

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À  
DERMATOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL**

**AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA COM ANTÍGENO RECOMBINANTE Lb6H  
NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DA  
REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS**

**NICOLLE TAYNÁ BRANDÃO DOS SANTOS**

**MANAUS**

**2021**

**NICOLLE TAYNÁ BRANDÃO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA COM ANTÍGENO RECOMBINANTE Lb6H NO  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DA  
REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convenio com a Fundação Alfredo da Matta como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Dermatologia.

Orientador: **Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra**  
Co-orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dra. Hiro Goto**

**MANAUS**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

Santos, Nicolle Tayná Brandão dos

Avaliação de teste Elisa com antígeno recombinante Lb6H no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana em amostras de pacientes de áreas endêmicas da região metropolitana de Manaus / Nicolle Tayná Brandão dos Santos. Manaus : [s.n.], 2021.

54 f.; 31 cm

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Prof. Dr. Guerra, Jorge Augusto de Oliveira

Co-orientadora: Prof. Dra. Goto, Hiro

1. Leishmaniose tegumentar americana 2. Antígenos recombinantes 3. Leishmania (Viannia) guyanensis 4. Manaus. I. Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (Orient.) II. Prof. Dra. Goto, Hiro (Co-orient.) III. Universidade do Estado do Amazonas IV. Avaliação de teste Elisa com antígeno recombinante Lb6H no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana em amostras de pacientes de áreas endêmicas da região metropolitana de Manaus

**AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA COM ANTÍGENO RECOMBINANTE Lb6H NO  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DA  
REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS**

**NICOLLE TAYNÁ BRANDÃO DOS SANTOS**

**“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em em Ciências Aplicadas à Dermatologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convenio com a Fundação Alfredo da Matta”.**

**Banca Julgadora:**

---

**Presidente**

---

**Membro**

---

**Membro**

## **DEDICATÓRIA**

“Dedico este trabalho aos grandes e verdadeiros amores  
da minha vida: meus pais, minhas avós e avôs.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre colocar pessoas tão especiais no meu caminho!

Aos pacientes que colaboraram com a dissertação;

À Universidade do Estado do Amazonas e Fundação Alfredo da Matta pela oportunidade desta Pós-Graduação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro; Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Dermatologia pela minha formação;

Ao meu querido orientador e amigo Dr. Jorge Guerra, pela paciência, incentivo, dedicação, atenção, ajuda e puxões de orelha durante todos esses anos. Obrigada por me ensinar os caminhos da pesquisa com *Leishmania*. Você mora no meu coração!

À Dra. Hiro Goto, pela parceria, orientação e gentileza com que me acolheu em seu laboratório no Instituto de Medicina Tropical – USP. E pela imprescindível colaboração na padronização do teste sorológico;

À minha amiga e parceira de todas as horas Susan Smith Doria, pela ajuda, força, companheirismo, amizade, carinho e atenção. Obrigada principalmente por me acompanhar em todas as etapas do teste e não soltar a minha mão. Você foi essencial;

À Ruth Portillo por ter me acompanhado no treinamento da padronização do teste no Laboratório na Universidade de São Paulo, pela constante disponibilidade em tirar todas as minhas dúvidas sobre o teste e pela paciência;

À Dra. Maria Carmen Arroyo do Instituto de Medicina Tropical – USP, por seus ensinamentos durante o treinamento da padronização, paciência, atenção e disponibilidade em toda a execução dos testes;

À toda a equipe do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pela contribuição e ensinamentos;

À Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, pelo incentivo, apoio, paciência, carinho e aprendizado;

Aos meus amigos do Laboratório de Leishmaniose da Fundação de Medicina Tropical, Maria Auxiliadora Chiarion, Yolanda Noguchi, Claudemir Félix, José Diéguez e Melissa Cavalcante, pelo apoio na execução deste trabalho;

À minha avó Rita Almeida pelo amor, paciência, dedicação e compreensão durante todos esses anos. Obrigada pelo esforço na minha educação. Não há palavra alguma que expresse a minha tamanha gratidão e amor por você;

Ao meu avô Eimar Tapajós, pela paciência, carinho e palavras de incentivo;

À minha prima Cristina Brito, por ter me hospedado em seu apartamento em São Paulo e ter me acompanhado durante os primeiros dias;

Ao meu pai Marden Eufrazio, meu exemplo de amor, perseverança e coragem. A pessoa que mais admiro no mundo. Obrigada por me fazer nunca desistir, mesmo estando ausente, me deu coragem e incentivo para seguir em frente e alcançar todos os meus objetivos;

À minha mãe Conceição Brandão, pelo amor, força, carinho e apoio. Obrigada por sempre acreditar em mim;

À minha avó Soraya Figueiredo, pela força, apoio e conselhos;

Ao meu tio Cassius Itaroty pelo carinho, atenção e ajuda no treinamento da apresentação;

À minha amiga Natalya Abreu, pelo carinho, amor, incentivo e por sempre acreditar em mim;

À minha amiga Jaqueline Souza, pelos conselhos, incentivo e carinho;

Ao senhor e amor Kleber Brasil, pelo apoio, força, conselhos e por sempre estar ao meu lado;

À todos aqueles direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Este projeto faz parte de um projeto piloto que foi financiado pelo LIM-38-FMUSP, o qual, tem a Dra. Hiro Goto como coordenadora. E também foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma doença infecto-parasitária, causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. Antígenos recombinantes vem sendo desenvolvidos para a obtenção de uma técnica mais rápida e padronizada para o diagnóstico da doença, que não dependa do crescimento do parasito. Recentemente, avaliou-se o desempenho de antígenos recombinantes de *Leishmania* para o seu diagnóstico sorológico, quando causada por diferentes espécies de *Leishmania*, através de antígenos recombinantes Lb6H e Lb8E. O teste ELISA-rLb6H ainda está em fase experimental para o diagnóstico, a necessidade de novos estudos com testes sorológicos utilizando antígeno recombinante (Lb6H) é de suma importância para verificar se esse antígeno continua apresentando um bom desempenho de sensibilidade e especificidade. Desta forma, este estudo propõe a avaliação através da utilização de ELISA-rLb6H no diagnóstico sorológico de rotina para Leishmaniose. Foram utilizadas 60 amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana e 31 amostras de indivíduos saudáveis para testar o ELISA-rLb6H na região. As amostras foram avaliadas e foi observado que o antígeno recombinante reagiu com 85% e 77% de sensibilidade e especificidade respectivamente. Além disso, foram testadas 5 amostras de soro de pacientes portadores Doença de Chagas e 10 de Malária para verificação de reatividade cruzada, onde obtivemos uma sensibilidade de 71% e especificidade de 73%.

**Palavras chaves:** Leishmaniose; Diagnóstico; Testes sorológicos; ELISA; Antígenos recombinantes.

## ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis is an infectious and parasitic disease, caused by different protozoa of the genus *Leishmania*, which belongs to the order Kinetoplastida and the family Trypanosomatidae. Recombinant antigens have been developed to obtain a faster and more standardized technique for diagnosing the disease, which does not depend on the growth of the parasite. Recently, the performance of recombinant *Leishmania* antigens for its serological diagnosis, when caused by different species of *Leishmania*, was evaluated through recombinant antigens Lb6H and Lb8E. The ELISA-rLb6H test is still in the experimental phase for diagnosis, the need for further studies with serological tests using recombinant antigen (Lb6H) is of paramount importance to verify whether this antigen continues to check a good performance in terms of sensitivity and specificity. Thus, this study proposes an evaluation through the use of ELISA-rLb6H in the routine serological diagnosis of leishmaniasis. Sixty patients with American tegumentary leishmaniasis and 31 healthy individuals were used to test the ELISA-rLb6H in the region. The prey were evaluated and it was observed that the recombinant antigen reacted with 85% and 77% sensitivity and specificity respectively. In addition, 5 serum from patients with Chagas Disease and 10 from Malaria were tested for cross-reactivity, where we obtained a sensitivity of 71% and a specificity of 73%.

**Key words:** Leishmaniasis; Diagnosis; Serological tests; ELISA; Recombinant antigens.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APS** Celulas apresentadoras de antígenos
- CD4+** Marcador de Linfócito T CD4
- ELISA** Ensaio imunoenzimático
- FMT-HVD** Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado
- GM-CSF** Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- gp63** Glicoproteínas de 63 kDa
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio
- IDRI** Infectious Disease Research Institute
- IgG** Imunoglobulina G
- IFI** Imunofluorescência Indireta
- IFN- $\gamma$**  Interferon-gama
- IL** Interleucina
- IMT** Instituto de Medicina Tropical
- IR** Índice de reatividade
- LC** Leishmaniose cutânea
- LCD** Leishmaniose cutânea difusa
- LD** Leishmaniose disseminada
- LMC** Leishmaniose mucocutânea
- LPG** Lipofosfoglicano
- LTA** Leishmaniose Tegumentar Americana
- LT** Leishmaniose Tegumentar
- LV** Leishmaniose Visceral
- L. (V) braziliensis** Leishmania (Viannia) braziliensis
- L. (V) guyanensis** Leishmania (Viannia) guyanensis
- L. (V) amazonenses** Leishmania (Viannia) amazonenses
- N=** Número de indivíduos
- NF $\kappa$ B** Factor nuclear kappa B
- NNN** Neal, Novy & Nicolle
- NO** Óxido nítrico
- OMS** Organização Mundial da Saúde
- PAMPs** Padrões moleculares associados a patógenos
- PBS-T** Tampão fosfato-salino – Tween

