o desfecho do caso**

Desfecho do caso	Nº pacientes	%
Cura espontânea	17	30,3
Cura pós teste terapêutico para LTA	10	17,8
Demais	29	51,7
Total	56	100

#### **4.2.6 Padronização clínica da técnica do Teste Intradérmico de Montenegro entre pacientes com ou sem LTA**

Buscou-se o máximo detalhamento para definição de protocolo-padrão para aplicação e leitura do Teste de Montenegro, considerando (a) inexistência de especificações na RDC 233 acerca da aplicação e interpretação de testes intradérmicos, (b) natureza da IDRМ como teste diagnóstico *in vivo* e (c) necessidade de maior controle das variáveis envolvidas na IDRМ para a sua correta interpretação e comparabilidade dos resultados entre diferentes pacientes e populações.

Assim, acreditamos, mediante o estudo realizado e apresentado a seguir, será possível propor, com segurança, protocolo de aplicação e leitura da IDRМ, procurando garantir assim maior confiabilidade dos resultados e permitindo sua descentralização às diferentes unidades de Saúde. Dessa forma, alcançaríamos maior agilização do diagnóstico e do tratamento do paciente.

##### **4.2.6.1 Padronização do protocolo de aplicação**

Para a padronização da técnica de aplicação da IDRМ, foram selecionados 87 pacientes nos quais a aplicação do teste de Montenegro e o seguimento estrito pôde ser feito por profissionais do CRLeish diretamente participantes desta pesquisa, precedido de entrevista (Anexos III e V)

A observação desses pacientes desde antes da aplicação do teste, possibilitou a verificação do tamanho da pápula formada, tempo de aplicação da injeção, conforto da aplicação referido, e eventual vazamento do líquido injetado e/ou sangramento pelo orifício de introdução da agulha. A Tabela 14 resume esses dados associados ao resultado da leitura do teste após 48 horas da aplicação.

**Tabela 14: Estudo II- Comparação entre as variáveis clínicas consideradas no protocolo de aplicação e o resultado final do Teste de Montenegro.**

Variáveis	IDRM +		IDRM -		Total		% Total
	n	%	n	%	n	%	(N=87)
<b>Duração da injeção (segundos)</b>							
7-10	5	38,46	8	61,54	13	100	14,94
11-15	28	62,22	17	37,78	45	100	51,72
16-20	11	52,38	10	47,62	21	100	24,14
21-25	5	62,50	3	37,50	8	100	9,20
<b>Tolerância referida ao teste</b>							
Confortável	38	56,72	29	43,28	67	100	77,01
Pouco confortável	9	50,00	9	50,00	18	100	20,69
Desconfortável	2	100,00	0	0,00	2	100	2,30
<b>Medida da pápula (mm)</b>							
6-7	4	44,44	5	55,56	9	100	10,34
8-10	42	56,00	33	44,00	75	100	86,21
11-12	3	100,00	0	0,00	3	100	3,45
Presença de sangramento	8	66,67	4	33,33	12	100	13,79
Presença de vazamento do antígeno	16	61,54	10	38,46	26	100	29,89
Presença de sangramento e vazamento	1	50,00	1	50,00	2	100	2,30
Ocorrência de reações locais em 30 minutos	7	63,64	4	36,36	11	100	12,64

Não foram observados efeitos adversos locais significativos, ou sistêmicos de qualquer natureza, na etapa de padronização. As reações locais, que ocorreram em 14,8 % dos casos confirmados e 11,4 % dos casos não confirmados de LTA, foram leves e se caracterizaram por edema, eritema e ou/prurido. Quanto à percepção de tolerância ao teste pelo paciente, foi considerado “confortável” por cerca de 80 % deles. A avaliação do conforto pelo paciente está associada com a aceitabilidade (dor) e a percepção de risco (medo) em relação ao teste, que são fatores importantes ao se analisarem produtos e serviços de saúde (DONABEDIAN, 1990 apud ROZENFELD, 2000)



Não houve correlação entre o tempo de aplicação do teste com presença de sangramento local, vazamento do antígeno, grau de conforto percebido pelo paciente e ocorrência de reações locais nas leituras de 30 minutos e 48 horas pós-aplicação (Tabelas 15 a 19)

**Tabela 15: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração, em segundos, e o grau de conforto referido à aplicação da IDRМ**

<i>Tempo de aplicação (s)</i>	<i>Grau de Tolerância ao teste (%)</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>confortável</i>	<i>pouco confortável</i>		
7 a 10	9 (69,2)	4 (30,7)	13 (100)	0,70
11 a 15	34 (75,5)	11 (24,4)	45 (100)	
16 a 20	18 (85,7)	3 (14,2)	21 (100)	
21 a 25	6 (75,0)	2 (25,0)	8 (100)	

**Tabela 16: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de vazamento do antígeno no local da aplicação**

<i>Tempo de aplicação (s)</i>	<i>Vazamento do antígeno (%)</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>		
7 a 10	2 (15,3)	11 (84,6)	13 (100)	0,40
11 a 15	15 (33,3)	30 (66,6)	45 (100)	
16 a 20	7 (33,3)	14 (66,6)	21 (100)	
21 a 25	4 (50,0)	4 (50,0)	8 (100)	

**Tabela 17: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de sangramento no local da aplicação**

<i>Tempo de aplicação (s)</i>	<i>Sangramento local (%)</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>		
7 a 10	3 (23,0)	10 (76,9)	13 (100)	0,81
11 a 15	6 (13,3)	39 (86,6)	45 (100)	
16 a 20	4 (19,0)	17 (80,9)	21 (100)	
21 a 25	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100)	

**Tabela 18: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de reações locais na leitura de 30 minutos**

<i>Tempo de aplicação (s)</i>	<i>Reação em 30 minutos (%)</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>		
7 a 10	2 (15,3)	11 (84,6)	13 (100)	0,61
11 a 15	4 (8,0)	41 (91,1)	45 (100)	
16 a 20	3 (14,2)	18 (85,7)	21 (100)	
21 a 25	2 (25,0)	6 (75,0)	8 (100)	

**Tabela 19: Estudo II- Pacientes suspeitos de LTA distribuídos de acordo com a duração da aplicação da IDRМ, em segundos, e a presença ou ausência de reações locais na leitura de 48 horas**

<i>Tempo de aplicação (s)</i>	<i>Reação 48 horas (%)</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>		
7 a 10	7 (53,8)	6 (46,1)	13 (100)	0,74
11 a 15	19 (42,2)	26 (57,7)	45 (100)	
16 a 20	9 (42,8)	12 (57,1)	21 (100)	
21 a 25	2 (25,0)	6 (75,0)	8 (100)	

#### **4.2.6.2 Padronização do protocolo de leitura: comparação das medidas obtidas na leitura do local da aplicação e do decalque em papel**

Neste estudo, a comparação entre a medida das endurações, no paciente e a decalcada no papel, foi realizada em todos os que apresentaram alguma enduração observada no local da injeção, totalizando 154 pacientes com e sem LTA. Destes, 77 tiveram resultados concordantes e 77 discordantes. A diferença de diâmetro das endurações medidas no braço e no papel variou de 1 a 6 mm, tendo ocorrido variação de 1 mm em 76 % (n= 58) dos 77 pacientes discordantes. Admitindo como resultado positivo a medida da enduração maior ou igual a 5 mm, 13% dos pacientes discordantes (n=11) que foram positivos na leitura direta passaram a negativos no

decalque, e 78% (n=60) apresentaram, no papel, diâmetro menor do que o verificado na medida direta na pele.

A Tabela 20 apresenta os resultados das duas medições. O índice kappa de concordância entre as duas medições foi de 0,83 % com erro padrão aproximado de 0,048 e  $p < 0,0001$ . Dos onze pacientes com medidas discordantes, cujo resultado da IDRМ foi negativo no decalque, 10 pertenciam ao grupo NLTA e 1 ao grupo LTA.

Esses resultados indicam que o método de leitura da IDRМ através do decalque em papel deve ser usado como alternativa à leitura direta da IDRМ na pele, por ter sido mais específico do que esta. Estudos similares não foram encontrados na literatura, para comparação com os resultados obtidos nesta pesquisa.

**Tabela 20: Estudo II- Comparação dos resultados da IDRМ, de acordo com as medidas realizadas no local da aplicação e no papel decalcado.**

<i>Resultado IDRМ (%)</i>		<i>Medida direta (pele)</i>		<i>Total</i>
		Positivo	Negativo	
Medida indireta (papel)	Positivo	102 (100)	0 (0)	102 (100)
	Negativo	11 (21,0)	41 (78,8)	52 (100)
Total		113 (73,3)	41 (26,6)	154 (100)

Agentes de saúde e profissionais de campo devem ser treinados para diminuir a discordância de observações e facilitar a leitura do teste, particularmente em locais de difícil locomoção do paciente e do profissional médico. Além disso, o papel decalcado funciona como registro e documentação do exame realizado e pode servir como controle de qualidade para a avaliação de serviços em processo de desenvolvimento e padronização da técnica. Para ambas as técnicas, direta e indireta, é primordial o treinamento do profissional, sendo que o decalque é de mais simples padronização.

O protocolo padronizado de aplicação e leitura encontra-se descrito detalhadamente no Anexo X.

### **4.2.6.3 Rendimento do antígeno utilizado**

O rendimento do antígeno foi estimado pela avaliação do número de doses aplicadas para os frascos de antígeno utilizados, com quantidade prevista de 10 doses por frasco. Considerando o número de pacientes incluídos no projeto (214), seriam necessários 22 frascos de antígeno para IDRМ. No entanto, foram utilizados 40 frascos.

A média de doses por frasco entre os 40 frascos foi de 5,95 doses, sendo 4,0 o número mínimo de doses por frasco e 8,0 o número máximo.

Com a utilização de seringas hipodérmicas tipo insulina, perde-se, no canhão da seringa 0,05 mL para cada aplicação de 0,1 mL (uma dose de antígeno). Ao final de dez doses de antígeno, 0,5 mL são perdidos. Além disso, a observação dos frascos após as aplicações, mostrou que, em cada um, 0,1 mL fica retido no fundo do frasco, em virtude do formato da tampa, que não permite o aproveitamento de todo o produto.

Portanto, para que cada frasco de antígeno renda 10 aplicações de 0,1 mL cada, é necessário que ele contenha 1,6 mL de suspensão antigênica e não 1,0 mL como é acondicionado atualmente.

## **4.2.7 A IDRМ e aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes**

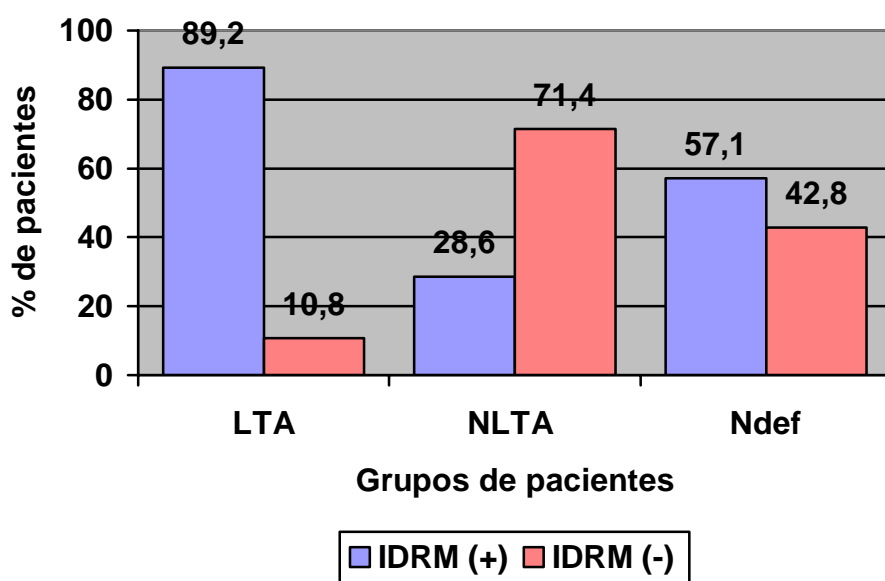
### **4.2.7.1 Frequência de positividade da IDRМ**

Embora todos os registros da IDRМ tenham sido obtidos pelos métodos do decalque e da leitura em pele, este último foi utilizado para a avaliação dos resultados, conforme referido na metodologia, por ser ele tradicionalmente utilizado no IPEC.

A figura 16 apresenta o resultado da IDRМ, de acordo com os grupos de pacientes considerados. Conforme descrito anteriormente, foram incluídos 214 pacientes na avaliação da IDRМ, cujo teste foi realizado no CRLeish entre os 302 atendidos no IPEC no período de estudo (março/2005 - março/2006). Os 88 pacientes restantes realizaram IDRМ anteriormente à adesão ao projeto ou com antígeno e/ou protocolo diferentes do padronizado para este estudo. Para evitar a interferência de fatores de confusão na análise dos resultados, os dados relativos à IDRМ destes pacientes não foram considerados.

No total, a positividade à IDRM foi de 116 pacientes (54,2%). Dos 74 pacientes com LTA avaliados por IDRM, 66 (89,2%) foram positivos e apenas 8 negativos (10,8%). No entanto, 30 pacientes dos 110 do grupo NLTA foram positivos à IDRM, perfazendo 28,6% dos casos deste grupo. Entre os 56 pacientes NDef, 20 (57,1%) foram positivos ao teste.

A positividade ao Teste de Montenegro encontrada nesta pesquisa entre pacientes de LTA (89,2%) é próxima à observada em estudos similares realizados em diferentes grupos de pacientes do Brasil: 100% em pacientes do Rio de Janeiro (OLIVEIRA-NETO, PIRMEZ et al., 1988), 92,2% no Espírito Santo (SESSA, FALQUETO et al., 1991), 78,4 % em Minas Gerais e 88,7% em São Paulo (MEDEIROS, RODRIGUES et al., 2002). Por outro lado, SILVEIRA et al (1991) verificaram apenas 51,6% de positividade ao Teste entre pacientes de LTA por *Leishmania amazonensis* no Pará, atribuindo essa baixa positividade a uma imunossupressão induzida pelo parasito.



**Figura 16: Estudo II- Resultados da IDRM de acordo com o grupo de pacientes estudados no Estudo II**

A porcentagem de cerca de 29% de pacientes positivos no grupo NLTA foi muito próxima a encontrada nos voluntários sadios do Estudo I (27,4 % para o antígeno mertiolatado e 32,0% para o antígeno fenolado). Diferentemente do grupo de voluntários do Estudo I, os pacientes NLTA do Estudo II residiam, em 56,3 % dos casos, em áreas endêmicas de LTA e apresentavam sintomatologia sugestiva de leishmanioses. No entanto, exceto à IDRM, não houve positividade a nenhum outro

exame parasitológico para diagnóstico etiológico de leishmanioses, e tiveram confirmação clínica e/ou laboratorial de outra etiologia. Os resultados da PCR neste grupo de pacientes seriam importantes para avaliação da especificidade da técnica, bem como da correlação entre a resposta à IDRМ e as diferentes variáveis clínico-epidemiológicas determinadas para cada paciente.

Trabalhos anteriores já haviam mostrado que pacientes com esporotricose, o mais importante diagnóstico diferencial para LTA no Rio de Janeiro, podem apresentar reatividade cruzada à IDRМ em percentual de aproximadamente 30 % (DE LIMA BARROS, SCHUBACH et al., 2001). A tabela 21 apresenta o diagnóstico confirmado dos pacientes do grupo NLTA e a resposta à IDRМ, cuja taxa de positividade em pacientes de esporotricose foi de 39 % (16 positivos em 41 pacientes de esporotricose), compatível com o trabalho referido. Como os resultados da PCR no sangue periférico de todos os 41 pacientes de esporotricose foram negativos, não podemos confirmar a hipótese de co-infecção *Leishmania-Sporothrix* nesses pacientes.

No entanto, sendo procedentes de áreas endêmicas de ambas as nosologias, a possibilidade de co-infecção com LTA subclínica é plausível. Novos estudos serão necessários para avaliação da especificidade da resposta celular evidenciada pela IDRМ neste grupo de pacientes, ou para confirmar a existência de reatividade cruzada entre esses dois organismos, interferindo na resposta ao teste. A avaliação da resposta humoral desses pacientes vem sendo objeto de uma tese de doutoramento em nosso laboratório (Mouta-Confort, comunicação pessoal)

**Tabela 21: Resultado da IDRМ no grupo de pacientes NLTA, de acordo com o diagnóstico etiológico confirmado**

<i>Diagnóstico</i>	<i>Resultado IDRМ (%)</i>		<i>Total</i>
	Positivo	Negativo	
Esporotricose	16 (39,0)	25 (60,9)	41 (100)
Piodermite	5 (19,2)	21 (80,7)	26 (100)
Úlcera vascular	5 (26,3)	14 (73,6)	19 (100)
Carcinoma epidermóide	0 (0)	4 (100)	4 (100)
Outros diagnósticos	4 (26,6)	11 (73,3)	15 (100)
<b>Total</b>	<b>30 (28,57)</b>	<b>75 (71,43)</b>	<b>105 (100)</b>

A positividade ao teste em pacientes com outras enfermidades, conforme mostra a tabela 21, variou entre 30,7 % para os pacientes com úlcera vascular e 0% para os pacientes de carcinoma epidermóide e pode estar relacionada a endemicidade da LTA.

Estudos específicos de reação cruzada com LTA merecem avaliação posterior, desenhados para este fim e incluindo não somente a esporotricose mas também outras nosologias sobretudo co-endêmicas

#### **4.2.7.2 Reações observadas após 30 minutos de aplicação do teste de Montenegro**

Reações locais discretas foram evidenciadas em cerca de 11,2 % dos pacientes (24/214) dos 3 grupos estudados: LTA - 12,1% (n=9), NLTA - 11,4 % (n= 12) e NDef - 8,6 % (n=3) (Figura 17); estas proporções não foram significativamente diferentes (Teste  $\chi$  de Pearson 0,982, p= 0,612). Os tipos de reações observadas são descritos e quantificados na Tabela 22. Tanto o edema quanto o eritema apresentaram-se em forma de halo circundando a pápula previamente formada pelo inóculo. O prurido na pápula e em seu entorno foi discreto.

A ocorrência das reações locais até 30 minutos após a aplicação do teste não interferiu na positividade à IDR<sub>M</sub> avaliada na leitura 48 horas após a aplicação, para os 3 grupos de pacientes estudados (Teste  $\chi$  exato de Fischer, p= 1,000 para os 3 grupos de pacientes). A figura 18 apresenta os resultados para todos os pacientes avaliados.

Nenhuma reação sistêmica foi observada em nosso estudo.

Reações locais ao teste foram anteriormente descritas por SHAW E LAINSON (1974; 1975; 1976), para diferentes formulações de antígeno de *Leishmania* e mesmo para antígenos de *Trypanosoma cruzi*; os autores sugeriram que as reações imediatas eram específicas e poderiam ser utilizadas como critérios diagnósticos. O presente estudo não confirmou essas considerações, configurando-se as reações observadas provavelmente como de resposta inflamatória ou alérgica inespecífica.

Trabalho anterior (FAGUNDES, MARZOCHI et al., 2003) mostrou a ocorrência de um caso de reação sistêmica alérgica imediatamente após a aplicação de antígeno de Montenegro mertiolatado; embora pouco freqüentes, essas podem eventualmente apresentar risco á integridade do paciente, como visto para outros

testes intradérmicos (LOCKEY, BENEDICT et al., 1987; LOCKEY, TURKELTAUB et al., 1988). Após essas observações, o protocolo padronizado para este estudo estabeleceu, como regra, a observação sistemática de todos os pacientes submetidos ao teste durante a primeira meia hora após a sua aplicação.

A ausência de reação sistêmica no atual estudo confirma tratar-se de evento incomum, apontando para a relativa segurança do teste, sem indicar que deva ser dispensado o cuidado preconizado. Deve ser lembrado que precisamente em decorrência de resultados do Estudo I sobre o potencial alergênico do timerosal, este foi substituído pelo fenol como preservante do antígeno de Montenegro.

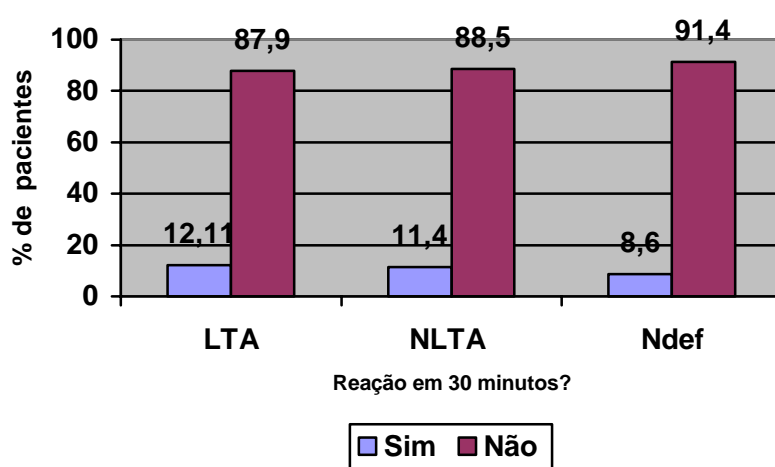
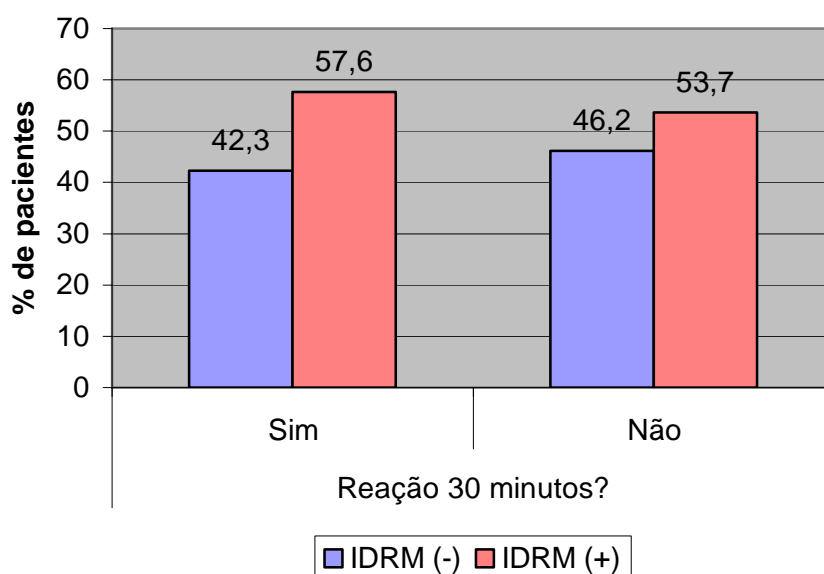


Figura 17: Estudo II- Ocorrência de reações locais após 30 minutos da aplicação do teste, por grupo de pacientes

Tabela 22: Estudo II- Número de pacientes e tipos de reações locais ao Teste de Montenegro após 30 minutos da aplicação do teste, por grupo de pacientes

Reações locais observadas	GRUPO			Total (n=214)
	LTA (n=74)	NLTA (n=110)	NDef (n=56)	
Edema/eritema	4	4	0	8
Prurido	2	5	0	7
Edema	1	1	1	3
Eritema e prurido	1	1	0	2
Eritema/edema e prurido	0	1	1	2
Eritema	1	0	1	2
<b>Total de pacientes</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>24</b>





**Figura 18: Estudo II- Resultados da IDR e ocorrência de reações locais após 30 minutos da aplicação do teste\*.**

\*Número de pacientes: Com reações em 30 minutos: IDR (+) = 15; IDR (-) = 11; Sem reações em 30 minutos: IDR (+) = 101; IDR (-) = 87

#### **4.2.7.3 Reações observadas após 48 horas de aplicação do Teste de Montenegro**

Foram acompanhados 207 pacientes, sendo 74 do grupo LTA, 100 do grupo NLTA e 33 do grupo NDef para avaliação da ocorrência de reações na leitura após 48 horas da aplicação do teste. Foram anotadas, além da endureção característica de uma reação de hipersensibilidade retardada, outros sinais e sintomas locais e sistêmicos apresentados/ descritos pelos pacientes. A Figura 19 mostra a proporção de pacientes que apresentou/ referiu tais reações, de acordo com o grupo de diagnóstico. As reações apresentadas / referidas estão descritas na Tabela 23. Não houve relação entre os pacientes que apresentaram reações imediatas (até 30 minutos) e reações posteriores.

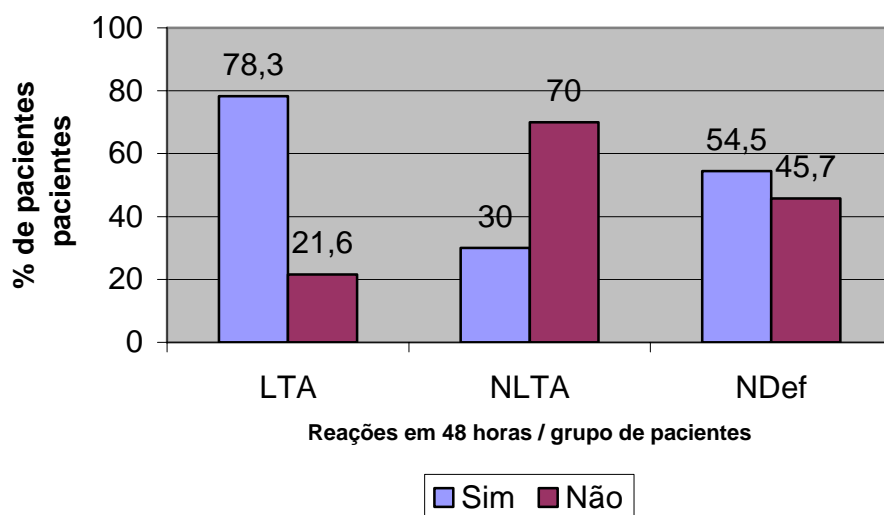


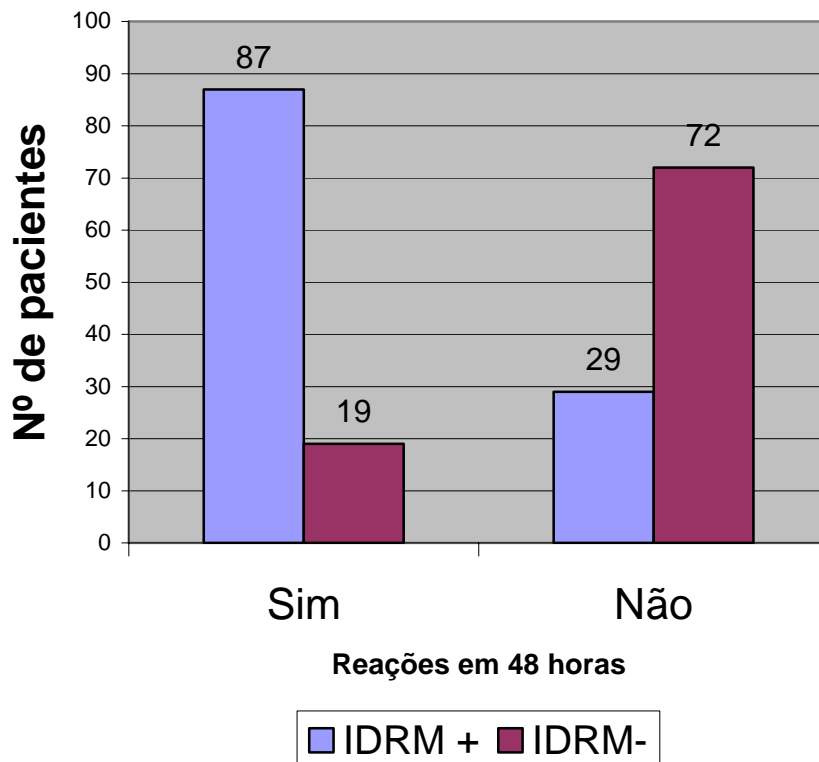
Figura 19: Estudo II- Ocorrência de reações locais (exceto endureção após 48 horas da aplicação da IDR, por grupo de pacientes.

