

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

**APLICABILIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA
FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

por

Diana Souza de Oliveira

Belo Horizonte
2018

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

D.S.OLIVEIRA

2018

Diana Souza de Oliveira

**APLICABILIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA
FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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

Orientação: Dr. Edward José de Oliveira

Coorientação: Dra. Gláucia Fernandes Cota

Belo Horizonte

2018

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

O482a Oliveira, Diana Souza de.
2018

Aplicabilidade de testes sorológicos para diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar / Diana Souza de Oliveira. – Belo Horizonte, 2018.

XIV, 88 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 72 - 87

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

1. Leishmaniose Mucosa 2. Leishmania braziliensis 3. Testes Sorológicos. I. Título. II. Oliveira, Edward José de (Orientação). III. Cota, Gláucia Fernandes (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Diana Souza de Oliveira

**APLICABILIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA
FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edward José de Oliveira (IRR-FIOCRUZ MINAS) Presidente

Prof. Dra. Denise Utsch Gonçalves (UFMG) Titular

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

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (IRR- FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 5 de junho de 2018.

“... We're having a miracle on Earth
Mother Nature does it all for us.”
Queen

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e a todos que acreditaram e auxiliaram na execução do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ilma e Alexandre, e ao meu irmão Tiago, pelo amor incondicional, paciência, sabedoria e apoio. Vocês são meus guias, meu alicerce. Somos e seremos sempre Um por Todos e Todos por Um.

Aos meus avôs paternos, Lia e Didi (in memoriam), por acreditarem e me auxiliarem em cada conquista, principalmente acadêmica. Aos meus demais familiares, por vibrarem comigo por essas conquistas.

Ao meu orientador Dr. Edward Oliveira, que tem sido, além de um grande professor, um amigo, que me ensina e "atura" há anos. Meu amadurecimento acadêmico, desde a iniciação científica até aqui, só foi possível graças a você.

À minha coorientadora Dra. Gláucia Cota, pelos ensinamentos, paciência e compreensão. Te admiro muito e agradeço muito por tudo que você fez.

Aos meus amigos do René Rachou, Anna Luiza, Carolina, Daniel, Dian, Eduardo, Eliza, Juliana, Jussara, Lara, Líndicy, Mariana, Nayara, Rosiana e Verônica, que me apoiaram muito. Compartilhamos muito risos e choros. Obrigada por vocês fazerem parte de algo maior na minha vida.

Ao Daniel e Karine pelo auxílio durante realização dos testes.

Agradeço aos pesquisadores do grupo que me proporcionaram um grande aprendizado.

À Adrielle, Augusto, Bárbara, Brenda, Daniela, Jéssica, Loyse, Lorena, Rayssa, Patrícia, Pedro, Suellem, Tleyse, Victor, Vinícius e aos demais amigos que entenderam minha ausência e me apoiaram mesmo com a distância.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e ao Instituto René Rachou por possibilitarem a realização e construção deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código do Financiamento 001.

À Andreza Marcelino e Fernanda Medeiros da Fundação Ezequiel Dias, pela doação de dois testes que foram avaliados neste estudo.

RESUMO

A leishmaniose mucosa (LM) é a forma de acometimento mucoso tardio que afeta entre 3 a 5% dos pacientes com histórico de leishmaniose cutânea (LC) causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A LM é caracterizada pelo surgimento de lesões e ulcerações em mucosas dos tratos respiratório e digestivo superiores, provocando deformidades estruturais e estigmatizantes nestes pacientes. O diagnóstico da LM por critérios clínico-epidemiológicos é insuficiente, devido à sua similaridade com doenças que podem acometer mucosas. Entretanto, os exames laboratoriais com desempenho suficiente, custo e operacionalidade acessíveis são escassos. Além disso, a produção do antígeno, que era usado na Intradermorreação de Montenegro (IDRM), exame complementar mais utilizado nos últimos anos, foi interrompida no Brasil em 2015. Nesse contexto, a aplicabilidade dos testes sorológicos, desenvolvidos e registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV), foi avaliada para o diagnóstico da LM. Por meio de uma pesquisa na plataforma eletrônica pública da ANVISA, realizada em setembro de 2016, foram identificados seis testes sorológicos para o diagnóstico da LV e com registro ativo no Brasil. Desses, *Leishmania* ELISA IgG+IgM da Vircell S.L., Ridascreen® *Leishmania* Ab da R-Biopharm AG., IFI Leishmaniose Humana – BioManguinhos, IT-LEISH® da Bio-Rad Laboratories, Inc. foram avaliados nesse estudo. Além destes, foi avaliado também o protótipo de kit do teste de aglutinação direta aprimorado no Instituto René Rachou (DAT-LPC). Análise de desempenho dos testes foi realizada em 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico de LM, confirmados por critérios clínico-epidemiológicos, e prova terapêutica, ou laboratoriais, preconizados pelo Ministério da Saúde, e 20 amostras de soro de pacientes com suspeita de LM, mas que tiveram confirmação de outra etiologia, atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose do Instituto René Rachou, no período de 2009 a 2016. A acurácia diagnóstica foi moderada, destacando os testes Ridascreen® *Leishmania* Ab (86,2%) e *Leishmania* ELISA IgG+IgM (73,3%). A IFI Leishmaniose Humana apresentou acurácia de 66,7%, enquanto IT-LEISH® e DAT-LPC demonstraram a menor acurácia (38,3%), apesar de alta especificidade (100% e 95%, respectivamente). Após determinação de novos pontos de corte, para os testes *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen® *Leishmania* Ab, houve melhora da acurácia de 73,3% para 88% ($p=0,04$) e de 86,2% para 89% ($p=0,64$), respectivamente. Os testes *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen® *Leishmania* Ab apresentaram maior sororreatividade e sensibilidade com amostras de pacientes com a forma clínica moderada/grave em comparação às amostras de pacientes com a forma leve da LM. Os resultados obtidos nesse estudo indicam diferenças significativas na aplicabilidade dos testes sorológicos, desenvolvidos e registrados na ANVISA para o diagnóstico da LV, quando aplicado para o diagnóstico da LM, o que deve orientar o planejamento de novos estudos.

Palavras-chave: Leishmaniose mucosa. *Leishmania braziliensis*. Diagnóstico laboratorial. Testes sorológicos.

ABSTRACT

Mucosal leishmaniasis (ML) is the form of late mucosal involvement that affects between 3 to 5% of patients with a history of cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The ML is characterized by the presence of lesions and ulcerations in mucous membranes of the respiratory and digestive tracts causing structural and stigmatizing deformities in these patients. The diagnosis of ML by clinical-epidemiological criteria is insufficient, due to its similarity with diseases that can affect mucous membranes. However, laboratory tests with sufficient performance, cost and operability are scarce. In addition, the production of the antigen that was used in the Montenegro Intradermoreaction (IDRM), the most commonly used complementary exam in recent years, was interrupted in Brazil in 2015. In this context, the applicability of the existing serological tests, developed and registered at the National Agency of Sanitary Surveillance (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL), was evaluated for the diagnosis of ML. A survey of ANVISA's public electronic platform, conducted in September 2016, identified six serological tests for leishmaniasis and with active registration in Brazil. Of these, *Leishmania* ELISA IgG+IgM from Vircell S.L., Ridascreen® *Leishmania* Ab from R-Biopharm AG., IFI *Leishmaniose Humana* - BioManguinhos, IT-LEISH® from Bio-Rad Laboratories, Inc. were evaluated in this study. In addition, a direct agglutination test prototype kit improved at the René Rachou Institute in Brazil (DAT-LPC) was included. Analysis of test performance was performed on 40 serum samples from patients diagnosed with ML, confirmed by clinical-epidemiological criteria, and therapeutic prove, or laboratory tests, as recommended by Ministry of Health, and 20 serum samples from patients with suspected ML, but who had confirmation of another etiology, attended at the *Leishmaniose* Reference Center of the René Rachou Institute from 2009 to 2016. The diagnostic accuracy was moderate, with Ridascreen® *Leishmania* Ab (86.2%) and *Leishmania* ELISA IgG+IgM (73.3%). The IFI *Leishmaniose Humana* showed 66.7% of accuracy, while IT-LEISH® and DAT-LPC demonstrated the lowest accuracy (38.3%), despite high specificity (100% and 95%, respectively). After the determination of new cut-off points, for the *Leishmania* ELISA IgG+IgM and Ridascreen® *Leishmania* Ab tests, there was an improvement in accuracy from 73.3% to 88% ($p=0.04$) and from 86.2% to 89% ($p=0.64$), respectively. The *Leishmania* ELISA IgG+IgM and Ridascreen® *Leishmania* Ab tests presented bigger seroreactivity and sensitivity in the patients with moderate/severe clinical form in comparison to the patient carriers of mild form ML. The results obtained in this study indicate significant differences in the applicability of the serological tests, developed and registered in ANVISA for the diagnosis of LV, when applied for the diagnosis of LM, which should guide the planning of new studies.

Key words: Mucosal leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Laboratory diagnosis. Serological tests.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com suspeita de LM, atendidos no CRL-IRR, 2009-2016	48
Tabela 2 - Positividade dos exames diagnósticos entre os 40 pacientes com LM atendidos no CRL-IRR, 2009-2016	49
Tabela 3 - Diagnósticos firmados entre os pacientes do grupo controle, atendidos no CRL-IRR, 2009-2016.....	49
Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos entre suspeitos de LM atendidos no CRL-IRR, 2009-2016 de acordo com ponto de corte do fabricante.....	53
Tabela 5 - Análise de concordância entre os testes sorológicos aplicados em 60 amostras de soro de pacientes com suspeita de LM, atendidos no CRL-IRR no período de 2009 a 2016	54
Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade para o teste Leishmania ELISA IgG+IgM de acordo com diferentes pontos de corte definidos pela Curva ROC.....	55
Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade para o teste Ridascreen® Leishmania Ab de acordo com os diferentes pontos de corte definidos pela Curva ROC	56
Tabela 8 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com a classificação clínica da LM	62
Tabela 9 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com tempo de evolução da LM	63
Tabela 10 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com as faixas etárias dos pacientes com LM	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da Curva ROC para o teste Leishmania ELISA IgG+IgM.....	55
Figura 2 - Representação da Curva ROC para o teste Ridascreen® Leishmania Ab.....	56
Figura 3 - Sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de pacientes com diferentes classificações clínicas da LM.....	58
Figura 4 - Sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de pacientes, de acordo com tempo de evolução da LM.....	59
Figura 5 - Sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de acordo com faixas etárias dos pacientes	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAT	Teste de Aglutinação Direta (do inglês Direct Agglutination Test)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCPP	Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
TF	Tampão Fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO GERAL	17
2.1 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO TEÓRICA	18
3.1 As leishmanioses	18
3.2 Aspectos gerais da LT	19
3.3 Leishmaniose mucosa	21
3.3.1 Diagnóstico	25
4 METODOLOGIA	37
4.1 Tipo de estudo	37
Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica de base amostral	37
4.2 População de estudo	37
4.2.1 Local do estudo e rotina de avaliação de casos suspeitos de LM.....	37
4.2.2 Seleção dos casos e controles.....	38
4.3 Caracterização clínica da população estudada.....	40
4.4 Aspectos éticos.....	40
4.5 Testes sorológicos	40
4.5.1 Ensaio imunoenzimático de ELISA	41
4.5.1.1 Leishmania ELISA IgG+IgM (Vircell S.L, Granada, ESP)	41
4.5.1.2 RIDASCREEN® Leishmania Ab. (R-BIOPHARM AG, Darmstadt, GER)....	42
4.5.2 Reação de imunofluorescência indireta - RIFI	43
4.5.2.1 IFI Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, BRA) ...	43
4.5.3 Teste imunocromatográfico.....	44
4.5.3.1 IT-LEISH® (BIO-RAD Laboratories, Inc, Marnes-la-Coquette, FRA)	44
4.5.4 Teste de aglutinação direta (DAT-LPC, PCPP/IRR-FIOCRUZ, BRA).....	45
4.6 Medidas de desempenho e análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Características da população estudada	47
5.2 Desempenho dos testes sorológicos	50
5.3 Sororreatividade das amostras de soro de acordo com a classificação clínica da LM, idade dos pacientes e tempo de evolução da doença	57
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	71

REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	88
ANEXO I. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	88

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose mucosa (LM) é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Leishmania*, caracterizada pelo acometimento progressivo de mucosas de vias aéreas superiores, o que provoca deformidades estruturais e estigmatizantes no paciente. O diagnóstico da doença, apenas por critérios clínico-epidemiológicos, é hoje considerado estratégia insuficiente, em função da existência de diversas outras doenças que podem cursar com lesões mucosas indistinguíveis, tais como linfoma, paracoccidiodomicose, hanseníase, sífilis, vasculites, dentre outras (MARSDEN, 1986; WHO, 2010; BRASIL, 2017). Por outro lado, em relação aos exames laboratoriais, observa-se indisponibilidade de método diagnóstico complementar, que reúna bom desempenho, baixo custo, operacionalidade e acessibilidade para o diagnóstico de LM. Até recentemente, a Intradermoreação de Montenegro (IDRM), era o teste complementar para o diagnóstico da LM mais utilizado no Brasil. O teste alia simplicidade de execução, baixo custo e alta sensibilidade para a confirmação da presença de infecção por *Leishmania*, embora não discriminasse infecção prévia de doença ativa. A partir de 2015, o antígeno de Montenegro teve sua produção interrompida devida à impossibilidade do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), em se adequar às novas exigências de boas práticas de fabricação, definidas pela ANVISA. Com isso, a IDRM não pôde ser mais utilizada nos serviços de saúde, dificultando mais ainda o diagnóstico de LM, não só no Brasil, como em toda a América Latina. Historicamente, a LM é reconhecida como condição em que todos os outros métodos laboratoriais têm ainda desempenho diagnóstico incerto ou são considerados de baixa sensibilidade, como os exames parasitológicos, ou de alto custo, como os ensaios moleculares. Diante desse cenário e considerando a fisiopatologia da LM, caracterizada essencialmente pela resposta inflamatória do hospedeiro, testes sorológicos despontam como alternativas potencialmente úteis para o diagnóstico da doença, mas ainda pouco estudados de forma sistemática. São diferentes testes sorológicos, com variadas metodologias, usando diversos antígenos de *Leishmania* spp. disponíveis para uso no Brasil. Esses testes sorológicos foram produzidos, em sua grande maioria, para aplicação no diagnóstico da forma visceral da doença (LV). Ainda que já sugeridos em manuais de manejo de LM (WHO, 2010), são poucas as séries de casos que descreveram o desempenho de testes sorológicos entre pacientes com LM (AMATO et al., 2007; CUNHA, 2015).

Além disso, não foram encontrados, na literatura científica, estudos de desempenho diagnóstico de testes sorológicos numa população constituída por casos e controles da doença.

Diante da falta de expectativa no desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas em curto prazo, este projeto se propõe a avaliar a aplicabilidade de testes sorológicos, produzidos e registrados para LV, no diagnóstico da LM. Espera-se que as informações aqui produzidas possam subsidiar as recomendações referentes ao manejo diagnóstico da LM, o que em última análise pode aumentar a resolutividade dos serviços de saúde, otimizar a utilização dos recursos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e reduzir a morbimortalidade da doença, fortemente relacionada ao tratamento tardio, inadequado e tóxico.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade de testes sorológicos para a leishmaniose visceral, baseado na pesquisa de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* spp. para o diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar.

2.1 Objetivos específicos

- Comparar a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos registrados na ANVISA;
- Avaliar a concordância dos resultados dos testes sorológicos;
- Determinar o ponto de corte, para testes sorológicos com resultado numérico contínuo, que proporcione melhor acurácia para o diagnóstico da LM;
- Correlacionar a sororreatividade das amostras com a classificação clínica de LM, tempo de evolução e idade do paciente;
- Correlacionar a sensibilidade dos testes sorológicos com a classificação clínica da LM, tempo de evolução e idade do paciente.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, caracterizadas por apresentações espectrais de acordo com a espécie do parasito e resposta imune do hospedeiro (SARAVIA et al., 1989; GONTIJO & CARVALHO, 2003). No homem, a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) são as principais manifestações clínicas da doença. As leishmanioses configuram um sério problema de saúde pública mundial e estão associadas a fatores ambientais tais como desmatamento e urbanização descontrolada, além de fatores imunológicos do hospedeiro, má nutrição e coinfeção com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DA-CRUZ et al., 2002; MACHADO-COELHO et al., 2005, BRASIL, 2010; GOMES et al., 2014). A LV, também conhecida como Calazar, é a forma mais grave da doença, que pode cursar com a presença de febre irregular de longa duração, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia, podendo ser fatal quando não tratada (PELLISSARI, 2011). A LV é endêmica em 62 países, principalmente em regiões tropicais e subtropicais das Américas, Ásia, Oriente Médio, África e Europa e estima-se que aproximadamente 500 mil novos casos da doença ocorram a cada ano (ALVAR et al., 2012). Por sua vez, a LT afeta pele e mucosas, é endêmica em 88 países de quatro continentes (África, Américas, Ásia e Europa), com incidência anual de 0,7 a 1,2 milhões de casos (ALVAR et al., 2012). No Brasil, uma média anual de 21.260 casos de LT foi notificada entre 2010 a 2016, dos quais aproximadamente 1.125 casos foram identificados com a forma mucosa. A maior parte dessas notificações (495 casos/ano) foi registrada pela região norte, seguida pelas regiões centro-oeste (272 casos), sudeste (229 casos/ano), nordeste (228 casos/ano), e, por fim, com menor incidência, a região sul, com 62 casos (BRASIL, 2018).