**PBS-T-L** Tampão fosfato-salino-Tween-Leite  
**PCR** Reação em cadeia de Polimerase  
**ROC** Receiver Operating Characteristic  
**SMF** Sistema mononuclear fagocitário  
**TCLE** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
**Th1** Subgrupo de linfócitos T auxiliar do tipo 1  
**Th2** Subgrupo de linfócitos T auxiliar do tipo 2  
**TLR** Toll-like receptor  
**TMB** Tetrametilbenzina  
**TNF- $\alpha$**  Fator de necrose tumoral alfa  
**USP** Universidade de São Paulo

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema da placa de ELISA-rLb6H, mostrando os parâmetros estudados, referente a 7 min de revelação. Placa semelhante foi feita para 10 min de revelação. ....	12
Tabela 1: Distribuição dos portadores de LTA quanto a sexo, faixa etária, tempo de evolução e número de lesões. ....	16
Tabela 2: Distribuição dos casos controle, doença de Chagas e Malária quanto a sexo e faixa etária. ....	17
Figura 2. a) Parâmetros de tampão Leite 5% - 1/20000 – 10 Min. b) Parâmetros de tampão Leite 5% - 1/20000 – 7 Min. ....	17
Figura 3. Curva ROC construída a partir das absorvâncias de amostras positivas para leishmaniose tegumentar e negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H. 60 positivas para LT e 31 negativas. ....	19
Figura 4. Curva ROC construída a partir das absorvâncias de 60 amostras positivas para leishmaniose tegumentar, 31 negativas, 10 de Malária e 5 de Doença de Chagas. ....	19

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	1
1.2 Epidemiologia .....	1
1.3 Imunologia na Leishmaniose Tegumentar Americana .....	3
1.4 Manifestações Clínicas na Leishmaniose Tegumentar .....	4
1.5 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana .....	5
1.5.1 Diagnóstico Parasitológico .....	5
1.5.2 Diagnóstico Sorológico .....	6
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
3.1 Geral.....	9
3.2 Específicos .....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
4.1 Tipo de estudo .....	10
4.2 Local de estudo .....	10
4.3 População de estudo .....	10
4.4 Padronização do teste ELISA-rLb6H.....	10
4.4.1 Antígeno recombinante .....	10
4.4.2 Procedimentos .....	11
4.4.2.1 Cálculo do <i>cut-off</i> do teste ELISA-rLb6H .....	12
4.4.1.2 Cálculo do índice de reatividade das amostras.....	12
4.4.1.3 Cálculo da sensibilidade do teste ELISA-rLb6H .....	13
4.4.1.4 Cálculo da especificidade do teste ELISA-rLb6H.....	13
4.4.2 TesteELISA-rLb6H.....	13
4.5 Avaliação do ensaio ELISA-rLb6H com amostras de áreas endêmicas da Região metropolitana de Manaus.....	13
4.6 Critérios de inclusão .....	14
4.7 Critérios de não inclusão.....	14
4.8 Aspectos éticos da pesquisa.....	14
4.9 Análise Estatística.....	15
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
5.1 Pacientes .....	16

5.2 Padronização.....	17
5.3 Protocolo final da ELISA com antígeno recombinante Lb6H – IgG.....	17
5.4 ELISA-rLb6H com amostras de áreas endêmicas da Região metropolitana de Manaus .....	18
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>23</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>30</b>
10.1 TCLE .....	30
10.2 Figuras do IR vs número e evolução das lesões .....	41

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (1). É transmitida aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (2,3).

A *Leishmania* é parasito intracelular obrigatório caracterizado por apresentar mitocôndria única, que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto (4). É considerado parasito digenético com seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Apresenta duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, que são: amastigota e promastigota (5).

As formas amastigotas, são imóveis, ovoides ou arredondadas, não apresentam flagelo livre e são encontradas no interior das células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF), especialmente em macrófagos dos hospedeiros mamíferos (6,7). As formas promastigotas, são extracelulares, móveis, compridas, achatadas, possuem flagelo livre e são encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores (8).

O ciclo no humano inicia-se após a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos dos hospedeiros vertebrados, quando ocorre a transformação destas em formas amastigotas e sua multiplicação, havendo então o rompimento da célula e liberação dos parasitos que vão infectar outros macrófagos (9). O desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestivo do inseto é complexo, as formas promastigotas passam por várias mudanças até se diferenciarem em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, que são denominadas promastigotas metacíclicas (10).

## 1.2 Epidemiologia

A Leishmaniose é uma endemia, negligenciada e subnotificada, que afeta principalmente populações de baixa renda (11). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose está entre as seis doenças infecciosas de maior importância no mundo (12). Ocorrem em 98 países distribuídos em cinco dos seis continentes e sua notificação é compulsória em apenas 30 países (13). Estima-se que anualmente ocorram de 0,2 a 0,4 milhões e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), respectivamente, são detectados no mundo (12,14).

A LT é amplamente distribuída, com 1/3 dos casos ocorrendo nas Américas, Bacia do Mediterrâneo e na Ásia (8,15). Nas Américas, a incidência estimada varia de 187.200 a 307.800 casos, dos quais aproximadamente 30.000 casos ocorrem no Brasil (8).

O Brasil representa área endêmica de maior extensão territorial e um dos países com as mais elevadas taxas de notificação da LT (12). Além disso, a doença tem sido confirmada em todos os estados brasileiros (13,14). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, no ano de 2015, somente a região metropolitana de Manaus registrou um número de casos de LT (8.939 casos) superior às regiões Nordeste, 5.152, Centro-Oeste, 2.937, Sudeste, 1.762, e Sul com 493 (8,12).

A leishmaniose é classificada de acordo com a região em que ocorre, o “Novo Mundo” (As Américas) ou o “Velho Mundo” (África, Ásia, Europa) (12). As espécies do subgênero *Viannia* estão presentes apenas no Novo Mundo, enquanto que as espécies do subgênero *Leishmania* estão presentes tanto no Novo Mundo quanto no Velho Mundo (8).

No Brasil são identificadas sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, e mais de duzentas espécies de flebotomíneos que transmite a doença (5). A forma cutânea é causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e, mais raramente, pela *Leishmania (Viannia) lisoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (8). Cada espécie apresenta particularidades com relação às manifestações clínicas, vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e a resposta terapêutica (5).

A *L. (V.) guyanensis* é a espécie mais prevalente no estado do Amazonas, com predomínio da forma cutânea, principalmente na região de Manaus (16), onde

vem sendo demonstrada sua importância também como agente etiológico das formas mucosas na região Amazônica (16).

### 1.3 Imunologia na Leishmaniose Tegumentar Americana

O sistema imune atua como uma rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes celulares, moleculares e estruturais (17). A geração de uma resposta imune adequada durante processo infeccioso é o ponto crucial para direcionar a progressão ou cura da doença; ou ainda, no caso específico das leishmanioses, para um padrão assintomático da infecção (17).

A resposta imune à *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasita através das células sentinelas, onde as formas promastigotas são interiorizadas, promovendo a ativação da resposta (18).

As células hospedeiras das espécies de protozoários do gênero *Leishmania* desempenham um papel fundamental para promover o elo ideal entre a imunidade inata e adaptativa, e o grau de virulência do parasita poderá influenciar em três pontos cruciais da indução da resposta adaptativa adequada; a apresentação antigênica, a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas (19). Nesse contexto, subconjuntos distintos de células T CD4+ podem ser gerados a partir da estimulação por células apresentadoras de antígenos (APCs) infectadas (19).

Os membros da família dos receptores similares à proteína *Toll* (TLR) são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como glicolipídeos, peptidoglicanos e lipopeptídeos, que são compartilhados por grandes grupos de microrganismos (20). A ativação de macrófagos via TLRs aciona a via do NFkB (NF-kappaB), um fator de transcrição que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-12, e também a produção de óxido nítrico (NO) (20).

A função dos linfócitos T com fenótipo CD4+ (Th1 e Th2) é importante na instalação da doença (21). Os linfócitos Th1 produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e TNF, que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitas (21). Por outro lado, perfil Th2 com presença de IL-4, IL-5, inibem a ativação dos macrófagos e

levam a ativação de linfócitos B, podendo levar a susceptibilidade da doença em modelo experimental (21).

A *Leishmania* utiliza mecanismos de escapes da resposta imune inata e adaptativa para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo seguras, a inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos através do LPG, a inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo pela gp63, a transformação em amastigotas que são mais resistentes ao óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ao pH ácido do fagolisossomo (22).

A resposta imune *Leishmania*-específica pode ser duradoura, e esta pode estar envolvida na proteção contra a reativação ou a reinfeção por *Leishmania* (22). As características biológicas do parasita e do sistema imune do hospedeiro humano podem estar diretamente envolvidos na patogênese e na evolução clínica da doença (22).

#### 1.4 Manifestações Clínicas na Leishmaniose Tegumentar

As espécies do gênero *Leishmania*, os vetores, reservatórios e diferentes ambientes geográficos, definem as distintas formas clínicas da LTA, que podem se apresentar desde úlceras únicas até lesões disseminadas, podendo atingir pele e as mucosas (23).

A LTA apresenta várias formas clínicas, de acordo com a espécie envolvida no processo infeccioso, sendo classificada em (23):

- Leishmaniose cutânea localizada (LC): é a forma mais clássica, apresentando úlceras únicas, rasas, com o formato ovalado ou arredondado, base eritematosa, infiltrada, de consistência firme, com as bordas bem elevadas, delimitadas, podendo ou não apresentar exsudato, medindo de alguns milímetros a alguns centímetros. Podem evoluir para a cura espontânea (24);

- Leishmaniose cutânea disseminada (LCD): é caracterizada por inúmeras lesões papulares e de aparência acneiformes, distribuídas pelo corpo, que podem ou não ulcerar (25);

- Leishmaniose difusa (LD): é uma forma clínica rara, porém grave, ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. É caracterizada por proliferação exacerbada do parasito, com lesões múltiplas, difusas por toda a pele, que se apresentam em forma de nódulos (26);

- Leishmaniose mucocutânea (LMC): na maioria das vezes são secundárias às lesões cutâneas. Destroem todo o tecido, envolvendo mucosas e cartilagens. Essas lesões surgem lentamente. Na LMC também aparecem lesões na pele (27).