Tabela 23: Número e tipo de reações locais observadas na leitura 48 horas após a aplicação do Teste de Montenegro, por grupo de pacientes

Reações observadas	GRUPO						Total	
	LTA (n=58)		NLTA (n=30)		NDef (n=18)			
Prurido local	46	54,76%	24	28,57%	14	16,67%	84	100%
Edema/Eritema	50	65,79%	10	13,16%	16	21,05%	76	100%
Prurido + “coçagem”	12	60,00%	5	25,00%	3	15,00%	20	100%
Vesículas/bolhas	9	69,23%	2	15,38%	2	15,38%	13	100%
Febre	3	42,86%	4	57,14%	0	0,00%	7	100%
<b>Total de reações</b>	<b>120</b>	<b>60,00%</b>	<b>45</b>	<b>22,50%</b>	<b>35</b>	<b>17,50%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>

A maior parte dos pacientes dos grupos LTA (58/74 - 78,4 %) e NDef (18/33 - 54,5 %) apresentou reações locais à leitura após 48 horas da aplicação da IDR, ao contrário dos pacientes do grupo NLTA (30/100 - 30%).

No entanto, verificamos que no total dos 206 pacientes avaliados à leitura de 48 horas, 87 entre 116 com IDR positiva (75%) apresentaram reações locais associadas à endureção, em comparação aos 29 positivos ao teste (25%) que não as apresentaram ( $\chi^2 = 59,78$ ,  $p = 0,0000001$ ) (Figura 20).



**Figura 20: Estudo II- Resultados da IDRMs e presença ou ausência de reações locais associadas ou não à enduração na leitura após 48 horas da aplicação do Teste de Montenegro.**

Resultados semelhantes foram encontrados quando os 3 grupos de pacientes foram analisados individualmente. Assim, no grupo LTA, a ocorrência das reações atingiu 81 % dos positivos ao Teste de Montenegro e 50 % dos negativos; no grupo NLTA, as reações ocorreram em 63 % dos pacientes com IDRMs positiva e 15,7 % dos negativos; e no grupo NDef, as reações ocorreram em 73,6 % dos pacientes positivos ao teste e em 30,7% dos negativos.

O acompanhamento estrito e a observação sistematizada da ocorrência de reações locais diferentes da enduração no momento da leitura do Teste de Montenegro, não têm descrição prévia na literatura, nem tampouco a associação significativa destas reações locais com a positividade à IDRMs.

Estudos específicos das endurações correspondentes à positividade da IDRMs foram realizados duas vezes, uma no Brasil (MAYRINK, SCHETTINI et al., 1989) e, mais recentemente, na Colômbia (GUARIN, PALMA et al., 2006). No entanto, ambos os autores pretenderam avaliar, através da histopatologia e imunohistoquímica, as semelhanças e diferenças entre o perfil celular da IDRMs positiva e da lesão cutânea por LTA apresentadas pelos mesmos pacientes.

É possível que a associação observada, na presente pesquisa, entre reações locais e enduração maior que 5 mM corresponda a uma resposta imunoalérgica exacerbada ao Teste de Montenegro, sobretudo considerando que o antígeno utilizado, extrato semi-particulado de formas promastigotas de *Leishmania*, inclui uma multiplicidade de antígenos, de características bioquímicas e moleculares diversas, com composição não definida. Este é um aspecto no qual o Teste de Montenegro difere do Teste Tuberculínico, que, ao contrário, utiliza como antígeno um derivado protéico purificado. Além disso, pode haver certa variação entre diferentes lotes de antígeno de Montenegro, considerando seu processo de produção (PASSOS, 2004).

Por outro lado, fatores inespecíficos podem estar associados em parte tanto à ocorrência das reações locais encontradas como até mesmo à própria enduração característica de uma resposta positiva ao Teste de Montenegro. Tais fatores poderiam incluir o conservante utilizado no antígeno (PINEDA, MACIAS et al., 2001) e o contato com alérgenos como o látex, presente na tampa do frasco de antígeno, veiculados pela agulha de aplicação (PRIMEAU, ADKINSON et al., 2001).

#### **4.2.7.4 Reações observadas na leitura entre 12 e 16 dias após a aplicação do Teste de Montenegro**

Entre os 98 pacientes revistos após um período variável de 10 a 14 dias após a leitura de 48 horas do teste, ou seja, 12 a 16 dias após o inóculo, nenhum paciente apresentou resposta local ou sistêmica. Estes resultados diferem do observado no Estudo I, no qual foi encontrada uma freqüência de 4,5 % de “reações tardias” entre 313 voluntários sadios acompanhados, e do trabalho de RABELLO et al (1945), que encontraram freqüência idêntica de reatividade tardia em pacientes.

Tal fato sugere que diferenças na composição do antígeno utilizado nos trabalhos acima citados possam estar associadas à ocorrência dessas reações, ou que a resposta tardia possa estar associada a estímulo antigênico diferente da IDRMM eventualmente recebido no período entre a aplicação e a leitura após 2 semanas como pode ter ocorrido no Estudo I.

#### 4.2.7.5 Associação entre a positividade à IDRМ e as variáveis estudadas entre os 3 grupos de pacientes

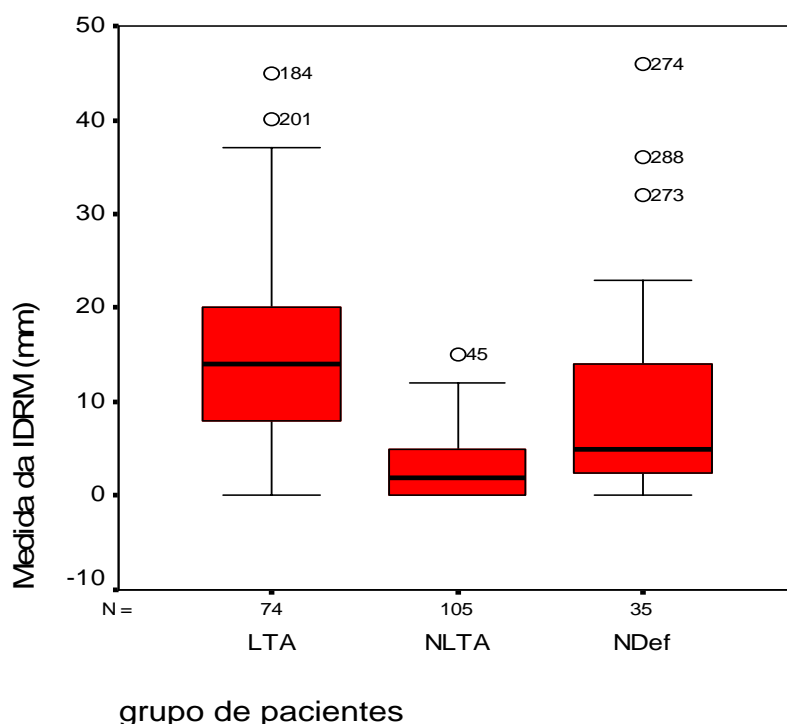
##### — Tamanho das endurações da IDRМ

A Tabela 24 mostra a análise descritiva do tamanho das endurações, medidas em seu maior diâmetro, no local de aplicação do teste, para os 3 grupos de pacientes. Os pacientes do grupo LTA apresentaram endurações significativamente maiores do que os pacientes dos outros grupos (teste Kruskal-Wallis= 98,25,  $p= 0,000$ ), mesmo com o grande desvio-padrão apresentado.

**Tabela 24: Comparação entre o tamanho das endurações verificadas à IDRМ, nos 3 grupos de pacientes**

<i>Grupo de pacientes</i>	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>	<i>IC 95 %</i>		<i>Desvio-padrão</i>	<i>Diâmetro</i>	
LTA	74	14,0	15,43	9,62	13,0	17,66	0	45
NLTA	105	2,0	2,70	2,10	3,13	3,31	0	15
NDef	35	5,0	9,51	5,75	10,95	13,28	0	46
Total	214	5,0	8,22	6,95	9,43	9,49	0	46

A Figura 21 mostra a distribuição das medidas das endurações da IDRМ medidas em seu maior diâmetro, no local de aplicação do teste. De acordo com a análise da distribuição, observamos que, somente o grupo LTA, apresenta distribuição claramente normal, tendo os grupos NLTA e NDef tendência a um desvio a esquerda devido ao grande número de pacientes IDRМ-negativos. Diante disso, optamos por analisar essa variável contínua com testes não paramétricos para a comparação dos diâmetros entre os 3 grupos de pacientes e para análise da associação dos diâmetros com as diferentes variáveis, abaixo consideradas.



**Figura 21: Estudo II- Distribuição dos diâmetros das endureções nos três grupos de pacientes.**

Não houve associação entre o tamanho das endureções da IDRMM e as seguintes variáveis: presença de co-morbidades (Mann-Whitney U, 3774,000, Z= -1,469, p = 0,142), alergias (Mann-Whitney U, 1766,500, Z= -0,145, p = 0,885), recebimento de vacinas (Mann-Whitney U, 3063,500, Z= -1,648, p =0,09), número de lesões (Mann-Whitney U, 4,05 Z= -0,128, p =0,131), tempo de evolução da LTA (Mann-Whitney U, 4,276, Z= -1,342, p = 0,118) e sexo dos pacientes (Mann-Whitney U, 557,5, Z= - 0,492, p =0,623).

No entanto, os pacientes da forma cutânea da LTA e todos aqueles que apresentaram reações associadas à IDRMM na leitura após 48 horas da aplicação, apresentaram endureções significativamente maiores (Mann-Whitney U 164, 000, Z= - 2,214, p =0,027 e Mann-Whitney U 1766,500, Z= - 8,352, p = 0,000, respectivamente). É uma observação que reforça a relevância do Teste de Montenegro no diagnóstico da doença e pode implicar, possivelmente, o grau de resposta imune.

Quando analisou-se o tamanho das endureções nos pacientes dos 3 grupos residentes ou não em áreas endêmicas para LTA (Tabela 25), verificou-se que o tamanho das endureções foi significativamente maior entre os pacientes residentes em áreas endêmicas, de acordo com o teste de Mann- Whitney (Mann-Whitney U=

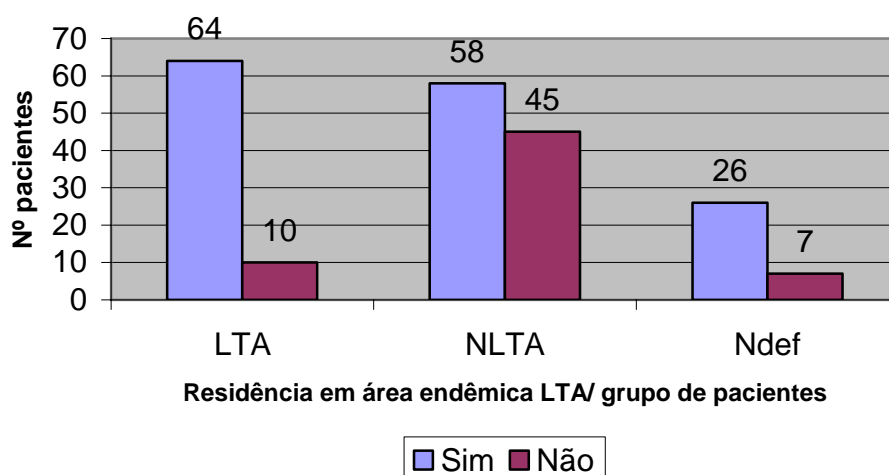
3210,000,  $Z = -3,471$ ,  $p = 0,001$ ). O mesmo resultado foi encontrado quando apenas os indivíduos com IDRMs positivas foram incluídos na análise (Mann-Whitney  $U = 772,000$ ,  $Z = -2,210$ ,  $p = 0,027$ )

**Tabela 25: Comparação entre o tamanho das endureções da IDRMs, de acordo com a residência dos pacientes, em área endêmica ou não para LTA**

<i>Reside em área endêmica de LTA?</i>	<i>Média</i>	<i>N</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Mediana</i>
sim	9,59	148	10,001	7,00
não	5,08	62	7,291	3,50
<b>Total</b>	<b>8,26</b>	<b>210</b>	<b>9,494</b>	<b>5,00</b>

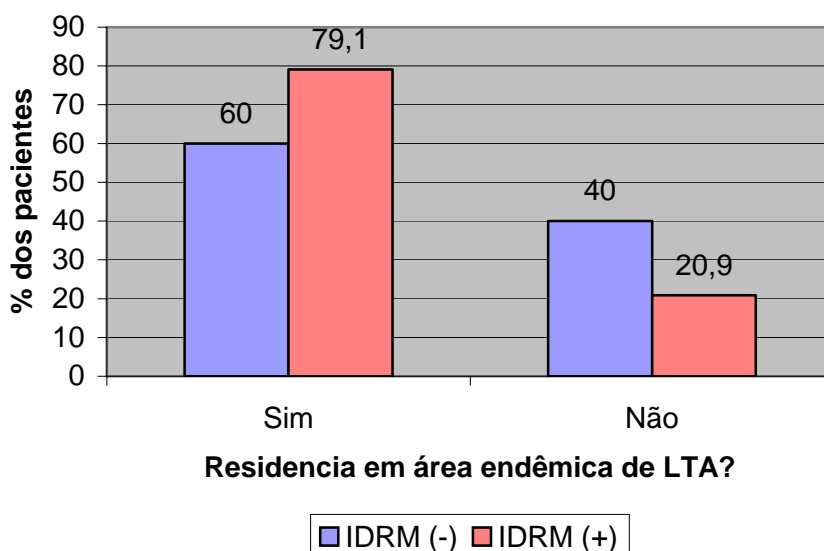
#### — Procedência dos pacientes

A Figura 22 classifica os pacientes dos 3 grupos de estudo de acordo com a residência ou não em área endêmica de LTA, onde se verifica que 86,5 % dos pacientes do grupo LTA e 78,8 % dos do grupo NDef provêm de áreas consideradas endêmicas para leishmaniose. No grupo NLTA a proporção de pacientes de áreas endêmicas foi de 56,3 %.



**Figura 22: Estudo II- Distribuição dos 3 grupos de pacientes de acordo com a residência ou não em áreas endêmicas de LTA**

Quando foi avaliada a associação entre a resposta à IDRМ e a procedência dos pacientes em geral, verificou-se que a positividade à IDRМ foi associada de forma estatisticamente significativa com a residência em áreas endêmicas de LТА, com base nos dados apresentados na Figura 23 (teste X<sup>2</sup> de Pearson= 9,150, p = 0,002).



**Figura 23: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com a residência dos pacientes, em área endêmica ou não de LТА**

\*Número de pacientes: Residentes em áreas endêmicas: IDRМ (+) = 91; IDRМ (-) = 57; Não residentes: IDRМ (+) = 24; IDRМ (-) = 38

Em inquéritos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas para LТА, a positividade ao teste variou grandemente, desde 8,9%, encontrada entre escolares do município do Rio de Janeiro (SOUZA, SABROZA et al., 1992), até 68 %, entre índios da Amazônia (COIMBRA JUNIOR, SANTOS et al., 1996), passando por 11,6 % entre plantadores de café de Minas Gerais, 27,6% novamente em Minas Gerais (NUNES, PAULA et al., 2006), e 34 % em área endêmica no Paraná (SILVEIRA, TEODORO et al., 1996). Logo, um paciente que resida em área endêmica para LТА pode apresentar, previamente ao aparecimento da lesão cutânea sugestiva, positividade ao Teste de Montenegro, a qual somente será revelada quando o referido paciente procurar atendimento para a doença clinicamente manifesta.

Em nosso estudo, 79 % dos pacientes procedentes de áreas endêmicas de LТА apresentavam resultado positivo ao Teste de Montenegro, independentemente da etiologia da lesão que o levou a procurar atendimento no IPEC.



Deve ser ressaltado, em relação ao grupo NLTA, no qual se incluíram 41 pacientes com esporotricose, que 23 destes casos (56,0%) residiam em áreas endêmicas de leishmaniose, dos quais 10 (43,5 %) foram positivos ao Teste de Montenegro. Entre os 18 (43,9%) pacientes de esporotricose que não residiam em áreas endêmicas, 6 (33,3%) foram positivos. A diferença não apresentou significância estatística (teste exato de Fischer,  $p= 0,96$ ). Diferentemente do que admitimos anteriormente diante da alta frequência de pacientes com esporotricose positivos à IDR (Tabela 21) - considerando a hipótese de superposição de áreas endêmicas das duas nosologias - a análise da procedência não corroborou essa possibilidade, sugerindo que outro fator possa estar interferindo na positividade cruzada com o Teste de Montenegro entre pacientes com esporotricose confirmada.

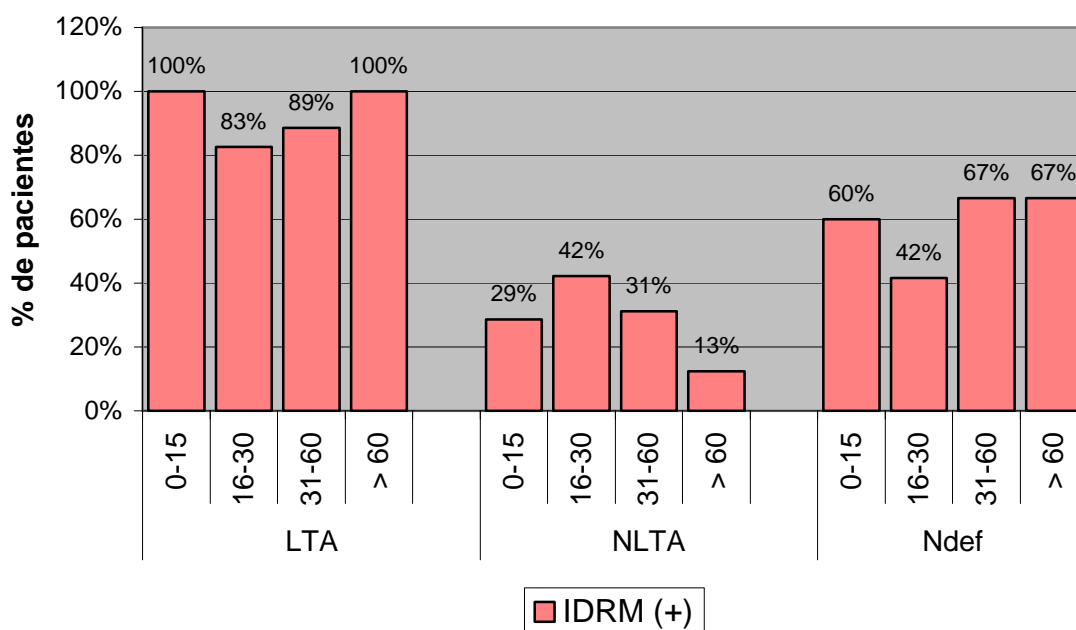
#### — Idade e sexo dos pacientes

Em relação a positividade à IDR por faixa etária dos pacientes, apesar da tendência ao aumento de casos positivos até a faixa etária de 31-60 anos no grupo LTA (Figura 24), esse aumento não foi estatisticamente significativo; não houve também diferenças significativas nos outros 2 grupos de pacientes (Teste  $\chi$  de Pearson 4,912,  $p= 0,178$  para o grupo NLTA,  $\chi^2= 2,986$ ,  $p = 0,394$ , para o grupo LTA e  $\chi^2= 1,857$ ,  $p = 0,603$  para o grupo NDef, respectivamente).

O esperado seria que praticamente todos os casos de LTA fossem positivos ao Teste de Montenegro, exceto quando o paciente apresentasse tempo de história menor que 45 dias, o que não ocorreu. Os oito casos negativos ao teste tinham mais de 15 e menos de 60 anos de idade, com tempo médio de doença de 4,2 meses e mediana de 2 meses. Também se poderia admitir alguma redução das taxas de positividade ao teste nas faixas etárias extremas, por alteração do padrão imunitário; o baixo número de casos nesses dois grupos pode ter impedido qualquer conclusão nesse sentido. Tradicionalmente, considera-se que ocorra aumento do número de positivos ao Teste de Montenegro numa área endêmica à medida que aumenta a idade da população (PESSOA E PESTANA, 1940).

A distribuição das respostas positivas à IDR no grupo NLTA, embora sem ter apresentado diferença significativa em relação aos demais, pode apontar para

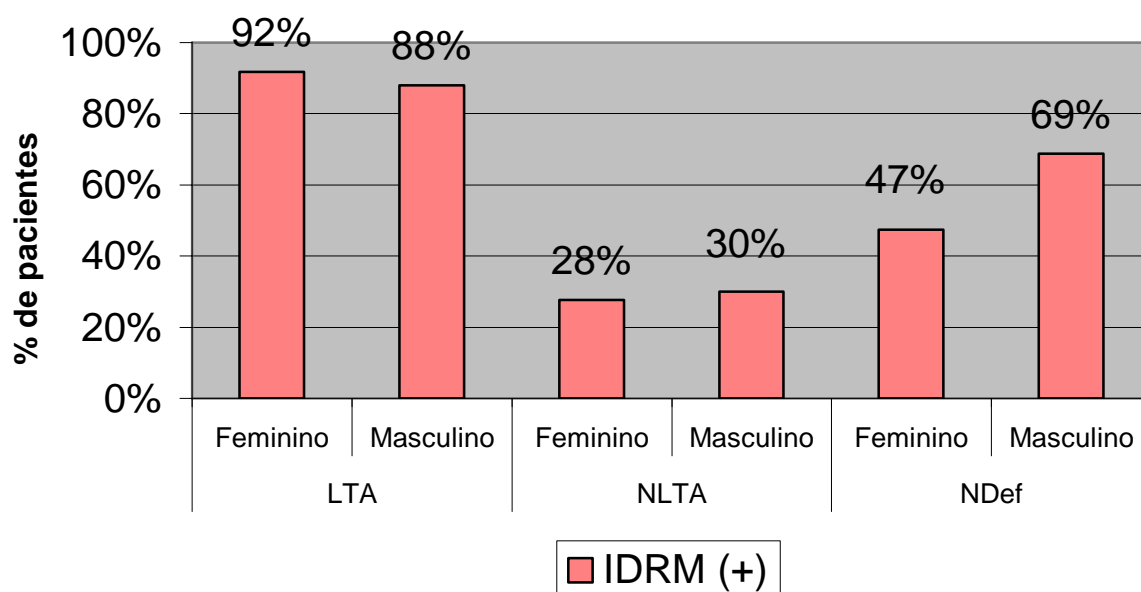
uma tendência de distribuição endêmica da doença por faixa etária, admitindo-se que os casos positivos representem as infecções subclínicas nessas áreas. Deve ser lembrado, no entanto, que boa parte do grupo NLTA (39%) correspondeu a pacientes de esporotricose que, como discutimos anteriormente, poderia apresentar reatividade cruzada à IDRМ, sem indícios de infecção subclínica.



**Figura 24: Estudo II- Porcentagem de pacientes IDRМ (+) de acordo com o grupo e a faixa etária (em anos) dos pacientes estudados**

\*Numero de pacientes IDRМ (+) por grupo e faixa etária, em anos: LTA: 0-15= 11; 16-30=19; 31-60= 31; >60=5; NLTA: 0-15=4; 16-30=8; 31-60= 15; >60=3; NDef: 0-15=3; 16-30=5; 31-60= 10; >60=2

A Figura 25 mostra os resultados da IDRМ segundo o sexo. Não houve diferença entre pacientes masculinos e femininos quanto à positividade ao teste, em nenhum dos grupos estudados (Teste  $\chi$  de Pearson = 0,065 , p = 0,799, para o grupo NLTA,  $X^2$ = 0,226, p = 0,634, para o grupo LTA e  $X^2$ = 1,621, p = 0,203 para o grupo NDef, respectivamente). Esses dados reforçam o caráter não profissional da LTA, clínica ou supostamente subclínica, no Rio de Janeiro.



**Figura 25: Estudo II- porcentagem de pacientes IDRMs (+) de acordo com o grupo e o sexo.**

*\*Número de pacientes IDRMs (+) por grupo e sexo: LTA: masculino=44; feminino= 22; NLTA: masculino= 12; feminino=18; NDef: masculino= 11; feminino=9*

#### — Antecedentes de alergias

Dos 214 pacientes avaliados por Teste de Montenegro, 81 apresentavam antecedentes de alergias, 129 não apresentavam e 4 não possuíam informação a respeito. Dos pacientes com antecedentes alérgicos, 42 apresentaram IDRMs positiva e 39 foram negativos, enquanto entre os sem antecedentes, 70 foram positivos e 59 negativos.

A Figura 26 mostra que o fato do paciente ser portador de alergia e/ou doença alérgica não interferiu na resposta da IDRMs ( $p= 0,777$ , Teste exato de Fischer), como também na ocorrência de reações adversas à mesma. Deve ser destacado que nenhum paciente apresentava doença alérgica clinicamente manifesta no momento da realização do teste. Com relação a este aspecto, não existem estudos na literatura.

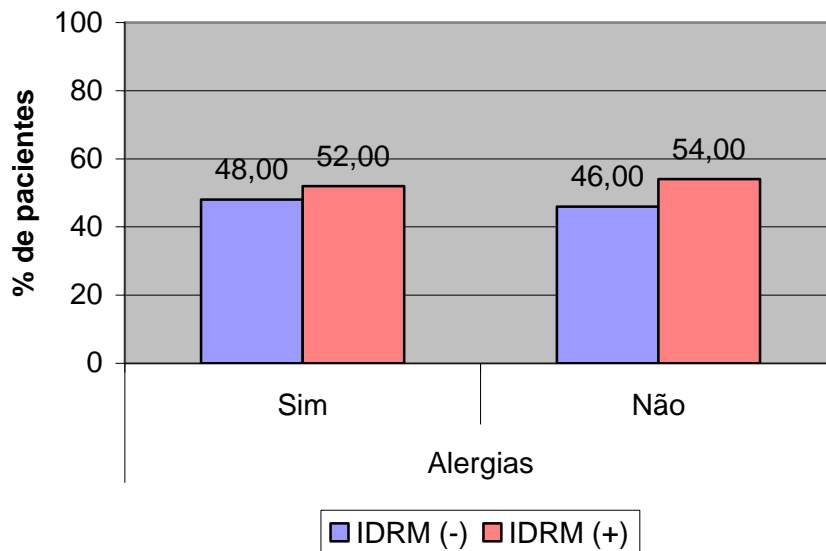


Figura 26: Estudo II- Resultados da IDR e histórico de alergias

#### — Histórico de vacinação

Cinquenta e um pacientes, dos 214 avaliados por IDR apresentaram histórico de vacinação recebida até um ano antes do atendimento no CRLeish, não havendo diferença de proporção entre os 3 grupos de pacientes estudados em relação ao histórico vacinal.