3.2 Aspectos gerais da LT

As principais espécies dermatóricas do parasito, encontradas no Brasil, são *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Além dessas, as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* são encontradas com menor frequência e limitadas à região amazônica (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; SILVEIRA et al., 2004; COSTA, S et al., 2007). A *L. braziliensis* é a principal espécie responsável pela doença no país (GRIMALD, TESH e McMAHON-PRATT, 1989; BRITO, 2008), reconhecidamente relacionada à baixa tendência de cura espontânea (AMATO et al., 1998b) e a um maior potencial de evolução para a forma mucosa.

A transmissão do protozoário *Leishmania* ocorre durante repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2017). No Brasil, as espécies *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* são de maior relevância na transmissão da *L. braziliensis*. As espécies *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca*, na transmissão da *L. amazonensis*. Já as espécies *Lu. umbratilis* e *Lu. anduzei*, na transmissão da *L. guyanensis* (BRASIL, 2017). O parasito possui um ciclo biológico heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos (vetores). Suas formas promastigotas infectantes, alongadas e com flagelos, são encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores e suas formas amastigotas, ovaladas e sem flagelo aparente, são encontradas no interior de células dos hospedeiros vertebrados. Após serem inoculados no hospedeiro, durante o repasto sanguíneo, os parasitos, na sua forma promastigota, são fagocitados por células do sistema monocítico fagocitário, onde se transformam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária. A célula infectada termina por romper-se, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos, amplificando a infecção. Durante o repasto sanguíneo, o vetor ingere células infectadas com amastigotas que se rompem ao chegarem no estômago do vetor e se diferenciam em promastigotas de *Leishmania* spp. (SCHLEIN et al. 1992; FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003). As promastigotas continuam se dividindo por divisão binária e migram para o intestino anterior ou posterior, dependendo da espécie do parasito. Após essa fase no

intestino, ocorre a migração através do estômago em direção à faringe do vetor. Durante essa migração ocorrem mudanças morfológicas e bioquímicas (metaciclogênese) e os parasitos se tornam infectantes, podendo ser inoculados em um hospedeiro, durante novo repasto sanguíneo.

Além da infecção humana, várias espécies de *Leishmania* têm sido encontradas parasitando animais domésticos (canídeos, felídeos e equídeos), silvestres e sinantrópicos (marsupiais, edentados, quirópteros e canídeos silvestres), mas não há um consenso sobre o principal reservatório no ciclo da LT. No caso dessa doença, não há recomendação de medidas de controle dirigidas aos animais silvestres e/ou domésticos. As medidas de controle são definidas de acordo com os aspectos epidemiológicos, sendo baseadas no diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos e controle químico entomológico quando há indicação (BRASIL, 2017).

Em relação ao espectro clínico, a LT pode acometer ambos os sexos em todas as faixas etárias. No Brasil, a doença tem incidência maior entre os indivíduos maiores de 10 anos e predomina no sexo masculino. As manifestações descritas variam desde lesões cutâneas localizadas (leishmaniose cutânea, LC), acima de 10 lesões (leishmaniose disseminada), a forma anérgica (leishmaniose difusa), além de apresentações com comprometimento em mucosas (leishmaniose mucocutânea simultânea, LMC ou leishmaniose mucosa tardia, LM) (WHO, 2010; OLIVEIRA, A.P. et al., 2013). A lesão típica de LC no Brasil caracteriza-se por úlcera ovalada ou arredondada com bordas infiltradas, única ou em pequeno número. Podem também ocorrer pápulas, nódulos ou placas (SILVEIRA, LAINSON E CORBETT, 2004; OLLIARIO et al., 2013; BRASIL, 2017). A forma disseminada é caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões na forma de pápulas, úlceras ou lesões acneiformes, que frequentemente cursa com acometimento mucoso simultâneo e pode estar associada à imunodeficiência celular (BARRAL et al., 1995). A leishmaniose difusa pode ser encontrada em pacientes infectados por *L. amazonensis*. Nesses pacientes são encontradas múltiplas lesões nodulares ou em forma de placas, raramente ulceradas, de difícil resposta ao tratamento devido à anergia imunológica (CASTELLUCCI et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2009). A forma mucocutânea é caracterizada pela presença de lesões cutâneas associadas ao comprometimento da

mucosa nasal ou orofaríngea. E, por fim, a LM propriamente dita, aquela com acometimento tardio, isolado, destrutivo e progressivo, principalmente da mucosa nasal, mas também orofaríngea, com pouca probabilidade de cura espontânea (AMATO et al., 1998b).

3.3 Leishmaniose mucosa

A LM é uma forma de comprometimento mucoso tardio que afeta entre 3 a 5% dos pacientes que tiveram leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, meses ou anos antes. Porém, cerca de 16% dos pacientes não relatam a ocorrência prévia de lesão cutânea compatível com LC (WEIGLE & SARAIVA, 1996, OLIVEIRA, A. P. et al., 2013). Alguns fatores, relacionados à doença cutânea primária, já foram associados com a ocorrência de lesão mucosa tardia, dentre eles a extensão, número, local, tratamento tardio, não realizado ou inadequado da lesão inicial de pele (GREVELINK e LERNER, 1996; CASTELLUCI et al., 2006; GOMES et al., 2014). Além desses, a associação entre idade avançada e baixo peso e a ocorrência de LM também tem sido aventada (JIRMANUS et al., 2012; OLIVEIRA, A.G. et al., 2013; CARVALHO, A. et al., 2015).

A evolução da LM inicia-se geralmente com infiltração no septo nasal e progride para lesões ulcerativas ou vegetantes capazes de levar à perfuração do septo nasal. Com a evolução da doença, pode haver progressão para a cavidade oral, faringe e laringe, sendo o acometimento de outras mucosas como conjuntiva ocular e região genital mais raramente descrito (AMATO et al., 1995; AMATO et al., 2007; LESSA et al., 2007; AMATO et al., 2008; TUON et al., 2008; LESSA, 2012; MORAES et al., 2012; COBO, 2016; BRASIL, 2017). As principais queixas são presença de crostas e obstrução nasal, epistaxe, podendo ocorrer disfagia, odinofagia, rouquidão, dispneia e tosse. Prurido nasal e dor são manifestações raras e estão associadas às infecções secundárias e sinusite (LESSA et al., 2007; BRASIL, 2017).

Ainda, existem outras apresentações clínicas de LT que também cursam com lesões mucosas, a saber, doença cutaneomucosa contígua, mucosa primária (presumida como o sítio da infecção por *Leishmania*) e aquelas com comprometimento mucoso não contíguo, mas simultâneo às lesões cutâneas, têm sido também denominadas

de LM. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil - MS (BRASIL, 2017), são as seguintes as formas clínicas da doença, de acordo com a fisiopatologia e evolução:

- a) mucosa concomitante: quando há lesão cutânea ativa e mucosa ao mesmo tempo, com distância entre elas;
- b) mucosa contígua: decorrente da invasão da lesão cutânea próxima às mucosas das vias aerodigestivas. A lesão no momento do diagnóstico pode apresentar-se ativa ou cicatrizada;
- c) mucosa de origem indeterminada: quando não é possível detectar lesões cutâneas prévias, por serem atípicas ou subclínicas, e não deixarem cicatrizes perceptíveis;
- d) mucosa primária: proveniente da picada do vetor na mucosa ou semi-mucosa de lábios e genitais;
- e) mucosa tardia: forma mais comum, lesão mucosa isolada e associada a um histórico prévio de LC.

Considerando que a extensão e intensidade da lesão podem influenciar os sintomas clínicos e a resposta terapêutica dos pacientes com LM (FRANKE et al., 1990; GUERREIRO et al., 2000), várias definições têm sido descritas para melhor categorizar a doença. Em 1997, Lhanos-Cuentas e colaboradores propuseram uma classificação baseada na combinação de localização das lesões e intensidade de sintomas, como segue:

- Leve: quando o acometimento é exclusivamente nasal;
- Moderada: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida e os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia são leves;
- Grave: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida e os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia são considerados intensos.

Em 2012, LESSA e colaboradores propuseram um novo sistema de cinco estágios clínicos da LM, baseados na intensidade do acometimento nasal observada no exame da mucosa e sintomatologia clínica:

- I- Presença de nodulação sem ulceração: pode ocorrer em pacientes assintomáticos ou com sintomas leves;
- II- Presença de ulcerações superficiais: lesões nodulares leves, normalmente em septo nasal anterior, concha nasal inferior e assoalho da fossa nasal, sintomas mais comuns são pequenos sangramentos, rinorreia e obstrução nasal;
- III- Presença de ulcerações profundas: reatividade tecidual mais intensa, granulações teciduais visíveis e infiltrados em mucosa, ocorre um espessamento do septo nasal, surgimento de crostas hemáticas no septo, concha inferior e assoalho da fossa nasal, os sintomas são sensação de dor em pirâmide nasal, rinorreia sanguinolenta, coágulo e obstrução nasal intensa. O surgimento desses focos de sangramento pode ser devido a fragilidade das lesões quando tocadas;
- IV- Perfuração do septo: necrose e perfuração em cartilagem no septo nasal anterior e infiltração no septo posterior, clinicamente, o paciente pode apresentar rinorreia sanguinolenta, coágulos e obstrução nasal;
- V- Destruição da arquitetura nasal e alteração da estrutura facial: destruição total da coluna nasal com ou sem o desabamento da estrutura nasal, paciente com rinorreia sanguinolenta, crostas hemáticas extensas, obstrução nasal e destruição nasal.

Segundo os autores, os estágios IV e V podem surgir tanto em doença ativa quanto inativa, ou seja, esses estágios podem ser vistos mesmo após o tratamento e resolução das lesões ativas.

Embora a imunopatogênese da LM não esteja totalmente elucidada, a relação com uma resposta inflamatória celular anti-Leishmania exacerbada tem sido descrita, com achados de aumento do número de células T CD4⁺, CD8⁺, Natural Killer (NK) e níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, principalmente, IFN- γ , TNF- α e IL-2 (CARVALHO et al., 1985; PIRMER et al., 1993; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002; AMATO et al., 2003; SILVEIRA, LAINSON e COBERTT, 2004; BERTHOLET et al, 2005; CASTELLUCI et al., 2006; TUON, 2008). Simultaneamente, observa-se uma diminuição da resposta à IL-10, TGF- β e queda da síntese de óxido nítrico, responsáveis pela modulação e inibição da ativação de macrófagos (BACELLAR et al., 2005; GOMES-SILVA et al., 2007; GOLLOB, VIANA

e DUTRA, 2014). Esta resposta imune pode ser a principal responsável pelas manifestações clínicas da doença e intensa destruição tecidual, apesar do controle da multiplicação ou mesmo eliminação do parasito (BRASIL, 2017).

Ainda não são bem conhecidos os fatores relacionados à evolução ou surgimento da LM. Entretanto, há evidências de associação com resistência do parasito ao antimônio pentavalente, estresse do sistema imune e fatores genéticos do hospedeiro. Algumas condições relacionadas à imunossupressão, tais como infecção por HIV, uso de corticosteroides e outros imunossupressores, já foram também relacionados ao risco do acometimento mucoso (ALIAGA et al., 2003; MOTTA et al., 2003; TUON et al., 2008; FAUCHER et al., 2011; GUERRA et al., 2011; COCUZZA et al., 2013). Há relatos ainda da relação entre a presença de alguns alelos, associados à produção de TNF- α , TNF- β , IL-6, CXCR1 e CXCR2/MCP1, com a evolução para a forma mucosa da leishmaniose tegumentar (RONET et al., 2011).

Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado o papel dos Leishmania RNA Virus (LRVs) na patogênese da doença, sendo um dos mecanismos sugeridos na indução da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Denominado LR1, esse foi o primeiro vírus encontrado em formas promastigotas de *L. guyanensis* em fragmento de tecido de paciente com LC e, posteriormente, identificado em *L. braziliensis* (SALINAS et al., 1996). Cantanhêde e colaboradores (2015) demonstraram correlação do LRV também com a intensidade da LT, além de um aumento de 2,9 vezes do risco relativo de acometimento mucoso. Ressalta-se, porém, que esse achado foi limitado à região amazônica, sendo a associação com a intensidade da doença ainda não corroborada por outros estudos (IVES et al., 2011; HARTLEY et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; CANTANHÊDE et al., 2015).

Em relação à resposta imune humoral, alguns poucos estudos têm demonstrado presença de classes de anticorpos específicos anti-Leishmania, principalmente IgG e IgA, circulantes em pacientes com LM (GUIMARÃES et al., 1989; DELGADO et al., 1996; BRITO et al., 2001; PEDRAS et al., 2003; TORRES-GUERRERO et al., 2017), com variação no índice de avidéz dos mesmos (SOUZA, M. et al., 2005). Mesmo com esses achados, o papel desses anticorpos não está bem elucidado (TRUJILLO

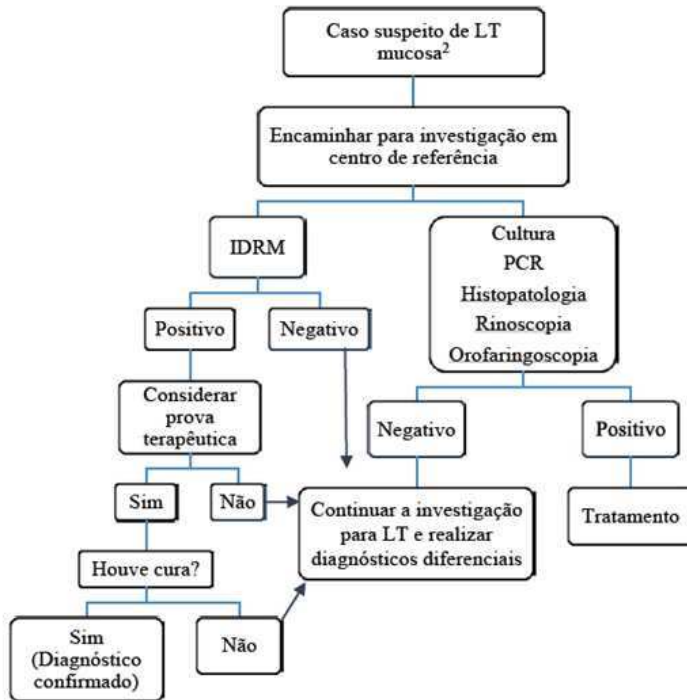
et al., 1999), o que justifica o entendimento ainda vigente de que a resposta imune celular seria preponderante na fisiopatologia da LM (LIEW e O'DONNELL, 1993).

3.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico de LM permanece um desafio. Embora se admita que o diagnóstico por critérios clínico-epidemiológicos seja possível (VRIES et al., 2015; BRASIL, 2017), a ampla gama de patologias, com quadros semelhantes, torna a confirmação laboratorial da infecção mandatória em locais com disponibilidade de recursos propedêuticos. As principais condições com manifestações mucosas similares são paracoccidiodomicose, hanseníase Virchoviana, sífilis terciária, carcinoma epidermóide e basocelular, linfomas, rinoftima, rinosporidiose, entomoforomicose, granulomatose de Wegner, sinusite, sarcoidose, rinite alérgica, perfuração traumática do septo nasal ou por uso de drogas (MARSDEN, 1986; WHO, 2010; BRASIL, 2017). São poucos os estudos abordando especificamente o diagnóstico laboratorial de LM, seja com métodos parasitológico, imunológico ou molecular e, os disponíveis descrevem desempenhos conflitantes para os testes e se baseiam em número limitado de pacientes. Um agravante desta insuficiência de informações é a ausência de um teste reconhecido como o padrão-ouro para o diagnóstico da doença (GOMES et al., 2014; BRASIL, 2017).

No Brasil, o MS apresenta em seu Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar, publicado em 2017, o seguinte fluxograma para o diagnóstico da LM:

Fluxograma 1 – Diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar



Fonte: Manual de vigilância para leishmaniose tegumentar, 2017.

Consta nesse fluxograma a recomendação da utilização da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) como exame complementar, porém a interrupção da produção do antígeno de Montenegro ocorreu dois anos antes da publicação desse manual. Como exames confirmatórios temos a cultura, PCR, histopatologia, rinoscopia e orofaringoscopia. Devido à escassez de parasitos provocada pela resposta inflamatória exacerbada, a cultura tem baixa sensibilidade no diagnóstico da LM. A reação em cadeia da polimerase (PCR), apesar de ser uma técnica sensível e

específica, é limitada aos centros de referências e, até o momento, não há uma padronização amplamente aceita para a técnica. Embora o exame histopatológico possa contribuir com o diagnóstico da LM, o mesmo somente pode ser considerado confirmatório quando formas compatíveis com amastigotas são encontradas no material examinado. Caso contrário, o resultado deve ser tomado como diagnóstico sugestivo.

Além dessas técnicas, a Organização Mundial da Saúde recomenda também o uso da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático de ELISA para o diagnóstico laboratorial da forma mucosa, mas não apresenta informações sobre o desempenho das mesmas (WHO, 2010). Essas técnicas também já foram recomendadas na versão anterior do manual brasileiro para tratamento da leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2010), mas por falta de evidências de acurácia, foram retiradas da versão revisada e publicada em 2017 (BRASIL, 2017).

