

**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

2020

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**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Dermatologia Tropical.

Orientador: **Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra**
Co-orientadora: **Prof^a. Dra. Hiro Goto**

MANAUS
2020

RESUMO

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. A LTA é diagnosticada com base em critérios clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. 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. Os testes moleculares também são empregados no diagnóstico da LTA. Devido às limitações dos demais métodos, pode-se recorrer a testes indiretos para a confirmação do diagnóstico de leishmaniose, ou para seguimento de casos. O ELISA apresenta sensibilidade de 92 a 95% e especificidade de 92 a 100%. É um método automatizável, que permite seu emprego em larga escala. Apresenta potencial para ser aplicado no diagnóstico e em estudos epidemiológicos de LTA. Antígenos recombinantes estão sendo desenvolvidos para a obtenção de uma técnica mais rápida e padronizada para o diagnóstico de LTA, que não dependa do crescimento do parasito. 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. O teste ELISA-rLb6H ainda está em fase experimental no diagnóstico da LTA, 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 LTA.

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

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is an infectious parasitic disease caused by different protozoa of the genus *Leishmania*, which belong to the order Kinetoplastida and the Trypanosomatidae family. ATL is diagnosed on the basis of clinical, laboratory and epidemiological criteria. Laboratory tests include scarification consisting of direct parasite search in the lesion, culture in NNN medium (Neal, Novy and Nicolle), inoculation in laboratory animals and histopathology. Molecular tests are also employed in the diagnosis of ATL. Due to the limitations of the other methods, indirect tests may be used to confirm the diagnosis of leishmaniasis or to follow up on cases. ELISA has a sensitivity of 92 to 95% and specificity of 92 to 100%. It is an automated method that allows its use on a large scale. It has potential to be applied in the diagnosis and epidemiological studies of ATL. Recombinant antigens are being developed to obtain a faster and standardized technique for the diagnosis of ATL that does not depend on parasite growth. Recently, the performance of recombinant *Leishmania* antigens was evaluated for the serological diagnosis of ATL caused by different *Leishmania* species by recombinant Lb6H and Lb8E antigens. The ELISA-rLb6H test is still in the experimental phase in the diagnosis of ATL, the need for further studies with serological tests using recombinant antigen (Lb6H) is of paramount importance to verify if this antigen continues to perform well in sensitivity and specificity. Thus, this study proposes the evaluation through the use of ELISA-rLb6H in the routine serological diagnosis for ATL.

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células 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 ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDRI	<i>Infectious Disease Research Institute</i>
IgG	Imunoglobulina G
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	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
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>
<i>L. (V.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) amazonensis</i>
N=	Número de indivíduos
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NNN	Neal, Novy & Nicolle

NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial
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	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Subgrupo de linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Subgrupo de linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR	Toll-like <i>receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da placa de ELISA-rLb6H.....	21
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	10
1.2 Epidemiologia.....	10
1.3 Imunologia na Leishmaniose Tegumentar Americana	12
1.4 Manifestações Clínicas na Leishmaniose Tegumentar	13
1.5 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	14
1.5.1 Diagnóstico Parasitológico	14
1.5.2 Diagnóstico Sorológico.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Tipo de estudo.....	19
4.2 Local de estudo	19
4.3 População de estudo.....	19
4.4 Padronização do teste ELISA-rLb6H.....	19
4.4.1 Antígeno recombinante	19
4.4.2 Procedimentos	20
4.4.2.1 Cálculo do <i>cut-off</i> do teste ELISA-rLb6H.....	21
4.4.1.3 Cálculo da sensibilidade do teste ELISA-rLb6H	22
4.4.1.4 Cálculo da especificidade do teste ELISA-rLb6H	22
4.4.2 TesteELISA-rLb6H	22
4.5 Avaliação do ensaio ELISA-rLb6H com amostras de áreas endêmicas da Região metropolitana de Manaus.....	22
4.6 Critérios de inclusão.....	23
4.7 Critérios de não inclusão	23
4.8 Aspectos éticos da pesquisa	23
4.9 Análise Estatística	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
6. ANEXOS	28
6.1 EQUIPE DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	29
6.2 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	30
6.3 ORÇAMENTO FINANCEIRO	31
6.4 TCLE	32
6.5 Ficha do primeiro atendimento médico	35

6.6 Ficha do primeiro atendimento médico – outras doenças	40
---	----

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 classe social (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, a região metropolitana de Manaus registrou o maior número de casos de LT com 8.939 casos, seguida do 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 NFκB (NF-kappaB), um fator de transcrição que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, 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-γ), 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 as enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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 intradermorreação 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 soroepidemiológicos 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).