## **1.5 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**

A LTA é diagnosticada com base em critérios clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (23). O diagnóstico clínico baseia-se na observação das características físicas das lesões associadas à anamnese do paciente, onde os dados epidemiológicos são de grande valor preditivo (28). Entretanto, as lesões se apresentam nas mais variadas formas, podendo simular outras patologias como: hanseníase, sífilis e tuberculose cutânea, o que torna o diagnóstico mais difícil (28).

### **1.5.1 Diagnóstico Parasitológico**

Os testes laboratoriais incluem a escarificação que consiste na pesquisa direta do parasito na lesão, cultura em meio NNN (Neal, Novy e Nicolle), inoculação em animais de laboratório e histopatologia (29,30). Dependendo do curso da evolução da lesão, a sensibilidade desses testes pode variar entre 15 a 90%, podendo ser menor naquelas lesões após 3 meses de evolução, principalmente nas formas crônicas e hiperérgicas (31). Uma vez que esses testes apresentam resultado positivo, o diagnóstico é confirmado, mesmo que apresentem baixa sensibilidade (32).

Os testes moleculares também são empregados no diagnóstico da LTA (23). O ensaio de PCR tem como objetivo encontrar o DNA do parasito (32). Para a realização de técnicas moleculares é necessário que os laboratórios possuam equipamentos específicos, e é um procedimento de custo relativamente elevado, o que acaba limitando sua utilização na rotina de diagnóstico (33).

### 1.5.2 Diagnóstico Sorológico

Devido às limitações dos demais métodos, pode-se recorrer a testes indiretos para a confirmação do diagnóstico de leishmaniose, ou para seguimento de casos. Testes indiretos para detecção de infecções por *Leishmania*, como a reação de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) detectam apenas a resposta imunológica ou o produto desta (34).

A intradermoreação de Montenegro ou, busca observar a resposta de hipersensibilidade celular retardada aos antígenos de *Leishmania*, sendo, portanto, de grande valor na detecção em casos onde os parasitos são escassos ou ausentes (35). Esta foi durante muito tempo empregada como ferramenta importante no diagnóstico imunológico da LTA, apresentava boa sensibilidade e especificidade, embora não indicasse tão somente lesão ativa, mas também infecção passada e fosse habitualmente negativa principalmente em casos de leishmaniose difusa (36). Atualmente, a produção do antígeno de Montenegro está em desuso e descontinuada (37).

Devido à baixa sensibilidade e reatividade cruzada com outras infecções, os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-leishmania não são utilizados na rotina para o diagnóstico da forma cutânea localizada (38). Atualmente, os testes empregados rotineiramente na detecção de leishmanioses são a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* = ELISA) (39).

A IFI apresenta sensibilidade em torno de 80% a 100%, principalmente em amostras de pacientes que apresentam a forma muco-cutânea, porém, não é uma técnica fácil de adaptar a estudos soropidemiológicos pois há algumas limitações, como a disponibilidade de parasitos e de microscópios de fluorescência (40,41).

O ELISA apresenta sensibilidade de 92 a 95% e especificidade de 92 a 100% (42,43). É um método automatizável, que permite seu emprego em larga escala. Apresenta potencial para ser aplicado no diagnóstico e em estudos epidemiológicos de LTA (42,43).

Nas Américas, especificamente no Norte e Nordeste do Brasil, estudos com LTA, com amostragem significativa, mostraram uma baixa sensibilidade de 27,7%, utilizando o IFI e 66,9% quando utilizou-se o teste ELISA para as amostras

de leishmaniose cutânea (44). Já sensibilidades mais altas de 56,7% para IFI e 93,3% para ELISA foram obtidas na detecção de leishmaniose mucocutânea (44).

Matta et al. (2009) demonstraram que a resposta de anticorpos, em geral, é gênero específica. Seus resultados sugerem a variação da resposta conforme as espécies de *Leishmania* presentes nos pacientes. Assim, amostras de pacientes com leishmaniose cutânea, infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, utilizando antígenos de *L. (L.) amazonensis* em testes sorológicos, os títulos eram mais baixos que naqueles infectados com *L. (V.) guyanensis*. Estes ensaios sorológicos apresentaram sensibilidade entre 75% a 96% (45).

Para orientar a conduta bem como o tratamento dos pacientes, faz-se necessário o uso de testes sorológicos sensíveis para o diagnóstico de LTA (42). Porém, para o desenvolvimento e reprodutibilidade desta ferramenta, fundamental seria o uso antígenos recombinantes como alternativa aos antígenos brutos que carecem do crescimento de parasitas (42).

Para a obtenção de uma técnica mais rápida e padronizada, antígenos recombinantes tem sido desenvolvidos (46), em relação as leishmaniose visceral se tem tido muitos avanços, mas, para o diagnóstico das formas tegumentares, (42,43) não há consenso, tampouco novos testes tem sido incorporados às rotinas de métodos sorológicos de diagnóstico, pois estudos sorológicos com antígenos recombinantes para a detecção de LTA ainda estão em fase experimental (39).

Recentemente, avaliou-se o desempenho de antígenos recombinantes de *Leishmania* para o diagnóstico sorológico de LTA causada por diferentes espécies de *Leishmania* através de antígenos recombinantes Lb6H e Lb8E, derivados da sequência cromossomal de *Leishmania braziliensis*, em método imunoenzimático ELISA. Foram avaliadas amostras das regiões Norte, Nordeste e do Sudeste do Brasil, que apresentavam prevalência variável para diferentes espécies de *Leishmania* estudadas. O resultado observado apontou que o antígeno rLb6H obteve melhor desempenho, apresentando sensibilidade de 100% em 219 amostras de LTA e especificidade de 98,5% em controles com pacientes sadios (39). Considerando que o teste ELISA-rLb6H, apresentou bons resultados em um estudo isolado e esta técnica com o antígeno em questão ainda está em fase experimental no diagnóstico da LTA, existindo a necessidade de novos estudos com testes sorológicos utilizando o antígeno recombinante Lb6H, é de suma importância verificar se esse antígeno continua apresentando um bom desempenho

de sensibilidade e especificidade. Por isso, nosso estudo se propôs a utilizar a mesma técnica com este antígeno com amostras de pacientes portadores de LTA, Malária, doença de Chagas e indivíduos saudáveis oriundos de áreas endêmicas da região metropolitana de Manaus.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar o teste ELISA com antígeno recombinante Lb6H (ELISA-rLb6H) para a detecção de anticorpos IgG antileishmania para o diagnóstico sorológico da LTA, em amostras de pacientes de áreas endêmicas da região Metropolitana de Manaus.

### **3.2 Específicos**

1. Avaliar a sensibilidade e especificidade do teste ELISA-rLb6H em amostras de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis residentes na região Metropolitana de Manaus;
2. Avaliar a reatividade cruzada do teste ELISA-rLb6H em amostras de indivíduos com Malária e doença de Chagas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Estudo transversal para a avaliação de um teste sorológico a ser utilizado para LTA em amostras da região Metropolitana de Manaus.

### **4.2 Local de estudo**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia/Leishmaniose/Doença de Chagas da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT/FMUSP).

### **4.3 População de estudo**

A população de estudo foi constituída de indivíduos provenientes da região metropolitana de Manaus, sendo 60 amostras de pacientes com LTA confirmada por exames laboratoriais e 31 controles. Para investigar a possibilidade de reação cruzada foram utilizadas 5 amostras de pacientes com Doença de Chagas, e 10 com Malária, selecionados após concordarem em participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).

### **4.4 Padronização do teste ELISA-rLb6H**

Uma padronização do teste foi realizada utilizando seis amostras de pacientes com LTA e três amostras de controles negativos. Amostras da Soroteca de Soros Humanos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP (IMT/FMUSP) foram utilizadas para padronizar o teste ELISA-rLb6H.

#### **4.4.1 Antígeno recombinante**

O antígeno recombinante Lb6H, que está sendo utilizado neste estudo foi produzido pelo IDRI (Instituto de Pesquisas de Doenças Infecciosas – Seattle, Estados Unidos). Esse antígeno foi identificado durante o rastreamento de *L. braziliensis*

na biblioteca de expressão genômica com soro de um paciente com Leishmaniose Mucosa.

#### 4.4.2 Procedimentos

Inicialmente foram estudados os seguintes parâmetros: diluição das amostras: 1/50 e 1/100; diluição do conjugado: 1/10.000 e 1/20.000; concentração do leite no diluente dos soros e do conjugado: 2 e 5%; tempo de revelação da reação: 7 min e 10 min (Figura 1).

Foram sensibilizadas placas de poliestireno *high binding* da marca *Corning, Incorporated*, New York, EUA, com 50 µL/poço do antígeno rLb6H diluído a 1 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato seguindo o protocolo abaixo:

- Após incubação, em câmara úmida, *overnight* a 4°C as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T);
- Bloqueamento com 200 µL/poço de PBS-T contendo leite desnatado na concentração de 5% (PBS-T-L-5%), incubando 2 horas a 37°C, em câmara úmida;
- Lavagem três vezes com PBS-T;
- Diluição a 1/50 e 1/100 em PBS-T contendo leite desnatado a 2% e 5%.
- Aplicadas em simplicata (50 µL/poço) para cada condição avaliada;
- Incubadas 30 min a 37°C, em câmara úmida.

A seguir, diluiu-se o conjugado peroxidase anti-IgG humana (Calbiochem) a 1/10.000 e 1/20.000 em PBS-T-L-2% e 5% e aplicaram-se 50 µL/poço.