Método Parasitológico

O método parasitológico baseia-se no achado do parasito por meios diretos ou indiretos. No caso da leishmaniose mucosa, a pesquisa direta da forma amastigota do parasito pode ser tentada em impressos ("imprint") de fragmentos de tecido biopsiado, que depois são corados com Giemsa, porém com sensibilidade inferior à 30% (CUBA et al., 1984; MARSDEN, 1986). A forma indireta de detecção do parasito pode ser realizada a partir do crescimento da forma promastigota do parasito em meio de cultivo Novy-MacNeal-Nicolle e Liver Infusion Tryptose (NNN-LIT), ou a partir de macerado de fragmento ou aspirado de lesão inoculados em animais, mas permanece com sensibilidade baixa e variável na LM, aproximadamente de 45% (CUBA et al., 1984; MARSDEN, 1994; PEARSON e SOUZA, 1996; GOTO e LINDOSO, 2010). Os principais limitantes do diagnóstico parasitológico da LM são a escassez de parasitos na lesão, o que acredita ser causado pela reação inflamatória exacerbada do hospedeiro. Além disto, a pesquisa do parasito exige a realização de biópsia para obtenção de material a ser examinado, técnica invasiva que requer profissionais especializados (REIS et al., 2008; BOGGILD et al., 2010).

Método Histopatológico

O exame histopatológico pode ser utilizado na pesquisa direta de formas amastigotas, utilizando-se a própria coloração com hematoxilina e eosina (H&E). O padrão inflamatório sugestivo de infecção por *Leishmania* spp. inclui reação granulomatosa com grande quantidade de linfócitos, neutrófilos e plasmócitos (MAGALHÃES et al., 1986; BITTENCOURT e BARRAL, 1991; SILVEIRA, LAINSON e COBERTT, 2004; LESSA, 2007; MOTTA, 2007). A primeira classificação histológica das formas da LT foi proposta por Azulay (1960), que preconizou uma categorização da doença baseada no padrão inflamatório tecidual, sendo a fase inicial uma inflamação exsudativa aguda até se tornar um granuloma tuberculóide em sua fase tardia.

Em 1980, Ridley e colaboradores apresentaram a classificação histológica baseados em amostras de pacientes com LC e LM, dividida em cinco grupos:

- Grupo I: derme quase normal, exceto pela presença das manchas de degeneração de colágeno;
- Grupo II: processo necrotizante mais grave que no grupo I;
- Grupo III: infiltrado inflamatório acentuado sem necrose ou granuloma;
- Grupo IV e V: associados às células epitelíoides e gigantes.

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

- I- Reação exsudativa celular – Infiltrado histioplasmocitário com proporções celulares que tendem para a equivalência;
- II- Reação exsudativa e necrótica – Necrose tissular de amplitude e forma variáveis, associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;
- III- Reação exsudativa e necrótico-granulomatosa – Reação granulomatosa desorganizada nas proximidades de área de necrose tissular, com vasculite aguda menos frequente, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;

- IV- Reação exsudativa e granulomatosa – Reação granulomatosa desorganizada isolada no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;
- V- Reação exsudativa e tuberculóide – Reação granulomatosa epitelióide organizada em tubérculos no centro do infiltrado histiolinfoplasmocitário.

A partir das classificações de Ridley (1980) e Magalhães (1986), Bittencourt e Barral (1991) simplificaram as classificações histológicas em três padrões:

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

O exame histopatológico exibe sensibilidade baixa para o diagnóstico definitivo da LM (SINGH e SIVAKUMAR, 2003; BOGGILD et al., 2011). Neste contexto, a histopatologia pode ser complementada com a técnica imuno-histoquímica, ferramenta que usa anticorpos monoclonais específicos contra *Leishmania* spp., capazes de detectar antígenos do parasito no material examinado, por meio da reação antígeno-anticorpo (SOTO et al., 1989; ALVES et al., 2013; GOMES et al., 2014; MARQUES et al., 2016). A maioria dos estudos encontrados aborda o desempenho da técnica em amostras de pacientes com lesão cutânea localizada, sem discriminar seu desempenho entre pacientes com as diferentes formas de LT. Os poucos estudos que incluíram amostras de pacientes com LM foram feitos com pequeno número de participantes. Amato e colaboradores (1998) realizaram a técnica de imuno-histoquímica em 16 amostras de pacientes com LM, dos quais, 12 foram positivas (70,5%). Já Marques e colaboradores (2017) demonstraram que seu protocolo de imuno-histoquímica foi capaz de detectar sete em um total de 11 amostras mucosas provenientes de pacientes com LM (63,6%).

Métodos imunológicos

Entre os métodos imunológicos, usados para diagnóstico das leishmanioses, incluem-se a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e testes sorológicos. A IDRM é um teste de hipersensibilidade tardia, produzida em resposta à inoculação de antígeno total de *Leishmania* spp. na derme do antebraço. O teste é de fácil aplicação e a leitura é realizada após 48 ou 72 horas, considerando positiva quando há endurecimento igual ou superior a cinco milímetros (MONTENEGRO, 1926). O teste pode se apresentar negativo em pacientes com lesões recentes e em pacientes imunossuprimidos. Resultados falso-positivos são observados em indivíduos residentes em áreas endêmicas para LT, pacientes com outras infecções parasitárias, como doença de Chagas e pacientes tratados a mais de um ano (SHAW & LAINSON, 1975; REED, 1996; SASSI et al., 1999; GONTIJO & CARVALHO, 2003; GOMES et al., 2014; SKRABA et al., 2015). Devido à resposta imunológica exacerbada na LM, a IDRM apresenta-se fortemente positiva, com endurecimentos superiores aos de pacientes com LC (BACELLAR et al., 2002; BRASIL, 2017). De acordo com algumas séries de pacientes, o teste pode atingir até 100% de sensibilidade (SHAW & LAINSON, 1975; OLIVEIRA, J. et al., 2005).

Os testes sorológicos, inicialmente foram desenvolvidos para o diagnóstico da LV e utilizam, como antígeno, extrato bruto, purificado ou recombinante para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. A premissa de que no paciente com LM ocorra produção moderada de anticorpos anti-*Leishmania*, em comparação à LC, (DELGADO et al., 1996; BRITO et al., 2001; PEDRAS et al., 2003; SOUZA et al., 2013) justifica a hipótese de que testes sorológicos podem ser usados no diagnóstico complementar da doença. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação direta (DAT) e o ensaio imunoenzimático de ELISA já foram avaliados para o diagnóstico da LT (AHMED, CHOWDHURY e BHUYAN, 2009). No diagnóstico da LM, estudos têm considerado a RIFI e ELISA como testes de boa sensibilidade, porém, como é de se esperar em testes sorológicos, podem apresentar baixa especificidade, reação cruzada com outras doenças, principalmente com doença de Chagas e baixa correlação com aspectos clínicos (ROMERO et al., 1998; BRITO et al., 2000; SOUZA et al., 2013; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Entretanto, os estudos que avaliam a aplicabilidade desses testes para o diagnóstico da LM ainda são muito limitados.

A RIFI caracteriza-se pela interação antígeno/anticorpo, visualizada pela adição de conjugado anti-IgG ou anti-IgM humanas ligado à um fluoróforo, destacando-se a fluoresceína como mais usada (DUXBURY e SADUN, 1964). Os resultados são observados em microscópio de fluorescência, sendo consideradas positivas as amostras que apresentarem fluorescência. É, portanto, uma técnica que exige infraestrutura laboratorial mais sofisticada e profissionais capacitados. Apesar dessas limitações, a RIFI tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV como teste confirmatório no Brasil. Um kit de RIFI é produzido por Bio-Manguinhos, unidade produtora de imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), utilizando como antígeno promastigotas de *Leishmania major*-like. O kit é repassado para o Ministério da Saúde, que o disponibiliza para os Laboratórios Centrais e Laboratórios de Referência do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB). Além disso, uma grande preocupação é o baixo desempenho da RIFI para o diagnóstico da LV e reações cruzadas com outras doenças, principalmente doença de Chagas. Nos estudos realizados no Brasil, nos quais foram usados o kit produzido por Bio-Manguinhos para o diagnóstico da LV, a sensibilidade variou de 88 a 92% e especificidade de 80 a 83,3% (PEDRAS et al., 2008; MACHADO DE ASSIS et al., 2008, 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012).

Já em relação ao diagnóstico da LM, desempenho muito variável tem sido descrito na RIFI, com sensibilidade de 38,6% até 100% (GUIMARÃES et al., 1991; PEDRAS et al., 2003; BARROSO-FREITAS et al., 2009; GUERRA et al., 2009). Essa variação pode estar relacionada à espécie do parasito utilizada como antígeno e/ou protocolo. Barroso-Freitas e colaboradores (2009) avaliaram o desempenho da técnica no diagnóstico de 94 pacientes com LT, utilizando diferentes antígenos. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas quando utilizaram a *L. braziliensis* e *L. major*-like, além do kit de Bio-Manguinhos, produzido também com *L. major*-like. Ao analisarem separadamente 20 amostras de pacientes com acometimento mucoso (LM e LMC), foram encontradas taxas de sensibilidade de 76,9%, 92,3% e 53,8% com *L. braziliensis*, *L. major*-like e kit Bio-Manguinhos, respectivamente. O que chama atenção nesses estudos é a existência de diferenças significativas no

desempenho entre os testes, ainda que o kit Bio-Manguinhos utilize o mesmo antígeno de uma das outras preparações testadas.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os antígenos, alguns estudos demonstraram um melhor desempenho da RIFI com a utilização da *L. braziliensis* como Guimarães e colaboradores (1991) que avaliaram o desempenho da RIFI com *L. braziliensis* e *L. major-like* em 78 amostras de LM, no qual encontraram sensibilidade de 48,7% e 44,9%, respectivamente. Pedras e colaboradores (2003) obtiveram 100% de sensibilidade utilizando *L. braziliensis* em comparação ao antígeno de *L. amazonensis*, em uma amostragem de 19 pacientes com LM.

O ensaio imunoenzimático de ELISA vem sendo utilizado no diagnóstico de várias doenças infecciosas e parasitárias, como a LV, por ser de fácil execução, de custo baixo e não exige infraestrutura laboratorial sofisticada (DOURADO, 2007; SOUZA et al., 2013). O ensaio se baseia na detecção da reação antígeno/anticorpo por meio de um conjugado ligado a uma enzima, que é evidenciada após acréscimo de solução cromógena. As preparações antigênicas usadas no ensaio de ELISA são diversas. No diagnóstico da LV, o antígeno bruto solúvel de *Leishmania* spp. é o mais utilizado, apresentando boa sensibilidade, mas baixa especificidade em razão de reações cruzadas, que ocorrem principalmente em amostras de soro de pacientes com doença de Chagas (CATALDO et al., 2010; SOUZA et al., 2013). No diagnóstico da LV, sensibilidades variam de 80 a 100% e especificidade de 71 a 98,3% utilizando extrato bruto (GARCEZ et al., 1996; BRAZ et al., 2002; CARVALHO, S. et al., 2003; MIKAEILI et al., 2007; ; KILIÇ et al., 2008; MACHADO DE ASSIS et al., 2008; PEDRAS et al., 2008; MOHAPATRA et al., 2009; FUKUTANI et al., 2014).

Alternativamente, preparações antigênicas contendo antígenos purificados e antígenos recombinantes de *Leishmania* spp. têm apresentado melhor especificidade (KUBAR & FRAGAKI, 2005). Foi observada elevação no desempenho do ensaio de ELISA com o uso do antígeno K39 recombinante (rK39) para o diagnóstico da LV (BURNS et al., 1993; BADARÓ et al., 1996; BRAZ et al., 2002; MAALEJ et al., 2003; KURKJIAN et al., 2005; MACHADO DE ASSIS et al., 2008, 2012; PEDRAS ET AL., 2008; MOHAPATRA et al., 2009; ABASS et al., 2013, 2015). Outros antígenos

recombinantes estão sendo avaliados e têm apresentado alto desempenho para o diagnóstico da LV. Entretanto, são poucos antígenos recombinantes descritos para o diagnóstico da LT (MONTROYA et al., 1997; BRAZ et al., 2002; BOARINO et al., 2005; SOUZA et al., 2013; DUARTE et al., 2015; COELHO et al., 2016; SATO et al., 2017).

No Brasil, os kits de ELISA registrados na ANVISA são produzidos com antígenos de *L. infantum*. Os testes *Leishmania* ELISA IgG+IgM e Ridascreen® *Leishmania* Ab foram avaliados pela primeira vez para o diagnóstico da LV no país, apresentando sensibilidade de 80% e 96,2% e especificidade de 93,7% e 75,9%, respectivamente (FREIRE, 2017). Em contraste, não foram encontrados, na literatura científica ou entre os produtos registrados na ANVISA, kits comerciais de ELISA para o diagnóstico da LM.

Nos poucos estudos disponíveis, ensaios de ELISA “in house” com desempenhos variados estão descritos (GOTO e LINDOSO, 2010). Guimarães, Celeste e Franco (1990) avaliaram o desempenho do ELISA produzido a partir de promastigotas de *L. major*-like em 341 amostra de soro, das quais 30 eram de LM. Nessas amostras, o teste apresentou 93,3% de sensibilidade e 84,4% de especificidade. Barroso-Freitas e colaboradores (2009) avaliaram, pelo ensaio de ELISA, o desempenho dos antígenos de *L. braziliensis* e *L. major*-like em amostras provenientes de pacientes portadores de LT. Quando analisaram separadamente o desempenho nas amostras de pacientes com LM e LMC (n=20), a positividade do ELISA, usando como antígeno *L. braziliensis*, foi de 100%, enquanto que com *L. major*-like de 75%. Em contraste, Pedras e colaboradores (2003) não encontraram diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, em 19 amostras de pacientes com LM.

Outro teste sorológico bastante utilizado no diagnóstico da LV é o DAT, que se baseia na interação do anticorpo presente no soro do paciente com o antígeno composto por promastigotas de *Leishmania* spp. tratados, fixados e corados, resultando em aglutinação quando positivo (ALLAIN e KAGAN, 1975; EL HARITH et al., 1986; MEREDITH et al., 1995). É um teste simples de ser realizado, de baixo custo e querer infraestrutura laboratorial simples. Na LV, seu uso é altamente incentivado pela OMS (WHO, 2010) e tem sido utilizado em áreas endêmicas,

principalmente no Sudão (CHAPPUIS et al., 2003; ABDALLAH et al., 2004). O DAT tem sido produzido por duas empresas europeias, e tem apresentado desempenho satisfatório, com sensibilidade e especificidade superiores a 95% dependendo do estudo (ADAMS et al., 2012; HASNAIN et al., 2014). Já no Brasil, um protótipo de kit do DAT (DAT-LPC), usando promastigotas de *L. infantum*, foi produzido por Oliveira e colaboradores (2013) após modificações e aperfeiçoamento na preparação do antígeno. Entre essas melhorias, foi possível diminuir o tempo de leitura de 18 para 4 horas e substituir o diluente de amostras, antes tóxico, por outro atóxico e inodoro, mantendo o alto desempenho com sensibilidade e especificidade, superiores a 96%, em todos os estudos realizados (OLIVEIRA, et al., 2011; 2013; 2017).

O DAT produzido com antígeno liofilizado de *L. aethiopica* foi avaliado no diagnóstico de pacientes com lesões cutâneas na Etiópia, exibindo sensibilidade de 90,5% e especificidade de 91,8%. Este bom desempenho pode estar relacionado ao fato do antígeno ter sido produzido com parasitos da mesma espécie de *Leishmania* infectante dos pacientes. A possibilidade de se tratar de uma resposta espécie-específica é reforçada pela observação de queda significativa na sensibilidade em testagens baseadas em relação antígeno-doença com espécies não-homólogas (HAILU, 2002). Nenhum estudo avaliando o desempenho do DAT para o diagnóstico da LM foi identificado em revisão da literatura.

O teste imunocromatográfico baseia-se em uma reação antígeno/anticorpo em suporte de papel de nitrocelulose. O teste é de simples realização e interpretação (SUNDAR, 1998), não necessita de infraestrutura laboratorial ou profissional especializado, pode ser feito usando sangue capilar ou soro, pode ser estocado em temperaturas de até 30°C e fornece resultado rápido (até 30 minutos), sendo considerado adequado para uso em serviços de saúde periféricos (WHO, 2010). O desempenho do teste rápido varia de acordo com o antígeno, plataforma, fabricante, do conjunto de amostras e do país em que cada estudo foi realizado (DOURADO, 2007). Esse teste tem sido produzido com diferentes antígenos recombinantes. O rK39, antígeno recombinante comumente utilizado, apresenta elevado desempenho e é usado nos testes imunocromatográficos mais utilizados no diagnóstico da LV, Kalazar Detect™ e IT-LEISH®. Estudos com Kalazar Detect™ demonstraram que a sensibilidade e especificidade variaram de 69,2 a 100% e 70 a 100%,

respectivamente, de acordo com o local em que o estudo foi conduzido (CARVALHO et al. 2003; CUNNINGHAM et al., 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012; KUMAR et al., 2013; BEZUNEH et al., 2014). Já para o IT-LEISH[®], sensibilidade entre 88 e 100% e especificidade 80 e 100%, foram encontradas (MARTY et al., 2007; BOELAERT et al., 2008; MACHADO DE ASSIS ET AL., 2008, 2011, 2012; AMATO ET AL., 2009; ABASS et al., 2011, 2015; CANAVATE et al., 2011; CUNNINGHAM et al., 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012; KUMAR et al., 2013; MBUI et al., 2013; BEZUNEH et al., 2014).