Dos pacientes vacinados, 22 foram positivos ao Teste de Montenegro e 29 negativos. Entre os não vacinados, 85 foram positivos ao teste e 57 negativos.

A Figura 27 mostra que não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o relato de vacinação, no conjunto dos pacientes ( $p = 0,05$ , Teste Exato de Fischer) e a resposta positiva ao Teste de Montenegro. Ao contrário, aparentemente, indivíduos não vacinados no ano anterior à realização da IDR foram frequentemente mais positivos do que os vacinados, o que, eventualmente, poderia estar associado a aspectos sócio-culturais dos pacientes de LTA, não avaliados, que levariam a não buscarem vacinação.

A associação entre recebimento de vacinas e resposta ao Teste de Montenegro foi aventada por MARZOCHI et al (1998), como hipótese para explicar a positividade ao teste em voluntários sadios que receberam placebo em estudo de vacinação anti-LTA. Considerando que a vacina aplicada nos voluntários e o antígeno de Montenegro utilizado continham timerosal como preservante, o timerosal contido na vacina poderia ter induzido

imunidade e a imunidade ao timerosal ter-se manifestado no Teste de Montenegro, fazendo com que o voluntário fosse um falso-positivo ao teste. No entanto, o antígeno de Montenegro utilizado no Estudo II é preservado com fenol e não mais com timerosal.

Porém, admite-se que algumas vacinas podem produzir imunossupressão inespecífica. Logo, é possível, embora pouco provável, que a negatividade à IDRМ dos indivíduos vacinados possa estar relacionada à imunossupressão induzida por vacinas recebidas.

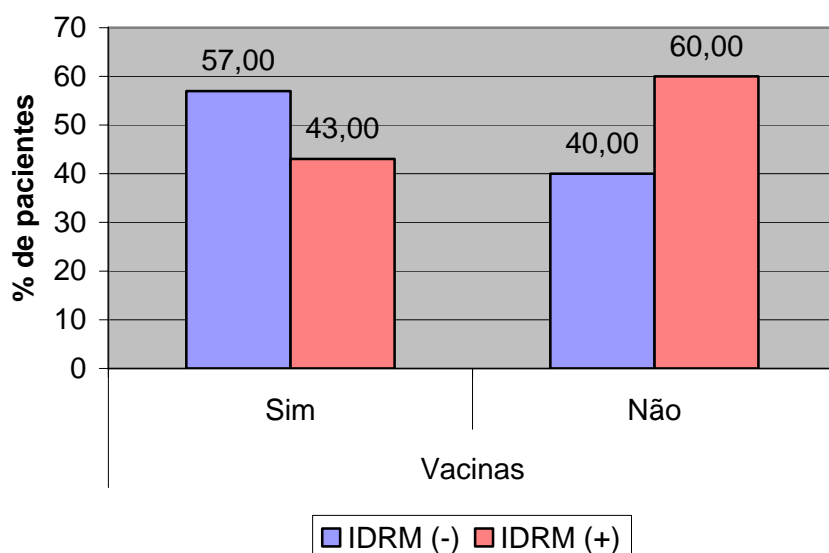


Figura 27: Estudo II- Resultados da IDRМ e histórico de vacinações entre os pacientes

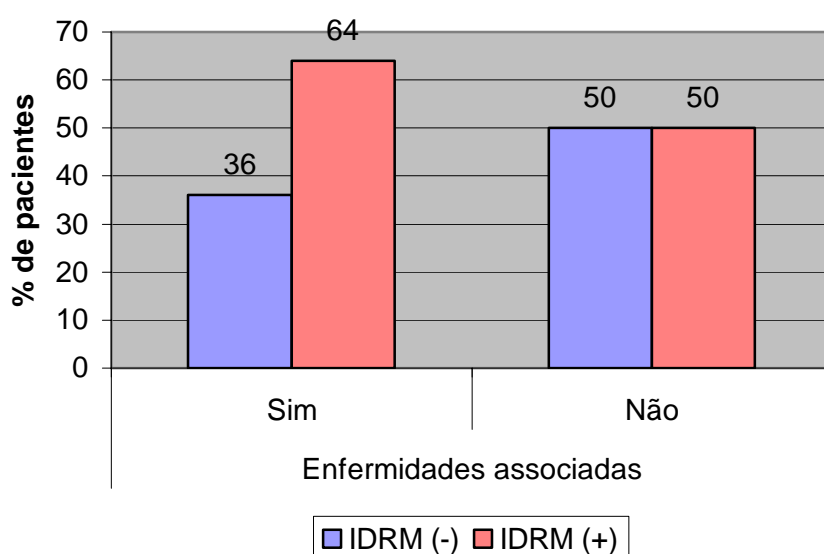
#### — Existência de co-morbidades

Conforme a revisão da literatura realizada, não existem estudos relacionando a positividade à IDRМ e a presença de co-morbidades. Considerando a clientela das nossas unidades de Saúde, admitimos ser fundamental essa avaliação. Cada paciente era questionado sobre alguma outra doença já diagnosticada, ou queixas, além da lesão que motivou a consulta atual. Além disso, nos bancos de dados dos pacientes foram buscadas a presença de co-morbidades entre os pacientes, que poderiam ter escapado à equipe da pesquisa.

Os resultados mostraram que grande parte dos nossos pacientes apresentava alguma co-morbidade acompanhando a queixa que o levou a procurar o CRLeish. As co-morbidades predominantes foram hipertensão arterial, distúrbios respiratórios e cardíacos. Entre os pacientes do grupo LTA, 32 (45,7%) de 70 pacientes que possuíam essa informação disponível, apresentaram alguma co-morbidade. Nos grupos NLTA

e NDef, a porcentagem de pacientes com enfermidades associadas foi de 37,1% (33 /89 pacientes) e 32,3 % (10/31 pacientes), respectivamente.

Entre os pacientes com enfermidades associadas, 48 foram positivos ao Teste de Montenegro e 27 foram negativos. Por outro lado, entre os pacientes sem enfermidades associadas, 58 foram positivos ao teste e 57 negativos. A diferença de positividade à IDRМ no total de pacientes com e sem co-morbidades não foi estatisticamente significativa ( $p=0,074$  Teste Exato de Fischer), apesar da tendência, sugerida na Figura 28, à maior positividade ao teste entre os pacientes com enfermidades associadas.



**Figura 28: Estudo II- Resultados da IDRМ e ocorrência de enfermidades associadas ao diagnóstico principal dos pacientes**

Tratando-se de estudo seccional, não houve, nesta pesquisa, pareamento de pacientes com co-morbidades e sem elas, como ocorreria num estudo caso - controle, talvez o melhor desenho para responder a essa questão específica. No entanto, como o número de pacientes avaliados neste estudo foi considerável, diferenças clinicamente relevantes poderiam ter sido evidenciadas no caso de se associarem ao tipo de resposta à IDRМ, o que não ocorreu.

No presente estudo, a análise da co-morbidade em nossos pacientes foi importante para comprovarmos que a presença de enfermidades associadas não interferiu na resposta à IDRМ, como também não se correlacionou com a ocorrência de efeitos adversos ao teste, o que contribuiu para caracterizar sua segurança.

#### 4.2.7.6 Tempo de história clínica, forma clínica e número de lesões na LTA

##### — Tempo de história clínica

O tempo de evolução da doença (Figura 13) foi recodificado em 4 categorias para o estudo da associação com a resposta ao Teste de Montenegro: 0,5 a 1 mês, 1,5 a 2 meses, 2 a 4 meses e acima de 4 meses. A Figura 29 mostra a distribuição dos casos segundo a IDRМ e tempo de desenvolvimento da doença. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade da IDRМ e tempo de história clínica (teste  $\chi^2$  de Pearson= 1,513,  $p= 0,469$ ).

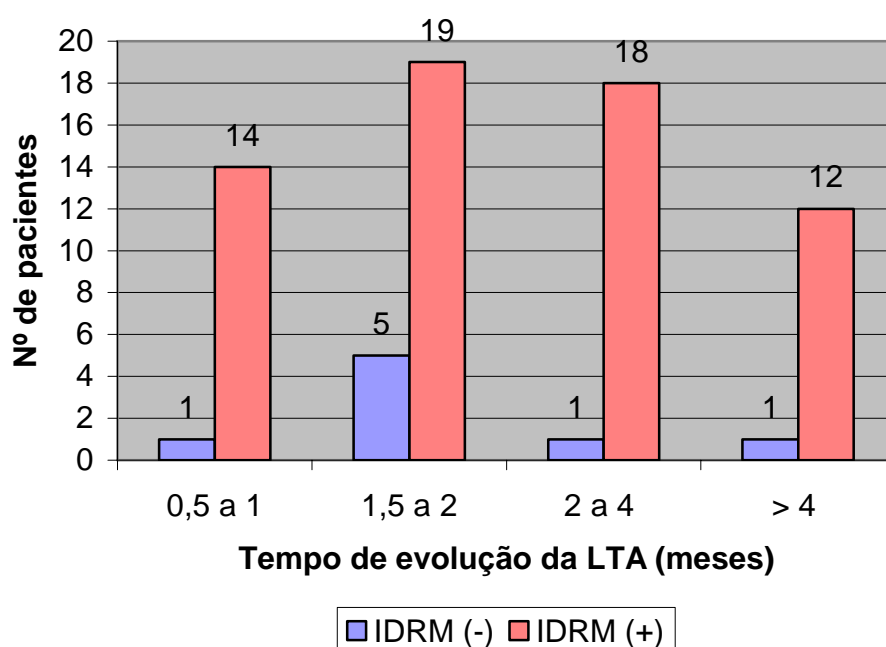


Figura 29: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com o tempo de evolução da LTA, em meses.

Classicamente, a resposta da IDRМ pode ser negativa nos primeiros 45 dias de evolução da LTA (ROTBERG, 1952; FURTADO, 1980; MARZOCHI, 1992). No entanto, 14 de nossos 15 pacientes com até 30 dias de evolução da LTA apresentaram IDRМ positiva. Considerando que a maioria deles reside em área endêmica e morava no mesmo endereço antes do desenvolvimento da lesão, seria possível que a positividade apresentada fosse anterior ao desenvolvimento da lesão? Ou seja, a lesão atual poderia ser proveniente não do primeiro contato do paciente com o parasito, diferentemente do que ocorre com um indivíduo recém-introduzido em área endêmica? Se for esse o caso, qual o mecanismo que faria com que essa nova

exposição levasse ao desenvolvimento da doença que as anteriores não foram capazes de desencadear?

Por outro lado, devemos considerar que a informação do tempo de história clínica é subjetiva e nem sempre é fornecida com a devida precisão pelo paciente.

Contudo, desconhecemos estudos detalhados acompanhando o tempo de história da doença atual, de modo que o achado da positividade da IDRМ em pacientes referindo até 30 dias do início da lesão, em mais de 90% destes, pode ser fidedigna e é resultado relevante ao contribuir para a precocidade do diagnóstico.

### — Forma clínica

Conforme já vimos (Figura 14), a maior parte dos pacientes do CRLeish apresentaram a forma cutânea da LTA. O pequeno número de pacientes com a forma mucocutânea e com a forma mucosa exclusiva dificultou a análise estatística da associação entre a IDRМ e forma clínica, e não encontramos, ao contrário do descrito na literatura clássica (SALLES-GOMES, 1939; PESSOA E PESTANA, 1940; ROTBERG, 1952), nem a associação entre presença de lesões mucocutâneas e maior positividade da IDRМ (teste X<sup>2</sup> de Pearson= 0,004, p= 0,951) (Figura 30), nem com o tamanho das endureções.

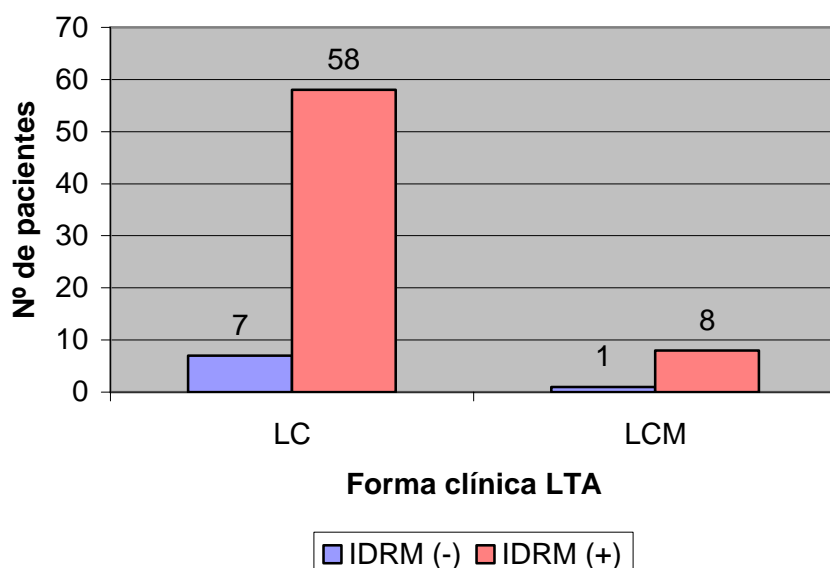


Figura 30: Estudo II- Resultados da IDRМ de acordo com a forma clínica apresentada pelos pacientes do grupo LTA



## — Número de lesões

Não encontramos em nossos resultados associação entre número de lesões cutâneas por LTA com positividade à IDRМ; nem também verificamos relação com o tamanho das endureções apresentadas (teste  $X^2$  de Pearson= 3,644,  $p= 0,162$ ) (Figura 31).

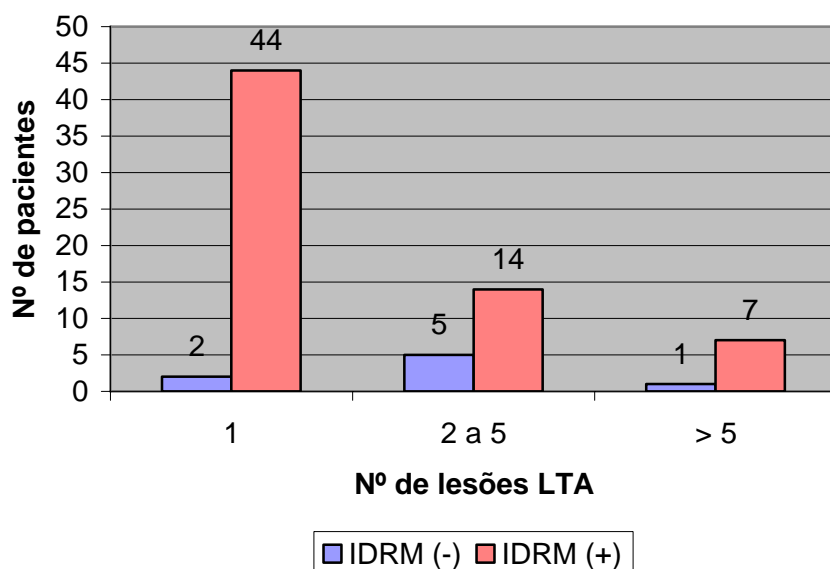


Figura 31: Estudo II- Resultados da IDRМ, de acordo com o número de lesões apresentadas pelos pacientes de LTA do Estudo II

Maior número de lesões por paciente poderia associar-se com resposta imunológica mais intensa devida a uma maior carga parasitária. Por outro lado, na forma mucosa, a destruição tecidual está associada à capacidade diferenciada de resposta imunológica do hospedeiro; neste caso, poucos parasitos podendo levar a grande intensidade de resposta inflamatória e, em decorrência, à maior destruição tecidual.

Como veremos mais adiante, todos os exames para detecção de DNA no sangue, dos 3 grupos de pacientes estudados, foram negativos. Isso poderia significar que as lesões múltiplas dos nossos pacientes possam estar mais fortemente relacionadas com o recebimento de múltiplas picadas de flebotomíneos do que com disseminação hematogênica dos parasitos.

#### 4.2.8 A IDRМ e o diagnóstico parasitológico de LTA

A Tabela 26 apresenta os resultados do Teste de Montenegro nos pacientes diagnosticados como LTA e a avaliação da positividade da IDRМ e de cada método de diagnóstico parasitológico. A co-positividade da IDRМ mostrou-se similar entre os pacientes diagnosticados pelos diferentes exames parasitológicos, variando entre 84,6 % e 91%, incluindo a PCR, que será tratada especificamente no item 4.2.11.

**Tabela 26: Resultados da IDRМ e dos exames de diagnóstico etiológico para LTA entre os pacientes do grupo LTA, cujo teste foi realizado no IPEC/CRLeish**

<i>Exames de Diagnóstico</i>	<i>de Positivos ao exame (%)</i>	<i>ao Positivos na IDRМ (%)</i>
Cultura	56	51 (91,0)
Histopatologia	30	26 (86,6)
Imprint	13	11 (84,6)
PCR	63	57 (90,4)

#### 4.2.9 Validação estatística da IDRМ

Para a avaliação da sensibilidade e especificidade da IDRМ considerou-se como paciente de LTA aquele com diagnóstico confirmado por qualquer método laboratorial utilizado (excluindo-se a PCR, que também é objeto deste estudo), tendo como comparação os dados dos pacientes do grupo NLTA. A Tabela 27 mostra os resultados da IDRМ utilizados para a validação estatística da técnica. E a Tabela 28 indica o resultado da validação estatística da IDRМ.

**Tabela 27: Avaliação da IDRM entre pacientes dos grupos LTA e NLTA.**

<i>Resultado da IDRM</i>	<i>Grupo de pacientes (%)</i>		<i>Total</i>
	<b>LTA</b>	<b>NLTA</b>	
Positiva	66 (89,1)	30 (28,5)	96 (54,0)
Negativa	8 (10,8)	75 (71,4)	83 (46,3)
Total	74 (100)	105 (100)	179 (100)

**Tabela 28: Validação da IDRM em pacientes dos grupos LTA e NLTA.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>IC 95 %</i>
Sensibilidade	89,1	0,82 - 0,96
Especificidade	71,4	0,62 - 0,80
Valor preditivo positivo	68,7	0,59 - 0,78
Valor preditivo negativo	90,3	0,84 - 0,96
Razão de verossimilhança para teste positivo	3,12	2,28 - 4,27
Razão de verossimilhança para teste negativo	0,15	0,07 - 0,29
Probabilidade pré-teste	0,41	-
Chance pré-teste	0,69	-
Chance pós-teste	2,08	-
Probabilidade pós-teste	0,67	-

A sensibilidade encontrada (89,1%) é bem próxima àquela descrita por Montenegro no primeiro trabalho sobre a IDRM (86%). O mesmo autor mostrou especificidade de 100 % ao teste. Esses parâmetros são intrínsecos à técnica, ou seja, relativamente estáveis, desde que seja seguido o mesmo protocolo de aplicação e utilizado o mesmo antígeno. A utilização de um número expressivo e variado de controles de diferentes etiologias, bem como os intervalos de confiança, não muito espaçados, torna os valores encontrados neste estudo, robustos.

Os valores preditivos, por sua vez, variam em função da prevalência da doença na população estudada. Considerando a frequência de 41 % da doença na população de estudo (74 pacientes de LTA entre 179 pacientes LTA e NLTA

testados), um teste de Montenegro negativo dá uma chance de 90 % daquela lesão apresentada pelo paciente não ser devida à LTA. Por outro lado, um teste positivo dá uma chance de 68 % do indivíduo ser realmente portador da doença.

A razão de verossimilhança (likelihood ratio) é um parâmetro mais consistente já que não sofre influência da prevalência da doença e diz quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo (ou negativo) do teste em doentes. Nosso estudo mostrou que é 3,12 vezes mais provável encontrar um resultado positivo ao teste nos doentes de LTA do que nos NLTA, enquanto que é apenas 0,15 vezes mais provável o achado de um resultado negativo nos mesmos doentes de LTA.

Com a razão de verossimilhança e a prevalência, foram calculadas as probabilidades pré e pós-teste. A probabilidade pré-teste é igual à prevalência da doença na população, ou seja, independentemente da IDR, existe uma probabilidade *a priori* de 41 % de um paciente atendido no CRLeish ser portador de LTA. Quando a IDR é utilizada na rotina diagnóstica, a probabilidade pós-teste passa a 67 %, bem próxima do valor preditivo positivo encontrado.

Os dados da validação estatística da IDR serão utilizados para a interpretação dos resultados do teste nos pacientes com diagnóstico não definido.

#### **4.2.10 Interpretação da IDR no grupo NDef**

O grupo de pacientes cujo diagnóstico não foi confirmado incluiu 56 pacientes, dos quais 35 participaram da avaliação da IDR. Destes, a IDR foi positiva nos 10 que apresentaram cura espontânea da lesão, em 2 de 3 que foram encaminhados e curados após teste terapêutico para LTA e em 8 de 19 dos demais pacientes deste grupo, perfazendo 20 pacientes.

Dos 35 pacientes, 13 foram biopsiados, dos quais 12 tiveram Teste de Montenegro positivo. A ausência de positividade a outros exames diagnósticos etiológicos dificultou a interpretação do resultado da IDR. Mas, considerando-se o valor preditivo positivo do teste, acima definido (Tabela 28), podemos supor que 68,7% dos 20 pacientes positivos à IDR, ou seja, 14 pacientes provavelmente apresentaram LTA. Não temos, no entanto, condições de identificar quais seriam os 14 portadores da infecção entre os 20 IDR positivos. Alguns pacientes deste grupo, que foram biopsiados, terão os resultados da PCR analisados a seguir.

#### 4.2.11 A PCR no sangue periférico e em tecido

Nenhuma amostra de sangue periférico dos 300 pacientes testados no Estudo II apresentou DNA de *Leishmania* no sangue, de acordo com o protocolo realizado no Estudo I com a revelação em gel de agarose a 2 %.

Outros estudos estão em andamento para determinar se essas amostras podem apresentar banda visível, caso forem aplicadas em eletroforese em poliacrilamida ou se a PCR for realizada em volume de 10 µL.

Para a padronização da PCR a partir de biópsia de lesão foi necessário, além do protocolo prévio conforme descrito no capítulo de metodologia, a padronização do melhor kit de extração de DNA para fragmento de tecido e a determinação do limiar de detecção da PCR utilizando DNA de culturas axênicas.

##### — Comparação dos kits de extração

A Tabela 29 mostra o rendimento, em nanogramas de DNA por microlitros de solução, dos kits utilizados na extração de DNA de fragmentos de biópsias de 11 pacientes com lesões sugestivas de LTA. Destaca-se que o rendimento obtido é mostrado em concentração de DNA total.

Embora algumas amostras tenham tido melhor rendimento com o kit DNAzol®, a maioria apresentou rendimento largamente superior com o kit Genomic Prep®, tendo sido este o escolhido para a extração de DNA das amostras subsequentes.

**Tabela 29: Rendimento da extração de DNA de biópsias: com os kits DNAzol® e Genomic Prep®, conforme protocolo de padronização da extração**

Nº Amostra	Quantidade de DNA (nG/µL)	
	Kit DNAzol®	Kit Genomic Prep®
1	603,2	21,0
2	802,7	816,6
3	585,7	1,8
4	678,5	1659,8
5	31,8	95,1
6	112,1	1089,0
7	57,9	1337,7
8	111,1	1492,5
9	61,0	664,5
10	40,7	416,5
11	571,7	123,2

— **Determinação do limiar de detecção da PCR em culturas de *Leishmania braziliensis***

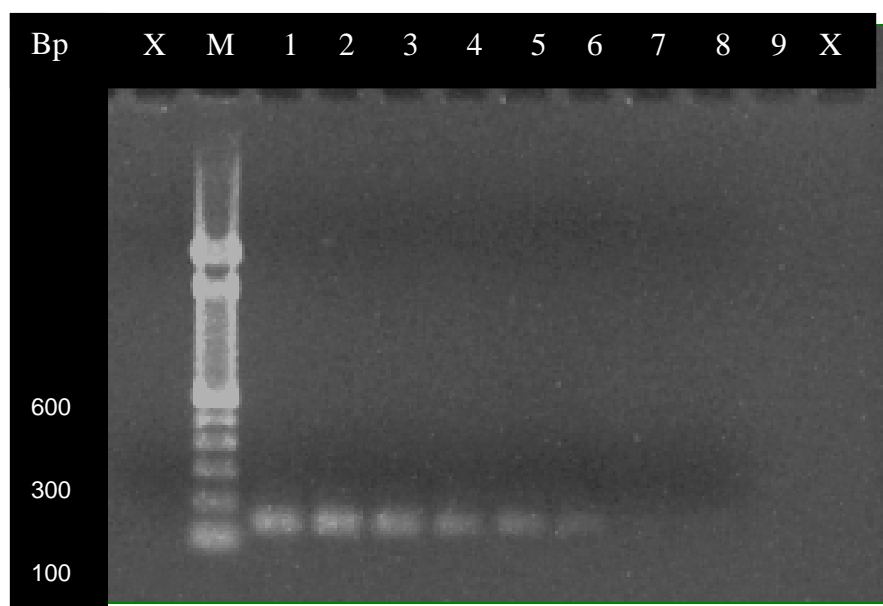
Para a determinação do limiar de detecção da PCR, foi estimada a quantidade mínima necessária de DNA, no tubo de reação, para que o gel de agarose apresentasse banda visível após a amplificação. Uma cultura axênica de *Leishmania braziliensis* teve o DNA extraído e quantificado em espectrofotômetro, e a seguir diluído em fatores de 10 e submetido à amplificação. A Tabela 30 e a Figura 32 apresentam os resultados obtidos.

De acordo com a Figura 32, é possível a visualização de banda até a amostra correspondente à diluição nº 6, que corresponde a concentração de 0,0000016678 µG/µL (Tabela 30). Considerando que foram aplicados 5 µL de DNA por tubo de reação, a banda corresponde a uma quantidade de DNA inicial alvo de 0,000008339 µG (8,34 picogramas).

O limiar encontrado é próximo do obtido pela equipe que desenvolveu e padronizou os primers utilizados em nosso trabalho - 1 picograma.

**Tabela 30: Concentrações de DNA de cultura axênica de *Leishmania braziliensis* utilizadas na avaliação do limiar de detecção da PCR**

Nº Amostra	Diluição	Concentração ( $\mu\text{G}/\mu\text{L}$ )	final	Volume aplicado	Quantidade aplicada ( $\mu\text{G}/\mu\text{L}$ )
1	1:10	0,16678		5 $\mu\text{L}$	0,8339
2	1:100	0,016678		5 $\mu\text{L}$	0,08339
3	1:1000	0,0016678		5 $\mu\text{L}$	0,008339
4	1:10000	0,00016678		5 $\mu\text{L}$	0,0008339
5	1:100000	0,000016678		5 $\mu\text{L}$	0,00008339
6	1:1000000	0,0000016678		5 $\mu\text{L}$	0,000008339
7	1:10000000	0,00000016678		5 $\mu\text{L}$	0,0000008339
8	1:100000000	0,000000016678		5 $\mu\text{L}$	0,00000008339
9	Sem DNA	0,0		5 $\mu\text{L}$	0,0



**Figura 32: Estudo II- Determinação do limiar de detecção da PCR com DNA de cultura de *Leishmania braziliensis*.**

- Bp, pares de bases; X=slot vazio;M=marcador de peso molecular 100 bp; 1-9 amostras (Tabela 31)

#### 4.2.11.1 Repetibilidade da PCR

A repetibilidade da PCR foi avaliada de forma preliminar em amostras de 143 pacientes, amplificadas em dois momentos diferentes, de acordo com o mesmo protocolo. A concordância foi avaliada através do índice kappa, do mesmo modo que para a comparação das leituras da IDRM no local da aplicação e no papel. A tabela 31 resume os resultados obtidos.