Após incubação a 37°C em câmara úmida por 30 min, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T. A reação foi revelada com 50 µL/poço do cromógeno TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio), incubando por 7 min e 10 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A reação foi interrompida com 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. As absorvâncias foram lidas em leitor de ELISA (Multiskan Go - ThermoScientific, Finlândia) com filtro de 450 nm.

		Elisa Lb6H - 7 Min											
amostra		1/50						1/100					
conjugado		1:10000			1:20000			1:10000			1:20000		
leite		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2%	A	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3
	B	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6
	C	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3
	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
5%	E	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3	LTA 1	LTA 2	LTA 3
	F	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6	LTA 3	LTA 4	LTA 6
	G	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3	CONT 1	CONT 2	CONT 3
	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 1. Esquema da placa de ELISA-rLb6H, mostrando os parâmetros estudados, referente a 7 min de revelação. Placa semelhante foi feita para 10 min de revelação.

#### 4.4.2.1 Cálculo do *cut-off* do teste ELISA-rLb6H

Para o cálculo do *cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste ELISA-rLb6H, foi empregado um painel caracterizado do IMT/FMUSP, com 68 amostras de pacientes com diagnóstico de LTA e 72 amostras de controles negativos.

O *cut-off* do teste foi calculado de dois modos (GraphPadPrism):

- Utilizando os valores das absorvâncias das amostras positivas e negativas obtidas na reação (A).
- Utilizando os valores do percentual do padrão positivo. Para tanto, a absorvância de cada amostra foi dividida pela absorvância de um padrão positivo, colocado em todas as placas (B), conforme a equação:

$$\text{Absorv\% do padrão positivo} = \frac{\text{Absorv\% da amostra}}{\text{Absorv\% do padrão positivo}} \times 100$$

#### 4.4.1.2 Cálculo do índice de reatividade das amostras

O índice de reatividade foi calculado de dois modos:

- Para o cálculo do índice de reatividade, dividiu-se o valor da absorvância de cada amostra pelo *cut-off* obtido em (A), conforme equação:

$$\text{Índice de reatividade} = \frac{\text{Absorv\% da amostra}}{\text{Cut-off}}$$

b) Para o cálculo do índice de reatividade, dividiu-se o valor da absorvância % do padrão positivo de cada amostra pelo valor do *cut-off* obtido em (B), conforme a equação:

$$\text{Índice de reatividade} = \frac{\text{Absorvância \% do padrão positivo}}{\text{Cut-off}}$$

#### 4.4.1.3 Cálculo da sensibilidade do teste ELISA-rLb6H

A sensibilidade do ELISA-rLb6H foi calculada dividindo-se o número de amostras de pacientes com LTA positivas no teste pelo número de amostras de LTA testadas (N=68).

#### 4.4.1.4 Cálculo da especificidade do teste ELISA-rLb6H

A especificidade do ELISA-rLb6H foi calculada dividindo-se o número de amostras de indivíduos controle negativas no teste pelo número de amostras de controles testadas (N=72).

#### 4.4.2 Teste ELISA-rLb6H

Placas sensibilizadas com o antígeno rLb6H foram enviadas pelo Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/FMUSP para Manaus, onde as amostras coletadas foram testadas.

### 4.5 Avaliação do ensaio ELISA-rLb6H com amostras de áreas endêmicas da Região metropolitana de Manaus

Foram selecionadas amostras, prospectivamente, utilizando amostras frescas, recém-colhidas. Foram utilizadas amostras de soro de 60 pacientes com LTA e de 31 controles sadios e 15 com outras doenças infecciosas, tais como Doença de Chagas e Malária.

A partir de uma curva ROC com os resultados das densidades óticas (DO) obtidos do ELISA, foi calculado a sensibilidade e especificidade do antígeno.

#### 4.6 Critérios de inclusão

Critérios de inclusão para o grupo de LTA: ser proveniente de área endêmica para LTA, com diagnóstico clínico (diferentes formas clínicas) e pelo menos um dos seguintes testes positivos: parasitológico ou cultura;

Critérios de inclusão do grupo controle sadio: não apresentar evidências de doenças atuais e/ou histórico de LTA, doença de Chagas ou Malária e não residir ou ter residido em áreas de reconhecida transmissão de LTA.

Critérios de inclusão para o grupo de outras doenças: ter diagnóstico clínico e laboratorial de uma das doenças infecciosas: doença de Chagas e/ou Malária.

#### 4.7 Critérios de não inclusão

Apresentar outras infecções concomitantes, estar coinfestado com HIV, apresentar outras condições que levem à imunossupressão, grávidas, ter idade menor que 18 e maior que 65 anos, para todos os tres grupos.

#### 4.8 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto faz parte de um estudo maior intitulado “**Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**” submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da USP – CEP – IMT número 000346. E pelo CEP da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – CAAE: 83450418.8.0000.0065, sendo aprovado em 07/03/2018, número do parecer: 2.530.363, com emenda aprovada em 21/06/2018, número do parecer: 2.729.336.

Também foi aprovado pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (Manaus/AM) – CAAE: 83450418.8.3001.0005, aprovado em 06/04/2018, número do parecer: 2.584.959.

Aos que aceitaram, após explicação dos objetivos do projeto, foi solicitado que assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1) para a coleta de amostra de sangue para a realização testes laboratoriais do projeto.

Também foi aplicado uma ficha contendo dados demográficos e epidemiológicos aos participantes (ANEXO 2).

#### **4.9 Análise Estatística**

Os níveis de significância dos testes empregados na análise estatística foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ( $=0,05$ ).

O programa GraphPadPrism 5 foi utilizado para construção das curvas ROC, cálculos de sensibilidade, especificidade, construção de gráficos; o programa Microsoft Office Excel 2016 foi empregado para confecção de planilhas de dados, construção de gráficos e tabelas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Pacientes

Foram utilizadas 60 amostras de soro de pacientes com LTA, sendo, 49 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, a maioria dos pacientes apresentou uma lesão (32 / 60) e 5 pacientes apresentaram 4 ou mais lesões. Com relação ao tempo de evolução das lesões, 14 pacientes apresentaram lesões com até 30 dias, 20 pacientes apresentaram lesões entre 31 e 50 dias, 9 entre 51-60 dias e 6 apresentaram mais de 90 dias. Em relação a forma clínica, 57 pacientes apresentaram a forma cutânea e 3 pacientes apresentaram a forma mucosa da doença. Um dos pacientes com a forma mucosa, teve leishmaniose cutânea há 10 anos atrás, e desenvolveu a forma mucosa há um ano (tabela 1).

**Tabela 1: Distribuição dos portadores de LTA quanto a sexo, faixa etária, tempo de evolução e número de lesões.**

Características	n	%
<b>Gênero</b>		
Feminino	11	18.3
Masculino	49	81.7
<b>Faixa etária</b>		
20-30	13	21.7
31-40	10	16.7
41-50	15	25
>50	21	35
Sem informação	1	1.7
<b>Número de lesões</b>		
1	32	53.3
2	9	15
3	8	13.3
4 ou mais	5	8.3
Sem informações	6	10
<b>Tempo de evolução das lesões</b>		
Até 30 dias	14	23.3
31-50 dias	20	33.3
51-60 dias	9	15
>60	6	10
sem informação	11	18.3
<b>Forma clínica</b>		
LC	57	95
LM	3	5

**Tabela 2: Distribuição dos casos controle, doença de Chagas e Malária quanto a sexo e faixa etária.**

		Controle		Malária		Doença de Chagas	
		N	%	N	%	N	%
Gênero	Feminino	13	41,9	4	40	3	60
	Masculino	18	58,1	6	60	2	40
Faixa etária	> 50	6	19,4	1	10	2	40
	20 a 30	7	22,6	2	20	1	20
	31 a 40	6	19,4	3	30	1	20
	41 a 50	12	38,7	4	40	1	20
		<b>31</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

## 5.2 Padronização

Através dos parâmetros testados na padronização definimos a melhor condição para o Elisa ser testado com os soros. Os melhores resultados obtidos foram: Tampão com Leite 5%, soros diluídos em 1/50, conjugado em 1/20000 e incubação do substrato de 7 min (Fig. 2 a). No entanto, foi observado que utilizando a incubação do substrato em 10 min e concentração do soro em 1/100 também foi obtido um bom resultado, por isso utilizamos esses parâmetros.

a)

b)

Leite 5% - 1/20000 - 10 Min			Leite 5% - 1/20000 - 7 Min		
	1/50	1/100		1/50	1/100
53 LMC	2.18	1.52	53 LMC	1.83	1.30
2225	1.03	0.67	2225	0.89	0.49
57	0.13	0.04	57	0.04	0.05
15 MARINA	2.72	2.14	15 MARINA	2.56	1.53
2761	1.98	1.37	2761	1.74	1.11
122	0.11	0.08	122	0.06	0.03
14 MARINA	0.30	0.29	14 MARINA	0.21	0.23
2782	1.67	1.40	2782	1.52	0.96
128	0.08	0.05	128	0.06	0.11
	1.65	1.23		1.46	0.94
	0.11	0.05		0.05	0.06
	15.48371	22.75		27.57	15.72773

Figura 2. a) Parâmetros de tampão Leite 5% - 1/20000 – 10 Min. b) Parâmetros de tampão Leite 5% - 1/20000 – 7 Min.