São encontradas poucas informações sobre testes imunocromatográficos para o diagnóstico da LT. A empresa norte-americana InBiosInternational Inc. registrou na ANVISA um teste imunocromatográfico para LT denominado CL Detect™ Rapid Test, que possui como princípio a detecção de antígenos de amastigotas em amostras de pele. Segundo o manual do fabricante, em um estudo realizado na Tunísia, esse teste apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 90,9%. Entretanto, não há informações sobre as características das amostras.

Método Molecular

O método molecular caracteriza-se pela amplificação e detecção de sequências específicas de DNA do parasito. As técnicas moleculares são consideradas promissoras no diagnóstico das leishmanioses, por apresentarem desempenho superior aos demais testes. Apesar de existirem várias técnicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais amplamente utilizada por apresentar alto desempenho para as formas de LT. A PCR é capaz de detectar DNA do parasito, mesmo que a carga seja pequena, por isso apresenta elevada sensibilidade diagnóstica (REITHINGER et al. 2007; BRASIL, 2017). Possibilidade de utilização de diferentes materiais biológicos, rapidez na obtenção do resultado e o uso de diferentes alvos, são outras vantagens observadas. É amplamente utilizada no âmbito da pesquisa, não sendo muito utilizada no diagnóstico de rotina, devido à necessidade de uma infraestrutura sofisticada (BRASIL, 2017; SOUZA et al., 2013).

Em uma revisão sistemática, a PCR apresentou sensibilidade e especificidade superiores a 93% para o diagnóstico da LV, dependendo do material utilizado, como

aspirado de medula óssea (De RUITER et al., 2014). Gomes e colaboradores (2015) reportaram sensibilidade variando de 35% a 100% e especificidade de 84,2-100%, quando utilizaram a PCR para o diagnóstico da LM. Oliveira e colaboradores (2005) obtiveram 97,1% de positividade quando usou a técnica de PCR em 35 amostras de pacientes com LM. Já Fagundes e colaboradores (2010) reportaram positividade da PCR próxima (93,3%) quando a técnica foi aplicada para o diagnóstico da LM, em apenas 15 pacientes.

Alternativas para o aprimoramento da técnica têm sido propostas, como por exemplo, a utilização da PCR em tempo real (qPCR) para minimizar o risco de contaminação e o uso de outros alvos além do comumente utilizado, kDNA (ULIANA et al., 1991, 1994; CASTILHO et al., 2003; FRAGA et al., 2010). Além disso, coleta de material menos invasiva, como swab, tem apresentado bom desempenho. Boni e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia dessa técnica não invasiva (swab), juntamente com a PCR com os alvos kDNA e HSP70, além da qPCR em 27 amostras de pacientes com LT. Desses pacientes, 14 possuíam LM, e as taxas de positividade da PCR-kDNA, PCR-HSP70 e qPCR nesse grupo foram de 93,3%, 26,6% e 26,7%, respectivamente.

Além disso, não existem kits de diagnóstico molecular registrados no Brasil e o uso das técnicas moleculares para diagnóstico, isolamento e caracterização das espécies está restrito aos centros de referência e pesquisa.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica de base amostral.

4.2 População de estudo

Pacientes com suspeita de LM avaliados em serviço de referência para tratamento de leishmaniose em Minas Gerais, entre os anos de 2009 e 2016.

4.2.1 Local do estudo e rotina de avaliação de casos suspeitos de LM

O ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou (CRL-IRR), configura-se como uma unidade assistencial ambulatorial em Belo Horizonte, Minas Gerais, integrada ao SUS e credenciado pelo Ministério da Saúde como referência técnica nacional em leishmaniose. Anualmente são realizadas cerca de 900 consultas e entre 90-120 pacientes são diagnosticados com LT, dos quais 8-15% apresentam a forma mucosa. De acordo com a rotina de investigação de LM no CRL-IRR, pacientes com suspeita de acometimento mucoso são submetidos à avaliação otorrinolaringológica e biópsia de fragmento de mucosa para análise histológica, realização de PCR para *Leishmania* spp. e cultura para fungo. O exame otorrinolaringológico é realizado no Hospital São Geraldo, unidade do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, através de acordo de colaboração entre as instituições. Exame direto e cultura para *Leishmania* spp. não são realizados rotineiramente pela baixa sensibilidade destes exames. Até janeiro de 2016, nos casos suspeitos de LT era realizado o teste de IDRM, cuja execução foi suspensa em fevereiro de 2016 por indisponibilidade do antígeno, que teve sua produção interrompida. Seguindo recomendação do Ministério da Saúde, vigente até abril de 2017, nos casos suspeitos de LM era ainda coletado sangue para realização da RIFI.

4.2.2 Seleção dos casos e controles

Todas as notificações ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) realizadas no CRL-IRR, a partir da implantação de planilha eletrônica com registro dos pacientes atendidos no serviço, de janeiro de 2009 até dezembro de 2016 foram pesquisadas para identificação dos casos notificados como LM (grupo LM). Para identificação de pacientes do grupo controle, recorreu-se à planilha de registro de pacientes que tiveram amostra de soro coletada e armazenada no congelador -80°C do grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou (PCPP) no mesmo período (2009-2016), rotina do serviço para casos suspeitos de LM. Através do cruzamento das informações contidas nas planilhas de casos notificados e casos investigados, identificou-se os pacientes em quem o diagnóstico de LM não foi confirmado (grupo controle). Para a consolidação dos grupos e obtenção de informações clínicas, todos os pacientes identificados nas planilhas tiveram seus prontuários revisados para confirmação de sua condição (caso LM ou controle) e coleta de outras variáveis de interesse. Baseado nos critérios preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) para o diagnóstico de LM, foram definidos dois grupos:

Grupo LM:

Pacientes residentes ou expostos à área de transmissão de leishmaniose com lesão inflamatória em mucosa, associada a um dos seguintes critérios:

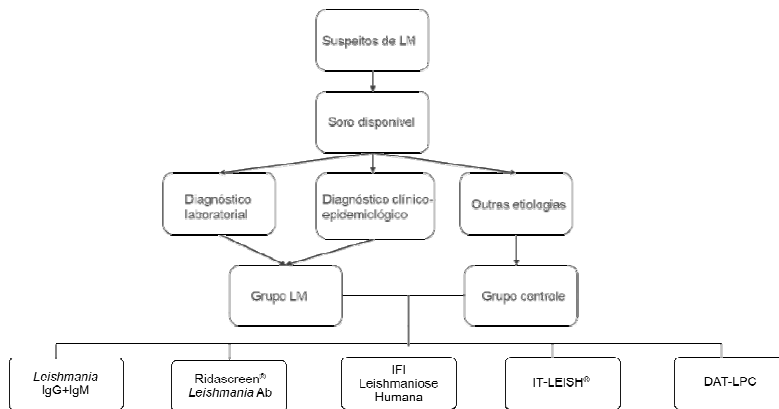
- a. Exame direto, cultura ou PCR positivo ou exame histopatológico com visualização de amastigota de *Leishmania* spp. (diagnóstico confirmado laboratorialmente);
- b. Intradermoreação de Montenegro positiva e/ou exame histopatológico com padrão inflamatório compatível com LM associados à melhora clínica após terapia anti-*Leishmania* (diagnóstico clínico-epidemiológico).

Grupo controle

Pacientes residentes ou expostos à área de transmissão de leishmaniose, com lesão inflamatória em mucosa e diagnóstico confirmado de outra etiologia, que não leishmaniose mucosa.

O fluxograma abaixo apresenta como as amostras foram selecionadas e classificadas em dois grupos de pacientes (casos LM e controle).

Fluxograma 2 – Obtenção das amostras e realização dos testes.



Fonte: elaborado pelo autor.

Trata-se, portanto, de uma amostra de conveniência, limitada pelo reduzido número de casos da doença. Em relação ao poder estatístico desta amostra, pode-se afirmar que este tamanho amostral é capaz de identificar, com uma taxa de acerto de 80%, uma diferença de 25% ou mais entre dois testes sorológicos.

4.3 Caracterização clínica da população estudada

As principais características dos pacientes incluídos nos grupos LM e Controle foram obtidas por revisão dos prontuários médicos realizada por dois investigadores. A partir de um formulário padronizado foram coletadas as seguintes variáveis de interesse: sexo, idade, presença de comorbidade, local de residência, tipo de caso (novo ou recidiva), exames diagnósticos realizados e classificação de LM, de acordo com a definição proposta por Llanos-Cuentas e colaboradores (1997), descrito anteriormente.

4.4 Aspectos éticos

Esse estudo seguiu as recomendações da Resolução 466 de 2012 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou/ FIOCRUZ Minas (Parecer: 1.952.499), CAAE: 61269816.2.0000.5091).

4.5 Testes sorológicos

A seleção dos testes sorológicos a serem avaliados baseou-se em pesquisa na base de registros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em setembro de 2016, quando foram identificados seis produtos diagnósticos com registro ativo, produzidos e disponíveis comercialmente para o diagnóstico sorológico da LV, a saber: dois kits da reação de imunofluorescência indireta (IFI Leishmaniose Humana – BioManguinhos da Fundação Oswaldo Cruz e Leishmania IFA IgG da Vircell S.L.), três testes baseados em ensaio imunoenzimático de ELISA (Leishmania ELISA IgG+IgM da Vircell S.L.; NovaLisa™ Leishmania infantum IgG da Novatec Immunodiagnostica GMBH e Ridascreen® Leishmania Ab da R-Biopharm AG) e um teste imunocromatográfico (IT-LEISH® da BIO-RAD Laboratories, Inc.). Além destes, optou-se por avaliar também o teste de aglutinação direta (DAT-LPC), modificado por pesquisadores do nosso grupo PCPP/IRR. Dos sete produtos identificados, cinco puderam ser avaliados: IT-LEISH® e a RIFI de BioManguinhos foram doados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED); DAT-LPC foi produzido pelo PCPP/IRR e os kits de ELISA (da Vircell S.L. e R-Biopharm) foram comprados por meio dos distribuidores nacionais. A aquisição dos demais kits não foi possível. Os testes

foram realizados em paralelo, de forma cega em relação ao diagnóstico do paciente, segundo metodologia STARD (BOSSUYT et al., 2015). Para os testes com resultado numérico contínuo, além do critério sugerido pelo fabricante para a definição da positividade para LV, outros pontos de corte foram explorados através da plotagem em gráfico da sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) versus taxa de falsos positivos, para identificação do limiar que representaram a melhor relação entre sensibilidade e especificidade do teste para o diagnóstico de LM.

Ressalta-se que, por se tratarem de testes já comercializados no Brasil, nenhum acordo para acompanhamento da execução dos testes ou apresentação dos resultados pré-publicação foi estabelecido com os fabricantes dos kits testados nesse estudo. Portanto, os resultados não produzirão conflitos de interesse entre os fabricantes dos testes e os pesquisadores envolvidos nesse estudo.

4.5.1 Ensaio imunoenzimático de ELISA

4.5.1.1 Leishmania ELISA IgG+IgM (Vircell S.L, Granada, ESP)

O kit é composto por uma microplaca de 96 orifícios sensibilizados com antígeno de *L. infantum*, diluente de amostra, soro "limite", controles positivo e negativo, conjugado anti-IgG+IgM humano-peroxidase, solução cromógena (Tetrametilbenzidina+ Peróxido de Hidrogênio), reagente bloqueador (ácido sulfúrico 0,5M) e tampão fosfato contendo Tween 20 (concentrado 20 vezes). Antes de iniciar, o tampão fosfato contendo Tween 20 foi diluído 1:20 com água tipo I. Em seguida, foram depositados 100µL do diluente de amostra, em cada orifício da microplaca, e adicionados 5µL das amostras de soro, controle positivo, controle negativo e soro "limite" (em duplicata). A microplaca foi tampada com folha adesiva, agitada por 2 minutos e incubada por 45 minutos, em câmara úmida a 37°C. Os orifícios da microplaca foram lavados cinco vezes com 300µL de solução de lavagem, usando lavadora de microplacas (Asys Atlantis, Cambridge, GRB) e foram adicionados 100µL do conjugado anti-IgG+IgM humano-peroxidase, incubando-se por 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após novas lavagens, foram adicionados 100µL/orifício de solução cromógena, incubando-se a microplaca por 20 minutos, em temperatura ambiente, protegida da luz. A reação enzimática foi interrompida com a

adição de 50µL de reagente bloqueador em todos os orifícios da microplaca. Imediatamente após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 450/620nm, usando um leitor de microplacas (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Device, San Jose, CA, USA). O ensaio foi considerado válido quando a leitura de absorbância dos controles positivo e negativo e do soro “limite” se apresentaram dentro dos intervalos pré-determinados pelo fabricante: positivo maior que 0,9; negativo, inferior que 0,5; e soro “limite” entre 0,55 e 1,5.

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

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

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

4.5.1.2 RIDASCREEN® Leishmania Ab. (R-BIOPHARM AG, Darmstadt, GER)

O kit possui uma microplaca de 96 orifícios sensibilizados com antígenos de *L. infantum*, tampão de amostra, tampão de lavagem (concentrado 10 vezes), controles positivo e negativo, conjugado anti-IgG humano-peroxidase, solução cromógena (Tetrametilbenzidina+Peróxido de Hidrogênio) e reagente bloqueador (ácido sulfúrico 1N).

Inicialmente, a solução de lavagem foi diluída 1:10 em água tipo I e as amostras de soro foram diluídas a 1:50 em tampão de amostra. Logo após esta etapa, 100µL das amostras diluídas foram dispensados nos orifícios da microplaca, assim como os controles positivo e negativo, que são fornecidos prontos para uso (ambos em duplicata) e a microplaca foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, cada orifício foi lavado por cinco vezes com 300µL de tampão de lavagem, usando uma lavadora de microplaca (Asys Atlantis). Posteriormente, 100µL de conjugado proteína A-peroxidase foram adicionados em cada orifício, incubando-

se novamente. Seguida de novas lavagens, foram adicionados 100µL de solução cromógena, incubando-se por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida com adição de 50µL de reagente bloqueador em todos os orifícios da microplaca. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 450/620nm (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader).

O controle de qualidade dos reagentes foi considerado válido quando as médias de absorbância do controle negativo mantiveram-se menores de 0,3 e com ausência de desvio maior do que 25% em suas duplicatas, e controle positivo maiores de 0,8. Quando esses parâmetros não foram produzidos, a reação foi repetida.

O índice das amostras foi calculado seguindo as seguintes equações:

1. Média de absorbância do controle negativo em duplicata adicionada a 0,150:

$$\text{Cut - off} = \frac{\text{Controle negativo 1} + \text{controle negativo 2}}{2} + 0,150$$

2. Divisão do valor da amostra pelo cut-off:

$$\text{Índice de amostras} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Cut - off}}$$

Seguindo critérios do fabricante, amostras que apresentaram índices menores que 0,9 foram consideradas negativas, entre 0,9-1,1 foram consideradas como duvidosas e acima de 1,1, positivas.

4.5.2 Reação de imunofluorescência indireta – RIFI

4.5.2.1 IFI Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, BRA)

O kit é composto por frascos contendo antígeno de promastigotas de *L. major*-like, conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína, glicerina tamponada, azul de Evans (0,1%) e 50 lâminas reticuladas. Controles positivo e negativo, tampão fosfato (TF) e lamínulas, não são fornecidos no kit. Cada kit contém reagentes suficientes para realizar 600 reações.

Para a execução do teste foram seguidas as recomendações do fabricante. Inicialmente, as lâminas foram sensibilizadas com antígeno, incubando-se por duas horas em estufa a 37°C. Posteriormente, o conjugado foi titulado em bloco contra soros controle negativo e positivo. As amostras foram diluídas nas proporções de 1:40 e 1:80 em TF e 10µL de cada diluição foram depositados nos retículos das lâminas, que foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TF três vezes de cinco minutos e rapidamente com água tipo I. As lâminas foram secas e 15µL de conjugado diluídos 1: 1.250 em TF, contendo azul de Evans a 0,004%, foram depositados nos retículos, incubando-se as lâminas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Em cada lâmina, foram adicionados controles positivo e negativo, diluídos 1:40, nas mesmas condições. Depois de lavadas e secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e cobertas com lamínulas. Amostras que apresentaram titulação superior a 1:80 foram retestadas utilizando a metodologia quantitativa, na qual novas diluições nas proporções de 1:40 a 1:640 foram produzidas.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência com lâmpada de mercúrio (Carl Zeiss, Axiostar plus, Thornwood, NY, USA), usando objetiva de 40x, por dois observadores. Em caso de discordância na leitura dos resultados entre os observadores, o teste foi repetido para confirmação do resultado. Os resultados, em título, das amostras em estudo foram devidamente registrados. Segundo critérios do fabricante, amostras que apresentaram fluorescência a partir da diluição 1:40 foram consideradas positivas.