Esses antígenos recombinantes estão sendo desenvolvidos para a obtenção de uma técnica mais rápida e padronizada para o diagnóstico de LTA, que não dependa do crescimento do parasito (42,43) ~~(50,51)~~. Para leishmaniose visceral, já estão disponíveis nos locais de atendimento aos pacientes, os ensaios utilizando antígenos recombinantes e testes rápidos imunocromatográficos (46). Porém, para leishmaniose tegumentar não há consenso, tampouco estão incorporados às rotinas, 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).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que o teste ELISA-rLb6H ainda está em fase experimental no diagnóstico da LTA, 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. Por isso, será testado com amostras de áreas endêmicas da região metropolitana de Manaus.

Conforme descrito acima, os dados sugerem que o diagnóstico sorológico da LTA utilizando antígeno recombinante Lb6H é um problema ainda não solucionado, desta forma, este estudo propõe a avaliação através da utilização de ELISA-rLb6H no diagnóstico sorológico de rotina para LTA.

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 do teste ELISA-rLb6H em amostras de pacientes com LTA residentes na região Metropolitana de Manaus;
2. Avaliar a especificidade do teste ELISA-rLb6H em amostras de indivíduos saudáveis residentes na região Metropolitana de Manaus;
3. Avaliar a reatividade cruzada do teste ELISA-rLb6H em amostras de indivíduos com outras doenças;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo prospectivo qualitativo 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 será 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 será constituída de 60 amostras pacientes com LTA confirmada por exames laboratoriais e 30 controles. Para investigar a possibilidade de reação cruzada serão utilizadas 10 amostras de pacientes com Doença de Chagas, 10 com Tuberculose 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/H₂O₂(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 H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram lidas em leitor de ELISA (Multiskan Go - ThermoScientific, Finlândia) com filtro de 450 nm.

		Elisa Lb6H - 7 Min											
amostra	conjugado	1/50						1/100					
		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 absorbância % do padrão positivo de cada amostra pelo valor do *cut-off* obtido em (B), conforme a equação:

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

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 serão enviadas pelo Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/FMUSP para Manaus, onde as amostras coletadas serão testadas.

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

Serão selecionadas amostras, prospectivamente, utilizando amostras frescas, recém-colhidas. Serão utilizadas amostras de soro de 60 pacientes com LTA e de 30 controles sadios e 30 com outras doenças infecciosas, tais como Doença de Chagas, malária e tuberculose.

A partir dos valores de *cut-off* obtidos no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/FMUSP, serão calculados os índices de reatividade das

amostras ensaiadas em Manaus. Também serão calculadas a sensibilidade e especificidade.

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, cultura ou imunofluorescência indireta;

Critérios de inclusão do grupo controle sadio: ser saudável ao exame clínico e laboratorial;

Critérios de inclusão para o grupo de outras doenças: ter diagnóstico clínico e laboratorial de uma das doenças infecciosas como: Doença de chagas, malária e tuberculose.

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;

Critérios de não inclusão de grupo controle sadio: apresentar doenças infecciosas, estar coinfestado com HIV, apresentar outras condições que levem à imunossupressão, grávidas, ter idade menor que 18 e maior que 65 anos;

Critérios de não inclusão para o grupo de outras doenças: 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.

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.

E pela Universidade do Estado do Amazonas (Manaus/AM) – CAAE: 83450418.8.3008.5015, aprovado em 28/05/2018, número do parecer: 2.679.177.