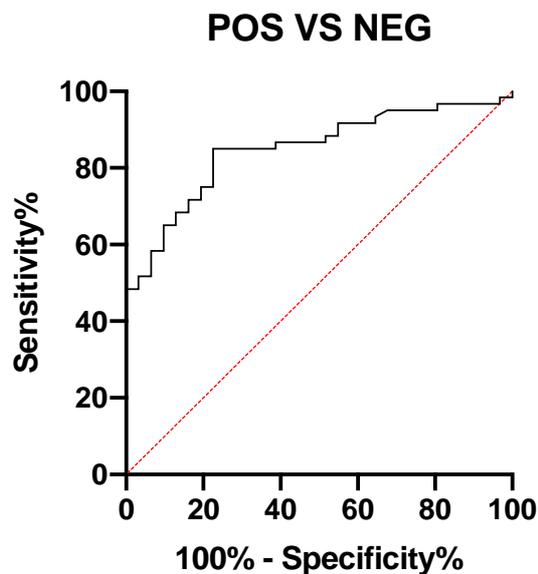
## 5.3 Protocolo final da ELISA com antígeno recombinante Lb6H – IgG

- 1) Placas de poliestireno Costar 3690, High Binding, de fundo plano, foram sensibilizadas com 50 ul do antígeno rLb6H 1,0 ug/ml (em tampão carbonato 0,05 M – pH 9,6) e incubadas 18 horas a 4° C em câmara úmida.
- 2) As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,01M (7,2 pH) com tween 20 a 0,05 % (PBS-T).
- 3) As placas foram bloqueadas com 125 ul de leite desnatado a 5% em PBS – T (PBS-T-L5%) e incubadas por 2 horas a 37° C em câmara úmida.
- 4) As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,01 M (7,2 pH) com tween 20 a 0,05% (PBS-T).
- 5) Foram adicionadas 50 ul das amostras do soro diluídas 1/100 em leite desnatado a 5% em PBS – T (PBS-T-L5%) as cavidades em duplicatas, com incubação de 30 minutos a 37° C em câmara úmida.
- 6) As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T.
- 7) Foram adicionados 50 ul do conjugado enzimático anti IgG humana – peroxidase (calbiochem), em 1:20000 diluído em PBS – T – L5% e incubado-se por 30 minutos a 37° C em câmara úmida.
- 8) As placas foram lavadas cinco vezes com PBS – T.
- 9) Adiciona-se em seguida 50 ul/cavidade de TMB (Life Technologies) e incubado-se 10 minutos a temperatura ambiente, em local protegido da luz.
- 10)A reação foi interrompida com a adição de 25 ul/cavidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.
- 11)A leitura da reação e feita medindo a absorbância em leitora de placas de ELISA com filtro de 450nm.
- 12)Para cada amostra calcula-se o índice de reatividade do teste.
- 13)São consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR > a 1.

#### **5.4 ELISA-rLb6H com amostras de áreas endêmicas da Região metropolitana de Manaus**

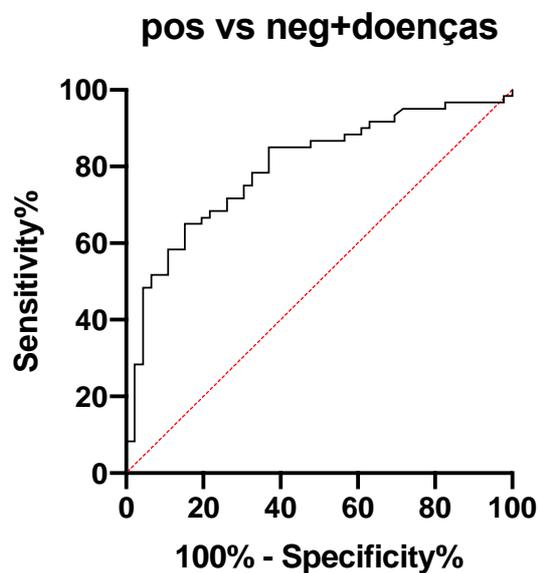
A partir dos valores da absorbância percentual do padrão positivo das 60 amostras positivas de LTA, 31 amostras controles e 15 amostras de outras doenças, foram construídas duas curvas ROC, para determinar o cut-off, sensibilidade e especificidade.

Na figura 3, pode-se observar a curva ROC utilizando as amostras positivas e amostras controle, onde foi obtido uma sensibilidade e especificidade de 85% e 77% respectivamente, com o cut-off de > 8,130.



**Figura 3. Curva ROC construída a partir das absorvâncias de amostras positivas para leishmaniose tegumentar e negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H. 60 positivas para LT e 31 negativas.**

Na figura 4, mostra a curva ROC com amostras positivas, amostras controles e de outras doenças, onde pode-se observar a reatividade cruzada. Apresentou sensibilidade de 71% e especificidade de 73%, com cut-off de  $> 11,90$ .



**Figura 4. Curva ROC construída a partir das absorvâncias de 60 amostras positivas para leishmaniose tegumentar, 31 negativas, 10 de Malária e 5 de Doença de Chagas.**

## 6. DISCUSSÃO

Existe uma grande variedade de testes serológicos para o diagnóstico da LTA, como, ELISA, Imunofluorescência indireta, e testes imunocromatográficos (46). A implementação de antígenos recombinantes têm se mostrado uma alternativa promissora, pelo fato de ser uma técnica simples, rápida, padronizada e de fácil aplicação em larga escala (46–48). Ao contrário de outras técnicas mais invasivas, como o diagnóstico parasitológico, que requer profissionais treinados e materiais específicos para sua realização (46,48).

No desenvolvimento de testes sorológicos, uma ferramenta, fundamental tem sido o uso antígenos recombinantes como alternativa aos antígenos brutos (42). O desenvolvimento desses antígenos recombinantes os colocam como o ideal para a obtenção de uma técnica mais rápida e padronizada para o diagnóstico das doenças, incluso a LTA, que não dependa do crescimento do parasito (42,43), se tem obtido muitos progressos em relação a leishmaniose visceral, como ensaios utilizando antígenos recombinantes e testes rápidos imunocromatográficos (49). Porém, para leishmaniose tegumentar estudos sorológicos com antígenos recombinantes para a sua detecção ainda estão em fase experimental assim como para o antígeno utilizado em nosso estudo, onde somente há uma publicação em que esse antígeno foi utilizado para o diagnóstico sorológico da LTA (39).

No nosso estudo a maior parte dos pacientes foi do sexo masculino, concordando com os dados obtidos de outros estudos em que a maioria dos pacientes acometidos são do sexo masculino, na faixa etária produtiva, os homens são os que mais tem contato com matas, por conta de suas atividades laborativas - muitos serem agricultores ou residirem e desenvolverem atividades extrativistas em matas onde ocorre o ciclo da doença (50–53).

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana é clínico, epidemiológico e laboratorial. Os testes laboratoriais como: parasitológico e histopatológico apresentam baixa sensibilidade no diagnóstico da leishmaniose pois são testes que apresentam limitações, que não só indicam infecção recente mas também infecção pasada (39,41,44).

Szargiki et al., 2009, comparando o método parasitológico com o sorológico, para LTA encontraram 79.3% de positividade em pacientes com clinico, e entre 83 a 96% pelo método sorológico, essa variação a depender do antígeno utilizado na sorologia(54).

Diferentes estudos utilizando o ELISA para diagnosticar a leishmaniose, apresentaram, sensibilidades e especificidades entre 66.9-96% e 77.5-100%, respectivamente (40,41,43–45,54).

Sato e colaboradores em 2017, testaram antígenos recombinantes utilizando a técnica ELISA. Foi possível observar que o desempenho do antígeno recombinante rLb6H apresentou alta sensibilidade quando comparado com os outros antígenos estudados, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 98,5% em pacientes com leishmaniose tegumentar, por esse motivo escolhemos este antígeno para a realização do presente estudo(39). Utilizamos a mesma técnica adotada por Sato et al. 2017, e testamos amostras somente da região de Manaus, considerada endêmica para LTA, e observamos que esse antígeno quando testado com as amostras da região apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 77%, resultados abaixo daqueles encontrados quando se utilizou testes para LTA com esse mesmo antígeno (39).

Além disso, no nosso trabalho foi encontrada alta reatividade cruzada com soros de pacientes de doença de Chagas e Malária, a sensibilidade e especificidade baixaram quando foram testadas amostras dessas outras doenças, apresentando 71% de sensibilidade e 73% de especificidade, não esquecendo a possibilidade de que essa é uma área endêmica para endêmica para LTA e pode ser que os pacientes de outras doenças já tenham tido contato com alguma espécie de *Leishmania* sem ter apresentado sintomas, no entanto todos o negavam. A reatividade cruzada é um aspecto que muitos autores já têm discutido em outros trabalhos, sobretudo com soros de pacientes com Doença de Chagas (46,55,56).

Sato e colaboradores, observaram 18,7% de reatividade cruzada em suas amostras de DC e concluem que isso pode estar ligado a antígenos de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* que compartilham de algumas similaridades, já que são da mesma família, além disso, levantam também a hipótese de que estes pacientes poderiam estar com infecção latente ou tiveram leishmaniose anterior(39).

No nosso trabalho, as amostras são verdadeiramente caracterizadas como sendo de doença de Chagas e Malária, os pacientes não apresentaram co infecção e nem histórico de LTA.

Outro fator que pode influenciar na sensibilidade e especificidade, é a espécie de *Leishmania* que o paciente apresenta. Neste estudo, não foi realizada a identificação da espécie, no entanto, diversos estudos demonstram que a espécie que mais predomina nos pacientes acometidos com LTA na região de Manaus é *L. (V.) guyanensis*, (em torno de 88 a 95% dos casos)(5,14,31,52,57–59). Mendes et al. 2020

encontraram que o 94% das amostras identificadas eram de *L. (V.) guyanensis* (N=83)(57), Neves et al. 2011 encontraram 88,1% (N=90)(14) e Chrusciak et al. 2011 encontraram um 95,5% de *L. (V.) guyanensis* nos casos de LTA (N=90)(58), e ainda que, Sato e colaboradores tenham testado soros com a espécie caracterizada, entre elas amostras de pacientes com *L. guyanensis*, (correspondendo a 44,2% das amostras testadas com tres diferentes antígenos – Lb6H, Lb8E e *Leishmania major*-like) e tenham encontrado uma boa sensibilidade e especificidade independentemente da especie(39), no nosso estudo, não foi encontrada a mesma sensibilidade e especificidade que eles descrevem, sendo abaixo daquela por eles encontrada.