4.5.3 Teste imunocromatográfico

4.5.3.1 IT-LEISH[®] (BIO-RAD Laboratories, Inc, Marnes-la-Coquette, FRA)

O kit é composto por 24 testes individuais constituídos por dispositivos plásticos contendo uma tira-teste sensibilizada com antígeno recombinante K39 de *L. infantum*, orifício com conjugado, orifício de lavagem, tampa para os orifícios, lanceta, ampola com tampão, compressa antisséptica e pipeta capilar. Para realização do teste, foi acrescentada uma gota do tampão ao primeiro orifício do

dispositivo e, no segundo, quatro gotas, aguardando-se um minuto. Com auxílio de micropipeta, foram adicionados 10µL da amostra de soro ao primeiro orifício, homogeneizando por um minuto. A fita-teste foi destacada e inserida no primeiro orifício, onde permaneceu por 10 minutos. Em seguida, o suporte com a fita foi deslocado para o segundo orifício, contendo apenas o tampão, por 10 minutos. Os resultados foram considerados válidos quando a banda controle foi visualizada. Ao contrário, nos casos em que a banda controle não foi visualizada, os resultados foram considerados inválidos e o teste foi repetido. As amostras foram consideradas positivas quando a banda controle e banda teste foram visualizadas, independente da intensidade da coloração. Por outro lado, quando apenas a banda controle apresentou coloração, as amostras foram consideradas negativas.

4.5.4 Teste de aglutinação direta (DAT-LPC, PCPP/IRR-FIOCRUZ, BRA)

O protótipo de kit DAT-LPC foi padronizado e validado recentemente por pesquisadores do PCPP para o diagnóstico da leishmaniose visceral (Oliveira et al. 2011; 2013; 2017). Cada kit é composto por 10 frascos de antígeno de promastigotas de *L. infantum* liofilizado, um frasco de solução de reidratação (solução fisiológica 9%), um frasco de diluente de amostras (a base de N-Acetilcisteína 0,005M) e um controle positivo. Antes da realização do teste, a solução de reidratação e diluente de amostras foram diluídos na razão de 1:10 em água tipo I, sendo o antígeno liofilizado ressuspendido com 5mL de solução de reidratação. Posteriormente, as amostras de soro foram diluídas em série, na razão de 1:2, em solução diluente, usando microplacas de fundo em "V" (não inclusa no kit). Todas as amostras foram diluídas nas razões de 1:100 a 1:800 (metodologia qualitativa). Em seguida, foram adicionados 50µL de antígeno reidratado em todos os orifícios da microplaca. A microplaca foi agitada por 5 minutos em agitador horizontal (Kline, NT 151, São Paulo, SP, BRA) e incubada em câmara escura, em temperatura ambiente, por no mínimo quatro horas. As amostras que apresentaram aglutinação em diluições superiores a 1:100 foram consideradas positivas, de acordo com critérios definidos para o diagnóstico sorológico da LV (OLIVEIRA et al., 2009). Posteriormente, as amostras positivas com títulos superiores a 1:800 foram novamente testadas na metodologia quantitativa, procedendo-se diluições de 1:100 até 1:102.400.

4.6 Medidas de desempenho e análise estatística

Para todas as análises, considerou-se o nível de significância de 5%. Para caracterização dos grupos de pacientes estudados foi analisada a frequência simples das variáveis categóricas e média (desvio padrão) ou mediana (intervalo interquartil 25-75%) para variáveis contínuas, de acordo com o padrão de distribuição quanto a normalidade, definido pelo teste Shapiro-Wilk. A comparação do desempenho entre os testes foi realizada utilizando-se teste qui-quadrado. As medidas de desempenho avaliadas para os testes foram: sensibilidade, especificidade e acurácia, e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), através de análise em tabela 2x2 no MedCalc Statistical Software versão 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, BEL). A avaliação da concordância entre os testes foi realizada pela análise do coeficiente Kappa (COHEN, 1960), com interpretação pela escala de Landis e Koch (1977): índices menores que 0, indicam concordância pobre; índices de 0,0 a 0,20, indicam concordância fraca; entre 0,21 e 0,40, concordância razoável; entre 0,41 e 0,60, concordância moderada; entre 0,61 e 0,80, concordância substancial e entre 0,81 e 1,0, concordância quase perfeita. Os testes que apresentam como resultado uma medida quantitativa, foram submetidos à análise da curva ROC (receiver operating curve-ROC), para definição do ponto de corte ideal para o diagnóstico de LM, utilizando o MedCalc Statistical Software versão 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, BEL). Em seguida, calculou-se novamente o desempenho dos testes assumindo os critérios de positividade indicados pela análise da curva ROC. A comparação das medianas e médias da sororreatividade das amostras de soro foi realizada utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste "t" de Student, respectivamente. A sensibilidade dos testes sorológicos, considerando o ponto de corte sugerido pelo fabricante, entre os subgrupos foi comparado pelo teste qui-quadrado.

5 RESULTADOS

5.1 Características da população estudada

Foram avaliadas as características clínicas e os resultados dos testes sorológicos realizados em amostras de soros de 60 pacientes atendidos no CRL-IRR com suspeita de LM, no período de 2009 a 2016. Deste total, 40 pacientes preencheram o critério diagnóstico para LM (grupo LM) e 20 tiveram diagnóstico de outras condições (grupo controle). As características clínicas, de acordo com a classificação de Llanos-Cuentas (1997), e demográficas dos pacientes, com e sem confirmação de LM, estão apresentadas na **Tabela 1**.

No grupo de pacientes com LM predominaram homens com idade igual/superior a 60 anos, considerados idosos perante o Estatuto do Idoso (Lei nº 10.741 de 1º de outubro de 2003), variando de 21 a 94 anos, com uma mediana de idade de 62 anos. Dos 40 pacientes com LM, 22 (55%) apresentavam comprometimento exclusivo da mucosa nasal e foram classificados como pacientes com a forma leve da doença, 13 (32,5%) apresentavam, além de lesão nasal, possuíam lesão na cavidade oral e foram classificados como pacientes com a forma moderada e somente 5 (12,5%) apresentavam, além da lesão nasal e oral, dificuldade respiratória grave e foram classificados como pacientes com a forma grave. Mais da metade dos pacientes com LM apresentavam tempo de evolução da doença superior a um ano (65,7%). Quanto à presença de comorbidades, como cardiopatias, diabetes, hipertensão, entre outras, 19 (47,5%) dos pacientes apresentaram uma (30%) ou duas ou mais (17,5%) comorbidades. Já no grupo controle, a mediana de idade foi de 47 anos (12-89 anos), com predomínio de pacientes femininos (55%), sendo o tempo de evolução dos sintomas inferior a um ano em 57,1% dos casos. Ainda no grupo controle, somente dois pacientes (10%) apresentaram pelo menos uma comorbidade e três (15%) apresentaram duas ou mais comorbidades.

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com suspeita de LM atendidos no CRL-IRR, 2009-2016

Características da população	LM n (%)	Controle n (%)	Valor de p
Idade (anos)			
<60	15 (30)	14 (70)	0,02
≥60	25 (70)	6 (30)	0,02
Gênero			
Feminino	8 (20)	11 (55)	0,01
Masculino	32 (80)	9 (45)	0,01
Residência			
RMBH	29 (72,5)	14 (70)	0,9
Outras*	11 (27,5)	6 (30)	0,9
Classificação clínica			
Leve	22 (55)	-	-
Moderada	13 (32,5)	-	-
Grave	5 (12,5)	-	-
Tempo da lesão			
≤ 1 ano	12 (34,3)	8 (57,1)	0,2
>1 ano	23 (65,7)	6 (42,9)	0,2
Comorbidades			
Nenhuma	21 (52,5)	15 (75)	0,1
Uma	12 (30)	2 (10)	0,1
Duas ou mais	7 (17,5)	3 (15)	0,8
Tipo de caso			
Novo	38 (95)	-	-
Recidiva	2 (5)	-	-

Legenda: *Cidades que não pertencem a RMBH e de outros estados.

Fonte: elaborado pelo autor.

A confirmação do diagnóstico entre os 40 pacientes com LM foi realizado por meio da detecção do parasito no exame direto, cultura, PCR ou exame histológico com visualização do parasito em 23 casos (57,5%). Os demais 17 pacientes (42,5%) tiveram diagnóstico de LM por critério clínico-epidemiológico: presença de IDRMs positiva ou presença de padrão inflamatório ao exame histopatológico compatível com LM, nas duas situações associados à documentação de resposta ao tratamento para leishmaniose. Na **Tabela 2** estão apresentadas as taxas de positividade de cada exame diagnóstico no grupo LM.

Tabela 2 - Positividade dos exames diagnósticos entre os 40 pacientes com LM atendidos no CRL-IRR, 2009-2016

Exames diagnósticos	(n/N) %
IDRM reator	(30/30) 100
PCR Leishmania spp. positivo	(19/20) 95
Pesquisa direta ou cultura positiva para Leishmania	(1/3) 33,33
Presença de amastigota ao exame histopatológico	(3/33) 3,1

Legenda: n = Total de pacientes com resultado positivo; N = Total de pacientes que realizaram os exames.

Fonte: elaborado pelo autor.

Entre os pacientes do grupo controle, ou seja, aqueles em que o diagnóstico de LM não foi confirmado, as causas do acometimento mucoso foram doenças infecciosas (20%), doenças inflamatórias (35%), doenças neoplásicas (15%) e traumas e outros (30%) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Diagnósticos firmados entre os pacientes do grupo controle atendidos no CRL-IRR, 2009-2016

Diagnóstico	N	%
Doenças infecciosas	4	20
Doenças inflamatórias	7	35
Doenças neoplásicas	3	15
Traumas/outros	6	30

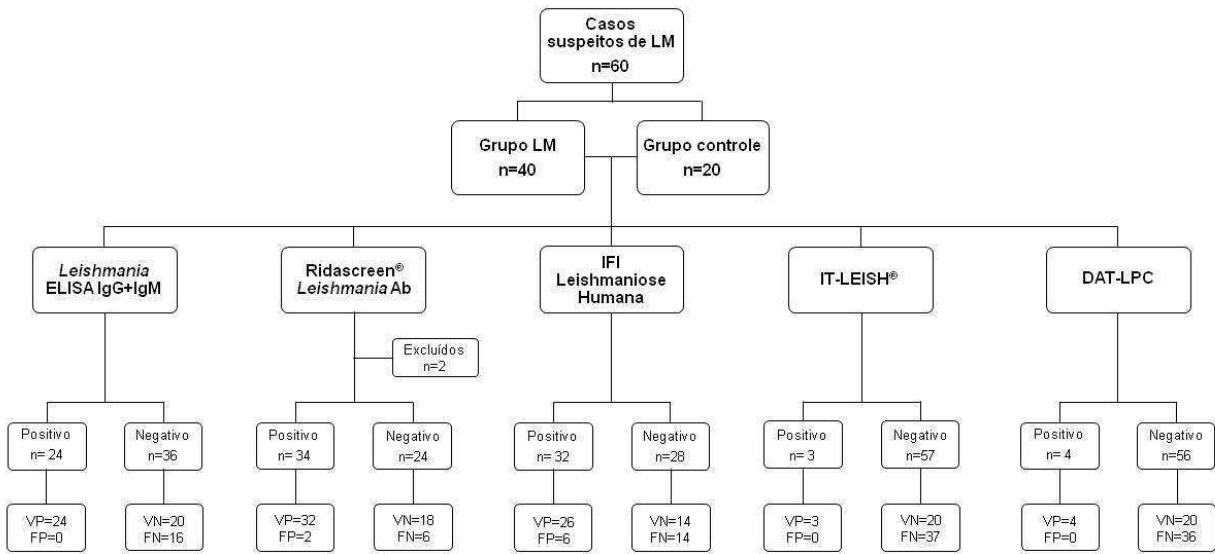
Legenda: Doenças infecciosas: hanseníase (1/4), impetigo bacteriano (2/4) e criptococose (1/4); Doenças inflamatórias: rinite/sinusite (5/7), colagenose (1/7) e doença granulomatosa de Wegener (1/7); Doenças neoplásicas: papilomas (2/3) e linfoma de células natural killer (1/3); Trauma/outros: trauma local (3/6), má formação congênita (1/6) e outros (2/6).

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Desempenho dos testes sorológicos

O fluxograma a seguir apresenta os resultados observados para cada um dos testes avaliados em amostras dos grupos LM e controle. Os testes foram realizados um por vez, no período de fevereiro a agosto de 2017. É oportuno ressaltar que, na análise de desempenho do teste Ridascreen® Leishmania Ab, foram excluídas duas amostras de pacientes que apresentaram resultado considerado duvidoso, de acordo com orientação de uso elaborado pelo fabricante do teste.

Fluxograma 3 - Resultados obtidos com os testes sorológicos.



Legenda: FN – Falso negativo; FP – Falso positivo; VN – Verdadeiro negativo; VP – Verdadeiro positivo.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados das medidas de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica dos testes são apresentados na Tabela 4.

A sensibilidade dos testes variou de 7,5% (IC95%: 2,6-19,9%) a 84,2% (IC95%: 69,6-92,6%), apresentadas pelo IT-LEISH[®] e Ridascreen[®] Leishmania Ab, respectivamente. O DAT-LPC apresentou sensibilidade de 10% (IC95%: 2,8-23,7%), a IFI Leishmaniose Humana de 65% (IC95%: 49,5-77,9%) e o Leishmania ELISA IgG+IgM de 60% (IC95%: 44,6-73,7%) (Tabela 4). Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) foram encontradas nas comparações entre dois testes baseados na metodologia ELISA (Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen[®] Leishmania Ab, $p=0,02$); entre Ridascreen[®] Leishmania Ab e todos os demais testes (IFI Leishmaniose Humana, $p=0,05$; IT-LEISH[®], $p < 0,0001$ e DAT-LPC, $p < 0,0001$); e entre o IT-LEISH[®] e todos os demais testes (DAT-LPC, $p < 0,0001$; IFI Leishmaniose Humana, $p < 0,0001$ e DAT-LPC, $p < 0,0001$).

A especificidade variou de 70% (IC95%: 64,7-91,1%) a 100% (IC95%: 83,9-100%), demonstrada pela IFI Leishmaniose Humana e Leishmania ELISA IgG+IgM e IT-LEISH[®]. O Ridascreen[®] Leishmania Ab apresentou especificidade de 90% (IC95%: 69,9-97,2%) e o DAT-LPC de 95% (IC95%: 76,4-99,1%) (Tabela 4). Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) foram observadas entre os testes Leishmania ELISA IgG+IgM e IFI Leishmaniose Humana ($p=0,01$) e na comparação da IFI Leishmaniose Humana com os testes IT-LEISH[®] ($p=0,009$) e DAT-LPC ($p=0,04$).

As taxas de acurácia diagnóstica maiores foram encontradas para os testes Ridascreen[®] Leishmania Ab com 86,2% (IC95%: 75,1-92,8%) e Leishmania ELISA IgG+IgM, 73,3% (IC95%: 61,0-82,9%). Os outros testes sorológicos apresentaram acurácia de 66,7% (54,1-77,3%) pela IFI Leishmaniose Humana e 38,3% (IC95%: 27,1-51,0%) pelos testes IT-LEISH[®] e DAT-LPC (Tabela 4). Foram confirmadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), na comparação entre o Leishmania ELISA IgG+IgM e os testes IT-LEISH[®] ($p=0,0001$) e DAT-LPC ($p=0,0001$); Ridascreen[®] Leishmania Ab e os testes IT-LEISH[®] ($p < 0,0001$) e DAT-LPC ($p < 0,0001$); e por fim, a IFI Leishmaniose Humana e os testes IT-LEISH[®] e DAT-LPC ($p=0,002$).

Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos entre suspeitos de LM atendidos no CRL-IRR, 2009-2016 de acordo com ponto de corte do fabricante

Testes sorológicos	Sensibilidade (%) IC ₉₅ % (n=40)	Especificidade (%) IC ₉₅ % (n=20)	Acurácia (%) IC ₉₅ % (n=60)
Leishmania ELISA IgG+IgM	60,0 (44,6-73,7)	100 (83,9-100)	73,3 (61,0-82,9)
Ridascreen® Leishmania Ab	84,2* (69,6-92,6)	90,0% (69,9-97,2)	86,2 (75,1-92,8)
IFI Leishmaniose Humana	65 (49,5-77,9)	70,0 (64,7-91,1)	66,7 (54,1-77,3)
IT-LEISH®	7,5 (2,6-19,9)	100 (83,9-100)	38,3 (27,1-51,0)
DAT-LPC	10,0% (2,8-23,7)	95,0 (76,4-99,1)	38,3 (27,1-51,0)

Legenda: *n=38.

Fonte: elaborado pelo autor.

Na análise da concordância entre os resultados apresentados pelos testes sorológicos, usando o coeficiente de concordância Kappa, os índices variaram de 0,03 (IC95%: 0,0-0,13%) a 0,67 (IC95%: 0,42-0,91). A maior concordância, considerada substancial, foi obtida entre os testes de ELISA (Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen® Leishmania Ab). Os demais testes apresentaram concordância considerada fraca ($\leq 0,2$) ou razoável ($\leq 0,4$). A menor concordância foi observada entre os testes IFI Leishmaniose e IT-LEISH® (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de concordância entre os testes sorológicos aplicados em 60 amostras de soro de pacientes com suspeita de LM, atendidos no CRL-IRR no período de 2009 a 2016

Testes sorológicos	Ridascreen® Leishmania Ab	IFI Leishmaniose Humana	IT-LEISH®	DAT-LPC
Leishmania ELISA IgG+IgM	0,67 (0,42-0,91)	0,34 (0,10-0,59)	0,15 (0,015-0,29)	0,08 (0-0,25)
DAT-LPC	0,04 (0-0,15)	0,08 (0-0,22)	0,2 (0-0,44)	-
IT-LEISH®	0,07 (0-0,17)	0,03 (0-0,13)	-	-
IFI Leishmaniose Humana	0,41 (0,15-0,66)	-	-	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Por meio da análise por curva ROC, novos pontos de cortes para a definição de diagnóstico de LM foram explorados para os testes Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen® Leishmania Ab. Embora os testes IFI Leishmaniose Humana e DAT-LPC também apresentem resultados quantitativos, a mesma abordagem não pôde ser realizada em função dos critérios de definição de positivo/negativo já adotados. Assim sendo, a primeira diluição já define uma amostra como positiva ou negativa.