Aos pacientes de quem serão colhidos sangue e material da raspagem da borda lesão, como procedimento de laboratório, será perguntado se querem participar do projeto. Aos que aceitarem, após explicação dos objetivos do projeto, será solicitado que assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1) para que uma amostra seja submetida aos testes laboratoriais do projeto. Também será 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 serão fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0,05$).

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. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camargo LMA, Barcinski M. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Cienc Cult* [Internet]. 2003;55(1):34–7. Available from: 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. 2004;99(May):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. Jr GG, Momen H, McMahon-pratt D. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans , Wild Mammals , and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. 1991;(May 2018).
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. Vigil MDE. Manual de vigilância da. 2017.
9. Neves DP. Parasitologia Humana. Vol. 13. 2016.
10. Rey L. Parasitologia. 2008.
11. Basano SDA. *Basano*. 2004;7:328–37.
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 O. LEISHMANIOSES Informe Epidemiológico das Américas. 2018;
14. Neves LO, Priscilla E, Gadelha N, Augusto J, Guerra DO, Talhari AC, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina , pentamidina e anfotericina B para o tratamento da. 2011;86(6):1092–101.
15. Pinheiro FG, Farias M De, Castro LM. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE RIO PRETO DA EVA ,. 2009;38(2):103–14.
16. Amazon B. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. 2011;5(3):1–5.
17. Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Immune response mechanisms to infections *. 2004;79(6):647–64.
18. Freitas JCC De, Pinheiro DCSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. 2008;(55):11–20.
19. Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania* – Host-cell Interaction : 2000;16(7).
20. Bhattacharyya S, Ratajczak CK, Vogt SK, Kelley C, Colonna M, Schreiber RD, et al. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and I κ B regulation in Toll-like receptor – stimulated macrophages.

- 2016;115(10):1921–32.
21. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. 2008;213:377–87.
 22. Reis LDC, Edileuza M, Brito F De, Assis M De. NA RESPOSTA CELULAR E HUMORAL. 2006;35(81):103–15.
 23. Angelo J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. 2014;7210.
 24. Murback NDN, Filho GH, do Nascimento RAF, 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: challenging diagnosis in pediatric practice. *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, Ali A, Costa UML, Elkhoury AN, Bezerril ACR, Barral A, et al. Leishmaniose Cutânea Difusa (Lcd) No Brasil Após 60 Anos De Sua Primeira Descrição Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (Dcl) in Brazil After 60 Years of Your First Description. 2009;79(Lcd):16–24.
 27. Nunes CSA, Yoshizawa JK, Oliveira RZ de, Lima AP de, Oliveira LZ de, 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. 2013;31–41.
 29. Manetti C, Bocchi R, Fiorini A, Rogério F, Mara S, Aristides A, 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, Raphael E, Cesetti MV, Albergaria G, Bächtold B, et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction : systematic literature review and meta-analysis. 2015;110(April):157–65.
 31. Farias M De, Paula L De, Veloso F, Simas S, Maria A, Franco R. Experimental Parasitology Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. 2016;167.
 32. Al-hucheimi SN, Sultan BA, Al-dhalimi MA. Tropical medicine rounds A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. 2009;404–8.
 33. Fichoux YLE, Quaranta OIS, Aueuvre J, 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. 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.

- 2010;1–6.
35. Skraba CM, França T, Mello P De, Pedroso RB, Ferreira EC, Demarchi IG, et al. Major Article Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. 2015;48(4):437–44.
 36. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007;
 37. Morais OO De, Roselino AM. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis *. 2014;89(5):701–9.
 38. Royal OFTHE, Tropical OF. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran *. 1979;289–92.
 39. Sato CM, Arroyo C, Celeste J, Duthie MS, Guderian J, Reed SG. crossm Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. 2017;55(2):495–503.
 40. Barroso-freitas APT, Passos SRL, Mouta-confort E, Marzochi MCA, Marzochi KBF. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. 2009;
 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. 1989;1–6.
 42. Marzochi MCA, Sabroza PC. [Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study of resu ... 1980;(May).
 43. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK, et al. 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. 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. Leon LL, Mattos MS, Coutinho SG, Nogueira RS, de Souza e Souza I, Da-Cruz AM, 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. 2018;80(3):339–44.
 46. Cunningham J, Hasker E, Das P, El S, Goto H, Mondal D, et al. MAJOR ARTICLE A Global Comparative Evaluation of Commercial Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis. 2012;55.