Corroborando com nossos achados, em outro trabalho, realizado por Szargiki et al. (2009), onde os pacientes tinham infecção por *L. (V.) braziliensis*, o teste sorológico que utilizou antígeno de *L. (V.) braziliensis* teve melhor detecção quando comparado com o teste que utilizou *L. (L.) amazonensis*(54).

Em estudo realizado por Lage et al, 2019, uma proteína hipotética conservada de *Leishmania*, que foi identificada em parasitas *Leishmania infantum*, foi avaliada para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar e visceral, bem como em indivíduos saudáveis vivendo em região endêmica da doença, e também soros de portadores de doença de Chagas, Hanseníase, Aspergilose e Paracoccidiodomicose de indivíduos vivendo na mesma área. Análises sorológicas com ELISA utilizando a proteína recombinante (rLiHyL) e os antígenos rA2 e SLA em um painel sorológico humano, a proteína rLiHyL revelou valores de 100% sensibilidade e especificidade para detectar ambas as doenças, o que não foi obtido para os demais antígenos, que mostraram reações cruzadas para todas as doenças, sobretudo no soro de portadores de LC, assim como nos resultados observados em nosso estudo.

Em uma revisão sistemática avaliando a acurácia do diagnóstico do ELISA para detectar anticorpos anti-*Leishmania* em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, Zanetti et al. (2019) encontraram em 10 estudos avaliando as reações cruzadas com amostras de soro de pacientes com doença de Chagas, relatos de reatividade em dois estudos realizados, com taxas de 17% (IC 95%, 12-27,9), no outro estudo (Szargiki et al, 2009), entre 10 pacientes com doença de Chagas, nove foram reativos para *L. (L.) amazonensis* e oito para *L. (V.) braziliensis* pelo ensaio ELISA. Usando IFA, sete soros foram reativos para *L. (L.) amazonensis* e oito para *L. (V.) braziliensis*.

Trabalhos realizados no Brasil, utilizando antígenos solúveis, geralmente utilizam cepas de *L. (V.) braziliensis*, provavelmente por esse motivo apresentam menor reatividade a soros oriundos de áreas onde predominam outras espécies,

dessa forma, esse estudo aponta a necessidade da produção de novos antígenos obtidos da espécie prevalente na região onde o estudo é desenvolvido, no nosso caso, a metropolitana de Manaus, e ainda que os antígenos recombinantes mostraram uma melhor sensibilidade e especificidade para detecção da doença, é preciso desenvolver novos testes com o intuito de observar se teremos um desempenho melhor de sensibilidade e especificidade(56).

Em nosso estudo foram avaliadas amostras com soros de pacientes oriundos de áreas onde predomina a *L. (V.) guyanensis* e é possível que por esse motivo nossos resultados tenham diferido daqueles obtidos por Sato et al. 2017, que utilizou o mesmo antígeno, porém com amostras de outras áreas e não só de *L.(V.) guyanensis*.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O antígeno recombinante Lb6h foi testado com amostras de LTA, controles negativos e pacientes com histórico de doença de Chagas e Malária da região de Manaus. A sensibilidade e especificidade foram um pouco abaixo do esperado, considerando-se como parametro um único estudo feito utilizando este antígeno para sorologia de leishmaniose e foi também encontrada uma alta reatividade cruzada. Isso pode estar relacionado à espécie predominante na região, *L. (V.) guyanensis*, e sugere-se fazer novos testes com antígenos obtidos a partir dessa espécie.

## 8. CONCLUSÃO

As amostras de LTA com os controles sadios apresentaram Sensibilidade de 85% e especificidade de 77%.

Os testes apresentaram altos índices de reação cruzada contra soros de Malária e doença de Chagas de pacientes oriundos da mesma região, apresentado 71% de sensibilidade e 73% de especificidade expressa pela curva ROC, indicando que a proteína Lb6H não é um bom antígeno para ser utilizado em testes sorológicos em áreas de *L. (V.) guyanensis*.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Endemias* [Internet]. 2003;55(1):34–7. Available from: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252003000100023&script=sci\\_arttext&lng=en](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252003000100023&script=sci_arttext&lng=en)
2. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):239–51.
3. Gontijo B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Med Trop*. 2003;36(13):71–80.
4. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(3):230–50.
5. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;1(2):13–32.
6. Grimaldi G, Momen H, Naiff R, McMahon-pratt D, Barret T V. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans , Wild Mammals , and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(6):645–61.
7. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000;16(4):142–4.
8. Ministério da saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2017.
9. Neves DP. *Parasitologia Humana*. Vol. 13. 2016.
10. Rey L. *Parasitologia*. 2008.
11. Basano SDA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Eídemiol*. 2004;7(3):328–37.
12. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5).
13. OMS, OPAS. LEISHMANIOSES Informe Epidemiológico das Américas. 2018.
14. Neves LO, Gadelha EPN, Guerra JAO, Talhari S, Talhari AC, Da Silva RM, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina ,

- pentamidina e anfotericina B para o tratamento da. *An Bras Dermatol*. 2011;86(6):1092–101.
15. Naiff RD, Pinheiro FG, Naiff MDF, Souza I de S, Castro LM, Menezes MP, et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana No Município De Rio Preto da Eva , Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2009;38(2):103–14.
  16. Guerra JA de O, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIRC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania ( Viannia ) braziliensis* and *Leishmania ( Viannia ) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *Plos Neglected Trop Dis*. 2011;5(3):1–5.
  17. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 2004;79(6):647–62.
  18. Freitas JCC De, Pinheiro DCSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a leishmania spp.pdf. *Rev Port Clin Vet*. 2010;(55):11–20.
  19. Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol Today*. 2000;16(7):292–7.
  20. Bhattacharyya S, Ratajczak CK, Vogt SK, Kelley C, Colonna M, Schreiber RD, et al. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and I $\kappa$ B regulation in toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood*. 2010;115(10):1921–31.
  21. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008;213(3–4):377–87.
  22. Reis LDC, Felinto De Brito ME, Souza MDA, Alves Pereira VR. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop*. 2006;35(2):103–15.
  23. Angelo J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. 2014;7210.
  24. Murback NDN, do Nascimento RAF, Dorval MEMC, Filho GH, Nakazato KR de O, Dorval MEMC. Leishmaniose tegumentar americana: Estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *An Bras Dermatol*. 2011;86(1):55–63.
  25. Bentes AA, Rodrigues DE, Carvalho E, Carvalho AL, Campos FA, Romanelli RM de C. Leishmaniose americana cutânea: diagnóstico desafiador na prática pediátrica. *Rev Médica Minas Gerais [Internet]*. 2015;25(Supl 6):83–7. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2238-3182.20150100>
  26. Costa JML, Costa AAUML, Elkhoury AN, Bezerril ACR, Barral A, Saldanha CR. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis ( Dcl ) in Brazil After 60 Years of Your First

- Description. *Gaz Médica da Bahia*. 2009;79(3):16–24.
27. Nunes CS, Yoshizawa JK, Oliveira RZ de, Lima AP de, Oliveira, Letícia Zigiotti, Lima MVN de. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. *Rev Bras Med Família e Comunidade*. 2011;6(18):52–6.
  28. Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep*. 2013;7(2):31–41.
  29. Skraba CM, Pedroso RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SMA, Lonardoni MVC, et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014;78(4):411–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.020>
  30. Gomes CM, Mazin SC, dos Santos ER, Cesetti MV, Bächtold GAB, Cordeiro JH de F, et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: Systematic literature review and meta-analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(2):157–65.
  31. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff M de F, Figueira L de P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol* [Internet]. 2016;167:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>
  32. Al-hucheimi SN, Sultan BA, Al-Dhalimi MA. A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. *Int J Dermatol*. 2009;48(4):404–8.
  33. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1953–7.
  34. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and Species Identification of *Leishmania* DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2010;50:1–6.
  35. Skraba CM, de Mello TFP, Pedroso RB, Ferreira ÉC, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):437–44.
  36. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581–96.

37. Gomes CM, de Moraes OO, Roselino AM, de Paula NA, Soares KA, Sampaio RNR. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):701–9.
38. Edrissian GH, Darabian P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73(3):289–92.
39. Sato CM, Arroyo C, Celeste J, Duthie MS, Guderian J, Reed SG. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):495–503.
40. Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):383–9.
41. Guimaraes MCS, Celeste BJ, Franco EL, Cuce LC, Jr WB. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ*. 1989;67(6):643–8.
42. Marzochi MC, Coutinho SG, Sabroza PC, de Souza WJ. Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1980;22(3):149–14955.
43. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1037–43.
44. Guimarães MCS, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ*. 1990;68(1):39–43.
45. Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, De Souza E Souza I, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, et al. *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon highland. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(3):339–44.
46. Lage DP, Machado AS, Ramos FF, Silveira PC, Dias DS, Ribeiro PAF, et al. A

- biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. *Immunobiology* [Internet]. 2019;224(4):477–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.008>
47. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagnosis Ther* [Internet]. 2018;22(4):443–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0343-y>
  48. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebalı M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. *Iran J Parasitol*. 2018;13(3):331–41.
  49. Cunningham J, Hasker E, Das P, El S, Goto H, Mondal D, et al. A Global Comparative Evaluation of Commercial Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1312–9.
  50. Guerra JADO, Ribeiro JAS, De Aguiar Raposo Da Camara Coelho LIDARDC, Das Graças Vale Barbosa M, Gomes Paes M. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2006;22(11):2319–27.
  51. de Melo MGN, de Moraes RCS, de Goes TC, E Silva RP, de Moraes RF, Guerra JA de O, et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with american cutaneous leishmaniasis from the States of Pernambuco and Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:1–8.
  52. Figueira L de P, Soares FV, Farias Naiff M de, Da Silva SS, Espir TT, Pinheiro FG, et al. Distribuição De Casos De Leishmaniose Tegumentar No Município De Rio Preto Da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2014;43(2):173–81.
  53. Guerra JA de O, das Graças Vale Barbosa Guerra M, Vasconcelos ZS, da Silva Freitas N, Fonseca FR, Andrade da Silva Júnior RC, et al. Socioenvironmental aspects of the Purus Region - Brazilian Amazon: Why relate them to the occurrence of American Tegumentary Leishmaniasis? *PLoS One*. 2019;14(2):1–15.
  54. Szargiki R, de Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado ÂM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2009;13(1):47–52.
  55. Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Lima Costa FA, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous mucosal, visceral leishmaniases. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(5):860–5.