Para o teste Leishmania ELISA IgG+IgM, o ponto de corte com a melhor relação sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LM foi identificado como 6,5 (Tabela 6), que corresponde a acurácia de 88% (IC95%: 77-95%), determinada pela área sob a curva (Figura 1). Já para o teste Ridascreen® Leishmania Ab, ponto de corte ideal foi identificado como 0,76 (Tabela 7), correspondendo a uma acurácia de 89% (IC95%: 78-96%), também definida pela área sob a curva (Figura 2). Com base nesses novos pontos de corte, as taxas de sensibilidade dos testes Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen® Leishmania Ab passaram para 77,5% e 85%, com novas taxas de especificidade de 95% e 90%, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores anteriores e novos de sensibilidade e especificidade do Leishmania ELISA IgG+IgM ($p=0,09$;

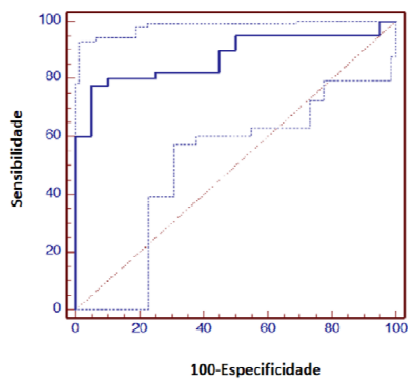
p=0,5, respectivamente) e Ridascreen® Leishmania Ab (p=0,92; p=1,0, respectivamente).

Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade para o teste Leishmania ELISA IgG+IgM de acordo com diferentes pontos de corte definidos pela Curva ROC

Critério	Sensibilidade	IC 95%	Especificidade	IC 95%
>=1,07393	100,00	91,1-100,0	0,00	0,0-17,0
>1,0793	100,00	91,1-100,0	5,00	0,8-24,9
>1,1820	95,00	83,0-99,2	5,00	0,8-24,9
>2,4392	95,00	83,0-99,2	50,00	27,2-72,8
>2,5045	90,00	76,3-97,1	50,00	27,2-72,8
>2,6311	90,00	76,3-97,1	55,00	31,6-76,9
>4,2664	82,50	67,2-92,6	55,00	31,6-76,9
>4,5181	82,50	67,2-92,6	75,00	50,9-91,2
>4,5474	80,00	64,3-90,9	75,00	50,9-91,2
>5,4624	80,00	64,3-90,9	90,00	68,3-98,5
>6,0687	77,50	61,5-89,1	90,00	68,3-98,5
>6,4567	77,50	61,5-89,1	95,00	75,1-99,2
>8,4263	60,00	43,3-75,1	95,00	75,1-99,2
>8,4606	60,00	43,3-75,1	100,00	83,0-100,0
>30,8511	0,00	0,0-8,9	100,00	83,0-100,0

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 1 - Representação da Curva ROC para o teste Leishmania ELISA IgG+IgM



Legenda: Curva ROC do teste Leishmania ELISA IgG+IgM, realizada com os resultados de índice de anticorpos das 40 amostras de pacientes do grupo LM e 20 do grupo controle. A linha contínua delimita a área sob a curva de 0,88 (IC95%: 0,77-0,95).

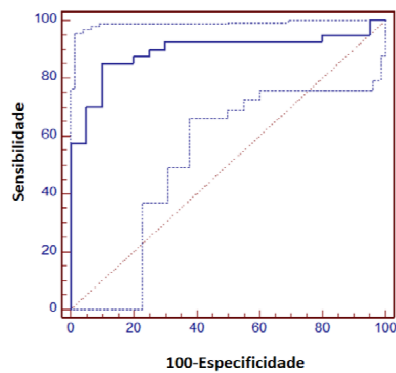
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade para o teste Ridascreen® Leishmania Ab de acordo com os diferentes pontos de corte definidos pela Curva ROC

Critério	Sensibilidade	IC 95%	Especificidade	IC 95%
>=0,1392	100,00	91,1-100,0	0,00	0,0-17,0
>0,1392	100,00	91,1-100,0	5,00	0,8-24,9
>0,1974	95,00	83,0-99,2	5,00	0,8-24,9
>0,2858	95,00	83,0-99,2	20,00	5,9-43,7
>0,2880	92,50	79,6-98,3	20,00	5,9-43,7
>0,4693	92,50	79,6-98,3	70,00	45,7-88,0
>0,5469	90,00	76,3-97,1	70,00	45,7-88,0
>0,5557	90,00	76,3-97,1	75,00	50,9-91,2
>0,5880	87,50	73,2-92,8	75,00	50,9-91,2
>0,6465	87,50	73,2-95,8	80,00	56,3-94,1
>0,7325	85,00	70,2-94,3	80,00	56,3-94,1
>0,7607	85,00	70,2-97,3	90,00	68,3-95,5
>1,3041	70,00	53,5-83,4	90,00	68,3-98,5
>1,4081	70,00	53,5-83,4	95,00	75,1-99,2
>1,7745	57,50	40,9-72,9	95,00	75,1-99,2
>1,8633	57,50	40,9-72,9	100,00	83,0-100,0
>5,3275	0,00	0,0-8,9	100,00	83,0-100,0

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 2 - Representação da Curva ROC para o teste Ridascreen® Leishmania Ab



Legenda: Curva ROC do teste Ridascreen® Leishmania Ab, realizada com os resultados de índice das 38 amostras de pacientes do grupo LM e 20 do grupo controle. A linha contínua delimita a área sob a curva de 0,89 (IC95%: 0,78-0,96).

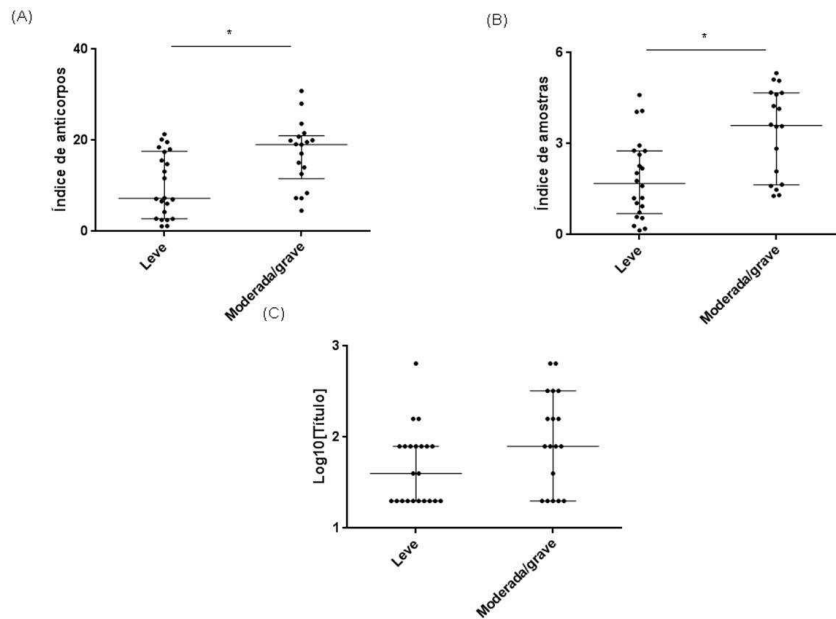
Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Sororreatividade das amostras de soro de acordo com a classificação clínica da LM, idade dos pacientes e tempo de evolução da doença

A sororreatividade observada pelos testes sorológicos, em amostras de soro de pacientes com as diferentes classificações de LM, são apresentadas nas figuras a seguir. Para análise do teste IFI Leishmaniose Humana, as titulações foram transformadas pela função logarítmica na base 10, sendo que as amostras com titulações inferiores a 1:40 foram consideradas com resultado igual ao título de 1:20.

Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na sororreatividade dos testes Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen[®] Leishmania Ab quando comparada entre os pacientes com a forma clínica leve e moderada/grave de LM ($p=0,003$ e $p=0,001$, respectivamente) como mostrado na Figura 3 (A) e (B). Já em relação à IFI Leishmaniose Humana, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras dos pacientes com a forma leve e moderada/grave da LM ($p=0,006$) como mostrado na Figura 3 (C).

Figura 3 – Sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de pacientes com diferentes classificações clínicas de LM

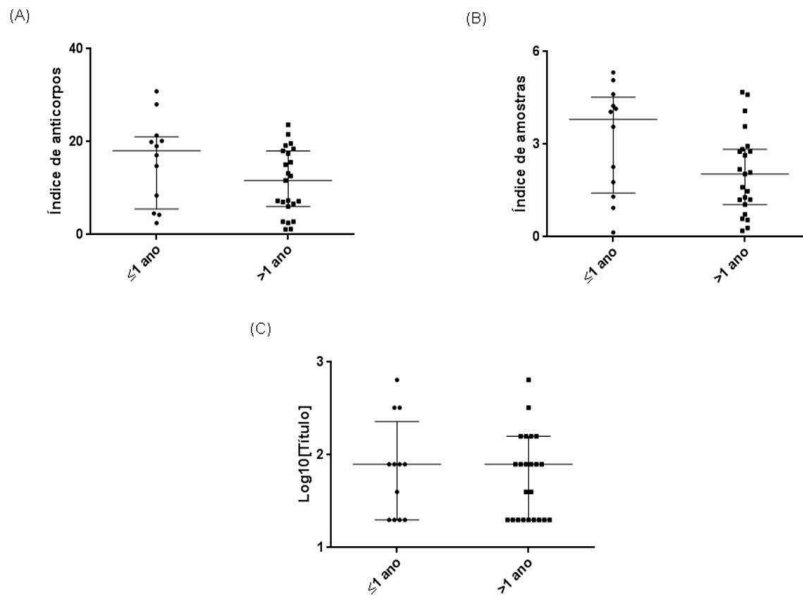


Legenda: Representação gráfica da sororreatividade das amostras nos testes (A) Leishmania ELISA IgG+IgM; (B) Ridascreen® Leishmania Ab; (C) IFI Leishmaniose Humana. nos subgrupos de pacientes com as diferentes classificações clínicas da LM: leve (n=22) e moderada/grave (n=18); *Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas na comparação das medianas nos testes (A) ($p=0,003$) e (B) ($p=0,001$). As barras representam a mediana e os interquartis de 25% e 75%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 4 apresenta uma comparação da sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de pacientes com diferente tempo de evolução da doença. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com diferente tempo de evolução da doença em nenhum dos testes sorológicos.

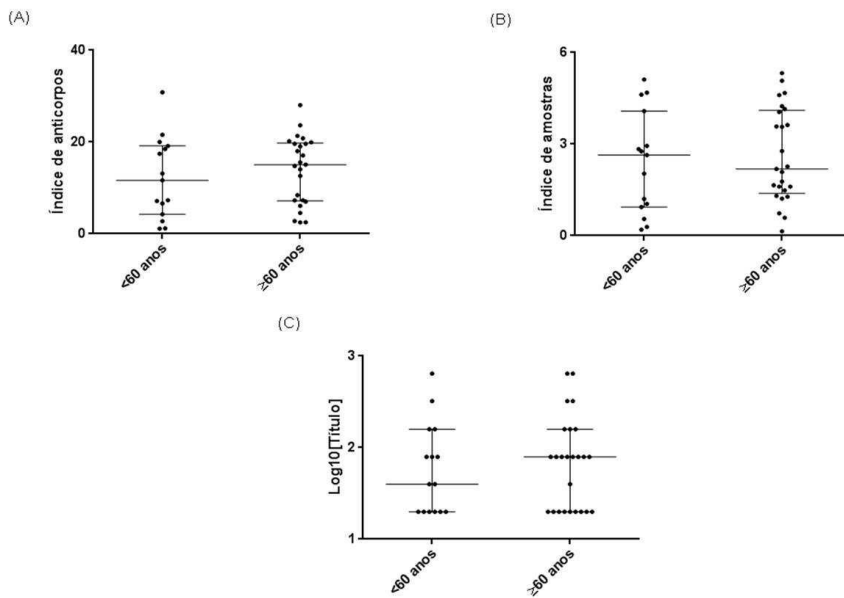
Figura 4 - Sororreatividade dos testes sorológicos em amostras de soro de pacientes, de acordo com tempo de evolução da LM



Legenda: Representação gráfica da sororreatividade em relação ao tempo de lesão ≤ 1 ano ($n=12$) e >1 ano ($n=23$): (A) Leishmania ELISA IgG+IgM; (B) Ridascreen® Leishmania Ab; (C) IFI Leishmaniose Humana. Uma análise das medianas dos resultados demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa da sororreatividade nos subgrupos, em todos os testes (A, B e C). As barras representam a mediana e os interquartis de 25% e 75%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Sororreatividade aos testes sorológicos de acordo com faixas etárias dos pacientes



Legenda: Representação gráfica da sororreatividade das amostras de soro nos subgrupos de pacientes classificados quanto às faixas etárias <60 anos (n=15) e ≥60 anos (n=25): (A) Leishmania ELISA IgG+IgM; (B) Ridascreen® Leishmania Ab; (C) IFI Leishmaniose Humana. Uma análise das medianas dos resultados demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa da sororreatividade nos subgrupos, em todos os testes (A, B e C). As barras representam a mediana e os interquartis de 25% e 75%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar se a sensibilidade dos testes variava com a classificação clínica da LM, idade dos pacientes e tempo de evolução da doença, foram realizadas análises das taxas de sensibilidade dos testes para os pacientes divididos nos seguintes subgrupos: forma leve versus moderada/grave de LM, pacientes com idades iguais/superiores versus inferiores a 60 anos, pacientes com evolução de doença superior versus inferior/igual a um ano.

Quanto à classificação clínica considerada leve, a sensibilidade variou de 4,6% (IC95%: 0,8-21,8%) a 70% (48,1-85,5%), valores estes observados para o IT-LEISH[®] e Ridascreen[®] Leishmania Ab, respectivamente. O teste Leishmania ELISA IgG+IgM apresentou sensibilidade de 45,5% (IC95%: 26,9-65,3%), a IFI Leishmaniose Humana, 54,6% (IC95%: 34,7-73,1%) e o DAT-LPC, 9,1% (IC95%: 2,5-27,8%).

Maior variação na medida de sensibilidade foi observada em amostras de pacientes com a forma moderada/grave de LM, de 11,1% (IC95%: 3,1-32,8%) a 100% (IC95%: 82,4-100%), valores apresentados pelos testes DAT-LPC e Ridascreen[®] Leishmania Ab, respectivamente. Os testes Leishmania ELISA IgG+IgM e IFI Leishmaniose Humana apresentaram sensibilidade de 77,8% (IC95%: 54,8-96,4%) e o IT-LEISH[®], 12,5% (IC95%: 3,5-36,0%). Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a sensibilidade das diferentes classificações clínicas dos testes Leishmania ELISA IgG+IgM ($p=0,04$) e Ridascreen[®] Leishmania Ab ($p=0,01$) na comparação global desta medida de desempenho em amostras provenientes de pacientes divididos nas três classificações clínicas de LM (Tabela 8). Entretanto, quando essas classificações foram comparadas em pares, diferença estatisticamente significativa foi encontrada unicamente para o teste Ridascreen[®] Leishmania Ab ($p=0,03$), na comparação de amostras de pacientes com a forma leve em relação à forma moderada/grave de LM.

Considerando apenas amostras de pacientes com tempo de evolução da doença inferior/igual a um ano, o IT-LEISH[®] apresentou a menor sensibilidade entre todos os testes: 0% (IC95%: 0-25,9%), enquanto a maior sensibilidade foi do Ridascreen[®] Leishmania Ab, 70% (IC95%: 39,7-89,2%). Já para o grupo constituído apenas por amostras de pacientes com tempo de evolução da doença maior que um ano, a menor taxa de sensibilidade foi apresentada pelo DAT-LPC: 9,1% (IC95%: 2,5-27,8%), sendo o Ridascreen[®] Leishmania Ab, novamente o teste mais sensível: 76,2% (54,9-89,4%). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ao se comparar as medidas de sensibilidade dos testes obtidas nas amostras dos pacientes com LM divididos de acordo com o tempo de evolução da doença (Tabela 9).

Embora sem alcançar diferença estatisticamente significativa, numericamente a sensibilidade de todos os testes foi maior entre pacientes com mais de 60 anos em relação ao grupo de pacientes com menos de 60 anos. Para pacientes com menos de 60 anos, o IT-LEISH[®] foi o teste que apresentou a menor sensibilidade, 0% (IC95%: 0-21,8%) e o Ridascreen[®] Leishmania Ab, a máxima, 76,9% (IC95%: 46,2-95,0%). Para pacientes com idade igual/superior a 60 anos, o IT-LEISH[®] e o DAT-LPC apresentaram a menor sensibilidade de 12,0% (IC95%: 2,6-31,2%), enquanto a maior sensibilidade foi do Ridascreen[®] Leishmania Ab, 88,0% (IC95%: 68,8-97,5%). Na análise global, não se identificou diferença estatisticamente significativa na medida de sensibilidade dos testes para pacientes com LM estratificados de acordo com a faixa etária (Tabela 10).