**Tabela 31: Resultados obtidos entre duas reações de PCR, com as mesmas amostras em tempos diferentes**

PCR 2	PCR 1		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	86	18	104
Negativo	5	34	39
Total	91	52	143

A concordância observada foi de 83,9%, sendo 16,1 % as amostras discordantes nos dois experimentos. Todas as amostras discordantes foram positivas a uma terceira PCR, tendo sido consideradas positivas no resultado final. O índice kappa calculado foi de 0,633, com IC 95%= 0,495- 0,770. A interpretação desse valor de kappa (LANDIS e KOCH, 1977) é considerada boa.

#### 4.2.12 Caracterização dos pacientes submetidos à biópsia com realização da PCR

Do total de 302 pacientes atendidos no CRLeish, 179 foram biopsiados, para realização de exames de diagnóstico etiológico e PCR para *Leishmania*, conforme mostrado na Figura 33. Conforme justificado anteriormente, os resultados do Teste de Montenegro trazidos de serviços externos não foram considerados, mas as biópsias dos mesmos pacientes foram incluídas para avaliação da PCR. Dos 214 pacientes que realizaram o Teste de Montenegro no IPEC, 91 foram biopsiados.



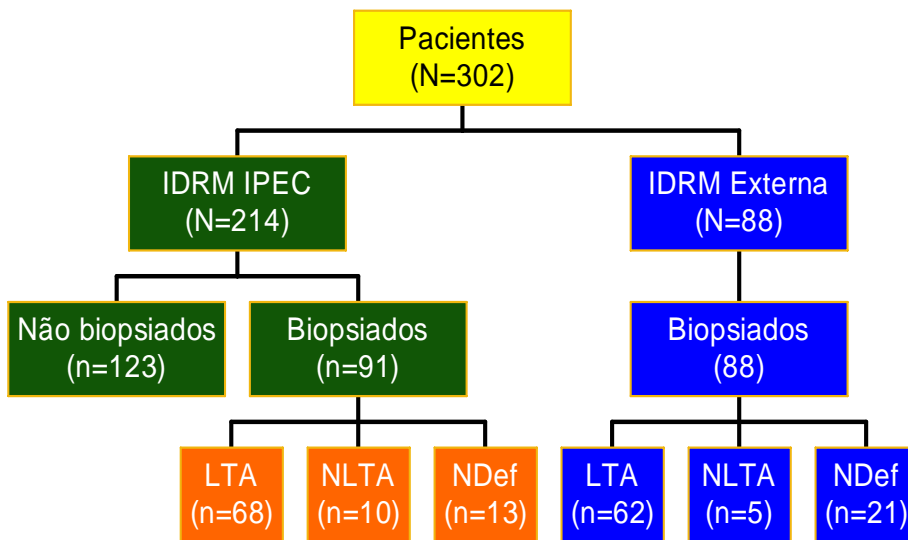


Figura 33: Estudo II- Número de pacientes biopsiados por local de realização do Teste de Montenegro e grupo de pacientes

#### 4.2.12.1 Taxa de positividade da PCR nos 3 grupos de pacientes

A Figura 34 mostra a positividade da PCR em biópsia de lesão suspeita de LTA ou outro diagnóstico diferencial. A reação foi positiva em 120 (92,3 %) dos 130 pacientes de LTA testados, em 1 (6,6%) dos 15 pacientes do grupo NLTA e em 16 (48,4 %) dos 33 pacientes do grupo NDef .

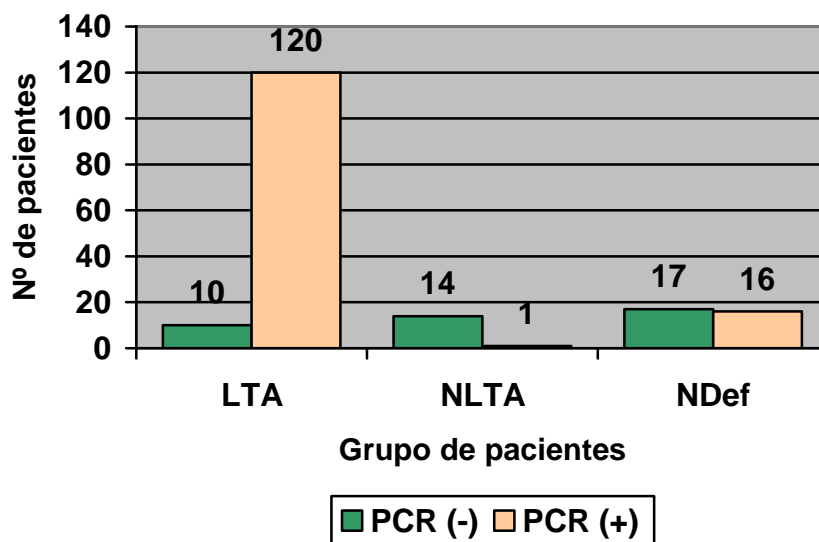


Figura 34: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com os grupos de pacientes estudados

A positividade da PCR no grupo LTA observada nesta pesquisa é similar à encontrada em outros estudos, no Brasil e no exterior, com o mesmo iniciador (*primer*) ou iniciadores

diferentes (LASKAY et al 1995; ROMERO et al, 2001; DE OLIVEIRA, BAFICA et al, 2003; MEDEIROS et al, 2002).

Dos 10 pacientes com LTA negativos à PCR, 6 residiam em áreas endêmicas de LTA, 1 era menor de 15 anos de idade, 6 apresentavam uma única lesão, sendo 1 paciente da forma mucocutânea, e 6 apresentavam menos de 2 meses de evolução da doença no momento do atendimento no IPEC. Nenhum dos estudos anteriormente citados mostrou associação entre esses parâmetros clínico-epidemiológicos e a positividade à PCR.

#### 4.2.12.2 Positividade da PCR e a procedência dos pacientes

Embora 6 dos 10 pacientes PCR-negativos residissem em áreas endêmicas de LTA, a Figura 35 mostra que a residência em área de LTA também foi associada à positividade da PCR (teste X<sup>2</sup> de Pearson= 11,612, p= 0,007).

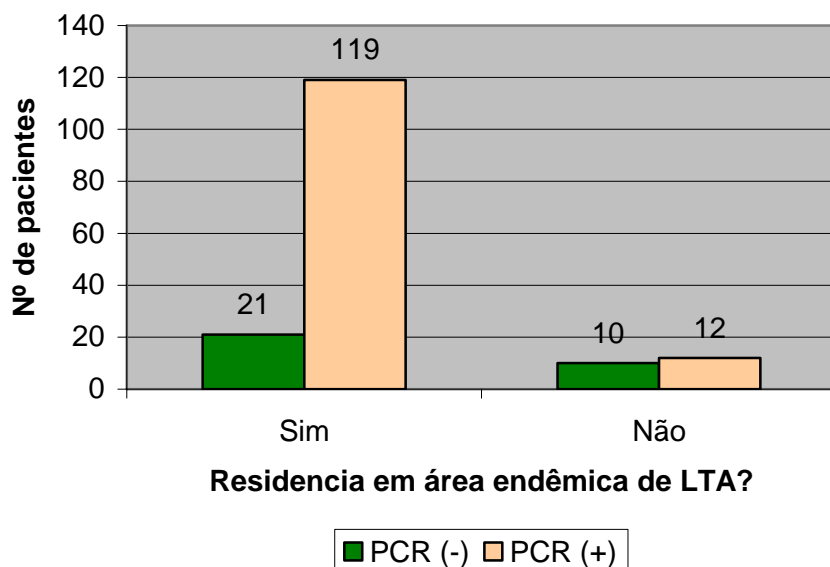


Figura 35: Estudo II: Resultados da PCR de acordo com a residência ou não em área endêmica de LTA

Esses resultados sugerem que a positividade aos exames estudados (IDRM e PCR) esteja de fato associada ao contato com os parasitos do gênero *Leishmania*, mesmo nos pacientes do grupo NLTA, que comprovadamente não tinham leishmaniose clinicamente manifesta.

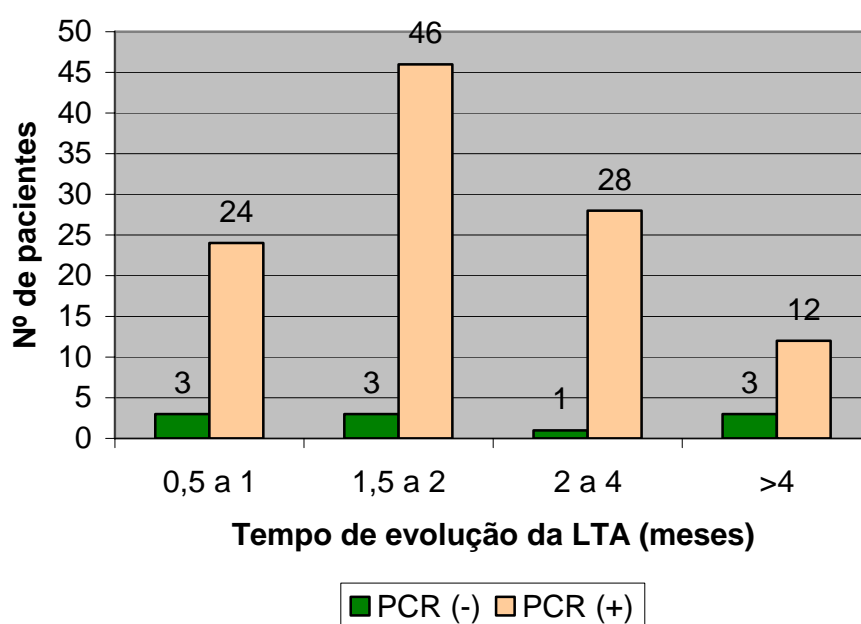
#### 4.2.12.3 Positividade da PCR e as variáveis clínico-epidemiológicas nos pacientes com LTA

A avaliação da correlação da positividade da PCR com perfil clínico envolvendo tempo de história da doença, forma clínica e número de lesões por LTA foi relativamente prejudicada pela grande homogeneidade da casuística atendida e elevada positividade da reação.

##### — Tempo de história clínica

O tempo de evolução anterior ao atendimento no CRLeish, conforme apresentado na Figura 36 não se associou à positividade da PCR ( $\chi^2$  de Pearson= 3,39,  $p= 0,183$ ) O mesmo aconteceu com a IDR, como vimos anteriormente.

No entanto, destacamos que dos dez pacientes PCR negativos do grupo LTA, seis apresentavam menos de dois meses de história clínica até o atendimento no IPEC.



**Figura 36: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com o tempo de evolução, em meses, da LTA**

### — Forma clínica

Conforme descrito anteriormente, a maior parte dos pacientes do CRLeish apresentava a forma cutânea da LTA. A Figura 37 mostra que o desempenho da PCR foi similar entre pacientes de forma cutânea e mucocutânea da LTA (teste  $\chi^2$  de Pearson= 0,020,  $p= 0,888$ ). Observação semelhante ocorreu na avaliação da IDRMM frente à mesma variável.

Em nosso estudo, a cultura diagnosticou 8 dos 15 pacientes da forma mucocutânea, a histopatologia diagnosticou 11 dos 15 e a PCR 14 dos 15 pacientes, tendo sido o método mais sensível para o diagnóstico da LTA mucocutânea. Outros estudos mostraram o grande valor da PCR no diagnóstico desta forma de LTA, comparando-a com os outros exames de diagnóstico etiológico utilizados (exame direto, cultura e histopatologia)(PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; OLIVEIRA, NOVAIS et al., 2005)

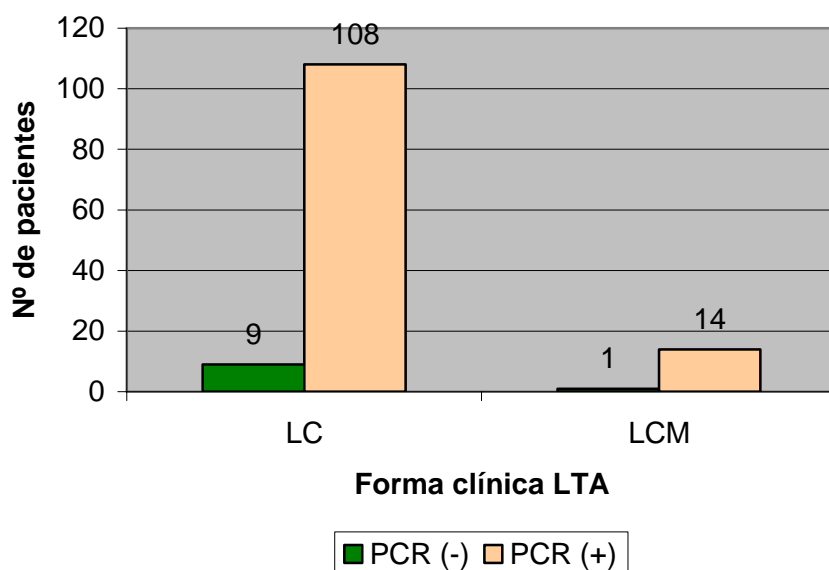


Figura 37: Estudo II- Resultados da PCR de acordo com a forma clínica de LTA apresentada

### — Número de lesões

Não encontramos em nossos resultados associação entre a positividade à PCR e o número de lesões apresentadas pelos pacientes avaliados (teste  $\chi^2$  de Pearson=

7,458,  $p= 0,114$ , respectivamente). O mesmo ocorreu com a avaliação da IDRMM nesses casos.

Como, praticamente, todos os pacientes foram positivos à PCR, a associação com as diferentes variáveis clínicas fica prejudicada, para este trabalho.

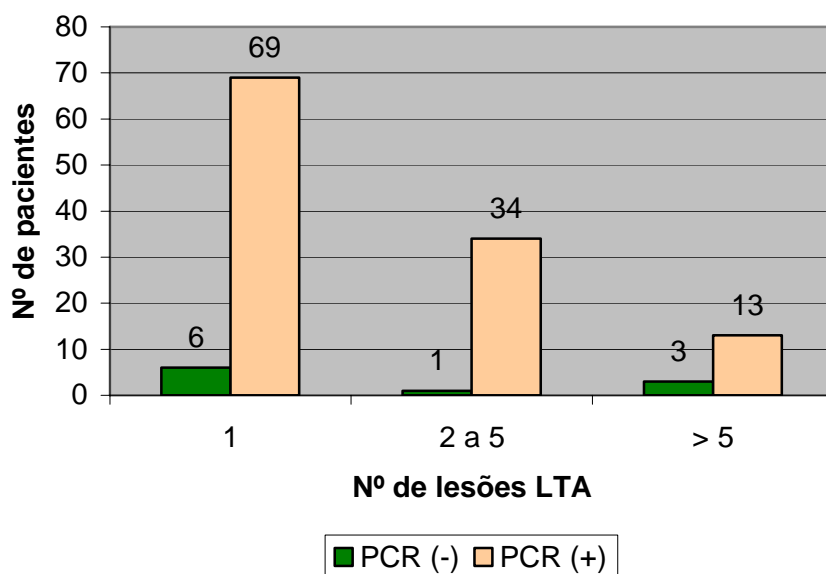


Figura 38: Estudo II- Resultados da PCR, de acordo com o número de lesões por LTA

#### 4.2.13 Validação estatística da PCR

A Tabela 32 mostra a co-positividade entre a PCR e os exames tradicionais de diagnóstico utilizados para os pacientes de LTA. A co-positividade da PCR foi de cerca de 90 %, tendo apresentado valores próximos a do Teste de Montenegro, mostrada na Tabela 26.

Tabela 32: Co-positividade entre a PCR e os outros exames de diagnóstico etiológico para LTA realizados nos pacientes

Exames de Diagnóstico	de Positivos ao exame (%)	ao Positivos na PCR (%)
Cultura	106	96 (90,5)
Histopatologia	48	44 (91,6)
Imprint	32	29 (90,6)

A sensibilidade analítica, a especificidade, os valores preditivos, a razão de verossimilhança e as probabilidades pré e pós- teste da PCR, apresentados na Tabela 34 foram calculados com base nos pacientes dos grupos LTA e NLTA, conforme demonstrado na Tabela 33. A avaliação incluiu todos os pacientes que realizaram a PCR, quer tenham realizado a IDRM no IPEC ou externamente (Figura 33).

**Tabela 33: Taxas de positividade da PCR nos pacientes com LTA ou com outro diagnóstico etiológico (NLTA)**

<i>Resultado da PCR</i>	<i>Grupo de pacientes</i>		<i>Total</i>
	<b>LTA</b>	<b>NLTA</b>	
Positiva	120 (92,3)	1 (6,6)	121 (83,4)
Negativa	10 (7,6)	14 (93,3)	24 (16,5)
Total	130 (100)	15 (100)	145 (100)

A Tabela 33 mostra os parâmetros estatísticos encontrados e o intervalo de confiança (IC 95%).

**Tabela 34: Avaliação da PCR nos pacientes com LTA ou com outro diagnóstico etiológico (NLTA)**

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>IC 95 %</i>
Sensibilidade	92,3 %	0,87 - 0,96
Especificidade	93,3 %	0,80 - 1,05
Valor preditivo positivo	99,2 %	0,97 - 1,00
Valor preditivo negativo	58,3 %	0,38 - 0,78
Razão de verossimilhança para teste positivo	13,84	2,08 - 92,04
Razão de verossimilhança para teste negativo	0,08	0,04 - 0,15
Probabilidade pré-teste	0,89	-
Chance pré-teste	8,09	-
Chance pós-teste	105,1	-
Probabilidade pós-teste	0,99	-

A PCR foi o exame mais sensível e específico dentre todos os utilizados, confirmando outros estudos similares realizados (PIRMEZ, DA SILVA TRAJANO et al., 1999; OLIVEIRA, NOVAIS et al., 2005) O baixo valor preditivo negativo da PCR provavelmente é efeito da alta prevalência da LTA na população estudada, a qual exerce efeito sobre os valores preditivos: quanto maior a prevalência, menor o valor preditivo negativo e maior o valor preditivo positivo.

A partir da frequência da doença na população de pacientes considerada na Tabela 33 (130 LTA em 145 pacientes) e da razão de verossimilhança para teste positivo, foram calculadas a chance pós-teste e a probabilidade pós-teste de um paciente com PCR positiva apresentar, de fato, leishmaniose. A probabilidade pré-teste equivale à prevalência da doença (0,89- 89 %). Dessa forma, a chance pré-teste de um paciente apresentar leishmaniose na população estudada foi de 8,09 vezes contra um de não apresentar. Após um resultado positivo da PCR, a chance pós-teste passa a 105,18 vezes e a probabilidade pós-teste de 89,0 % para 99,0.

#### **4.2.14 PCR em pacientes sem diagnóstico etiológico de LTA**

Apenas 1 paciente do grupo NLTA foi positivo à PCR. Este paciente, de 57 anos, residia no bairro de Bangu, Rio de Janeiro, área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral. Ao exame clínico, apresentava ulceração extensa acometendo o pavilhão auricular e a região temporal do lado direito, com aproximadamente 6 meses de evolução. Concomitantemente, apresentava miíase local, diabetes e seqüelas de acidente vascular cerebral, incluindo afasia e epilepsia. A clínica e a epidemiologia sugestiva de LTA justificaram o encaminhamento do paciente à rotina diagnóstica padrão, incluindo exames para diagnóstico diferencial.

O paciente apresentou IDRМ negativa e exames diretos de diagnóstico etiológico para LTA e diferenciais negativos. Porém, a PCR para *Leishmania* foi positiva; o DNA extraído da biópsia foi encaminhado para PCR com primers específicos para o subgênero *Viannia*, no laboratório de Sistemática Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz, com resultado novamente positivo. Para investigar a possibilidade de contaminação laboratorial do DNA do paciente, foi realizada, no mesmo laboratório, extração de DNA da lâmina do paciente encaminhada para exame direto e que não passou pelo laboratório de diagnóstico molecular do IPEC, e a PCR para *Leishmania* (*Viannia*) foi novamente positiva.

No entanto, a histopatologia da biópsia da lesão diagnosticou carcinoma epidermóide.

Realizada a sorologia para *Leishmania*, por Imunofluorescência Indireta, foi positiva a 1:160 (Mouta-Confort, E., comunicação pessoal). Este resultado, associado à IDRМ negativa e o dado epidemiológico, seria compatível com diagnóstico de leishmaniose visceral (MARZOCHI, 1981). Contudo, seria improvável que o mesmo paciente tivesse 3 nosologias associadas (LTA, leishmaniose visceral e carcinoma epidermóide).

Foi realizada nova biópsia, dez dias após a primeira, com o mesmo encaminhamento de rotina. A PCR do DNA da segunda biópsia foi negativa, bem como os outros exames. E, novamente, a histopatologia confirmou o carcinoma epidermóide. O paciente foi então encaminhado para tratamento específico da neoplasia.

Antes do resultado da segunda biópsia, o paciente fora internado para prova terapêutica com Glucantime® (5mg/kg/dia, durante 30 dias), com uso concomitante de antibioticoterapia de amplo espectro, e não respondeu ao tratamento com antimonial.

A PCR para *Leishmania* mostrou resultados positivos com dois primers diferentes, em dois laboratórios diferentes e em dois espécimes clínicos diferentes (biópsia e lâmina), em paciente de área endêmica de LTA. Considerando este fato, podemos admitir a associação do carcinoma epidermóide com infecção subclínica por *Leishmania*. Revisão da literatura mostra que carcinomas aparecem preferencialmente sobre cicatrizes de outras etiologias, tendo sido descritos casos de carcinoma basocelular em cicatriz de LTA tratada (GUREL, INAL et al., 2005; UNLU, ALTUN et al., 2007) . Sabe-se também que o DNA de *Leishmania* pode persistir na cicatriz da LTA que tenha sido tratada ou não, passível de ser visualizado por PCR (SCHUBACH, HADDAD et al., 1998a). Além disso, é referida a associação entre leishmaniose cutâneo-difusa e desenvolvimento de carcinomas sobre as lesões, os quais podem, inclusive, levar à morte os pacientes (Jackson Costa, comunicação pessoal).

Não podemos descartar, todavia, a hipótese de que o paciente em questão apresentava LTA anterior, não diagnosticada, em cuja cicatriz desenvolveu-se o



carcinoma epidermóide. Tal hipótese explicaria a positividade da primeira PCR e a sorologia positiva, considerando que o paciente é de área endêmica. Esta hipótese não pode ser comprovada, mas poderá ser melhor estabelecida a partir de estudos comparativos de lesões cicatrizadas e de pele sadia de pacientes de LTA, a fim de detectar DNA do parasito nesses locais.

Mais ainda, se lesões cicatriciais são sítios favoráveis ao aparecimento de carcinomas, seria importante investigar a frequência desses tumores em ex-pacientes de leishmaniose ou moradores de áreas endêmicas de LTA. Tal investigação talvez viesse a auxiliar na detecção precoce de casos de câncer, ao identificar populações de risco para a doença, auxiliando na prevenção e/ou tratamento oportuno dos casos.

#### 4.2.15 Interpretação da PCR nos pacientes do grupo NDef

A Tabela 35 apresenta os resultados da IDRМ e da PCR nos 13 pacientes do grupo NDef que participaram do projeto IDRМ e foram biopsiados.

Dos 13 pacientes do grupo NDef que foram biopsiados, 12 (92 %), apresentavam IDRМ positiva. Esse fato prejudicou a avaliação do comportamento da IDRМ nesse grupo. Por outro lado, demonstra a confiança da equipe clínica no teste, principalmente no valor de uma IDRМ negativa para excluir a possibilidade de um paciente apresentar LTA, o que foi confirmado neste estudo pelo valor preditivo negativo de 90 % apresentado pelo teste. Entre esses 12 pacientes, se incluem 9 pacientes IDRМ-positivos que apresentaram cicatrização espontânea da lesão, antes da conclusão do diagnóstico (provável cura espontânea), 3 IDRМ- positivos que não tiveram diagnóstico conclusivo e 1 paciente submetido ao teste terapêutico para LTA.

**Tabela 35: Resultados da IDRМ e da PCR nos pacientes do grupo NDef que realizaram Teste de Montenegro e PCR no IPEC.**

<i>Resultado da PCR</i>	<i>Resultado IDRМ (%)</i>		<i>Total</i>
	<b>Positiva</b>	<b>Negativa</b>	
Positiva	8 (100)	0 (0)	8 (100)
Negativa	4 (80)	1 (20)	5 (100)
<b>Total</b>	<b>12 (92,3)</b>	<b>1 (0,7)</b>	<b>13 (100)</b>

Analisando os dados da tabela e considerando os valores preditivos e a razão de verossimilhança da PCR mostrados na tabela 33, mesmo com os grandes intervalos de confiança, podemos acreditar que a PCR confirmou o resultado da IDRМ em 8 dos 12 pacientes IDRМ-positivos biopsiados (66%); no entanto, 4 pacientes IDRМ positivos (33,3%) foram negativos à PCR. O único paciente IDRМ negativo biopsiado, o qual havia sido submetido à terapia com base na história clínica e epidemiológica, foi também negativo à PCR.

Como todos os outros exames parasitológicos foram negativos, a PCR foi a única ferramenta de diagnóstico etiológico capaz de revelar este fato. Os pacientes foram novamente chamados ao CRLeish para reavaliação, com base nos resultados positivos da PCR.

Além dos 13 pacientes descritos anteriormente, foram biopsiados 21 pacientes que realizaram IDRМ fora do IPEC (Figura 33), perfazendo um total de 33 pacientes do grupo NDef biopsiados. A Tabela 36 mostra o resultado da PCR nesses pacientes, de acordo com o desfecho apresentado. Deste grupo de pacientes, 16 (48,4%) foram positivos.

**Tabela 36: Resultados da PCR no grupo NDef, de acordo com o desfecho do caso.**

<i>DIAGNOSTICO</i>	<i>RESULTADO PCR</i>		<i>Total</i>
	Negativo (%)	Positivo (%)	
Cura espontânea	9 (60,0)	6 (40,0)	15 (100,0)
Cura após Teste Terapêutico LTA	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100,0)
Demais pacientes	7 (70,0)	3 (30,0)	10 (100,0)
<b>Total</b>	<b>17 (51,5)</b>	<b>16 (48,4)</b>	<b>33 (100,0)</b>

Dos pacientes com possível LTA, com cura espontânea, 6 em 15 foram positivos à PCR. Considerando os resultados observados nos pacientes LTA e NLTA confirmados, principalmente o valor preditivo positivo e a probabilidade pós- teste, podemos admitir que esses pacientes sejam portadores de LTA. Novamente, com base nos resultados da PCR, tais pacientes foram chamados para reavaliação. Diante

desses dados, podemos afirmar que em mais de um terço (40 %) dos doentes que procuraram o CRLeish com suspeita de LTA e evoluíram com cicatrização espontânea da lesão, esta foi devida à infecção por *Leishmania*. Ou seja, além dos casos clínicos confirmados e dos pacientes com infecção subclínica, podem ser encontrados em áreas endêmicas de LTA indivíduos com doença clinicamente manifesta, mas que evoluíram espontaneamente à cura clínica.