6. ANEXOS

6.1 EQUIPE DE EXECUÇÃO DO PROJETO

N°	Nome	Formação	Instituição	Função/Projeto	Função
1	Nicolle Tayná Brandão dos Santos	Biomédica	FMT-HVD	Mestranda	Pesquisadora
2	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Médico	FMT-HVD	Orientador	Orientador
3	Hiro Goto	Médica	IMT/USP	Co-orientadora	Co-orientadora
4	Maria Carmen Arroyo Sanchez	Farmacêutica	IMT/USP	Colaboradora	Auxílio na análise de dados
5	Ruth T. Valencia Portillo	Bióloga	IMT/USP	Colaboradora	Realização da técnica sorológica
6	Maria Auxiliadora Cruz Messa Chiarion	Farmacêutica	FMT-HVD	Colaboradora	Acompanhamento na técnica sorológica
7	Susan Smith Doria	Química	FMT-HVD	Colaboradora	Acompanhamento na técnica sorológica

6.3 ORÇAMENTO FINANCEIRO

Este projeto faz parte de um projeto piloto que está sendo financiado pelo LIM-38-FMUSP, o qual, tem a Dra. Hiro Goto como coordenadora.

ESPECIFICAÇÃO	UNIDADE	VALOR TOTAL
IgG Anti-human	2 mL	726,7
Leite (Molico®)	1 lata	24,69
Placas de poliestireno Costar 3690	50U	1100
TMB	50U	662
Tween 20	100 mL	194,4
Ácido sulfúrico	1L	85
Tubo falcon		
Microtubos 1,5 ml	500U	74,97
Cloreto de sódio	500G	33,18
Bicarbonato de sódio	1KG	66,28
Carbonato de sódio	500G	51,06
Fosfato de sódio bibásico	1KG	235,59
Fosfato de sódio monobásico	500G	164,14
TOTAL		3.418

6.4 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 gerência 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: _____ / _____ / _____		