Tabela 8 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com a classificação clínica de LM

Testes sorológicos	Sensibilidade (%) IC95%		Valor de p
	Leve (n=22)	Moderada/Grave (n=18)	
Leishmania ELISA IgG+IgM	45,5 (26,9-65,3)	77,8 (54,8-96,4)	0,04
Ridascreen [®] Leishmania Ab	70* (48,1-85,5)	100 (82,4-100,0)	0,01
IFI Leishmaniose Humana	54,6 (34,7-73,1)	77,8 (54,8-96,4)	0,13
IT-LEISH [®]	4,6 (0,8-21,8)	12,5 (3,5-36,0)	0,37
DAT-LPC	9,1 (2,5-27,8)	11,1 (3,1-32,8)	0,84

Legenda: *n=20.
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com tempo de evolução da LM

Testes sorológicos	Sensibilidade (%) IC95%		Valor de p
	≤1 ano (n=12)	>1 ano (n=23)	
Leishmania ELISA IgG+IgM	45,5 (21,3-72,0)	50,0 (30,7-69,3)	0,8
Ridascreen® Leishmania Ab	70* (39,7-89,2)	76,2 (54,9-89,4)	0,7
IFI Leishmaniose Humana	54,6 (28,0-78,7)	63,6 (43,0-80,3)	0,6
IT-LEISH®	0,0 (0-25,9)	13,6 (4,8-33,3)	0,2
DAT-LPC	9,1 (1,6-37,7)	9,1 (2,5-27,8)	1,0

Legenda: *n=11; **n=22
 Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 10 - Sensibilidade dos testes sorológicos de acordo com as faixas etárias dos pacientes com LM

Testes sorológicos	Sensibilidade (%) IC95%		Valor de p
	<60 anos n=15	≥60 anos n=25	
Leishmania ELISA IgG+IgM	53,3 (26,6-78,3)	64,0 (42,5-82,0)	0,5
Ridascreen® Leishmania Ab	76,9* (46,2-95,0)	88,0 (68,8-97,5)	0,4
IFI Leishmaniose Humana	60,0 (32,3-83,7)	68,0 (46,5-85,1)	0,6
IT-LEISH®	0,0 (0-21,3)	12,0 (2,6-31,2)	0,2
DAT-LPC	6,7 (0,2-32,0)	12,0 (2,6-31,2)	0,6

Legenda: *n=13.
 Fonte: elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Considerando a ausência de perspectiva de disponibilidade a curto prazo de novas alternativas diagnósticas e diante da interrupção da produção do antígeno de Montenegro, a aplicabilidade de testes sorológicos, desenvolvidos e registrados na ANVISA para o diagnóstico da LV, foi avaliada quanto à sua aplicação para LM nesse estudo. Foram encontrados poucos testes sorológicos na base de dados da ANVISA, todos registrados para LV. Além disso, os poucos estudos encontrados na literatura, que avaliaram testes sorológicos para o diagnóstico da LM, além de apresentarem limitações, principalmente em relação aos critérios de classificação da LM, avaliaram no máximo dois testes em paralelo. No presente trabalho, foram avaliados cinco testes sorológicos, sendo quatro kits comerciais e um kit protótipo produzidos em nosso laboratório. A pesquisa na base de registros da ANVISA identificou ainda o kit Leishmania Cutânea IgG CELISA (Cellabs Pty Ltd., Sydney, AUS), que foi desenvolvido e registrado para o diagnóstico sorológico da LT. Este teste não foi avaliado no presente estudo em função de estar com o registro vencido e o produto indisponível comercialmente por ocasião da execução dos testes, em 2017.

Os testes avaliados apresentaram diferenças capazes de gerar implicações relevantes na abordagem diagnóstica da LM. O teste Leishmania ELISA IgG+IgM apresentou uma acurácia razoável (73,3%), mas uma sensibilidade insuficiente para compor uma rotina de investigação para a doença (60%). O fabricante informa que o antígeno usado no kit é produzido a partir de promastigotas de *L. infantum*, mas não relata a natureza do mesmo. É importante ressaltar que esse kit foi desenvolvido para detectar as duas principais classes de anticorpos (IgG e IgM) humanos. Em teoria, essa característica proporciona aumento na sensibilidade, mas compromete a especificidade, devido à baixa avidéz dos anticorpos IgM. Após determinação do novo ponto de corte, houve aumento da sensibilidade do Leishmania ELISA IgG+IgM, aumentado de 60 para 77,5%, entretanto pequena perda na especificidade foi demonstrada, diminuindo de 100 para 95%. Contudo, observa-se que o novo ponto de corte gera acréscimo em sensibilidade superior à perda na especificidade, fato que aumentou significativamente a acurácia diagnóstica do Leishmania ELISA IgG+IgM, que passou de 73,3% para 88% ($p=0,04$). Esta observação confirma que o

padrão de resposta sorológica difere entre as formas visceral e mucosa da leishmaniose, o que provavelmente exigirá a identificação de antígenos e pontos de corte específicos para LM. São resultados a serem avaliados com cautela, pois trata-se de análise ainda limitada pelo pequeno tamanho da amostra, sendo necessários outros estudos com maior representatividade nacional e de subgrupos de pacientes, a fim de validar esse ponto de corte.

Nesse estudo, o Ridascreen® Leishmania Ab foi o teste que apresentou melhor desempenho para o diagnóstico da LM. O fabricante do kit (r-Biopharm AG) informa que o antígeno usado é purificado a partir de *L. infantum*. Diferentemente do Leishmania ELISA IgG+IgM, que usa anticorpo anti-IgG/IgM humanos ligado à peroxidase como conjugado, esse ensaio de ELISA detecta anticorpos usando proteína A-peroxidase como conjugado. Esse conjugado apresenta maior afinidade para anticorpos IgG, mas, também reconhece as outras classes de anticorpos humanos. Até o momento, não há muitos estudos documentando a presença de anticorpos IgA circulantes nos pacientes acometidos por LM. Entretanto, é uma possibilidade que merece ser mais investigada, por ser uma doença que acomete mucosas. Usando o ponto de corte, calculado segundo o manual de instrução do seu fabricante, o Ridascreen® Leishmania Ab apresentou sensibilidade de 84,2%, especificidade de 90% e acurácia diagnóstica de 86,2%. A adoção do novo ponto de corte, indicado pela curva ROC, provocou pequeno aumento em sua acurácia, de 86,2% para 89% ($p=0,64$). Esse ganho foi em razão de um pequeno aumento da sensibilidade (0,8%) produzido pela inclusão de duas amostras, que anteriormente foram consideradas duvidosas e passaram a ser consideradas positivas com o novo ponto de corte. É prudente considerar que a maioria dos pacientes desse estudo é residente na região metropolitana de Belo Horizonte, que é endêmica para LV. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de que, indivíduos residentes nesta região e infectados por *L. infantum* com a forma assintomática terem apresentado sorologia positiva ao ser investigado para LM, comprometendo a especificidade do Ridascreen® Leishmania Ab.

A acurácia observada para a IFI Leishmaniose Humana foi inferior (66,7%) àquela observada em outros estudos que utilizaram esse mesmo kit em amostras de pacientes com LM (BARROSO-FREITAS et al., 2009). Esses autores observaram

ainda diferenças estatisticamente significativas quando compararam o kit em questão com uma metodologia de imunofluorescência in house com mesmo antígeno (*L. major*-like). Há, entretanto, outros estudos demonstrando que o desempenho da RIFI no diagnóstico de LM aumenta quando são utilizados promastigota de *L. braziliensis* como antígeno (GUIMARÃES et al., 1991; PEDRAS et al., 2003; BARROSO-FREITAS et al., 2009). Limitações do teste como a falta de padronização dos reagentes entre os diferentes lotes e subjetividade da leitura entre pesquisadores já foram apontadas por Barroso-Freitas e colaboradores (2009). É consenso que a subjetividade da leitura é um fator que compromete a reprodutibilidade dos resultados da RIFI, quando usada para diagnóstico da LV e outras doenças infecciosas e parasitárias. Esse fator é mais impactante quando a RIFI é usada para diagnóstico laboratorial de infecções que cursam com baixos níveis de anticorpos específicos, como é o caso da LM. Estudos em LV tem confirmado o baixo desempenho da IFI Leishmaniose Humana inclusive para o diagnóstico da LV (FREIRE, 2017).

No presente trabalho, o teste rápido IT-LEISH[®] foi positivo somente em três amostras de soro de pacientes com LM, o que resultou em sensibilidade de 7,5% e uma acurácia diagnóstica de apenas 38,3, apesar da especificidade alta (100%). O antígeno rK39 torna o IT-LEISH[®] altamente sensível e específico para o diagnóstico da LV, causada por infecções por espécies do complexo donovani (SUNDAR e RAI, 2002), o que deve explicar a baixa sensibilidade do teste para infecção causada por espécie do subgênero *Viannia*. Outra justificativa para o baixo desempenho exibido pelo IT-LEISH[®] pode estar relacionada ao tipo de plataforma do teste, ideal para o diagnóstico de doenças que cursam com altos níveis de anticorpos circulantes. Assim, é provável que esse tipo de plataforma não promova uma sensibilidade analítica suficiente para a detecção de baixos níveis de anticorpos. Contudo, uma possibilidade a ser explorada no futuro, seria o desempenho de testes utilizando esta plataforma, mas com novos antígenos recombinantes mais específicos, numa tentativa de promover aumento na sensibilidade analítica desse tipo de plataforma e contribuir com o diagnóstico complementar da LM. Esforços e investimentos nesse sentido já vêm sendo empreendidos por pesquisadores brasileiros. Alguns pesquisadores têm investido na padronização da citometria de fluxo (CF) para detecção de anticorpos IgG contra *L. braziliensis* com a finalidade de uso para o

diagnóstico da LT. A principal vantagem dessa plataforma é uma sensibilidade analítica muito superior às convencionais, como RIFI, ELISA. A primeira descrição da aplicação da CF para diagnóstico da LT foi feita por Rocha e colaboradores (2002), sendo descritas taxas de 93,6% de sensibilidade em pacientes que tinham a forma ativa da doença. Posteriormente, outro estudo mostrou que o desempenho da CF foi superior ao da RIFI, quando os dois testes sorológicos foram usados para diagnóstico da LT ativa e acompanhamento de cura dos pacientes após tratamento (OLIVEIRA, A.P. et al., 2015). Recentemente, foi proposto um ensaio triplo de CF para detecção de IgG1, com aplicação no diagnóstico diferencial entre doença de Chagas, LT e LV, denominado TRIPLEX (TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015). Apesar do ensaio exigir equipamentos de alta tecnologia, os resultados devem servir de base para desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas usando essa metodologia.

Outros pesquisadores têm investido na prospecção de novos antígenos recombinantes de *Leishmania* spp. para o diagnóstico da LT, tanto da forma cutânea como da forma mucosa. Os mais utilizados e conhecidos derivam de *L. infantum* e, normalmente, estão associados à virulência e antigenicidade do parasito. Souza e colaboradores (2013) avaliaram uma série de antígenos recombinantes derivados de *L. infantum* (HSP70, H2A, H2B, H3, H4 e KMP11), além de um extrato solúvel em um painel sorológico de LT, visando o desenvolvimento de um teste sorológico para o diagnóstico dessa doença. Quando avaliaram o desempenho em pacientes com LM (53 casos), a sensibilidade variou de 43% a 93% e a especificidade, de 55% a 84%, dependendo do antígeno empregado. Com exceção do extrato solúvel, que apresentou uma sensibilidade de 93% e especificidade de 84%, o HSP70 foi o antígeno recombinante que exibiu o melhor desempenho, sensibilidade e especificidade de 83% e 81%, respectivamente. Coelho e colaboradores (2016), identificaram dois antígenos derivados de *L. infantum* (CcOx e HRF) promissores para o diagnóstico da LT. Sensibilidade e especificidade de 100% foram encontradas em 24 amostras de ambas as formas de LT, sendo 12 amostras provenientes de pacientes com LM.

Novos antígenos derivados de *L. braziliensis* também têm sido identificados e descritos. Menezes-Souza e colaboradores (2014) avaliaram o antígeno HSP83 e

seus peptídeos derivados (1, 2 e 3) em 20 amostras de pacientes com LM e descreveram sensibilidade de 90%, 55%, 50% e 75%, respectivamente. Já Duarte e colaboradores (2015) identificaram 20 proteínas excretadas de *L. braziliensis*, sendo 18 com funções conhecidas e duas hipotéticas (sem função descrita). Dentre estes antígenos, uma triparedoxina peroxidase atingiu sensibilidade e especificidade máximas, tanto no grupo LC, quanto LM, composto por 23 e 20 pacientes, respectivamente. Apesar da identificação de antígenos recombinantes promissores para o diagnóstico de LM, são necessários mais estudos para que a sua aplicabilidade no diagnóstico dessa doença seja confirmada.

O DAT-LPC também não apresentou bom desempenho nesse estudo. A acurácia diagnóstica apresentada pelo DAT-LPC foi de apenas 38,3%, mesma taxa apresentada pelo IT-LEISH. O DAT-LPC detectou apenas quatro pacientes com LM, sendo positivo em um paciente do grupo controle. O baixo desempenho do DAT-LPC pode estar associado às características do antígeno, que em sua preparação, as promastigotas de *L. infantum* são submetidas a um tratamento com tripsina. Esse tratamento cliva muitas proteínas que poderiam ser reconhecidas por anticorpos produzidos em resposta à infecção por *L. braziliensis*. É interessante destacar que, em estudos anteriores, amostras de soro de pacientes portadores de LT, incluídas no grupo controle, não apresentaram reações cruzadas. Num estudo recente, apenas dois entre vinte pacientes apresentaram resultados falso-positivos, todos em títulos baixos (OLIVEIRA, E. et al., 2013). Nesse estudo, não foi possível definir um título de corte do DAT-LPC, quando o mesmo foi aplicado para o diagnóstico da LM. Uma questão que deve ser considerada é a natureza do antígeno. Um estudo realizado na Etiópia, usando o DAT produzido com *L. aethiopica* e *L. donovani* para o diagnóstico da LC, causada pelas mesmas espécies de parasitos usados na preparação do antígeno, reportou sensibilidade de 90,5% e 19% (HAILU, 2002). Tendo como base esse estudo, um DAT produzido com promastigotas de *L. braziliensis* está em andamento em nosso laboratório.

Nesse estudo, foi possível observar maior sororreatividade dos testes em amostras dos pacientes com a forma clínica moderada/grave em relação ao resultado dos testes em soros de pacientes com a forma clínica leve, quando foram testados pelo Leishmania ELISA IgG+IgM ($p=0,003$) e pelo Ridascreen® Leishmania Ab ($p=0,01$).

Já em relação à IFI Leishmaniose Humana, não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com a forma moderada/grave de LM na comparação com os pacientes da forma leve da doença ($p=0,06$, Figura 3). Em diferentes doenças infecciosas e parasitárias como, por exemplo, na esquistossomose mansoni, há uma forte resposta imune pro inflamatória (Tipo Th1) nas fases iniciais da infecção, seguida por um contrabalanço da resposta imune anti-inflamatória (Tipo Th2) durante a evolução da doença (PEARCE e MACDONALD, 2002; STADECKER et al., 2004). Essa mudança no perfil da resposta imune é importante para diminuir os danos aos tecidos acometidos. Considerando as características, ainda muito pouco conhecidas, da resposta imune na LM, esses resultados, se confirmados por estudo mais amplo, podem ser importantes para contribuir na compreensão da imunopatogênese da LM e no desenvolvimento dos testes sorológicos a serem aplicados à doença. Ou seja, caso o mesmo padrão de resposta imune com variação temporal seja confirmado na LM, os testes sorológicos provavelmente terão aplicabilidade nas fases clínicas tardias da doença. Em relação ao tempo de evolução da doença e faixas etárias, não foram observadas variações significativas da sororreatividade aos testes Leishmania ELISA IgG+IgM e Ridascreen® Leishmania Ab entre os pacientes (categorizados de acordo com o tempo de evolução da doença: superior e inferior/igual a um ano de sintomas) e faixa etária (categorizados em maiores/iguais e menores a 60 anos).

Em contraste, foram encontradas maiores taxas de sensibilidade no subgrupo de pacientes com as formas moderada/grave em relação àqueles com a forma leve de LM, quando suas amostras de soro foram testadas pelo Leishmania ELISA IgG+IgM ($p=0,04$) e Ridascreen® Leishmania Ab ($p=0,01$). Além disso, numa comparação pareada, o Ridascreen® Leishmania Ab apresentou maior taxa de sensibilidade no subgrupo de pacientes classificados com a forma moderada em relação à forma leve da doença ($p=0,03$). Nesse estudo, o tempo de evolução e a idade dos pacientes não influenciaram diretamente o desempenho dos ensaios de ELISA.