Do grupo que foi submetido ao teste terapêutico, 7 dos 8 pacientes biopsiados foram positivos à PCR, perfazendo 87,5 % de positividade. Entre os 8 casos se incluem 1 com IDRМ positiva, sendo que os outros 7, embora não tivessem realizado IDRМ no CRLeish, foram biopsiados e submetidos à PCR. A inclusão desse grupo mostrou-se fundamental para a verificação da utilidade da PCR como ferramenta diagnóstica da LTA e confirmatória do diagnóstico clínico, já que foi o único exame de diagnóstico etiológico positivo nesses casos. Todos os pacientes submetidos ao teste terapêutico responderam favoravelmente à medicação, com cura clínica das lesões.

A inclusão do grupo NDef em nosso estudo é um diferencial de outros trabalhos encontrados na literatura, os quais, ou utilizaram a positividade ao Teste de Montenegro como critério para definição de pacientes com LTA (MARQUES, VOLPINI et al., 2006), ou avaliaram apenas pacientes confirmados de LTA (DE OLIVEIRA, BAFICA et al., 2003). No entanto, na prática clínica, muitas vezes, os pacientes não são confirmados por nenhum exame tradicional de diagnóstico etiológico, nem são confirmados com outra etiologia. Em nosso estudo, 16 dos 56 pacientes do grupo NDef foram confirmados como portadores de LTA pela PCR. Isso corresponde a cerca de 10 % de todos os pacientes de LTA atendidos.

Logo, com a inclusão da PCR na rotina, a prevalência da doença entre os pacientes confirmados por algum método de diagnóstico etiológico aumentou de 72,6 % (130 confirmados como LTA em 179 pacientes biopsiados) para 81,5 % (146 pacientes em 179 biopsiados). No entanto, mais do que mudança significativa em indicadores epidemiológicos, conseguiu-se que 16 pacientes, sem perspectiva diagnóstica pelos métodos atualmente disponíveis, pudessem ser diagnosticados e adequadamente tratados.

A Tabela 37 mostra o efeito da inclusão dos 16 pacientes agora considerados como LTA na avaliação dos exames de diagnóstico etiológico realizados. A PCR apresentou a maior sensibilidade e, independentemente da positividade a outros exames, diagnosticou 93,1 % dos pacientes classificados como LTA. O ganho em sensibilidade do diagnóstico, com a inclusão da PCR na rotina, foi de 20,5 %.

Consideramos que esses valores falam a favor da inclusão da PCR na rotina diagnóstica realizada no CRLeish, para todos os casos negativos aos exames padrões de diagnóstico etiológico.

**Tabela 37: Estudo II- Sensibilidade dos exames de diagnóstico etiológico realizados nos pacientes confirmados como LTA, incluindo os pacientes diagnosticados pela PCR**

<i>Exames de Diagnóstico</i>	<i>de N° positivos ao exame / total de pacientes</i>	<i>Sensibilidade dos exames</i>
Cultura	106/146	72,6 %
Histopatologia	52/146	35,6 %
Imprint	32/146	21,9 %
PCR	136/146	93,1%

#### **4.2.16 IDRM e PCR: co-positividade e co-negatividade, avaliação do uso em série e em paralelo**

Para a avaliação da co-positividade da IDRM e da PCR, foram utilizados os resultados dos 91 pacientes que realizaram simultaneamente os dois exames (Figura 35).

A avaliação do desempenho dos testes em série ou paralelo exige que os mesmos sejam examinados sob a mesma prevalência da doença em questão. Dessa forma, para o estabelecimento da melhor maneira de utilização dos dois testes, foram utilizados os resultados dos pacientes com LTA confirmada (N=68) e confirmados com outra etiologia (N=10), dentre os 91 pacientes, para o cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes quando usados em paralelo ou em série.

#### 4.2.16.1 Co-positividade e Acurácia

A Tabela 38 mostra os resultados dos 91 pacientes submetidos à IDRМ e à PCR (Figura 35). A co-positividade IDRМ-PCR foi de 86,6 % (65/ 75 pacientes) e a co-negatividade foi de 56,2 % (9/16 pacientes). A acurácia foi de 81,3 % (65+9/91). Considerando que a) o número de pacientes de LTA biopsiados é bem maior do que os NLTA e b) o encaminhamento dos pacientes pela equipe médica para a realização de biópsias possa ter sido influenciado pelo resultado positivo da IDRМ (ver item 4,2,14 -Tabela 35), esses valores podem estar superestimados.

**Tabela 38: Resultados da IDRМ e da PCR no grupo de pacientes submetidos a ambos os exames, independente do diagnóstico de certeza dos pacientes.**

<i>Resultado da</i> PCR	<i>Resultado IDRМ (%)</i>		<i>Total</i>
	Positiva	Negativa	
Positiva	65	7	72
Negativa	10	9	19
Total	75	16	91

#### 4.2.16.2 IDRМ e PCR: testes em paralelo e em série

Na utilização dos testes em paralelo, o paciente é submetido aos testes diagnósticos de forma simultânea, e é considerado positivo quando um dos métodos apresenta resultado positivo. Na utilização em série, um dos testes, geralmente o mais sensível, é utilizado inicialmente, e o teste mais específico é utilizado como confirmatório, nos pacientes positivos ao teste inicial.

Para a definição da melhor forma de utilização dos testes, são calculadas a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos combinados a partir dos resultados de aplicação dos testes no mesmo conjunto de pacientes

As Tabelas 39 e 40 mostram os resultados da IDRМ e da PCR para os 78 pacientes com LTA confirmada (N=68) e confirmados com outra etiologia (N=10) (Figura 33), utilizados para a avaliação do desempenho dos testes em série e em paralelo.

**Tabela 39: Resultados da IDRМ nos pacientes dos grupos LTA e NLTA submetidos à IDRМ e à PCR .**

<i>Resultado da</i> IDRМ	<i>Grupo de pacientes (%)</i>		<i>Total</i>
	LTA	NLTA	
Positiva	61 (96,8)	2 (3,17)	63 (100)
Negativa	7 (46,6)	8 (53,3)	15 (100)
Total	68 (87,1)	10 (12,8)	78 (100)

**Tabela 40: Resultados da PCR nos pacientes dos grupos LTA e NLTA submetidos à IDRМ e à PCR.**

<i>Resultado da</i> PCR	<i>Grupo de pacientes (%)</i>		<i>Total</i>
	LTA	NLTA	
Positiva	63 (98,4)	1 (1,5)	64 (100)
Negativa	5 (35,7)	9 (64,2)	14 (100)
Total	68 (87,1)	10 (12,8)	78 (100)

A Tabela 41 apresenta o desempenho do Teste de Montenegro e da PCR nos 78 pacientes apresentados nas Tabelas 39 e 40.

**Tabela 41: Desempenho da IDRМ e da PCR, com base nos dados das tabelas 38 e 39**

<i>Parâmetro</i>	<i>IDRМ</i>		<i>PCR</i>	
	<b>Valor</b>	<b>IC 95 %</b>	<b>Valor</b>	<b>IC 95 %</b>
Sensibilidade	89,7	0,79 - 0,94	92,6	0,86 - 0,98
Especificidade	80,0	0,82 - 0,96	90,0	0,71 - 1,08
Valor preditivo positivo	0,96	0,925- 1,01	0,98	0,95 - 1,01
Valor preditivo negativo	0,53	0,28 - 0,78	0,64	0,39 - 0,89
Razão de verossimilhança - teste positivo	4,49	1,3 - 15,53	9,26	1,44 - 59,55
Razão de verossimilhança- teste negativo	0,12	0,05 - 0,27	0,08	0,03 - 0,19
Probabilidade pré-teste	0,87	-	0,87	-
Chance pré-teste	6,69	-	6,69	-
Chance Pós-teste	26,76	-	60,23	-
Probabilidade pós-teste	0,96	-	0,98	-

A Tabela 42 apresenta os valores combinados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, calculados a partir da Tabela 41.

**Tabela 42: Avaliação da IDRM e da PCR quando utilizadas em série ou em paralelo, com prevalência de LTA de 87 % .**

<i>Parâmetro</i>	<i>Modo de aplicação dos testes</i>	
	<i>Série</i>	<i>Paralelo</i>
Sensibilidade	81,8 %	99,1 %
Especificidade	98 %	72,0 %
Valor preditivo positivo	84,4 %	95,9 %
Valor preditivo negativo	44,6 %	92,4 %

Os resultados apresentados mostram que a performance dos testes quando utilizados em paralelo é superior àquela obtida quando os testes são utilizados em série.

O método de aplicação dos testes diagnósticos deve ser escolhido de forma a maximizar seus resultados e minimizar a ocorrência de resultados falso positivos e falso negativos. No entanto, deve-se levar em conta fatores como: tempo de execução dos testes, custo e aceitabilidade do paciente, entre outros fatores.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo I foi planejado para a obtenção da maior validade interna possível. Foi realizado em voluntários de mesma faixa etária, sexo e procedência, o que, por um lado, traz limitações quanto à validade externa, já que limita a extrapolação dos resultados para ambos os sexos e diferentes faixas etárias. No entanto, a grande homogeneidade da população estudada foi necessária para que os grupos testados pudessem ser comparáveis entre si e dimensionado para que um mesmo indivíduo não recebesse mais de uma aplicação de antígeno de Montenegro evitando, assim, a sensibilização pela aplicação concomitante do antígeno e da salina controle, o que poderia ocasionar indução de positividade de uma aplicação pela outra por efeito de dose (SILVA, 1999). Este estudo forneceu a evidência necessária para a avaliação da segurança da IDRM e da padronização do antígeno quanto ao seu preservativo.

O Estudo II dirigiu-se a casuística hospitalar, ou seja, para indivíduos doentes com suspeita de leishmaniose ou de seus diagnósticos diferenciais (infecções bacterianas, micoses subcutâneas e sistêmicas, úlceras vasculares, tuberculose, hanseníase, tumores, úlceras inespecíficas). A realização desse estudo foi necessária para avaliação da IDRM como ferramenta de diagnóstico clínico e seus possíveis efeitos adversos em pacientes, sob condições controladas. Permitiu também analisar o comportamento dos testes de detecção molecular em comparação com a resposta do paciente à IDRM, conforme realizado em e diferentemente de estudos anteriores, nos quais a IDRM foi utilizada como critério de inclusão de pacientes ou definição de casos (OLIVEIRA, NOVAIS et al., 2005; MARQUES, VOLPINI et al., 2006) ou mesmo não foi considerado para comparação (ROMERO, GUERRA et al., 2001; DE OLIVEIRA, BAFICA et al., 2003). Embora realizada anteriormente, a comparação IDRM- PCR está sendo realizada pela primeira vez em relação à leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Destacamos que o protocolo em questão avalia o desempenho da PCR em amostras repetidas, o que não pode ser realizado para a IDRM, e mesmo assim, a performance da IDRM foi considerável.

Por motivos éticos e operacionais, não foi possível a realização da IDRM e PCR simultaneamente em toda a casuística atendida. Vários fatores contribuíram para isso, incluindo a realização de IDRM pela Unidade de Saúde de onde os



pacientes se originaram, o diagnóstico etiológico concluído antes da realização de biópsia e o aumento da demanda de pacientes, esgotando a capacidade de atendimento do CRLeish. Se no desenho do projeto calculamos a inclusão de 60 pacientes de LTA e 100 de outras etiologias, acabamos incluindo 136 pacientes de LTA, 110 de pacientes com outras etiologias e 56 com diagnóstico não definido, perfazendo 302 pacientes. Foi necessário o estabelecimento de uma estratégia para o melhor atendimento de todos os pacientes, considerando que o nosso projeto previa o mínimo possível de interferência na rotina clínica.

A PCR das amostras de sangue periférico obtidas neste estudo será repetida até a eliminação de qualquer dificuldade técnica que possa estar influenciando a negatividade dos resultados.

Ainda assim, conseguimos uma amostra de conveniência bastante considerável para a avaliação da IDRМ e da PCR, envolvendo 214 pacientes para a IDRМ, 179 pacientes para a avaliação da PCR e 91 pacientes para a análise de ambas as técnicas. No entanto, como, aparentemente, a realização das biópsias pode ter sido influenciada pelo resultado da IDRМ, alguns dados da avaliação conjunta estão superestimados em relação a este exame.

Este trabalho trata-se de uma linha de pesquisa que, até o momento, contribuiu de forma concreta para:

- A Retirada do timerosal da fabricação do antígeno de Montenegro da Fiocruz e de outros fabricantes;
- O Encontro de infecção subclínica por *Leishmania (Viannia)* no Rio Grande do Sul, estado brasileiro até então sem registro de leishmanioses; e, de forma indireta, para o início do programa de Vigilância da doença no RS e o encontro dos primeiros casos clínicos.
- A produção de material informativo acerca da IDRМ para distribuição aos membros da equipe do CRLeish e aos pacientes;
- A Padronização da técnica de aplicação e leitura do Teste de Montenegro e criação, como desdobramento, do respectivo Procedimento Operacional Padrão para a aplicação e leitura da IDRМ
- O estabelecimento da indicação da PCR a partir de biópsias de pacientes com lesões sugestivas de leishmanioses na rotina laboratorial do IPEC/FIOCRUZ;

## 6 CONCLUSÕES

1. O timerosal, quando injetado por via intradérmica, pode desencadear reações locais visualmente idênticas a uma resposta positiva ao antígeno de *Leishmania* inoculado em uma IDRMM
2. A utilização do timerosal como veículo do Teste de Montenegro em voluntários sadios foi responsável por uma alta frequência - 12% - de falso positivos ao teste, levando à recomendação da retirada deste composto da fabricação de antígenos de Montenegro.
3. Os antígenos mertiolatado e fenolado comportaram-se de forma similar em relação à potencia do teste, considerada como a intensidade da reação apresentada pelos voluntários.
4. Existe infecção subclínica por *Leishmania* em Santa Maria, Rio Grande do Sul, a área de estudo considerada até então indene para LTA, indicada pela positividade de 29,5 % `a IDRMM entre 203 voluntários sadios e detectada pela PC positiva em 1 dos 151 voluntários testados.
5. Indivíduos sadios testados com antígeno de Montenegro e negativos à leitura após 48 horas, podem apresentar reações no local da inoculação cerca de dez dias após a leitura inicialmente negativa, o que foi identificado em 4,5 % dos mesmos.
6. Não foram verificadas reações locais à leitura entre 10 e 16 dias, em 98 pacientes suspeitos de LTA acompanhados, previamente negativos à leitura da IDRMM em 48 horas.
7. A aplicação da IDRMM deve seguir protocolo padronizado (apresentado em anexo), para a devida atenção clínica e comparabilidade dos resultados.
8. O Teste de Montenegro pode ser considerado seguro para indivíduos sadios e em pacientes com LTA e suspeitos, não tendo sido verificadas reações adversas sistêmicas ao teste entre 400 voluntários sadios e 214 pacientes avaliados, e tendo sido as reações locais discretas e pouco frequentes em ambos os grupos, presentes em 21,5 % e 11,2 % dos mesmos, respectivamente.
9. O histórico de alergias ou doenças alérgicas, tanto nos voluntários sadios como nos pacientes, não interferiu na resposta à IDRMM,

10. O método de leitura da IDRМ por meio do decalque em papel deve ser usado como alternativa à leitura direta, uma vez que apresentou diferença expressiva de especificidade, desde que realizado por profissional adequadamente treinado, obedecendo protocolo padronizado de aplicação do teste e leitura da reação.
11. O Teste de Montenegro pode ser considerado confortável para o paciente, sendo bem aceito pelo mesmo.
12. Os pacientes portadores de LTA apresentaram endurações significativamente maiores do que os pacientes com outros diagnósticos ou com diagnósticos não definidos.
13. O fato de o paciente residir em área endêmica de LTA aumenta em 1,5 vezes a chance de o mesmo apresentar uma IDRМ positiva, mesmo que a lesão ativa no momento do atendimento não seja devido à infecção por *Leishmania*.
14. No grupo de pacientes suspeitos de LTA que evoluíram com cicatrização espontânea das lesões, e cujo diagnóstico etiológico não pôde ser confirmado pelos métodos parasitológicos, 40 % apresentaram LTA confirmada por PCR.
15. A PCR foi a técnica de diagnóstico mais sensível (92,3%) entre todos os métodos parasitológicos utilizados – cultura (78 %), histopatologia (40%) e *imprint* (24 %).
16. A repetibilidade da PCR, de 83,9%, avaliada pelo índice kappa, é considerada boa
17. A IDRМ e a PCR apresentaram co-positividade de 86,6% e acurácia de 81,3 %.
18. O encontro de positividade à IDRМ aumentou em até 4 vezes a chance do paciente testado apresentar realmente LTA, enquanto o encontro de positividade à PCR aumentou em até 13 vezes a chance do paciente testado apresentar realmente LTA
19. O achado, por PCR, de um caso de co-infecção por *Leishmania* em paciente com carcinoma epidermóide de pele, recomenda a investigação dessa associação em pacientes de áreas endêmicas de LTA
20. A melhor maneira de utilizar a IDRМ e a PCR ainda é em paralelo, no entanto, pode-se usar os testes em série, com boa performance de diagnóstico.
21. O conjunto das conclusões obtidas reforça a constatação de que a IDRМ é o melhor instrumento para inquéritos de LTA, e, como método diagnóstico, apresenta sensibilidade de 89 %, especificidade de 71,4%, valor preditivo positivo de 68,7% e valor preditivo negativo de 90,3 %

## 7 Referências Bibliográficas

ABRAMSON, M. A.; DIETZE, R. et al. Comparison of New and Old World leishmanins in an endemic region of Brazil. **Clin Infect Dis**, v.20, n.5, p.1292-1297. 1995.

AGWALE, S. M.; DUHLINSKA, D. D. et al. Response to heterologous leishmanins in cutaneous leishmaniasis in Nigeria--discovery of a new focus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, n.1, p.23-27. 1998.

AKUFFO, H.; DARCE, M. et al. In vivo evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. **Am J Trop Med Hyg**, v.53, n.1, p.16-22. 1995.

ALIMOHAMMADIAN, M. H.; KIVANJAH, M. et al. Evaluation of the efficacy of Iran leishmanin and comparison with leishmanins from Wellcome (UK) and Roma (Italy) in cured cutaneous leishmaniasis patients. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.87, n.5, p.550-551. 1993.

ALVAR, J.; YACTAYO, S. et al. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v.22, n.12, Dec, p.552-557. 2006.

AMPUERO, J.; URDANETA, M. et al. Risk factors for cutaneous leishmaniasis transmission in children aged 0 to 5 years in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Cad Saude Publica**, v.21, n.1, Jan-Feb, p.161-170. 2005.

ANDRADE, M. S.; BRITO, M. E. et al. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.3, May-Jun, p.229-233. 2005.

ANDRESEN, K.; GAAFAR, A. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.90, n.2, Mar-Apr, p.133-135. 1996.

ARANA, B. A.; ROCA, M. et al. Evaluation of a standardized leishmanin skin test in Guatemala. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.93, n.4, Jul-Aug, p.394-396. 1999.

ARBAJI, A. K.; GRADONI, L. et al. Leishmanin skin test survey in a focus of high endemicity of *Leishmania major* in Jordan. **Acta Trop**, v.54, n.1, p.77-79. 1993.

ARMIJOS, R. X.; WEIGEL, M. M. et al. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. **J Infect Dis**, v.177, n.5, p.1352-1357. 1998.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.53, n.3, Sep, p.251-255. 1995.

ASTON, D. L. e THORLEY, A. P. Leishmaniasis in Central Brazil: results of a Montenegro skin test survey among Amerindians in the Xingu National Park. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.64, n.5, p.671-678. 1970.

BADARO, R.; PEDRAL-SAMPAIO, D. et al. Evaluation of the stability of a soluble intradermal skin test antigen preparation in American visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.84, n.2, p.226-227. 1990.

BAHAMDAN, K. A.; KHAN, A. R. et al. Value of touch preparations (imprints) for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol**, v.35, n.8, Aug, p.558-560. 1996.

BARROS, M. B.; SCHUBACH ADE, O. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis**, v.38, n.4, Feb 15, p.529-535. 2004.

BAUER, A.; GEIER, J. et al. Type IV allergy in the food processing industry: sensitization profiles in bakers, cooks and butchers. **Contact Dermatitis**, v.46, n.4, Apr, p.228-235. 2002.

BEARMAN, J. E.; KLEINMAN, H. et al. A Study of Variability in Tuberculin Test Reading. **Am Rev Respir Dis**, v.90, Dec, p.913-919. 1964.

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B. et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.58, n.1, Jan, p.102-109. 1998.

BEN SALAH, A.; LOUZIR, H. et al. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.192, n.11, Dec 1, p.1981-1987. 2005.

BERN, C.; HAQUE, R. et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, n.5, May, p.909-914. 2007.

BHATTACHARYYA, R.; DAS, K. et al. Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol Lett**, v.135, n.2-3, Jan 15, p.195-200. 1996.

BRASIL. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde**. 2000a.

\_\_\_\_\_, Ed. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília DF: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2006.

- BRENIERE, S. F.; TELLERIA, J.et al. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. **Acta Trop**, v.73, n.3, Oct 15, p.283-293. 1999.
- BREWSTER, S.; ASLETT, M.et al. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, v.14, n.11, p.437-438. 1998.
- BREWSTER, S. e BARKER, D. C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.96 Suppl 1, Apr, p.S55-63. 2002.
- CAMPOS, J. A. A intradermorreação de Montenegro no pênfigo tropical. **Arq. Hig. Saúde Pública**, v.8, n.18, p.121-123. 1943.
- CASCIO, A.; CALATTINI, S.et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. **Pediatrics**, v.109, n.2, Feb, p.E27. 2002.
- CASTES, M.; BLACKWELL, J.et al. Immune response in healthy volunteers vaccinated with killed leishmanial promastigotes plus BCG. I: Skin-test reactivity, T-cell proliferation and interferon-gamma production. **Vaccine**, v.12, n.11, p.1041-1051. 1994.
- COIMBRA JUNIOR, C. E.; SANTOS, R. V.et al. Cutaneous leishmaniasis in Tupi-Monde Amerindians from the Brazilian Amazonia. **Acta Trop**, v.61, n.3, p.201-211. 1996.
- CORREA, C. A intradermorreação de Montenegro na tuberculose. **Arq. Hig. Saúde Publ.**, p.61-63. 1941.
- CORRÊA, M. A. e AMATO NETO, V. Intradermorreações com antígeno de culturas de *Leishmania braziliensis* submetidas à ação do ultra-som: resultados obtidos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 1958.
- COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.et al. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.96 Suppl 1, Apr, p.S173-178. 2002.
- COX, N. H. e FORSYTH, A. Thiomersal allergy and vaccination reactions. **Contact Dermatitis**, v.18, n.4, p.229-233. 1988.
- CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D.et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.89, n.3, p.195-208. 1980.
- CULHA, G.; UZUN, S.et al. Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey. **Int J Dermatol**, v.45, n.5, May, p.569-572. 2006.

DA COSTA, C. A.; DE TOLEDO, V. P. et al. Montenegro skin test--evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, n.2, p.193-194. 1996.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, Oct, p.861-870. 2003.

DE BRUIJN, M. H. e BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop**, v.52, n.1, Sep, p.45-58. 1992.

DE BRUJIN, M. H.; LABRADA, L. A. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Trop Med Parasitol**, v.44, n.3, Sep, p.201-207. 1993.

DE LIMA BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Trop**, v.93, n.1, Jan, p.41-47. 2005.

DE LIMA BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. M. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.6, Aug, p.777-779. 2001.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W. et al. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, v.17, n.9-10, p.1179-1185. 1999.

\_\_\_\_\_. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Acta Trop**, v.80, n.3, Dec 21, p.251-260. 2001.

\_\_\_\_\_. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmanin skin test. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.97, n.6, Nov-Dec, p.709-712. 2003.

DE OLIVEIRA CAMERA, P.; JUNGER, J. et al. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, n.12, Dec, p.1112-1117. 2006.

DE OLIVEIRA, C. I.; BAFICA, A. et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.37, n.11, Dec 1, p.e149-153. 2003.

DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S. et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **Int J Dermatol**, v.39, n.7, Jul, p.506-514. 2000.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, Jul-Sep, p.463-469. 1994.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.95, n.3, May-Jun, p.239-243. 2001.

DUARTE, I.; LAZZARINI, R. et al. Interference of the position of substances in an epicutaneous patch test battery with the occurrence of false-positive results. **Am J Contact Dermat**, v.13, n.3, Sep, p.125-132. 2002.

EDITORIAL. The frequency of contact sensitivity in North America 1972-74. **Contact Dermatitis**, v.1, n.5, p.277-280. 1975.

FAGUNDES, A.; MARZOCHI, K. B. et al. Immediate and generalized reaction to Montenegro skin test. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.3, May-Jun, p.413-414. 2003.

FELICIANGLI, M. D.; DELGADO, O. et al. The burden of the *Leishmania chagasi*/infantum infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. **Trop Med Int Health**, v.10, n.5, May, p.444-449. 2005.

FERNANDES, O.; CATANHO, M. P. et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania* (*Viannia*) species. **J Parasitol**, v.85, n.3, Jun, p.563-568. 1999.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin Infect Dis**, v.34, n.11, Jun 1, p.E54-58. 2002.

FORSTROM, L.; HANNUKSELA, M. et al. Merthiolate hypersensitivity and vaccination. **Contact Dermatitis**, v.6, n.4, p.241-245. 1980.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v.55, n.2, p.81-86. 1980.

GOLDRICK, B. A. Another hazard of war: infectious diseases: leishmaniasis, malaria threaten troops, millions worldwide. **Am J Nurs**, v.104, n.12, Dec, p.64-66. 2004.

GONTIJO, B. e CARVALHO MD MDE, L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.

GREEN, M. S. The male predominance in the incidence of infectious diseases in children: a postulated explanation for disparities in the literature. **Int J Epidemiol**, v.21, n.2, Apr, p.381-386. 1992.

GUARIN, N.; PALMA, G. I. et al. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomedica**, v.26 Suppl 1, Oct, p.38-48. 2006.