56. Zanetti ADS, Sato CM, Longhi FG, Ferreira SMB, Espinosa OA. Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-Leishmania antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systemic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61(JULY).
57. Mendes L, Guerra JO, Costa B, Silva AS da, Guerra M das GB, Ortiz J, et al. Association of miltefosine with granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: A randomized and controlled trial. *Int J Infect Dis*. 2021;103:358–63.
58. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Da Silva RM, Yamashita EPG, De Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):255–60.
59. De Guerra JAO, Maciel MG, De Guerra MVF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of Amazonas: What have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(December 2013):12–9.

## 10. ANEXOS

### 10.1 TCLE

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**PROJETO: AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA COM ANTÍGENO RECOMBINANTE Lb6H NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS**

**Investigador em Manaus:** Jorge Augusto de Oliveira Guerra, Médico.

**Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - Gerência de leishmaniose**

Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000  
(92)2127 3555, (92) 99988 3215, 2127 3518.

**Comitê de Ética:** Comitê de Ética em Pesquisas da FMT-HVD Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 às 13:00h Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000 **Fone:** 2127 3555

**Nome do Paciente:**

---

#### **1. Para ser lido por todos os participantes do estudo:**

As informações a seguir descreverão o estudo e a forma como você vai participar. O investigador responderá quaisquer perguntas que você possa fazer sobre o estudo. Esse documento tem duas vias, e uma delas ficará com você.

#### **2. Convite e Propósito do Estudo:**

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre a leishmaniose tegumentar americana (Leche ou Ferida Braba), que será realizado na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

O objetivo deste estudo é avaliar o teste ELISA para o diagnóstico sorológico da LTA, utilizando amostras de pacientes de áreas onde ocorrem muitos casos da

doença, com diagnóstico clínico/laboratorial de LTA, com outras doenças infecciosas e de controles saudáveis.

Sua participação neste estudo será importante porque você apresenta essa doença e a avaliação desse teste será de grande valia para a rotina laboratorial.

### **3. Procedimentos do Estudo**

Se você concordar em participar voluntariamente do estudo, depois de ler este consentimento na sala de consulta, será realizado o preenchimento de uma ficha constando seus dados e, se for o caso, sobre sua doença. Também será coletado uma amostra de sangue para obtenção do soro que será utilizado em testes sorológicos (ELISA).

E concordar também que o material retirado do paciente (sangue) se destina apenas a pesquisa constante do protocolo, mas que o excedente ficará estocado na gerencia de Leishmaniose da FMT-HVD e concorda que seja utilizado para outras pesquisas envolvendo esta doença, como aspectos diagnósticos, estudos imunológicos, nesse caso você será contactado para dar seu consentimento novamente.

### **4. Participação Voluntária:**

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participar ou desistir da participação a qualquer momento que você assim decidir. Sua recusa em participar ou sua decisão de abandonar o estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você precise na FMT-HVD. Isto também não vai prejudicar suas futuras relações com a FMT-HVD e com as pessoas que lhe atenderam.

### **5. Confidencialidade:**

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial (ou seja, em momento algum seu nome ou dados serão revelados a não ser para equipe da pesquisa) sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica, porém na amostra coletada será usado apenas um código de identificação no lugar do seu nome. Os resultados deste estudo serão divulgados na forma de comunicação científica (publicação em congressos e revistas científicas), não permitindo a identificação individual dos participantes.

### **6. Análises de riscos e benefícios:**

A retirada de sangue da veia é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados. Em caso de danos decorrentes da sua participação no estudo, você terá assistência médica integral e gratuita por todo tempo que for necessário e será tratado com medicamentos ou procedimentos adequados para cada caso pelos profissionais responsáveis pelo estudo, sem nenhum custo para você. Você também terá direito a indenização e ou ressarcimento de gastos que porventura ocorram em decorrência de sua participação neste estudo.

Este estudo pode trazer benefícios diretos ou indiretos para você e para outros pacientes que são portadores de Leishmaniose. Com o estudo podemos validar um teste sorológico para ser incluído na rotina laboratorial. Você será incluído como portador de Leishmaniose e como participante deste estudo se pelo menos um dos seguintes testes, estiver positivo: parasitológico, cultura ou histopatológico com encontro de parasitos. O material coletado (sangue) será utilizado apenas neste estudo mas concorda que possa ser estocado e posteriormente reutilizado para outros estudos e que você será contactado novamente para dar seu consentimento caso isso venha a acontecer.

Ou ainda como participante em outros grupos da pesquisa se tiver diagnóstico confirmado de doenças como (Doença de Chagas, Malária, Tuberculose). Também será incluído como participante no grupo controle se apresentar ser saudável ao exame clínico e laboratorial.

### **7. Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação. Caso você apresente qualquer problema associado a esta pesquisa, a FMT-HVD lhe dará toda assistência médica necessária em Manaus. Informação adicional pode ser obtida na Gerência de Leishmaniose da FMT-HVD com a Dra. Nicolle Tayná Brandão dos Santos (92)99283-6478, ou Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (92)99988-3215, (92)2127 3555, (92)2127 3518, das segundas às sextas-feiras, das 8 às 11 horas.

O participante e seus familiares têm direitos a ressarcimento de gastos ou indenizações por prejuízos que porventura possam acontecer em decorrência de sua participação neste estudo, assim como de toda assistência médica garantida pela FMT-HVD.

### **6. Esclarecimentos de contatos**

Se você tiver qualquer outra questão sobre a sua participação nesta pesquisa, por favor contate a Dra. Nicolle Tayná Brandão dos Santos e o Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, nos telefones acima ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD localizado na Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000. Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 às 14:00h, Fone: 2127 3572.

### **9. Consentimento:**

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. **A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.**

- Sim, eu concordo o material excedente e estocado (sangue ou Soro) seja utilizado para outras pesquisas envolvendo esta doença
- Não, eu não concordo o material excedente e estocado (sangue ou Soro) seja utilizado para outras pesquisas envolvendo esta doença

Assinatura do Paciente Data/Hora

---

Assinatura da Testemunha Data/Hora

---

### **Impressão do Polegar da Testemunha**

**Compromisso do Pesquisador:** Discutir as questões acima apresentadas com os participantes do estudo e ter certeza que o participante entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do Pesquisador Data Hora



**Impressão do Polegar do Paciente**

## 6.5 Ficha do primeiro atendimento médico

### 1. Identificação

ID:		Data:
Nome:		
Data de Nascimento:	Sexo: Masculino ( ) Feminino ( )	
Local de residência:		
Ocupação:		

### 2. Detalhes de participação

Consentimento para este estudo:	( ) Sim	( ) Não
Consentimento para estudos futuros:	( ) Sim	( ) Não
Data de entrada no estudo: _____ / _____ / _____		

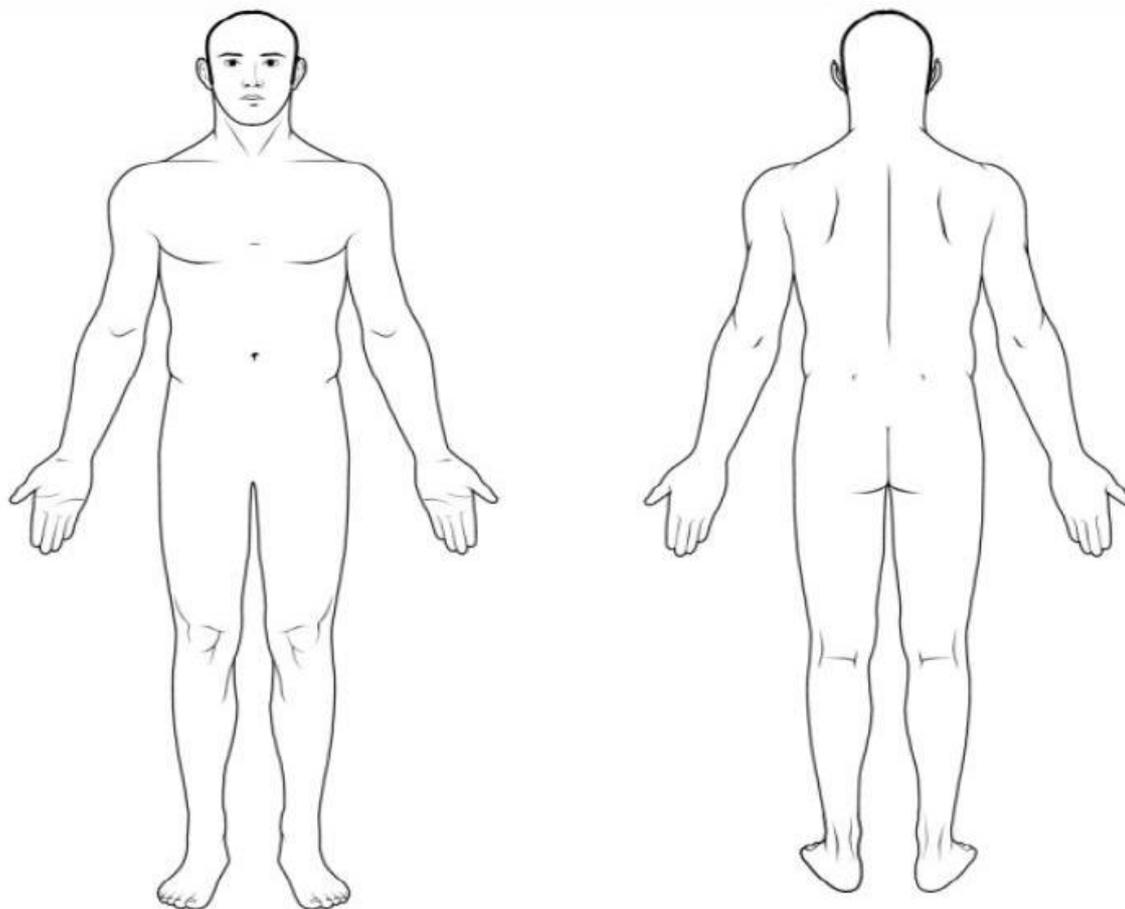
### 3. Histórico

Teve leishmaniose tegumentar pregressa? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei Quando _____ Fármaco que tomou _____ Duração do tratamento _____ Data da cura _____	Teve leishmaniose visceral/calazar? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei Quando _____ Fármaco que tomou _____ Duração do tratamento _____ Data da cura _____
Histórico de viagens – especificar:	