Importante ressaltar que esse estudo foi realizado com amostras de conveniência, por tratar-se de uma doença com incidência relativamente baixa. Desta forma, uma limitação destas observações é a pouca representatividade de pacientes com as formas graves de LM, além de ter utilizado amostras de soro congeladas, o que

pode ter influenciado o desempenho dos testes. Diante disso, um novo estudo prospectivo para avaliar o desempenho dos testes sorológicos está sendo realizado pelo nosso grupo de pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, resguardadas as limitações de um estudo do tipo caso-controle de base amostral, com amostras congeladas de um único centro e em número pequeno, as observações aqui realizadas são geradoras de hipótese e devem embasar principalmente o planejamento de novos estudos. Com foco na aplicação clínica, os resultados observados nesse estudo sustentam a não recomendação dos testes IFI Leishmaniose Humana, IT-LEISH® e DAT-LPC para o diagnóstico de LM. Por outro lado, sugerem uma aplicabilidade dos testes baseados na metodologia ELISA, especialmente para pacientes com acometimento mucoso moderado ou grave.

REFERÊNCIAS

ABASS, E. et al. Validation of a β -ME ELISA for detection of anti *Leishmania donovani* antibodies in Eastern Sudan. *Iran J Immunol*, v. 8, n. 3, p. 150, 2011.

_____. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS one*, v. 10, n. 3, p. e0116408, 2015.

ABDALLAH, K. A. et al. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. *Trop Med Int Health*, v. 9, n. 10, p. 1127-1131, 2004.

ADAMS, E.R. et al. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 12, p. e1946, 2012.

AHMED, Z.; CHOWDHURY, S.A.; BHUYAN, S.I. Cutaneous leishmaniasis. *Mymensingh Med J*, v.18, n. 2, p. 260-3, 2009.

ALIAGA, L. et al. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine*, v. 82, n. 3, p.147-158, 2003.

ALLAIN, D. S.; KAGAN, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. *The Am J Trop Med Hyg*, v. 24, n. 2, p. 232-236, 1975.

ALMEIDA, T.F.A. et al. Exclusive primary lesion of oral leishmaniasis with immunohistochemical diagnosis. *Head Neck Pathol*, v. 10, n. 4, p. 533–537, 2016.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, 2012.

ALVES, C.F. et al. American tegumentary leishmaniasis: Effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. e63343, 2013.

AMATO, V.S. et al. The use of a silicone T tube for the treatment of a case of American mucocutaneous leishmaniasis with tracheomalacia. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 28, n. 2, p. 129-130, 1995.

_____. An Evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Rev Inst de Med Trop de S Paulo*, v. 40, n. 1, p. 23-30, 1998a.

_____. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isethionate. *Annal Dermat Venereol*, v.125, p. 492-495, 1998b.

_____. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*, v. 85, n. 1, p. 39-49, 2003.

_____. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospect for treatment. *Acta Trop*, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.

_____. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg*, v.77, n.2, p. 266-274, 2007.

_____. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad of Dermatol Venereol*, v. 23, n. 9, p.1026 –1034, 2009.

AZULAY, R.D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. *Dermatol Iber Latin Am* 2: 7–15, 1960.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, v 70, n 12, p 6734-6740, 2002.

BADARÓ, R. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

_____. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol*, v. 147, n. 4, p. 947–954, 1995.

BARROSO-FREITAS, A.P.T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 4, p. 383-389, 2009.

BERTHOLET, S. et al. Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. *Infect Immun*, v.73, n. 10, p.6620-6628, 2005.

BEZUNEH, A. et al. Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in East African patients. *Am J Trop Med Hyg*, v. 91, n. 6, p. 1109-15, 2014.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v 86, n.1, p. 51-56, 1991.

BOAVENTURA, V.S. et al. Short report: The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Am J Tropical Med Hyg*, v. 81, n. 3, p. 384-386, 2009.

BOARINO, A. et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 12, n. 5, p. 647-653, 2005.

BOGGILD, A.K. et al. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. e26395, 2011.

_____. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, v. 79, n. 6, p. 847-852, 2008.

BONI, S. M. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American tegumentary leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v.59, p.e38, 2017.

BOSSUYT, P. et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*, v. 315, 2015.

BRACHO, C.O. et al. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n.5, p. 549-54, 2007.

BRASIL. ANVISA. Consulta a produtos para saúde registrados na ANVISA. Disponível em <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>. Acesso em: Outubro. 2016.

_____. DATASUS. MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: Abril. 2018.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose

tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: i.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRAZ, R. F. et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BRITO, M.E.F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cad Saúde Pública*, v.24, n.10, 2008.

_____. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 7, n.2, p. 318-332, 2000.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

CANAVATE, C. et al. Evaluation of two rK39 dipstick tests, direct agglutination test, and indirect fluorescent antibody test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a new epidemic site in highland Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg*, v. 84, n. 1, p. 102-6, 2011.

CANTANHÊDE, L.M. et al. Further evidence of an association between the presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. *PLOS Negl Trop Dis*, v. 9, n.9, p. e0004079, 2015.

CARVALHO, A.M. et al. Age modifies the immunologic response and clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 92, n. 6, p. 1173-1177, 2015.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol*. 135:4144–4148, 1985

CARVALHO, E.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; ROMERO, G.A.S. Mucosal leishmaniasis: urgent need for more research. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.51 n.1, 2018.

CARVALHO, S. F. G. et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 68, n. 3, p. 321-324, 2003.

CASTELLUCCI, L. et al. IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis*, v. 194, n. 4, p.519-27, 2006.

CASTILHO TM, SHAW JJ, FLOETER-WINTER LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CATALDO, J.I. et al. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal*, v. 24, p.289-294, 2010.

CHAPPUIS, F. et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health*, v. 8, n. 3, p. 277-285, 2003.

COBO, F. et al. Localized mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* mimicking cancer in the rhinolaryngeal region. *Int J Infect Dis*, v. 50, p. 54-56, 2016.

COCUZZA et al. Isolated laryngeal leishmaniasis in immunocompetent patients: an underdiagnosed disease. *Case Rep Infect Dis*, v. 2013, 2013.

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

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Ed Psyc Measur*, v. 20, n. 1, 1960.

COSTA, S.M. et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102, n.2, 2007.

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

CUBA, C.C. et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.17, n.4, p. 161-167, 1984.

CUNHA, M.A. et al., Efficacy and safety of liposomal Amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the New World: A retrospective study. *Am J Trop Med Hyg*, v. 93, n.6, p. 1214–1218, 2015.

CUNNINGHAM, J. et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

DA-CRUZ, A.M. et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 9, n. 2, p. 251-256, 2002.

DAVID, C.V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermat Therapy*. v. 22, p. 491-502, 2009.

DELGADO, D. et al. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, v. 55, n. 3, p. 267–272, 1996.

De RUITER, C.M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*, v. 52, n. 9. p. 3147-3155, 2014.

DOURADO, Z.F. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). *Rev Patolog Tropical*. v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DUARTE, M.C. et al. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potencial serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, v. 22, n 11, p. 1187-1196 2015.

DUXBURY, R.E.; SADUN, E.H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 13, p. 525-9, 1964.

EI AMIN ER, et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA, immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 80, n. 2, p. 271-4, 1986.

EL HARITH, A. et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 80, n. 4, p. 583-586, 1986.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis of tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 1, p. 109-112, 2010.

FAUCHER, B. et al. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *J Infect*, v.63, n. 1, p. 76-82, 2011.

FERREIRA, M.U.; FORONDA, A.S.; SCHUMAKER, T.T.S. Fundamentos biológicos da parasitologia humana. Barueri: Manole, 2003.

FRAGA, T.L. et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 3, p. 310-313, 2010.

FRANKE, E.D. et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*, v. 113, n. 12, p. 934-940, 1990.

FREIRE, Mariana Lourenço. Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DATLPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Dissertação (mestrado) – Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2017.

FUKUTANI, K.F. et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infect Dis*, v. 14, n. 422, 2014.

GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 29, n. 2, p. 165-180, 1996.

GOLLOB, K.J.; VIANA, A.G.; DUTRA, W.O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*, v. 36, n. 8, p. 367-376, 2014.

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

_____. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. v. 89 n. 5, p. 701-11, 2014.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*, v. 149, p. 440-444, 2007.

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

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

_____. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*, v. 26, p. 293-307, 2012.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, v. 34, n. 2 Pt 1, p. 257-72, 1996.

GRIMALDI, G. Jr., TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, v. 41, p. 687-725, 1989.

GUERRA, J.A.O; COELHO, L.I.R.C.; PEREIRA, F.R. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, vol. 85, n3, p.524-527, 2011.

GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira. Leishmaniose mucosa – estudo de casos atendidos em um Centro de Referência em Manaus, Amazonas. Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical, Manaus 2009.

GUERRA M. et al. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar. *An Bras Dermatol*, v.60, p.365-369, 1985.

GUERREIRO, et al. Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a maker of disease activity and indicator of healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, v. 109, n. 1, p. 89-94, 2000.

GUIMARÃES, L.H. et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 7, p. 712-715, 2009.

GUIMARÃES, M.C.S. et al. Comparison on the performance of *Leishmania major*-Like and *Leishmania braziliensis braziliensis* as antigen for new world leishmaniasis IgG-immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, v. 33 n. 6, p. 503-508, 1991.

GUIMARÃES, M.C.S.; CELESTE, B.J.; FRANCO, E.L. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis

sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ*, v. 68, n. 1, p. 39-43, 1990.

_____. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassay for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ*, v. 67, n. 6, p. 643-648, 1989.

HAILU, A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 42, n. 4 p. 251-256, 2002.

HARTLEY, M. et al. Leishmania RNA virus: when the host pay the toll. *Front Cell Infect Microbiol*, v.2, n. 99, 2012.

HASNAIN, M. G. et al. An evaluation of the performance of direct agglutination test on filter paper blood sample for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 91, n. 2, p. 342-344, 2014.

IVES, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, v. 11; 331, p. 775-778, 2011.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg*, v. 86, n. 3, p. 426-433, 2012.

KILIÇ, S. et al. Evaluation of Serological Tests for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Turk J Med Sci*, v.38, n.1, p.13-19, 2008.

KUBAR, J., FRAGAKI, K., 2005. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis*, v. 5, n. 2, p. 107-114.

KUMAR, D. et al. Comparative evaluation of blood and serum samples in rapid immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 12, p. 3955-9, 2013.

KURKJIAN, K. et al. Application of an improved method for the recombinant K39 enzymelinked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 12, n. 12, p. 1410-1415, 2005.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAWN S. D. et al. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 100, n. 3, p. 264–269, 2006.

LESSA, H.A. et al. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 106, n. 6, p. 376-381, 2012.

_____. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

_____. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. v. 65, n. 2, p. 87-89, 2001.

LIEW, F.Y; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol*, v. 32, p. 161-259, 1993.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 25, p. 677-84, 1997.

MAALEJ, I. A. et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 68, n. 3, p. 312-320, 2003.

MACHADO-COELHO, G.L.L. et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 99, p. 55-61, 2005.

MACHADO DE ASSIS, T.S. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 17, n. 2, 2008.

_____. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 105, n. 2, p. 81-5, 2011

_____. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trop Med Int Health*, v. 17, n. 10, p. 1202-1207, 2012.

MACHADO, P.R.L. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent leishmaniasis with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 44, n. 6, p. 788-793, 2007.

MAGALHÃES, A.V. et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Classificação histológica. Rev Inst Med Trop, v. 28, p. 421-430, 1986.

MARQUES, F.A. et al. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. Parasitol Int, v.66, n.1, p.884-888, 2016.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 80, n.6, p. 859-76, 1986.

_____. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. Bahia-Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v. 27, n.101. 1994.

MARZOCHI, M.C., MARZOCHI, K.B., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroppo-zoonosis and possibilities for their control. Cad.Saude Publica, v. 10, 359-375.

MARTY, P. et al. [Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Update on the utility of the IT-Leish and ID-Pagia leishmaniasis tests]. Med Trop (Mars), v. 67, n. 1, p. 79-85, 2007.

MBUI, J. et al. Validation of two rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Kenya. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 9, p. e2441, 2013.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol, v.21, n.7, p. 949-959. 2014.

MEREDITH, S. et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol, v. 33, n. 7, p. 1742-1745, 1995.

MIKAEILI, F. et al. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. Iran J Immunol, v. 4, n. 2, p. 116-121, 2007.

MOHAPATRA, T. M. et al. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dev Ctries, v. 4, n. 02, p. 114-117, 2009.

MONTENEGRO J.B. A cutis-reação na leishmaniose. An Facul Med Uni S Paulo, v.1, p.323-30, 1926.

MONTOYA, Y. et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 91, p. 674–676, 1997.

MORAES, B.T. et al. Laryngeal leishmaniasis. *Int Arch Otorhinolaryngol*, v. 16, n. 4, p. 523-526, 2012.

MOTTA, A. C. et al. Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. *Int J Dermatol*, v. 42, p. 703-706, 2003.

_____. Oral Leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases; *Oral Dis*, v. 13, n 3, p. 335-40, 2007.

OLIVEIRA, A.G.L. et al. Influence of the nutritional status in the clinical and therapeutical evolution in adults and elderly with American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 128, p. 36– 40, 2013a.

OLIVEIRA, A.P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. *J Immunol Methods*. v. 387, p. 245–253, 2013b.

OLIVEIRA, E. et al. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 12, p. 1279-1281, 2009.

_____. Direct agglutination test (DAT): improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 105, p. 414-416, 2011.

_____. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Tropical Med Hyg*, v.107, n.4, p.243-7, abril, 2013c.

_____. Multicentre evaluation of a direct agglutination test prototype kit (DAT-LPC) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasitology*. v. 144, n. 14, p. 1964-1970, 2017.

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

OLLIARIO, P. et al. Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v.7, n.3, 2013.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. v. 5, n. 31, 2015.

PEARCE, E.J.; MacDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.*, v.2, n.7, p.499-511, 2002.

PEARSON, R.D.; SOUZA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v.22, p. 11-272.

PEDRAS, M.J. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 47, p. 477-485, 2003.

PEDRAS, M. J. et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 2, p. 172-178, 2008.

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

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 7, p. 951-952, 2012.

PELLISSARI, D.M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 20, n. 1, p.107-110, 2011.

PIÑERO, J. et al., PCR–ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, v.73, p. 21-29, 1999.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Investig*, v. 91, p. 1390–1395, 1993.

RANGEL, E. F., LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 937-954, 2009.

REED SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol*, v. 14, n. 5, p. 471-8, 1996.

REIS LC, et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, p. 439–443, 2008.

REITHINGER R, et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, p. 143-148, 1998.

RIDLEY, D. S. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 74, p. 515-521, 1980.

ROCHA RD, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados por citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Ver Soc Bras Med Trop*, v. 35, p. 551-62, 2002.

ROMERO, G.A. et al. [Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two years follow-up]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 31, p. 511-516, 1998.

RONET, C. et al., Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World. *Virulence*, v. 2, n. 6, p.547-552, 2011.

SADEGHIAN G, ZIAEI H, SADEGHI M. Electrocardiographic changes in patients with cutaneous leishmaniasis treated with systemic glucantime. *Ann Acad Med Singapore*, v. 37, n.11, p. 916-918, 2008.

SALINAS G. et al. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *Am J Trop Med Hyg*, v. 54, p. 425-429, 1996.

SARAVIA, N.G. et al. The Relationship of *Leishmania braziliensis* Subspecies and Immune Response to Disease Expression in New World Leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 159, n. 4, p. 725-735, 1989.

SASSI, A. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*, v. 116, p. 127-132, 1999.

SATO, C.M. et al. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. *J Clin Microbiol*, v. 55, n. 2, 2017.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, n. 20, p. 9944-9948, 1992.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 239–251, 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*, v. 49, p. 55–60, 2003.

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

SKRABA, C.M. et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 48, n.4, p. 437-444, 2015

SOTTO, M.N. et al. Cutaneous leishmaniasis of the New World: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop*, v.46, p.121-130, 1989.

SOUZA, A.P. et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.

SOUZA, M.A. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38, n. 2, p. 137-141, 2005.

STADECKER, M.J et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, v. 201, p.168-179, 2004.

STRAZZULLA, A. et al. Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. *BioMed Res Int*, v. 2013, 2013.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TARR, P.I. et al. LR1: A candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 9572-9575, 1988.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flowcytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. *PLoS One*, v. 10, 2015.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. *F1000 Res*, v. 6, p.750, 2017.

TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett*, v. 70, p. 203–209, 1999.

TUON, F.F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol*, v.128, p. 442-446, 2008.

ULIANA, S.R. et al. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol*, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

_____. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol*, v. 72, p. 157-163, 1991.

VRIES, H.J.C.; REEDIJK, S.H; SCHALLIG, H.D.F.H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*, v. 16, p. 99–109, 2015.

WEIGLE K, SARAIVIA NG: Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, v.14, p.433-450, 1996.

WISE, E.S. et al. Monitoring Toxicity Associated with Parenteral Sodium Stibogluconate in the Day-Case Management of Returned Travellers with New World Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n, 6, 2012.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. World Health Organization, 2010. ISBN 9240686525.

ZAJTCHUK, J.T. et al. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope*. v. 99, n. 9, p. 925-939, 1989.

ANEXOS

ANEXO I. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: DESEMPENHO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE MUCOSA

Pesquisador: Edward José de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61269816.2.0000.5091

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

Patrocinador Principal: Centro de Referência em Leishmanioses

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.952.499