- GUERRA, M. O. P.; FURTADO, T. et al. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v.60, n.6, p.365-369. 1985.
- GUREL, M. S.; INAL, L. et al. Basal cell carcinoma in a leishmanial scar. **Clin Exp Dermatol**, v.30, n.4, Jul, p.444-445. 2005.
- HANSSON, H. e MOLLER, H. Letter: Thimerosal reaction and cell-mediated immunity. **N Engl J Med**, v.290, n.21, p.1202. 1974.
- HENDRICKS, L. e WRIGHT, N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. **Am J Trop Med Hyg**, v.28, n.6, Nov, p.962-964. 1979.
- IMPERATO, P. J. e DIAKITE, S. Leishmaniasis in the Republic of Mali. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.63, n.2, p.236-241. 1969.
- IMPERATO, P. J.; FOFANA, B. et al. Leishmanin skin sensitivity in the inland delta of the Niger. **Trop Geogr Med**, v.26, n.3, p.303-306. 1974.
- ISAZA, D. M.; ARBOLEDA, M. et al. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.96 Suppl 1, Apr, p.S165-168. 2002.
- JOSE, F. F.; DA SILVA, I. M. et al. Evaluation of the sensitization power of Montenegro skin test. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, n.6, Nov-Dec, p.537-542. 2001.
- LACHAUD, L.; DEREURE, J. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J Clin Microbiol**, v.38, n.1, Jan, p.236-240. 2000.
- LANDIS, J. R. e KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, Mar, p.159-174. 1977.
- LASKAY, T.; MIKO, T. L. et al. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.89, n.3, May-Jun, p.273-275. 1995.
- LEBREC, H.; BACHOT, N. et al. Mechanisms of drug-induced allergic contact dermatitis. **Cell Biol Toxicol**, v.15, n.1, p.57-62. 1999.
- LOCKEY, R. F.; BENEDICT, L. M. et al. Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST). **J Allergy Clin Immunol**, v.79, n.4, Apr, p.660-677. 1987.
- LOCKEY, R. F.; TURKELTAUB, P. et al. Fatalities associated with skin testing and immunotherapy. A retrospective study by questionnaire. **Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M**, n.82, p.153-162. 1988.

LOPES, C. F. e LAENDER, J. F. A intradermorreação de Montenegro no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Brasil-Médico**, n.5-6, p.41-46. 1945.

LOUIE, M.; LOUIE, L. et al. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. **Cmaj**, v.163, n.3, Aug 8, p.301-309. 2000.

MACKENZIE, D. L. e VLAHCEVIC, Z. R. Letter: Adverse reaction to gamma globulin due to hypersensitivity to thimerosal. **N Engl J Med**, v.290, n.13, p.749. 1974.

MANZUR, A. e BARI, A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. **Dermatol Online J**, v.12, n.4, p.2. 2006.

MARQUES, M. J.; VOLPINI, A. C. et al. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, n.6, Dec, p.902-906. 2001.

\_\_\_\_\_. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.54, n.1, Jan, p.37-43. 2006.

MARRIOTT, I. e HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. **Immunol Res**, v.34, n.3, p.177-192. 2006.

MARSDEN, P. D. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Parasitol Today**, v.1, n.5, Nov, p.129-133. 1985.

MARTIN-SANCHEZ, J.; PINEDA, J. A. et al. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, n.5, May, p.545-548. 2004.

MARTY, P.; LELIEVRE, A. et al. Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.88, n.6, p.658-659. 1994.

MARZOCHI, K. B.; CAMILLO-COURA, L. et al. Epidemiological aspects of meningococcal disease. II. Mortality and lethality study in nonepidemic and epidemic periods in the municipality of Londrina, Parana, Brazil (1965-1975). **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v.33, p.31-63. 1981a.

\_\_\_\_\_. [Epidemiological aspects of meningococcal diseases. I, Morbidity study during non-epidemic and epidemic periods in the municipality of Londrina, Parana, Brazil (1965-1975)]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v.33, p.1-30. 1981b.

MARZOCHI, K. B.; MARZOCHI, M. A. et al. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, n.2, p.205-212. 1998.

MARZOCHI, M. e MARZOCHI, K. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, v.10, n.Suppl. 2, p.359-375. 1994.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G. et al. Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.22, n.3, p.149-155. 1980.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmaniose visceral-calazar. **J. bras. Med**, v.41, p.69-84. 1981.

\_\_\_\_\_. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **JBM**, v.63, n.5/6, p.82-104. 1992.

MATHIS, A. e DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **J Clin Microbiol**, v.33, n.5, May, p.1145-1149. 1995.

MAYRINK, W.; MELO, M. N. et al. Montenegro's intradermal test in American cutaneous leishmaniasis after antimonial treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.18, n.3, p.182-185. 1976.

MAYRINK, W.; SCHETTINI, A. P. et al. Histological observations on Montenegro's reaction in man. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.31, n.4, Jul-Aug, p.256-261. 1989.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P. et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v.79, n.3, p.259-269. 1985.

MEDEIROS, A. C.; RODRIGUES, S. S. et al. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n.4, Apr, p.421-424. 2002.

MELO, M. N.; MAYRINK, W. et al. Standardization of the Montenegro antigen. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.19, n.3, p.161-164. 1977.

MENDONÇA, M. G.; DE BRITO, M. E. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J Infect Dis**. 189: 1018-1023 p. 2004a.

\_\_\_\_\_. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J Infect Dis**, v.189, n.6, Mar 15, p.1018-1023. 2004b.

MIMORI, T.; MATSUMOTO, T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Trop**, v.81, n.3, Mar, p.197-202. 2002.

MIZUTANI, H. Letter: Hypersensitivity to thimerosal. **N Engl J Med**, v.289, n.26, p.1424. 1973.

MONTENEGRO, J. A cutis reação na leishmaniose. **Ann. Fac. Med. Univ. S.P.**, v.1, p.323:330. 1926.

MORGAN, U. M. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, n.12-13, Nov, p.1407-1421. 2000.

NASCIMENTO, M. D.; ALCANTARA-NEVES, N. M. et al. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.87, n.1, Jan-Feb, p.91-93. 1993.

NUNES, A. G.; PAULA, E. V. et al. Epidemiological aspects of American tegumentary leishmaniasis in Varzelândia, Minas Gerais, Brazil. **Cad Saude Publica**, v.22, n.6, Jun, p.1343-1347. 2006.

OLIVEIRA, J. G.; NOVAIS, F. O. et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Trop**, v.94, n.1, Apr, p.55-59. 2005.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; PIRMEZ, C. et al. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.83, n.4, p.427-435. 1988.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A. et al. Use of PCR on lymph-node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v.91, n.7, Oct, p.845-850. 1997.

PASSOS, J. P. S. **Padronização do método de produção do antígeno para Intradermoreação de Montenegro**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004. 74. - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- INCQS, Rio de Janeiro.

PASSOS, V. M.; BARRETO, S. M. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bull World Health Organ**, v.78, n.8, p.968-974. 2000.

PESSOA, S. B. e PESTANA, B. R. A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. **Arq. Hig. Saude Pública**, p.125-137. 1940.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v.49, n.3, Sep, p.364-369. 1993.

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F. et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. **J Clin Microbiol**, v.32, n.3, Mar, p.746-749. 1994.

PINEDA, J. A.; MACIAS, J. et al. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.95, n.2, Mar-Apr, p.173-174. 2001.

PIRMEZ, C.; DA SILVA TRAJANO, V. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.37, n.6, Jun, p.1819-1823. 1999.

PRIMEAU, M. N.; ADKINSON, N. F., JR. et al. Natural rubber pharmaceutical vial closures release latex allergens that produce skin reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v.107, n.6, Jun, p.958-962. 2001.

RABELLO, F. E.; PORTUGAL, H. et al. Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, alergia específica, estrutura histológica e número de germens. In: (Ed.). I REUNIÃO DE DERMATO-SIFILIOGRAFOS BRASILEIROS. Rio de Janeiro: *s.l*, 1945. Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, alergia específica, estrutura histológica e número de germens, p.37-71

RAMIREZ, J. R.; AGUDELO, S. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **J Clin Microbiol**, v.38, n.10, Oct, p.3768-3773. 2000.

RIVAS, L.; MORENO, J. et al. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? **Trends Parasitol**, v.20, n.7, Jul, p.297-301. 2004.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J. et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol**, v.71, n.3, Oct, p.267-275. 1990.

RODRIGUES, E. H.; FELINTO DE BRITO, M. E. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v.40, n.10, Oct, p.3572-3576. 2002.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V. et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Trop**, v.79, n.3, Jun 22, p.225-229. 2001.

ROMERO, G. A.; SAMPAIO, R. N. et al. Sensitivity of lymph node aspiration in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.4, Jul-Aug, p.509-511. 1999.

ROTBERG, A. Contribuição para o estudo da alergia na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Hosp. N. S. Aparecida**, v.5, n.1, p.1-88. 1952.

ROZENFELD, S. Fundamentos da vigilância sanitária. Fiocruz. Rio de Janeiro; p.401 p. 2000

SABROZA, P. C. **O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1981. 187. Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L. et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, v.324, n.6093, Nov 13-19, p.163-166. 1986.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L. et al. [Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis using the immunoperoxidase method, using polyclonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional methods of diagnosis]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, n.1, Jan-Mar, p.53-60. 1989.

SALLES- GOMES, L. A Intra-dermo-reacção de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas affins. **Brasil-Medico**, n.49, p.1079-1087. 1939.

SATTI, I.; EL HASSAN, A. et al. The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in healthy volunteers. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.96, n.5, Sep-Oct, p.565-567. 2002.

SCHALLIG, H. D. e OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Trop Med Int Health**, v.7, n.8, Aug, p.641-651. 2002.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F. et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J Infect Dis**, v.178, n.3, Sep, p.911-914. 1998a.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M. C. et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am J Trop Med Hyg**, v.58, n.6, p.824-827. 1998.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. et al. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.12, Dec, p.1952-1954. 2005.

SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. et al. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. **N Engl J Med**, v.353, n.11, Sep 15, p.1185-1186. 2005.

SEAL, D.; FICKER, L. et al. The case against thiomersal [letter]. **Lancet**, v.338, n.8762, p.315-316. 1991.

SEIDENARI, S.; MANZINI, B. M. et al. Contact sensitization to thimerosal in healthy subjects. **G Ital Dermatol Venereol**, v.124, n.7-8, p.335-339. 1989.

SESSA, P. A.; FALQUETO, A. et al. Resultados da reação de Montenegro em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, autóctones do Espírito Santo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.37, n.3, p.115-118. 1991.

SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.5, Aug, p.541-547. 2007.

SHAW, J. J. e LAINSON, R. Letter: An immediate intradermal reaction to leishmanial antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.68, n.2, p.168-169. 1974.

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

\_\_\_\_\_. Skin test reactions in cutaneous leishmaniasis and Chagas' disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.70, n.3, p.258. 1976.

SILVA, A. F. **Inquéritos por Intradermorreação de Montenegro em populações militares do Brasil: positividade e resposta inespecífica.** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1999. 103. MSc - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.85, n.6, Nov-Dec, p.735-738. 1991.

SILVEIRA, T. G.; TEODORO, U. et al. Epidemiologic aspects of Cutaneous Leishmaniasis in an endemic area of the state of Parana, Brazil. **Cad Saude Publica**, v.12, n.2, Apr, p.141-147. 1996.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A. et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v.105 ( Pt 2), Oct, p.183-192. 1992.

SOKAL, J. E. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. **N Engl J Med**, v.293, n.10, p.501-502. 1975.

- SOLBACH, W. e LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv Immunol**, v.74, p.275-317. 2000.
- SOUZA, W. J.; SABROZA, P. C.et al. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. **Acta Trop**, v.52, n.2-3, p.111-119. 1992.
- TARLETON, R. L. e ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today**, v.15, n.3, Mar, p.94-99. 1999.
- TARNOW, K. e KING, N. Intradermal injections: traditional bevel up versus bevel down. **Appl Nurs Res**, v.17, n.4, Nov, p.275-282. 2004.
- UNLU, R. E.; ALTUN, S.et al. *Leishmania* scar: a risk factor for the development of basal cell carcinomas. **J Craniofac Surg**, v.18, n.3, May, p.708-710. 2007.
- VANLOUBBEECK, Y. e JONES, D. E. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. **Ann N Y Acad Sci**, v.1026, Oct, p.267-272. 2004.
- WEIGLE, K. A.; ESCOBAR, M.et al. A clinical prediction rule for American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Int J Epidemiol**, v.22, n.3, p.548-558. 1993.
- WEIGLE, K. A.; VALDERRAMA, L.et al. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **Am J Trop Med Hyg**, v.44, n.3, p.260-271. 1991.
- WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.1, Jan, p.113-130. 1995.
- WESTPHAL, G. A.; SCHNUCH, A.et al. Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. **Int Arch Occup Environ Health**, v.73, n.6, p.384-388. 2000.
- WHO. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v.793, p.1-158. 1990.
- WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Ann Trop Med Parasitol**, v.89 Suppl 1, Dec, p.95-100. 1995.
- YURCHENKO, V. Y.; MERZLYAK, E. M.et al. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. **J Clin Microbiol**, v.37, n.5, May, p.1656-1657. 1999.



## **8 ANEXOS**

- 8.1 ANEXO I- Parecer da comissão de ética- estudo I**
- 8.2 ANEXO II- Rotina Clínica Dos Pacientes Atendidos No Crleish**
- 8.3 ANEXO III- Antígeno Utilizado**
- 8.4 ANEXO IV- Ficha de aplicação da IDRm**
- 8.5 ANEXO V: Folder Sobre A Idm Para Os Pacientes**
- 8.6 ANEXO VI: Ficha para leitura da IDRm**
- 8.7 ANEXO VII- artigo publicado - Acta Tropica**
- 8.8 ANEXO VIII- Artigo submetido - Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**
- 8.9 ANEXO IXI- Artigo submetido - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**
- 8.10 ANEXO X - Protocolo Padronizado De Aplicação E Leitura Da IDRm**

**8.1. ANEXO I- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA- ESTUDO I**



PARECER - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/ENSP

Nome do Projeto: "Reavaliação do Teste Intradérmico de Montenegro como Instrumento para inquérito epidemiológico e diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana"-

Autora: Aline Fagundes da Silva - Data da Revisão: 15/09/97

**PARECER**

Após a leitura do Projeto encaminhado para a CEP/ENSP para verificar a sua adequação aos termos da Resolução 196, de 10/10/1996, sobretudo quanto à diretriz N° VI - Protocolo de Pesquisa, resolveu-se considerá-lo aprovado com as seguintes pendências referentes à complementação das informações e dos documentos. De acordo à Exigências da Resolução:

- número da carteira de identidade e do CPF, artigo VI § 1
- nome e assinatura dos dirigentes das instituições envolvidas, artigo VI § 1
- Curriculum Vitae do pesquisador, artigo VI. § 4.
- termo de compromisso do pesquisador responsável e da instituição de cumprir os termos da Resolução 196/96, artigo VI. § 5.

Solicita-se o atendimento destes itens no prazo de 60 dias.

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 1997.

  
Elizabeth Moreira dos Santos  
Coordenadora da Comissão de Ética  
em Pesquisa da ENSP/FIOCRUZ

## **8.2. ANEXO II- ROTINA CLÍNICA DOS PACIENTES ATENDIDOS NO CRLEISH**

Texto extraído de : [Protocolos de Técnicas Diagnósticas das Leishmanioses IPEC](#)  
Disponível em : <http://www.ipec.fiocruz.br/pepes/leish/leish.html>

## **INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC - FIOCRUZ**

### **DEPARTAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

#### **SERVIÇO DE ZONOSSES E SERVIÇO DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS**

### **ROTINA DE ATENDIMENTO CLÍNICO HUMANO**

#### **1. OBJETIVOS**

Avaliar clinicamente pacientes com suspeita diagnóstica de LTA, a fim de realizar o diagnóstico diferencial ou a confirmação diagnóstica e, conseqüentemente, o encaminhamento ou tratamento adequado e a notificação do caso.

#### **2. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES**

- a) História e exame clínico.
- b) Exame dermatológico.
- c) Exame otorrinolaringológico com fibra ótica.
- d) Exame da cavidade bucal utilizando técnicas de semiologia estomatológica.
- e) Documentação fotográfica e em vídeo de lesões cutâneas.
- f) Documentação fotográfica e em vídeo de lesões mucosas.
- g) Realização do teste de Montenegro (injeção do antígeno e leitura da reação cutânea).
- h) Realização de biópsias cutâneas.
- i) Realização de biópsias mucosas.
- j) Solicitação de exames complementares.
- k) Tratamento e acompanhamento de pacientes.
- l) Acompanhamento pós-terapêutico a longo prazo.
- m) Manutenção de banco de dados informatizado.
- n) Consulta de enfermagem pós-atendimento médico para reorientação e encaminhamento, se indicado

**3. PLANILHA DE PESSOAL**

<b>NOME</b>	<b>FORMAÇÃO</b>	<b>CARGO</b>	<b>FUNÇÃO</b>	<b>LOTAÇÃO</b>
Armando de Oliveira Schubach	Médico infectologista e dermatologista, Doutor	Pesquisador Titular	a, b, e, f, g, h, j, k, l, m	Sv. Zoonoses - Depto. Doenças Infecciosas - IPEC <a href="mailto:armando@ipec.fiocruz.br">armando@ipec.fiocruz.br</a>
Mariza de Matos Salgueiro	Médico, Especialista Clínica Médica	Estagiária	a, b, e, f, g, h, j, k, l	Sv. Zoonoses - Depto. Doenças Infecciosas – IPEC
Érica de Camargo Ferreira e Vasconcellos	Médico	RPA	a, b, e, f, g, h, j, k, l	Sv. Zoonoses - Depto. Doenças Infecciosas - IPEC <a href="mailto:xxxxx@ipec.fiocruz.br">xxxxx@ipec.fiocruz.br</a> <a href="mailto:erimedi@hotmail.com">erimedi@hotmail.com</a>
João Soares Moreira	Médico otorrinolaringologista, Mestre	Médico	c, f, g, h, i, j, k, l	Setor de Otorrinolaringologia - Sv. Especialidades Clínicas - Depto. Doenças Infecciosas - IPEC <a href="mailto:jmoreira@ipec.fiocruz.br">jmoreira@ipec.fiocruz.br</a>
Cláudia Maria Valete Rosalino	Médico otorrinolaringologista, Mestre, Doutoranda	Médico	c, f, g, h, i, j, k, l	Setor de Otorrinolaringologia - Sv. Especialidades Clínicas - Depto. Doenças Infecciosas - IPEC <a href="mailto:cmvalete@ipec.fiocruz.br">cmvalete@ipec.fiocruz.br</a>
Renata de Souza Coutinho	Acadêmico de Medicina	Bolsista Curricular	a, b, e, f, g, h, j, k, l, m (auxiliar)	Sv. Zoonoses - Depto. Doenças Infecciosas - IPEC
Kátia Francisca Vivório	Enfermeira, Especialista em Doenças Infecciosas	Enfermeira	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l (auxiliar)	Sv. Enfermagem - Depto. Clínico Complementar - IPEC <a href="mailto:katiavivorio@ipec.fiocruz.br">katiavivorio@ipec.fiocruz.br</a> <a href="mailto:vivorio@brasilvison.com.br">vivorio@brasilvison.com.br</a>

#### 4. LISTA DOS ENSAIOS REALIZADOS/METODOLOGIAS

##### **Rotina para Diagnóstico Clínico-Laboratorial (pré-tratamento)**

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

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

##### **Sangue**

Resposta linfoproliferativa a antígenos de *Leishmania* "in vitro" (casos selecionados)

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Leishmania* (casos selecionados)

Sorologias para LTA, VDRL, paracoccidiodomicose, histoplasmoses (especialmente nos casos com lesão mucosa)

Eletroforese de hemoglobina (úlceras de perna)

Hemograma completo

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

Coagulograma (pacientes com indicação de biópsia mucosa)

##### **Eletrocardiograma (ECG)**

##### **Reações intradérmicas: PPD e Montenegro**

Para a intradermorreação de Montenegro utiliza-se a leishmanina produzida por Biomanguinhos – Fiocruz, contendo 40 µg de nitrogênio protéico por mililitro e fenol 0,4% como conservante. Após assepsia local com álcool 70°, injeta-se 0,1 mL de antígeno por via intradérmica na face anterior do antebraço. O grau de resposta cutânea é medido 48 horas após a injeção. A endureção é marcada com caneta esferográfica, medida em milímetros, decalcada em papel umedecido e arquivada no prontuário do paciente. Uma endureção de 5mm ou mais em seu maior diâmetro é considerada positiva.

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

(casos selecionados)

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

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

*Acondicionamento dos fragmentos de biópsia cutânea e/ou mucosa e / ou de gânglio periférico*

Formol (histopatologia)

Solução salina estéril (cultura para fungos e micobactéria)

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

*Imprint* em lâmina de vidro

Congelação a -70 °C (imunopatologia e PCR)

*Radiografia do tórax e dos seios da face* (nos casos com lesão mucosa)

*Coleta de saliva:* para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* (casos selecionados)

*Outros exames:* direcionados pela história e/ou exame clínico

## **Tratamento Padrão**

### *Medidas Gerais*

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

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

No caso da presença de crostas e obstrução nasal, as cavidades nasais deverão ser instiladas com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, por várias



vezes ao dia, durante todo o período do acompanhamento, a fim de possibilitar o alívio sintomático do paciente, assim como uma boa visualização das mucosas das cavidades nasais.

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

### *Medidas específicas*

A princípio, todos os pacientes atendidos no CRLeish serão tratados, ambulatorialmente, com antimoniato de meglumina (antimoniato de N-metil-glucamina = Glucantime<sup>®</sup>) na dose de  $5\text{mgSb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia}^1$ , IM. A droga é apresentada em ampolas de 5 mL contendo 1,5g de antimoniato de meglumina, equivalente a 405 mg de  $\text{Sb}^{5+}$ . Portanto, 5 mL correspondem a 405 mg de  $\text{Sb}^{5+}$  e cada mL a 81 mg de  $\text{Sb}^{5+}$ .

A administração EV, quando indicada para diminuir o desconforto local, deverá ser realizada, de preferência, em ambiente hospitalar. Não há necessidade de diluição, embora o produto possa ser diluído em solução glicosada por comodidade de administração. Pacientes idosos ou apresentando outras complicações clínicas, poderão ser tratados, no IPEC, em regime de internação ou de hospital-dia.

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

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

Pacientes com lesões na laringe ou com extensas lesões nas vias aéreas e digestivas superiores deverão ser internados a fim de prevenir a instalação de um quadro de insuficiência respiratória por edema local, mais provável de ocorrer nas primeiras 72 horas após início do tratamento. A profilaxia com corticosteróides deverá ser iniciada antes da primeira dose do tratamento específico. Utiliza-se

---

<sup>1</sup> Exemplo de cálculo de dose para um paciente de 60 kg:  
 $5\text{ mg Sb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia} = 300\text{ mg Sb}^{5+}/\text{dia} = 3,7\text{ ml}/\text{dia}$ , arredondando, = 3,5 ml/dia EV ou IM.  
 $20\text{ mg Sb}^{5+}/\text{kg}/\text{dia} = 1200\text{ mg Sb}^{5+}/\text{dia} = 14,8\text{ ml}/\text{dia}$ , arredondando, = 15 ml/dia EV ou IM.

hidrocortisona 100mg EV, de 6/6h durante um mínimo de 24 horas, e descontinuada durante os próximos dois dias.

Idosos e pacientes com co-morbidades (cardiopatias, nefropatias e hepatopatias) apresentam dificuldade de concluir o esquema antimonial, mesmo quando tratados em regime de internação ou de hospital-dia. Nesses casos, o uso de 5 mg Sb<sup>5+</sup>/ kg/ dia em séries de 10 dias com 10 dias de intervalo, vem sendo adotado com sucesso no CRLeish. No tratamento da forma cutânea, caso não ocorra epitelização das lesões até o final da 3ª série, parar o tratamento e avaliar quinzenalmente. No tratamento das forma mucosa, administrar a quantidade de séries necessárias até a epitelização e desinfiltração das mucosas.

Pacientes com uma ou duas lesões cutâneas, que por qualquer motivo apresentem impossibilidade de receber medicação parenteral regular ou que apresentem sinais de toxicidade importante ao antimonial por via sistêmica, poderão ser submetidos a tratamento intralesional com antimoniato de meglumina. Injeta-se o volume necessário para infiltrar a lesão (geralmente entre 5-20 mL). A evolução das lesões costuma ser semelhante àquela observada com tratamento contínuo ou em séries. A critério médico poderá ser indicada uma segunda aplicação após 15 dias.

Alguns efeitos adversos podem ser observados, embora não constituam necessariamente motivo de suspensão do tratamento: artralgia, mialgia, anorexia, dor abdominal, prurido, febre, cefaléia, edema, herpes zoster, e erupções cutâneas. Alterações eletrocardiográficas freqüentes são as alterações do ritmo cardíaco ou da repolarização ventricular: com achatamento ou inversão de onda T e alargamento do espaço QT corrigido (suspender temporariamente o tratamento caso QTc > 0,46 segundo). O tratamento é contra-indicado em gestantes. Durante o uso do antimoniato de meglumina, orientar as mulheres em idade fértil para uso de método contraceptivo de barreira.

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

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

Em caso de insucesso no segundo tratamento, avaliar a possibilidade de utilização da dose de 20mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia<sup>1</sup>, ou de outra droga como a anfotericina B ou a pentamidina.

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

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

### ***Rotina de acompanhamento***

#### ***Acompanhamento laboratorial***

##### ***Exames laboratoriais para monitorização da toxicidade***

Hemograma completo, glicose, uréia, creatinina, TGO/AST, TGP/ALT, fosfatase alcalina, gama GT, amilase, lipase e ECG deverão ser realizados: a cada 7, 10 ou 15 dias durante o tratamento com antimoniato de meglumina (na dependência da idade e do estado de saúde geral); imediatamente após o tratamento; e depois, apenas os exames alterados, até a sua normalização.

Em casos de alterações persistentes ou rapidamente progressivas, recomenda-se a suspensão temporária do tratamento até a normalização dos exames.

Ao utilizar-se a anfotericina B acrescentar dosagens de Na e K a intervalos de uma semana ou menos.

Ao utilizar-se a pentamidina, desde que a dose total tenha ultrapassado 1g, a glicemia deve ser acompanhada, mensalmente, durante 6 meses.

### Sorologias para LTA

Deverão ser realizadas em todas as consultas de retorno.

Quando as consultas forem realizadas em outros locais, o sangue deverá ser centrifugado e o soro poderá ser transportado em isopor com gelo, no espaço de 4 horas, ou estocado congelado (preferencialmente a -20°C) e posteriormente transportado em isopor com gelo para o laboratório.

### Sorologia anti-HIV

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

### *Acompanhamento clínico de pacientes com a forma cutânea*

#### *Avaliação clínica geral e dermatológica*

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

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

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

A partir da constatação da epitelação das lesões, os pacientes deverão ser reavaliados após 1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses e então anualmente, pelo mínimo de 5 anos.

#### *Avaliação otorrinolaringológica*

Nos pacientes sem lesão mucosa anterior ao tratamento, deverá ser realizada, no mínimo, com 6, 12, 18 e 24 meses, e então anualmente, por um mínimo de 5 anos.