### 4. Dados Clínicos

Febre:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	se sim, anote a temperatura _____
Palidez:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Linfadenopatia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	se sim, local: cervical / axilar / inguinal / generalizada  Lado esquerdo / direito / ambos
Hepatomegalia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Espenomegalia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	

5. Locais e extensão das lesões(indicar os sítios/extensão das lesões na figura abaixo)



6. Apresentação clínica leishmaniose cutânea localizada

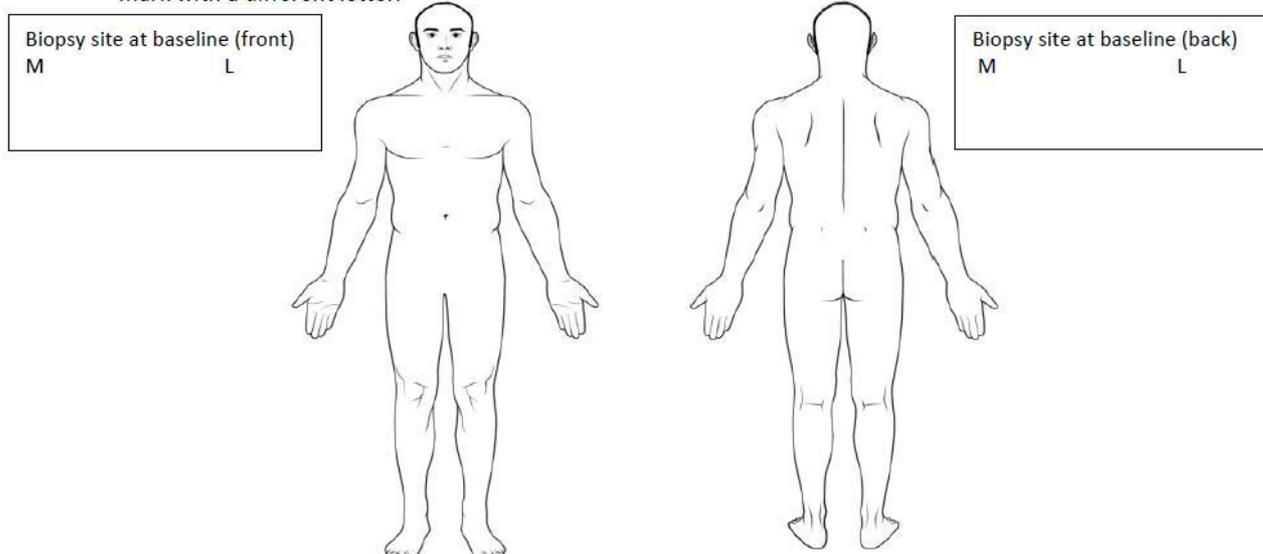
Presenting sign(s): Please indicate which of the following clinical features are evident and the number of lesions at the time of presentation and if possible the duration of the lesion (s).	Presence of lesion types	Number of lesions; tick relevant box	Duration in months (if less than one month in weeks)
5.1.1 Recent onset macule (circumscribed change in the color of skin that is flat on palpation – (excludes scarring and post inflammatory pigmentary change)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.2 Papule ( $\leq 5$ mm diameter, palpable solid elevation)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.3 Nodule ( $> 5$ mm diameter, palpable elevation)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.4 Plaque (flat topped with diameter greater than its height)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
<b>Ulcerative change</b>			
5.1.5 Dry ulcer (destruction of epidermis of skin with central crusting/scaling)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.6 Wet ulcer (destruction of epidermis of skin with wet exudates)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.7 Nodular ulcerative ( $> 5$ mm diameter, palpable elevation with central ulceration)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
<b>Other features associated with acute lesion(s)</b>			
5.1.8 Satellite lesions	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.9 Halo pigmentation	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
<b>Sequelae from resolved or resolving lesion(s)</b>			
5.1.10 Hyperpigmentation	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.11 Hypopigmentation	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.12 Atrophic Scarring	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.13 Hypertrophic or Keloid scarring	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
5.1.14 Any other atypical lesions – remarks			
5.1.15 Patient reported symptoms e.g. pain, loss of function etc.			

- Tempo da lesão primária - \_\_\_\_\_

## LOCALISED CUTANEOUS LEISHMANIASIS: BASELINE VISIT PRE TREATMENT

### 6.1 Baseline biopsy and index lesion(s) for assessment

- Please indicate on the figure below the site(s) of any biopsy(ies) taken and mark with a letter e.g. A
- Draw the lesion(s) biopsied in the box and indicate where the biopsy has been taken (M= medial L = lateral)
- Indicate features of the lesion(s) biopsied in the table below
- Distinguish any index lesion(s) for assessment throughout the study from the biopsy sites on the figures, and mark with a different letter.



### 7. Apresentação clínica leishmaniose cutânea com lesões múltiplas

Inclui pacientes com 5 ou mais lesões

Leishmaniose cutânea com lesões múltiplas – 6 a 20 lesões (úlceras sem pápulas ou nódulos) - lesões apareceram ao mesmo tempo  sim  não

Leishmaniose cutânea disseminada – > 20 lesões (pequenas úlceras com ou sem pápulas ou nódulos) - lesões apareceram ao mesmo tempo  sim  não

Leishmaniose cutânea difusa – numerosas lesões (nódulos com ou sem pápulas e sem úlceras) - lesões apareceram ao mesmo tempo  sim  não

PKDL - mácula hipopigmentada simetricamente distribuída, ou pápula / placa eritematosa, ocupando principalmente a face, tronco e extremidades, com história de leishmaniose visceral precedente / concomitante

8. Leishmaniose mucosa

Concomitante com leishmaniose cutânea <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Teve leishmaniose cutânea pregressa <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Localização das lesões: <input type="checkbox"/> nariz <input type="checkbox"/> palato mole <input type="checkbox"/> faringe (    ) face <input type="checkbox"/> laringe <input type="checkbox"/> septo nasal <input type="checkbox"/> outras

**IMPORTANTE**

- **Sorologia para HIV**
- **Sorologia para doença de Chagas**

**Observação**

---

**Critérios de Inclusão – LTA**

- Paciente deve ser proveniente de área endêmica para LTA
- Com diagnóstico clínico (diferentes formas clínicas) e
- Pelo menos um dos seguintes testes positivo: parasitológico, histopatológico com encontro de parasitos, PCR, Montenegro.

**Critérios de Exclusão – LTA**

- Apresentar outras infecções concomitantes,
  - Estar coinfestado com HIV,
  - Apresentar outras condições que levem à imunossupressão,
  - Mulheres grávidas,
  - Ter idade menor que 18 e maior que 65 anos.
-

## 6.6 Ficha do primeiro atendimento médico – outras doenças

### 9. Identificação

ID:		Data:
Nome:		
Data de Nascimento:	Sexo: Masculino ( ) Feminino ( )	
Local de residência:		
Ocupação:		
Histórico de viagens – especificar:		

### 10. Detalhes de participação

Consentimento para este estudo:	( ) Sim	( ) Não
Consentimento para estudos futuros:	( ) Sim	( ) Não
Data de entrada no estudo:	_____ / _____ / _____	

### 11. Histórico

Teve leishmaniose tegumentar progressiva? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei Quando _____ Fármaco que tomou _____ Duração do tratamento _____ Data da cura _____	Teve leishmaniose visceral/calazar? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei Quando _____ Fármaco que tomou _____ Duração do tratamento _____ Data da cura _____
--	--

### 12. Outras doenças

Doença de Chagas
------------------

Histoplasmose
Malária
Paracoccidiodomicose
Toxoplasmose
Tuberculose
Esporotricose

### 13. Dados Clínicos


### **IMPORTANTE**

- **Sorologia para HIV**
- **Sorologia para doença de Chagas**

### **Observação**

---

### **Critérios de Inclusão**

- Os critérios de inclusão para o grupo de outras doenças são
- Ter diagnóstico clínico e laboratorial de uma das doenças infecciosas a seguir
- Doença de Chagas, histoplasmose, malária, paracoccidiodomicose, toxoplasmose e tuberculose, esporotricose, etc

### **Critérios de Exclusão**

- Apresentar outras infecções concomitantes,
  - Estar coinfectado com HIV,
  - Apresentar outras condições que levem à imunossupressão,
  - Mulheres grávidas,
  - Ter idade menor que 18 e maior que 65 anos.
-

## 10.2 Figuras do IR vs número e evolução das lesões