### **8.3. ANEXO III- ANTÍGENO UTILIZADO**

CENTRO DE PRODUCAO E PESQUISAS DE IMUNOBIOLOGICOS 8.01510-4

REAGENTE PARA REACOES INTRADERMICAS 25351.034160/2003-54

ANTIGENO DE MONTENEGRO

FABRICANTE : CENTRO DE PRODUCAO E PESQUISAS DE IMUNOBIOLOGICOS - BRASIL

Frasco-Ampola com 1 ml de antígeno

CLASSE : B 80151040004

8003 - Registro de Produtos para Diagnósticos de Uso In Vitro, NACIONAL

Resolução RE nº 1531, de 24 de setembro de 2004

**OBSERVAÇÃO:** Pode apresentar-se negativa nos seguintes casos:

- 1) Nos primeiros 30 dias após início das lesões, excepcionalmente em tempo mais prolongado;
- 2) Nos casos de leishmaniose disseminada, positivamente se no decurso do tratamento;
- 3) Na leishmaniose cutâneo-mucosa;
- 4) Na leishmaniose visceral;
- 5) Em pacientes imunodeprimidos;
- 6) Na leishmaniose atípica.

Pode apresentar reação cruzada com tripanosomoses, tuberculose e leishmaniose.

Nota: Sempre que possível o diagnóstico deve ser clínico, epidemiológico e laboratorial.

#### CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE:

O teste deve ser executado por pessoal qualificado e com competência comprovada para o desempenho adequado do processo de medição.

#### VALORES DE REFERÊNCIA:<sup>1,2,4</sup>

A positividade do teste é de 90% dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Nas áreas onde predomina a L(L) amazônica a positividade pode ser mais baixa.

A reação de Montenegro geralmente permanece positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, repetindo nos indivíduos franco-tratados e nos precocemente tratados. Em áreas endêmicas, deve-se considerar leishmaniose anterior ou exposição ao parasita (infecção) sem doença. Nas populações de área endêmica, na ausência de lesão ativa ou cicatriz, a positividade varia entre 20 a 30%. Nas lesões mucosas a resposta cutânea ao teste de Montenegro é mais intensa, podendo ocorrer até ulceração e necrose local.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília/DF. 5ª edição. 2000.
- Brasil. Ministério da Saúde. Legislação sobre o controle de doenças na área de Dermatologia Sanitária. Brasília/DF. 4ª edição. 1993.
- Melo, M.N. et al. Padronização do antígeno de Montenegro. Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo 19(3): 161-164, 1977.
- World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series, 793, 1990.
- Consolidação de Controle de Infecção Hospitalar. Procedimento de artigos e superfícies em estabelecimentos de saúde. Ministério de Saúde. 2ª ed. Brasília/DF, 1994.
- Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília/DF. 3ª edição. 1994.
- Ferreira, Antonio Walter e Ávila, Sandra L.M. Diagnóstico Laboratorial. Avaliação de Métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias autônomas. Correlação clínico-laboratorial. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1996.

#### CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO:

O cumprimento às orientações contidas nesta instrução é fator determinante na obtenção de resultados fidedignos.

A execução do teste, de forma diferente da recomendada e os resultados obtidos, não são de responsabilidade do fabricante.

#### FARMACÊUTICO RESPONSÁVEL

Isaete Pauli da Silva  
CRF9 3066 - PR

#### FABRICADO E DISTRIBUÍDO POR:

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ  
CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS - CPPI  
RUA TARGINO DA SILVA S/Nº - PIRAQUARA - PR  
CNPJ: 36.683.986/9051-72

#### REGISTRO NO MS Nº 80151040004

#### SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Tel./Fax: 0\*\*41 3673-8800

E-mail: [psacppi@pr.gov.br](mailto:psacppi@pr.gov.br)

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a Coordenação da Garantia da Qualidade do CPPI.

Edição Outubro de 2005



ANTIGENO DE MONTENEGRO

#### FINALIDADE:<sup>1</sup>

Auxílio diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

#### PRINCÍPIO DO TESTE:<sup>2</sup>

O teste de intradermoreação do antígeno de Montenegro traduz resposta alérgica de hipersensibilidade celular retardada, é de grande valor presuntivo, dado sua sensibilidade e especificidade.

#### COMPOSIÇÃO:<sup>3,4</sup>

Cada frasco ampola de Antígeno de Montenegro com 1 ml contém suspensão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 1 copa de referência OMS MHOM/BR/73/M2769), na concentração de 400 p/ml de nitrogênio protético.

- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ..... 10<sup>7</sup>/ml
- Fenol (máximo) ..... 0,005 g/ml
- Cloreto de sódio ..... 0,0078 g/ml
- Água destilada ..... 1 ml

#### MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO:

- Algodão,
- Solução anti-séptica,
- Seringa com agulha de tuberculose ou insulina de 1 ml,
- Caneta esferográfica,
- Régua milimetrada para medição da lesão,
- Lava descartável,
- Coletores de materiais perfuro-cortantes.

#### ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE:

Conservar a temperatura de 2 a 8°C e ao abrigo da luz. Evitar congelamento.

#### PRAZO DE VALIDADE:

Três anos conforme expresso na embalagem.

#### PRECAUÇÕES E CUIDADOS:<sup>5</sup>

##### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO:

- 1) Não usar em paciente sensível ao Fenol;
- 2) O produto tem aspecto levemente turvo. Se ocorrer aumento acentuado da turbidez, ou alteração na sua coloração, não usar o produto e descartá-lo.

##### MANUSEIO DO PRODUTO:

- 1) Não utilizar após o vencimento;
- 2) Não misturar lotes diferentes para sua aplicação;
- 3) Agitar bem o frasco antes de usar;
- 4) Recomenda-se retirar somente a parte central do lacre, seguida de assepsia.

##### DESCARTE:

Tendo em vista tratar-se de produto biológico, recomenda-se descartar em lixo hospitalar segundo a resolução nº 5 de 05/08/93 do CONAMA.

##### BIOSEGURANÇA:

- 1) Usar luvas descartáveis;
- 2) Descartar após a aplicação, a seringa e a agulha num coletor de materiais perfuro cortantes.

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO:<sup>3,2A,7</sup>

##### PREPARAÇÃO:

- 1) Agitar o frasco por 30 vezes antes de usar;
- 2) Retirar o lacre central;
- 3) Fazer a assepsia da parte exposta da rolha com solução anti-séptica;
- 4) Perfurar a rolha com agulha de insulina retirando 0,1 ml do antígeno;
- 5) Aplicar imediatamente, evitando que a suspensão sedimente no frasco e/ou na parede da seringa.

##### APLICAÇÃO:

- 1) Proceder à assepsia da pele do paciente, no local da aplicação, com solução anti-séptica;
- 2) Injetar via "intradérmica" com a seringa de tuberculina ou insulina (preparada com 0,1 ml do antígeno de Montenegro) na face anterior do antebraço 2 a 3 cm abaixo da dobra do cotovelo (dobra antecubital);
- 3) Elevação ou pápula de  $\pm 1$  cm deverá ocorrer no momento da inoculação, no local da aplicação.

##### LEITURA DO TESTE:

A leitura deve ser realizada entre 48 a 72 horas após a inoculação; Recomenda-se utilizar a técnica da caneta esferográfica para medir a endureção, OMS/1990:

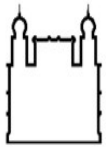
- a) Exercer pressão moderada, traçando lentamente uma linha com uma caneta a partir de um ponto exterior que dista 1 a 2 cm da área de inoculação até encontrar resistência.
- a) Quando encontrar resistência para seguir avançando, levantar a caneta da pele. Este ponto indica um dos limites da endureção que será medida.
- b) Repetir a mesma operação no lado oposto da endureção.
- c) Esta técnica permite visualizar as bordas da endureção ou pápula, cujo diâmetro pode-se determinar medindo a distância entre as linhas opostas.

#### RESULTADO:<sup>1,2A,7</sup>

Reação Negativa: Ausência de qualquer sinal no ponto de inoculação ou presença de uma pápula ou nódulo com menos de 5 mm de diâmetro.

Reação Positiva: Presença de uma pápula ou nódulo, igual ou superior a 5 mm ou ulceração.

#### **8.4. ANEXO IV- FICHA DE APLICAÇÃO DA IDRM**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



I P E C

## Protocolo para aferição da técnica de aplicação da Intradermoreação de Montenegro

Nome do Paciente : \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data IDRM: \_\_\_\_\_

Método da IDRM:  bisel p/ cima  bisel p/ baixo

Volume aplicado: \_\_\_\_\_

Tempo de aplicação do teste (segundos): \_\_\_\_\_

Formação de pápula:  sim  não; Se sim, medida (mm): \_\_\_\_\_

Sangramento no local da aplicação:  sim  não

Vazamento :  sim  não

Grau de desconforto registrado pelo paciente:

confortável  pouco confortável  desconfortável  altamente

desconfortável

Data prevista para leitura: \_\_\_\_\_ Data de leitura: \_\_\_\_\_

Resultado do teste :  positivo  negativo

Medida da endureção (mm): \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

---



# Cuidados

É importante tomar alguns cuidados no local da aplicação até ser realizada a cura:

- não coçar;
- não esfregar;
- não passar perfume;
- não passar creme;
- não usar sabonete;
- não usar nenhum produto químico ou qualquer outro produto



IPEC  
Instituto de Pesquisa Clínica  
Evandro Chagas

Projeto Intradermoreação de Montenegro  
CRLeish – Centro de Referência em  
Leishmaniose

Av. Brasil, 4.365 – Mangueiras  
CEP: 21045-900 – Rio de Janeiro  
Tel.: (21) 3865-9567



**TESTE  
DE  
MONTENEGRO**

Instituto de Pesquisa Clínica  
Evandro Chagas  
Centro de Referência em Leishmaniose  
IPEC

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## O que é Reação de Montenegro?

A reação de Montenegro ou teste de Montenegro é um teste intradérmico de natureza alérgica que serve para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana e para diagnóstico diferencial de outras doenças.

## Isso dói ???



A aplicação do teste não provoca dor, apenas uma ardência durante a introdução do antígeno na pele.

## Aplicação do teste



O teste é realizado com a aplicação de um antígeno no antebraço direito do paciente.

## Leitura do teste

A leitura do teste é feita 48 horas após a aplicação do antígeno.

## Porque tenho que esperar?

Após a aplicação o paciente precisa esperar 30 minutos para ser liberado pois como é um teste alérgico é necessário certificar a presença ou não de uma reação imediata.

## É IMPORTANTE!

É importante voltar para a leitura porque o teste não pode ser realizado em curto espaço de tempo e a falta do paciente na leitura acarreta a perda do resultado e o teste não deverá ser realizado novamente.



## E se der positivo?

A reação positiva do teste indica que o paciente já esteve em contato com o antígeno e está tendo uma resposta imunológica ou seja, seu organismo está se defendendo do antígeno aplicado. No entanto, não afirma que o paciente está com leishmaniose

## **8.6. ANEXO VI: FICHA PARA LEITURA DA IDRM**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



I P E C

### Projeto IDRM- Ficha de Resultados

Paciente: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Leitor: \_\_\_\_\_

<u>Data do teste</u>	
<u>Data da Leitura</u>	
<u>Medida local (mm)</u>	
<u>Data próximo retorno</u>	

#### Reações ao Teste

Locais	30 minutos	48 horas	15 dias
1. Edema/eritema	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
2. Surgimento/duração	_____	_____	_____
3. Coçou o local do teste?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
4. Prurido local:	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
5. Vesículas/bolhas	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
6. Urticária:	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
7. Gerais/ sistêmicos	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
8. Urticária	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
9. Febre	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
10. Usou medicamento?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Qual? _____	Quando? _____		
Outras Observações:			

**8.7. ANEXO VII- ARTIGO PUBLICADO – ACTA TROPICA**

## Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil

Aline Fagundes<sup>a,\*</sup>, Mauro C.A. Marzochi<sup>a</sup>, Maurício Perez<sup>b</sup>, Armando Schubach<sup>c</sup>, Antonio Ferreira<sup>d</sup>, Janaína P. Silva<sup>d</sup>, Tânia Schubach<sup>c</sup>, Keyla B. Feldman Marzochi<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de MicroImunoParasitologia, Serviço de Parasitologia, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21-045-900, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Coletiva Av. Brigadeiro Trompowsky s/n<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> andar, Ala Sul, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Serviço de Zoonoses, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21-045-900, Brazil

<sup>d</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Imunobiológicos, Laboratório de Referência Nacional para produção de Reativos, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21-045-900, Brazil

<sup>e</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21-045-900, Brazil

Received 3 April 2006; received in revised form 29 November 2006; accepted 30 November 2006

Available online 16 January 2007

### Abstract

A randomized double-blind trial was performed to determine the frequency of positive reactions to the Montenegro antigen (leishmanin) preserved in thimerosal (Merthiolate<sup>TM</sup>) 1:10,000 or phenol 0.4%. The respective products were tested separately in 400 young healthy individuals from a non-endemic area for *Leishmaniases*. Each volunteer received one of the following reagents: merthiolated antigen, phenolated antigen, merthiolated saline, or phenolated saline. The frequency of positive responses to each reagent after the first application was as follows: 0% (phenolated saline), 9.2% (merthiolated saline), 34.6% (antigen in phenolated saline), and 41.1% (antigen in merthiolated saline). After 1 week, volunteers who had tested positive for merthiolated or phenolated antigen were retested with the respective preservative, while negatives were retested with the preservative they had not received during the first test. In all, 331 volunteers who received merthiolated saline during the study, of whom 41 (12.4%) tested positive. Meanwhile, 326 volunteers who received phenolated saline, 4 (1.2%) tested positive. Positive reactions in each group were similar in relation to gross appearance skin reactions. Considering the high frequency of hypersensitivity to thimerosal in the study population, it is recommended that this compound should be replaced as a preservative of the leishmanin antigen. Almost 30% of positive reactions to Montenegro antigen in what is considered a non-endemic region was surprising and will be the object of future studies.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Leishmania*; Skin test; Thimerosal; Phenol

### 1. Introduction

The Montenegro skin test (MST) (Montenegro, 1926) is considered the most important complementary test in the diagnosis of tegumentary *Leishmaniasis* (TL) and is also widely used in epidemiological studies and as

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 9541; fax: +55 21 3865 9541.

E-mail address: [aline@ipecc.fiocruz.br](mailto:aline@ipecc.fiocruz.br) (A. Fagundes).

an indicator of inapparent infection with *Leishmania* (Restrepo Isaza, 1980; Souza et al., 1992; Zijlstra and el-Hassan, 1993; Ben Salah et al., 2005; de Castro et al., 2005). However, standardization of a reagent for universal use has still not been achieved, and various formulations are used in Brazil and elsewhere in the world (Melo et al., 1977; Reed et al., 1986; Alimohammadian et al., 1993; Abramson et al., 1995; Akuffo et al., 1995).

Thimerosal (thiomersal, merthiolate) has been used as a preservative in vaccine and skin test antigens for decades (Marzochi et al., 1998). Marzochi et al. (1998) described a post-vaccinal MST conversion rate of 66% in volunteers who received only placebo (thimerosal 1:10,000 in saline) in a Phase I tegumentary *Leishmaniasis* vaccine trial in Brazil, suggesting that the thimerosal present in the vaccine and in the Montenegro reagent received by the vaccinated volunteers could act as a confounder in similar vaccine evaluation studies.

Several studies have shown that thimerosal is allergenic (Forstrom et al., 1980; Seidenari et al., 1989), capable of inducing delayed hypersensitivity as demonstrated by skin tests (Maibach, 1972; Lebec et al., 1999). Thimerosal present in intramuscular vaccines is associated with the occurrence of adverse effects, and the utilization of such vaccines can also cause hypersensitivity to thimerosal (Cox and Forsyth, 1988; Osawa et al., 1991).

Seeking to evaluate the frequency of delayed hypersensitivity to thimerosal and its possible interference with the MST, this study compared the response to Montenegro antigen conserved in thimerosal or phenol in healthy volunteers from leishmaniasis non-endemic areas using a randomized double-blind design.

## 2. Patients and methods

The study was designed according to Resolution 196/96 of the Brazilian National Health Council and approved by the Brazilian Ministry of the Army. The FIOCRUZ Ethics committee also approved the study. Informed consent was obtained from all the volunteers who presented after an explanatory lecture on the *Leishmaniasis* and on the study's objectives and risks. The following data were obtained through individual interviews: place of residence, vaccines received in the previous 2 years, previous skin tests, history of allergies, routine use of products that could contain thimerosal (eye drops, nasal drops) and other medications, and prior knowledge of *Leishmaniasis*.

A total of 400 male volunteers with an age range of 18–23 were recruited into the study. The volunteers came from the city of Santa Maria in Rio Grande do Sul,

which is not known to be endemic for *Leishmaniasis*. Volunteers known to be allergic to thimerosal and/or phenol and those who presented any signs or symptoms of any disease at the time the tests were performed were excluded from the study. The sample size was calculated for a statistic power of 80% to discriminate differences of 15% between the frequency of hypersensitivity to phenol (5% Imperato and Diakité, 1969) and to thimerosal, expected to be around 20% (Program Statcalc-EPIINFO version 6.0).

### 2.1. Reagents

Antigens were prepared by the Reference Center for Diagnostic Reagents (BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ-RJ) using the PH8 strain of *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) containing 40 µg of proteic nitrogen/ml (Melo et al., 1977). Identical batches of antigen suspension were preserved in 0.85% NaCl solution with either thimerosal 1:10,000 or 0.4% phenol. The same preservative solutions were prepared separately without the antigens. The four formulations were stored identically and coded by an observer who was independent of the production and test application process.

### 2.2. Testing

The order of application of the reagents was obtained through randomization in blocks of four, with the volunteers allocated to treatment at the moment in which they arrived at the testing site. The volunteers were allocated in four groups according to the reagent received at the initial test (Table 1): group I ( $n = 102$ ), merthiolated antigen; group II ( $n = 101$ ), phenolated antigen; group III ( $n = 97$ ), merthiolated saline; group IV ( $n = 100$ ), phenolated saline.

Each allocated volunteer initially received a single intradermal application of 0.1 ml of one of the reagents on the anterior left forearm. All volunteers remained under observation for 45 min after the application. Readings were performed 48 h later as proposed by Sokal (1975) and were considered positive with an induration  $\geq 5$  mm measured at the largest diameter. Any local or systemic responses to the tests were also recorded.

### 2.3. Retesting

One week after the first test the volunteers were retested on the opposite forearm, based on the allocation and the result of the first test. Individuals from groups I and II, when positive, received the homologous diluent solution for the antigen initially administered to them,

while the negatives received the heterologous diluent solution. Positive individuals from groups III and IV were retested with 0.1 ml of 0.85% saline solution, while negatives received phenolated or merthiolated saline, respectively.

#### 2.4. Analysis and interpretation of results

The results were analyzed using EpiInfo version 6.0 and SPSS for Windows (Statistical Package for Social Sciences). *p*-values <0.05 were considered significant. To study the frequency of positive reactions to the antigen and preservatives, the following assumptions were considered: (1) that no volunteer presented current or prior *Leishmania* infection and (2) that there was no *Leishmania* transmission in the study area.

### 3. Results

The groups were homogeneous in relation to: mean age, frequency of individuals vaccinated in the previous two years, and frequency of allergic antecedents. The majority of the volunteers who were initially tested (340/400; 85%) were re-tested. One hundred and sixty nine of the volunteers (169/400; 34.7%) came from the city of Santa Maria, while the rest came from other non-endemic areas in the State of Rio Grande do Sul. Minorities of volunteers reported using thimerosal

before (13.3%), or had previously received other skin tests (8.7%), all negative. The majority of volunteers who reported previous intra-muscular vaccination (295/296) had received tetanus toxoid (TT) 15–90 days prior to the beginning of the study.

Table 1 shows the response to skin tests in the four groups studied. Frequency of positive responses to each reagent following the first application was: 0% (phenolated saline), 9.2% (merthiolated saline), 34.6% (antigen in phenolated saline), and 41.1% (antigen in merthiolated saline). Of the 87 volunteers who presented positive skin tests, 83 in were re-tested, which includes 41 positive to merthiolated antigen in group I, 33 positive to phenolated antigen in group II and 9 positive to merthiolated saline in group III. Of the 41 volunteers who were re-tested with merthiolated saline, 13 (31.7%) were positive. Of the 33 volunteers who were re-tested with phenolated saline, only 1 (3.0%) was positive. Of the 9 volunteers in group III who were retested with plain saline, none were found positive.

Two hundred fifty seven of the 313 volunteers who did not react were re-tested; 125/257 received merthiolated saline where 14.4% of them tested positive. The remaining volunteers (132/257) received phenolated saline, only a minority (2.4%) tested positive ( $\chi^2 = 11.80$ ,  $p < 0.001$ ). All these negative volunteers received each reagent only once, to avoid double application of any product in the same volunteer.

Table 1  
Responses to skin tests in the four groups studied

Groups <sup>a</sup>	Results initial test	<i>n</i>	Volunteers retested ( <i>n</i> )	Reagent used in retest	Results of retest	<i>n</i>
I ( <i>n</i> = 102)	Positive	42	41	Merthiolated saline	Positive	13
					Negative	28
	Negative	60	50	Phenolated saline	Positive	3
					Negative	47
II ( <i>n</i> = 101)	Positive	36	33	Phenolated saline	Positive	1
					Negative	32
	Negative	65	51	Merthiolated saline	Positive	5
					Negative	46
III ( <i>n</i> = 97)	Positive	9	9	Plain saline	Positive	0
					Negative	9
	Negative	88	75	Phenolated saline	Positive	0
					Negative	75
IV ( <i>n</i> = 100)	Positive	0		–		
	Negative	100	81	Merthiolated saline	Positive	14
					Negative	67
Total		400	340			

<sup>a</sup> I: merthiolated antigen; II: phenolated antigen; III: merthiolated saline; IV: phenolated saline.



Table 2  
Association between response to skin tests and the study variables

Variables*	Initial test (n = 400)			Retest (n = 340)		
	Positive	Negative	p	Positive	Negative	p
Prior vaccination						
Yes	65	231	1.000	30	223	0.230
No	22	82		6	81	
History of allergies						
Yes	20	59	0.446	8	59	0.238
No	67	254		28	245	
Prior use of medications						
Yes	8	46	0.217	4	41	1.000
No	267	79		32	263	
Prior use of topical thimerosal						
Yes	77	269	0.745	32	260	0.800
No	10	43		4	44	

\*The volunteers were asked about receiving vaccination before entering the study, about previous history of allergies, use of medication and use of any product containing thimerosal (eyedrops, etc.). \*\*There was no statistically significant association with the study variables, based on Fischer's exact tests.

Adding the tests and retests, 331 volunteers received merthiolated saline during the study, of whom 41 (12.4%) were positive, while 326 volunteers received phenolated saline, of whom 4 (1.2%) were positive. The frequency of positive reactions to saline containing thimerosal among those who received it once was significantly less than among those who received it twice (14.4% versus 31.7%;  $\chi^2 = 6.22$ ,  $p < 0.05$ , the same was true for phenolated saline (2.4% versus 3.0%,  $\chi^2 = 4.98$   $p < 0.05$ ).

Local reactions to the tests could not be differentiated based on the reagents received and were identical to a classical positive reaction to the Montenegro skin test. The local reactions to the merthiolated saline injected

were identical in appearance those of the merthiolated Montenegro antigen. In other words, with the naked eye, as it is performed the reading of a standard skin test, it could not be discriminated a positive result to the test with the antigen or with the merthiolated saline alone. The diameter of indurations obtained with the first test for merthiolated saline varied from 3 to 24 mm and from 4 to 24 mm for the retest. The four volunteers with positive reactions to phenolated saline presented indurations of 4, 6, 6, and 18 mm. The volunteer who presented an induration of 18 mm reacted positively to the initial test with phenolated antigen (15 mm) and had injured the site of the second test before the 48 h reading was performed.

Table 3  
Number of volunteers with local or systemic reactions to skin tests in the four groups

Local/systemic reactions	Groups <sup>a</sup>				Total
	I	II	III	IV	
Local edema/erythema					
Initial test	5	2	3	0	10
Retest	0	1	0	4	5
Local pruritus					
Initial test	29 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	17	1	76
Retest	3	3	0	5	11
Fever, blisters, urticaria, local pain					
Initial test	0	0	0	0	0
Retest	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> I: merthiolated antigen; II: phenolated antigen; III: merthiolated saline; IV: phenolated saline.

<sup>b</sup> The frequency of local pruritus was statistically associated with the injection of merthiolated or phenolated antigen and not with the injections of the saline solutions ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test).

Frequency of positive reactions to the tests was not associated with a history of allergies or allergic diseases in the volunteers, utilization of medications, topical use of thimerosal, or having received vaccines prior to the study (Table 2). The size of indurations following the tests and retests was also no different comparing previously vaccinated to non-vaccinated individuals (Wilcoxon,  $p > 0.05$ ).

Side reactions to the tests are described in Table 3. The appearance of edema/erythema was associated with receiving thimerosal (Pearson  $\chi^2 = 3.75$ ,  $p < 0.05$ ), while the appearance of pruritus was associated with receiving the *Leishmania* antigen, whether merthiolated or phenolated (Pearson  $\chi^2 = 33.27$ ,  $p < 0.0001$ ). All of the local reactions to retests (five cases of edema and nine of local pruritus) occurred in volunteers who received merthiolated saline (Table 3).

#### 4. Discussion

The possibility that thimerosal may induce a false-positive reaction to the Montenegro skin test emerged from the work by Marzochi et al. (1998), who observed that responses to intradermal injection of thimerosal were identical to those induced by the application of merthiolated *Leishmania* antigen. Based on this observation, the study was conducted in a non-endemic area for *Leishmaniases*, so that only the allergic components of thimerosal and phenol would be analyzed. The current results confirm the study by Marzochi et al. (1998), demonstrating the sensitizing capacity of thimerosal in some 12% of the volunteers tested (Table 1), as well as: (1) the morphological similarity between the intradermal reactions to thimerosal and the Montenegro antigen and (2) the association between receiving thimerosal and a higher frequency of side effects to the tests (Table 3). Sensitization to thimerosal was significantly more frequent than to phenol (Table 1), which showed sensitization in only four individuals.

The study of a homogeneous population allowed for comparable groups, so it was not necessary to perform more than one simultaneous application in the same individual. This decreases the risks of increasing positive reactions to the test based on a dose effect, both of antigens and of different preservatives, which could occur if volunteers received various applications. Retesting was done on the contralateral forearm from the initial test.

Given the possibilities of sensitization by merthiolate or phenol (Nascimento et al., 1993; Satti et al., 2002; De Luca et al., 2003), we chose not to repeat application of the antigen with either thimerosal or phenol. The purpose of retesting with only diluent was to distinguish

between individuals that had reacted only to the *Leishmania* antigen (those who were negative on retesting) and double positive individuals (those who reacted to two consecutive tests). However, the positive reaction to thimerosal was significantly greater among those who received it twice, suggesting that the thimerosal present in Montenegro antigen can obscure the test's sensitizing capacity.

Although various authors reported sensitization to thimerosal associated with receiving vaccines, our data do not show this association. The small number of non-vaccinated individuals in the four groups may make the analysis difficult. Neither was it possible to associate delayed hypersensitivity to thimerosal with a history of allergies or use of medications by volunteers (Table 2), and it was not possible to demonstrate cross-reactivity between hypersensitivity to thimerosal and other products, as described previously (Goncalo et al., 1996) (e.g. piroxicam).

The development of hypersensitivity reactions is associated with different exposure routes to allergens and is regulated by different immune mechanisms. Although 86% of the volunteers used topical thimerosal, none reported signs or symptoms of current or past allergy to the product, even though 12.4% of them showed post-test delayed hypersensitivity, which was unfamiliar to them. The intradermal antigen inoculation route is associated with the development of delayed hypersensitivity, while the topical use of subcutaneous inoculations usually triggers reactions of the immediate type, which are more easily perceived by the patient.

The high frequency of delayed hypersensitivity to thimerosal, the similarity between the reaction induced by this compound and that elicited by the MST, the association between receiving thimerosal and the higher frequency of side effects to thimerosal (Table 3) indicate that this compound should be replaced as the preservative for the Montenegro antigen and other antigens applied in intradermal tests. The low sensitivity induced by phenolated saline in our study (1.2%) and the rare occurrence of side effects associated with this reagent suggest that it could be used to replace thimerosal until the development of new antigens free of non-specific components.

It was necessary to get consistent and evaluable results about the safety and the allergic potential of the preservatives used in the leishmanin and subsidiate the design of other field evaluations to verify if the non-specific reactions found to the preservatives occurs in other regions and countries.

Considering the absence of infection or disease from *Leishmania* among the volunteers and the absence of transmission of this parasite in the study area, the

response in the group that received the antigen should be the same as that which received only the corresponding diluent. However, from the 41 positive volunteers re-tested with mertiolated saline (Table 1), 28 were negative to re-testing, suggesting that they were skin-test positive, without sensitization by the preservative used. Studies are under way to elucidate the reason for the increased frequency of true positives to the Montenegro antigens with or without thimerosal in an area which is presumed to be non-endemic and without any association with allergy to the preservatives.

### Acknowledgements

To all the volunteers of the study, to Tatiana Cristina Vieira de Carvalho for helping with data analysis, to the military personnel that helped in the field work and to the entire staff of Reference Center for *Leishmaniasis* – IPEC/FIOCRUZ-RJ. This work received support from FIOCRUZ, the National Council of Research- Brazil (CNPq), The National Foundation of Health in Rio Grande do Sul State and the General coordination of Laboratories, SVS–Ministry of Health, Brazil.

### References

- Abramson, M.A., Dietze, R., Frucht, D.M., Schwantz, R., Kenney, R.T., 1995. Comparison of new and old world leishmanins in an endemic region of Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1292–1297.
- Akuffo, H., Darce, M., Maasho, K., Berhan, T.Y., 1995. In vivo evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 16–22.
- Alimohammadian, M.H., Kivanjah, M., Pak, F., Gaznavia, A., Kharazmi, A., 1993. Evaluation of the efficacy of Iran leishmanin and comparison with leishmanins from Wellcome (UK) and Roma (Italy) in cured cutaneous leishmaniasis patients [see comments]. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 550–551.
- Ben Salah, A., Louzir, H., Chlif, S., Mokni, M., Zaatour, A., Raouene, M., Ismail, R.B., Dellagi, K., 2005. The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 192, 1981–1987.
- Cox, N.H., Forsyth, A., 1988. Thiomersal allergy and vaccination reactions. *Contact Dermatitis* 18, 229–233.
- de Castro, E.A., Luz, E., Telles, F.Q., Pandey, A., Biseto, A., Dinaiski, M., Sbalqueiro, I., Soccol, V.T., 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. *Acta Trop.* 93, 141–149.
- De Luca, P.M., Mayrink, W., Santiago, M.A., Nogueira, R., Conceicao-Silva, F., Melo, G., Mendonca, S.C., 2003. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmanin skin test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 709–712.
- Forstrom, L., Hannuksela, M., Kousa, M., Lehmuskallio, E., 1980. Merthiolate hypersensitivity and vaccination. *Contact Dermatitis* 6, 241–245.
- Goncalo, M., Figueiredo, A., Goncalo, S., 1996. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34, 201–203.
- Lebrec, H., Bachot, N., Gaspard, I., Kerdine, S., Guinépain, M.T., Laurent, J., Pallardy, M., 1999. Mechanisms of drug-induced allergic contact dermatitis. *Cell. Biol. Toxicol.* 15, 57–62.
- Maibach, H.I., 1972. False-positive intradermal skin tests and thimerosal. *JAMA* 220, 126.
- Marzochi, K.B., Marzochi, M.A., Silva, A.F., Grativol, N., Duarte, R., Confort, E.M., Modabber, F., 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93, 205–212.
- Melo, M.N., Mayrink, W., da Costa, C.A., Magalhaes, P.A., Dias, M., Williams, P., Araujo, F.G., Coelho, M.V., Batista, S.M., 1977. Standardization of the Montenegro antigen. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 19, 161–164.
- Montenegro, J., 1926. A cutis reação na leishmaniose. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo* 1, 323–330.
- Nascimento, M.D., Alcantara-Neves, N.M., Muniz, M.E., Nunes, S.F., Paranhos, M., de Carvalho, L.C., 1993. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 91–93.
- Osawa, J., Kitamura, K., Ikezawa, Z., Nakajima, H., 1991. A probable role for vaccines containing thimerosal in thimerosal hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 24, 178–182.
- Reed, S.G., Badaro, R., Masur, H., Carvalho, E.M., Lorencio, R., Lisboa, A., Teixeira, R., Johnson Jr., W.D., Jones, T.C., 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 79–85.
- Restrepo Isaza, M., 1980. The Montenegro test in the epidemiology of South American leishmaniasis. *Bol. Oficina Sanit Panam* 89, 130–138.
- Satti, I., el Hassan, A., Khalil el, T.A., Akuffo, H., 2002. The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in healthy volunteers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 565–567.
- Seidenari, S., Manzini, B.M., Modenese, M., Danese, P., 1989. Contact sensitization to thimerosal in healthy subjects. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 124, 335–339.
- Sokal, J.E., 1975. Editorial: measurement of delayed skin-test responses. *N. Engl. J. Med.* 293, 501–502.
- Souza, W.J., Sabroza, P.C., Santos, C.S., de Sousa, E., Henrique, M.F., Coutinho, S.G., 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 52, 111–119.
- Zijlstra, E.E., el-Hassan, A.M., 1993. Leishmanin and tuberculin sensitivity in leishmaniasis in the Sudan, with special reference to kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 425–427.

## **8.8. ANEXO VIII- ARTIGO SUBMETIDO – REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**

Letter:

Response to Montenegro skin test after 12 to 16 days in individuals with negative readings at 48 hours.

The classical method used in the Montenegro skin test (MST), the most used complementary test in diagnosis of cutaneous leishmaniasis around the world, consists of the intradermal injection of 0.1 ml of antigen (leishmanin), followed by reading after 48-72 hours to detect an indurated area with or without erythema that can be demarcated with a ball-point pen (Montenegro, 1926; Sokal, 1975). The test is considered positive if the indurated area is equal to or greater than 5 mm in diameter (Melo *et al.*, 1977).

In this letter, we report 26 cases of an indurated, erythematous reaction at the MST site between 10 and 14 days after an initial negative reading of the MST in these individuals. The reaction was not associated with the development of cutaneous or visceral disease, nor with probable exposure to sand flies in endemic areas during this period. All of the individuals were healthy males, with no previous history of leishmaniasis nor knowledge of cases of tegumentary or visceral disease. They were tested in areas considered non-endemic for leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro (southeastern Brazil) and in the city of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul (southern Brazil).

In Rio de Janeiro, the 12 individuals observed (mean age 23 years) were participating in the selection process for leishmaniasis vaccination (Marzochi *et al.*, 1998) and received an MST with 0.1 ml of BIOBRAS antigen (40 µg of proteic antigen from a pool of *Leishmania* strains/ml in merthiolated saline at 1:10000) and presented negative readings 48 hours after the application. About ten days after the initial negative reading, we observed indurated, erythematous areas with diameters between 4 and 10.5 mm at the MST site, which were marked and measured (Sokal, 1975). Another 86 volunteers were negative at 48-hour reading and did not present any reaction 10 days later.

No individual developed leishmaniasis nor allergic or exanthematic disease up to 3 months after the appearance of this delayed reaction. Although tested in Rio de Janeiro, 10 of the 12 individuals presenting the delayed reaction were from the State of Rio Grande do Sul.

In a posterior study in Rio Grande do Sul, 125 individuals were examined, who were participating in a trial to study two leishmanins (both with 40 µg of *Leishmania amazonensis* proteic antigen/ ml of saline, merthiolated at 1:10000 in one and phenolated at 0.4 % in the other), and had negative readings 48 hours after the intradermal injection. All were observed for 30 days to identify any delayed reactions, and were compared to 188 individuals who received only merthiolated (88) or phenolated (100) vehicle.

Table I shows the frequency of cases of delayed reaction among the 313 individuals examined, according to the reagent they received. The results show a significant association between the merthiolated antigen and the appearance of a delayed reaction ( $\chi^2 = 4.60$ ;  $p < 0.005$ ). However, none individual who received only merthiolated or phenolated saline developed this reaction.

The delayed reactions appeared between 10 and 14 days after initial reading of the MST in 14 of the 125 individuals tested with antigen (11.2 %), and the diameter of the induration varied from 6 to 11 mm. There were no accompanying systemic or other local signs or symptoms.

In the two groups studied (Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul), the delayed reactions could not be differentiated morphologically from classic positive responses to MST. The absence of this response in individuals receiving only control solutions suggests that the reaction is due to the *Leishmania* antigens present in the test solution. The proportion of late reactors among those who received the phenolated antigen in Rio Grande do Sul was similar to that observed previously (Rabello *et al.*, 1945), i.e., 5%.

The meaning of this delayed reaction remains obscure. Rabello *et al.* (1945) suggested that the late reactors are “false negatives” at the 48-hour reading and recommended reexamination of all the negative tests some 15 days after they are performed. We believe that further and systematic studies of this reaction are necessary to obtain more information on the significance of these findings.

## REFERENCES:

- Marzochi, K.B., Marzochi, M.A., Silva, A.F., Grativol, N., Duarte, R., Confort, E.M., Modabber, F.; 1998. Phase I study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 205-212.
- Melo, M.N. , Mayrink, W., da Costa ,C.A., Magalhães, P.A., Days, M., Williams, P., Araújo, F.G., Coelho, M.V., Batista, S.M. ;1977. Padronização do antígeno de Montenegro. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 161-64.
- Montenegro, J. ;1926. A cutis reacção na leishmaniose. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 1, 323-330.
- Rabello F. E., Portugal, H., Serra, O. ;1945. Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, alergia específica, estrutura histológica e número de germens. In: *I Reunião de dermato-sifiliógrafos brasileiros, s.l.*, Rio de Janeiro, 37-71.
- Sokal, J. E. ;1975. Editorial: measurement of delayed skin test responses. *New England Journal of Medicine*, 293, 501-502.

**8.9. ANEXO IX- ARTIGO SUBMETIDO – MEMÓRIAS DO INSTITUTO  
OSWALDO CRUZ**

# First encounter of subclinical human *Leishmania (Viannia)* infection in Rio Grande do Sul State, Brazil

Aline Fagundes/<sup>+</sup>, Mauro CA Marzochi, Octavio Fernandes\*, Mauricio A Perez\*\*  
Armando O Schubach\*\*\*, Tânia MP Schubach\*\*\*, Maria RR Amendoeira\*\*\*\*,  
Eliame Mouta-Confort, Keyla BF Marzochi

National Reference Center for Diagnosis of Tegumentary Leishmaniasis, Laboratory of Parasitology, Department of Micro-Immunoparasitology \*\*\*Department of Infectious Diseases, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil \*Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas \*\*\*\*Laboratório de Toxoplasmose, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil \*\*Departamento de Medicina Preventiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*The objective of the present study was to evaluate the specificity of the Montenegro skin test (MST) in an area in Brazil, state of Grande do Sul State (RS), which was considered to be non-endemic for leishmaniasis. Sixty subjects presented a positive MST and were reevaluated by clinical examination, serology and polymerase chain reaction (PCR) of peripheral blood for the detection of subclinical Leishmania infection. None of the subjects presented clinical signs or symptoms of current leishmaniasis or a history of the disease. Leishmania (Viannia) DNA was detected in blood by PCR and hybridization in one subject. The PCR skin test-positive individual remained asymptomatic throughout the study. Clinical examination showed no scars suggestive of past cutaneous leishmaniasis. Human subclinical infection with Leishmania (Viannia) in RS was confirmed by PCR. This is the first report of subclinical infection with this parasite in the human population of this area.*

Key words: *Leishmania* - PCR - Montenegro skin test - subclinical infection - Rio Grande do Sul - Brazil

*Leishmania (Viannia) braziliensis* infection occurs in most Brazilian states, and some authors believe that the dispersal of this parasite from the western Amazon is associated with anthroponotic action (Marzochi & Marzochi 1994). The traditional clinical manifestations are single or multiple cutaneous lesions, but *L. (V.) braziliensis* has also been associated with mucosal or mucocutaneous leishmaniasis (Marzochi & Marzochi 1994). Nevertheless, most infected individuals remain asymptomatic indefinitely, and show a cell-mediated or humoral immune response to *Leishmania* antigens or parasites in peripheral blood detected by polymerase chain reaction (PCR) (Follador et al. 2002, de Oliveira Camera et al. 2006).

The Montenegro skin test (MST) is the most widely used complementary test for the presumptive diagnosis of *Leishmania* infection. Classically, a positive MST is an indicator of previous contact with the parasite through natural inoculation after the bite of the sandfly. Alternatively, MST positivity can be the result of immunity acquired by vaccination (Mayrink et al. 1979, Marzochi et al. 1998), or nonspecific reactions to the merthiolate or phenol used in the MST as a preservative (Marzochi et

al. 1998, Fagundes et al. 2003, 2007). In some cases, the nonspecific reaction was found to be morphologically identical to a classical positive MST (Marzochi et al. 1998, Fagundes et al. 2007), and it was not possible to discriminate between a false-positive MST due to merthiolate hypersensitivity and a true positive MST result.

In view of these nonspecific reactions, we performed a study in an area non-endemic for leishmaniasis in order to compare the MST response using antigens preserved in merthiolate or phenol. The study protocol has been described in detail by Fagundes et al. (2007). The study population consisted of 151 healthy male military volunteers from the state of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, where no case of leishmaniasis has been described so far. Informed consent was obtained from all volunteers and the study was approved by the Institutional Ethics Committee (Fiocruz) and the Brazilian Defense Ministry.

The Biomanguinhos® MST antigen (40 mg/ml *Leishmania amazonensis* protein antigen, IFLA/BR/1967/PH8 strain) (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) preserved in 1:10,000 thimerosal or 0.4% phenol was used. All MST-positive and thimerosal- or phenol-allergic volunteers were reevaluated by clinical examination, serology and PCR. Venous blood samples (3 ml) were collected into Vacutainer® tubes containing EDTA for DNA extraction. One-hundred microliter of buffy coat was used for DNA extraction with DNAzol® reagent (Gibco BRL), followed by washing in 95% ethanol, according to manufacturer instructions. Extraction was performed in a DNA workstation (Airclean System®, Raleigh, NC, USA), with no more than six samples being processed simultaneously to avoid cross-contamination. Addition-

Financial support: Fiocruz/Ipec, MS/SVS, CNPq/FAPERJ, PAPES-Fiocruz

Corresponding author: aline.fagundes@ipecc.fiocruz.br

Received 26 June 2007

Accepted 6 November 2007



ally, another blood sample was collected and serum was separated for the detection of *Leishmania* antibodies by indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA (Madeira et al. 2000) and *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay and IFI (Silva et al. 2002). For PCR amplification, 1 ml of a 1:20 dilution of the DNA extracted from each sample was submitted to hot-start PCR with primers that amplify the conserved region of the mini-circle molecules present in all *Leishmania* species (Degraeve et al. 1994). The reaction mixture contained 100 ng of each primer (5'- (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)-CTAT(A/T)TTACACCAACCCC and 5'-GGGGAGGGG-CGTTCTGCGAA), 200 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo), 2.5 units of Taq polymerase (Ampliaq Gold, Perkin-Elmer, Norwalk) in the buffer supplied by the manufacturer, and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Amplification was carried out in a Perkin-Elmer 900 thermocycler under the following conditions: 94°C for 10 min, 30 cycles of 94°C/30 s, 50°C/30 s and 72°C/30 s, and a final cycle at 72°C/10 min. A negative control tube containing no DNA was included in each amplification. A positive control, consisting of 10 pg DNA extracted from an axenic culture of *Leishmania braziliensis*, was also performed. The DNA from the agarose gels was transferred to nylon membranes by capillary blotting using 0.4 N NaOH and hybridized against *Leishmania (Viannia)*-specific probes as described elsewhere (Schubach et al. 1998, Pirmez et al. 1999).

The population sample for clinical and laboratory reevaluation consisted of 60 originally MST-positive individuals, 14 subjects with nonspecific reactions to thimerosal or phenol, and 77 MST-negative individuals as controls. None of these 151 individuals presented anti-*Leishmania* antibodies. Anti-*T. cruzi* antibodies were detected by ELISA in three volunteers (one of this MST-positive), and by IFI in two (one of this MST-positive). None of the volunteers presented anti-*T. cruzi* antibodies simultaneously detected by the two techniques. Of the 151 PCRs for the detection of *Leishmania* DNA, one was positive and hybridization showed that the product corresponded to *Leishmania (Viannia)* DNA. Hybridization did not enhance the sensitivity of the ethidium bromide-stained products, demonstrating that the other 150 samples were really negative. The positive PCR corresponded to an 18 year-old healthy male volunteer who tested positive in the MST with merthiolate antigen (11 mm induration diameter), and negative in the preservative test. The subject was asymptomatic, born in RS (Santa Maria city) and had never lived in a different place. The man did not present any scar or history of allergy or blood transfusion and was seronegative for Chagas' disease.

The MST is the most widely used presumptive diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. It is a simple and reliable test (Pineda et al. 2001), but nonspecific results may occur due to the presence of allergenic reagents in the preparation that are not related to *Leishmania* antigens (Pineda et al. 2001, Fagundes et al. 2007). Moreover, the test is unable to distinguish between active, inactive or past infection and may become positive

in individuals vaccinated against leishmaniasis (Mayrink et al. 1979), thus indicating an immune response to *Leishmania* antigens in the absence of infection.

In clinical practice, methods for the etiological diagnosis of leishmaniasis (imprint, histopathology, in vitro culture and PCR) are used to confirm leishmaniasis infection in an MST-positive individual. These methods are generally applied in the presence of clinical disease. In our setting, since we studied asymptomatic MST-positive individuals, the most appropriate technique was PCR of peripheral blood because of its high sensitivity and specificity (Pirmez et al. 1999, de Oliveira Camera et al. 2006) which revealed one positive case. In addition to MST-positive subjects, we performed PCR on 91 other individuals (allergic or MST-negative) who tested negative.

In visceral leishmaniasis, PCR has been used as a tool for the evaluation of subclinical infection (Costa et al. 2000, 2002). Some studies have shown that the persistence of *Leishmania* DNA in blood or bone marrow of treated visceral leishmaniasis patients is associated with disease relapse or the appearance of post-kala azar dermal leishmaniasis (Osman et al. 1997). Furthermore, PCR permitted the detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in scars of clinically cured cutaneous leishmaniasis patients, demonstrating the persistence of the parasite (Schubach et al. 1998). Likewise, the scar of one of these patients was also positive by culture (Schubach et al. 1998). Assuming that a positive PCR corresponds to the presence of viable parasites, it might be considered to be an indicator of active infection (Tarleton et al. 1999).

The hypothesis of occurrence of persistent subclinical infection detected by a positive MST has been suggested since 1940 in Brazil (Pessoa & Pestana 1940), and was later supported by PCR (Schubach et al. 1998, Costa et al. 2002, de Oliveira Camera et al. 2006). Whereas the MST does not discriminate among the infectious *Leishmania* species, the PCR-hybridization approach permits the identification of the infectious agent. In our case, the amplified product corresponded to DNA of the *Viannia* subgenus.

In conclusion, the finding of this MST-positive individual who presented *Leishmania (Viannia)* DNA detected by PCR, confirms the first case of subclinical human *Leishmania* infection in RS, Brazil. In contrast, the prevalence of positive responses to the MST is very high, excluding thimerosal- or phenol-allergic individuals. Other studies are in progress to identify *Leishmania* DNA in other populations, including domestic animals. The finding of MST positivity and *Leishmania* infection in individuals without symptoms and in an area where no human cases have been detected so far suggests the circulation of *Leishmania* in the study area, and the establishment of subclinical infection as the base of the "iceberg", whose peak is represented by the clinical confirmed cases. Besides, PCR might be a useful tool for surveillance in order to identify areas that are at risk for acquisition of the disease, and the circulating parasites, starting out from MST positive results. In fact, after the preparation of this manuscript, some cases of cutaneous leishmaniasis were notified (Rio Grande do Sul 2006) in another site in RS far from the study area.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the medical staff of the military units participating in the study, the Secretary of Health of Rio Grande do Sul, and the National Health Foundation, Brazil.

## REFERENCES

- Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH 2000. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182: 997-1000.
- Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 334-337.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- de Oliveira Camera P, Junger J, do Espirito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C 2006. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 1112-1117.
- Fagundes A, Marzochi KB, Marzochi MC 2003. Immediate and generalized reaction to Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 413-414.
- Fagundes A, Marzochi MC, Perez M, Schubach A, Ferreira A, Silva JP, Schubach T, Marzochi KB 2007. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. *Acta Trop* 101: 25-30.
- Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* 34: E54-58.
- Madeira M, Serra CM, Uchoa CM, Duarte R, Cruz DA, Perdomo C 2000. Canine leishmaniasis: a serological survey of 310 dogs in Itaipu, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Públ* 16: 568.
- Marzochi KB, Marzochi MA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 205-212.
- Marzochi M, Marzochi K 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Públ* 10 (Suppl. 2): 359-375.
- Mayrink W, da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 385-387.
- Osman OF, Kager PA, Zijlstra EE, el-Hassan AM, Oskam L 1997. Use of PCR on lymph-node sample as test of cure of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 91: 845-850.
- Pessoa SB, Pestana BR 1940. A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. *Arch Hyg Saúde Públ* 5:125-137.
- Pineda JA, Macias J, Morillas F, Fernandez-Ochoa J, Cara J, de la Rosa R, Martin-Sanchez J, Gonzalez M, Garcia-Briones E, Delgado J, Lissen E 2001. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 173-174.
- Pirmez C, Da Silva Trajano V, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Goncalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37: 1819-1823.
- Rio Grande do Sul 2006. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Secretaria Estadual da Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, *A saúde da população do Estado do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, p. 117.
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr., Fernandes O 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 178: 911-914.
- Silva ED, Pereira VR, Gomes JA, Lorena VM, Cancado JR, Ferreira AG, Krieger MA, Goldenberg S, Correa-Oliveira R, Gomes YM 2002. Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. *J Clin Lab Anal* 16: 132-136.
- Tarleton RL, Zhang L 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94-99.

**8.10. ANEXO X – PROTOCOLO PADRONIZADO DE APLICAÇÃO E LEITURA DA IDRM**

## Procedimento operacional padrão para aplicação e leitura da IDRM

Adaptado de: Tarnow, K e King, N. *Applied Nursing Research*, 17 (4): 275-282. 2004

### Aplicação

1. verificar o pedido médico e checar com o paciente a existência de alergias e/ou outros impedimentos para o teste
  2. identificar-se ao cliente; providenciar um lugar apropriado para a realização do exame
  3. retirar o frasco de antígeno da geladeira e mantê-lo a temperatura ambiente
  4. lavar as mãos
  5. informar ao cliente a medicação que lhe será aplicada
  6. colocar luvas
  7. inspecionar o antebraço do paciente procurando lesões e/ou descoloração
  8. colocar o antebraço do paciente flexionado sobre uma superfície plana
  9. identificar, no antebraço do paciente, o(s) local(is) possível (is) de inoculação do teste
  10. escolher o local mais apropriado para a injeção
  11. fazer a assepsia do local da inoculação
  12. fazer assepsia da tampa do frasco de antígeno
  13. abrir uma seringa descartável apropriada, já agulhada
  14. desencapar a agulha e retirar 0,1 ml de antígeno de Montenegro do frasco origem, sem formar bolhas
  15. segurar a seringa confortavelmente, com o bisel da agulha para cima
  16. esticar ligeiramente a pele, com os dedos, acima do local de inoculação
  17. inserir lentamente a agulha através da epiderme, logo abaixo da superfície da pele, num ângulo de 5 a 15 graus.
  18. não aspirar antes da inoculação
  19. injetar o antígeno lentamente durante 15 a 16 segundos, devendo sentir resistência
  20. observar a formação da pápula no local da aplicação
  21. após a aplicação, retirar a agulha, no mesmo ângulo em que foi inserida
  22. não massagear o local da inoculação
  23. cuidadosamente, remover possíveis resíduos com gaze enbebida em álcool
  24. colocar o cliente em posição confortável
  25. descartar seringa e agulha apropriadamente
  26. lavar as mãos
  27. explicar os procedimentos subsequentes ao cliente
  28. manter o cliente em observação nos 30 minutos após a inoculação, para verificação de possíveis reações imediatas
  29. fazer os registros do procedimento, marcando a data para a leitura da reação.
  30. caso ocorra reação imediata, proceder o atendimento ao cliente, documentar a reação e liberar o cliente após providências cabíveis
- 9.

10. caso não ocorra reação imediata, liberar o cliente, informando a data para retorno e instruções específicas

#### 11. Leitura

12. identificar-se ao cliente; providenciar um lugar apropriado para a realização do exame

13. informar ao cliente o procedimento que será realizado

14. verificar o pedido médico e os documentos da realização do exame

15. lavar as mãos

16. inspecionar o antebraço do cliente procurando alterações, decorrentes ou não do teste realizado

17. interrogar o cliente acerca das suas observações do local do teste, medicamentos realizados e outras observações

18. colocar o antebraço do paciente flexionado sobre uma superfície plana

19. fazer a assepsia do local da leitura

20. observar a presença/ausência de endureção/ eritema e/ou outros sinais locais

21. com uma caneta esferográfica, demarcar a área endurecida. Colocar a ponta da caneta a cerca de 3 cm da borda da área endurecida

22. deslizar a caneta em direção ao centro da endureção, até a parada do deslizamento da caneta

23. repetir os itens 9 e 10 no lado oposto ao ponto aplicado inicialmente e na linha perpendicular ao mesmo

24. marcar a área correspondente aos 4 pontos de parada da caneta esferográfica, que indicará o tamanho da endureção

25. medir a área demarcada com régua milimetrada, em seu maior diâmetro

26. anotar a medida encontrada em ficha específica

27. umedecer uma folha de papel branco com algodão embebido em álcool, formando uma mancha um pouco maior do que a área de endureção

28. aplicar o papel umedecido sobre a área endurecida e demarcada, transferindo a marcação de tinta da pele do cliente para o papel

29. documentar o registro da endureção em papel.

30. Explicar os procedimentos subsequentes ao cliente, encaminhando-o ao médico acompanhante, quando for o caso.

31. lavar as mãos

32.