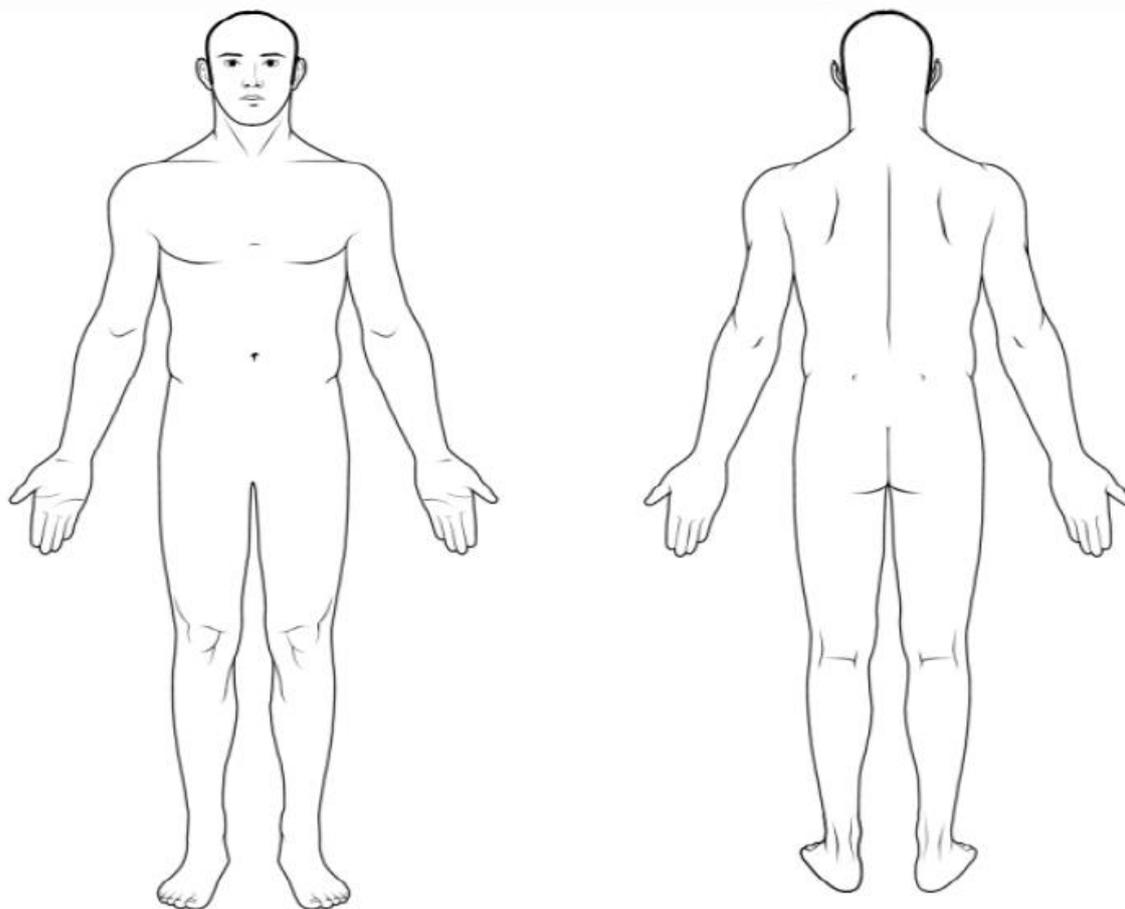
3. Histórico

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

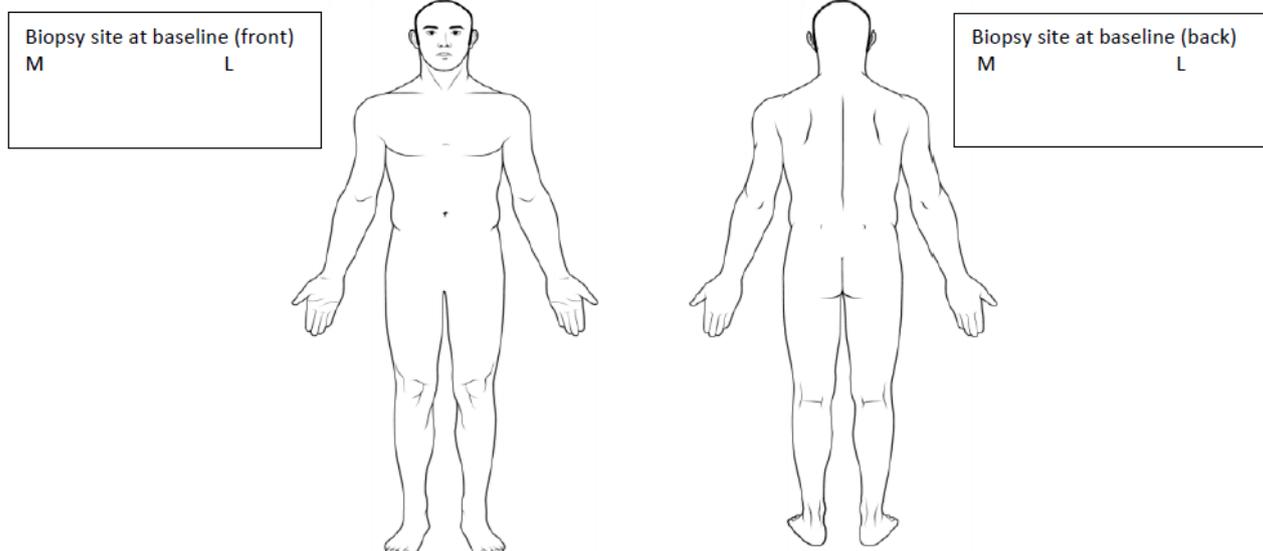
Presenting sign(s): Please indicate which of the following clinical features are evident and the number of lesions at the time of presentation and if possible the duration of the lesion (s).	Presence of lesion types	Number of lesions; tick relevant box	Duration in months (if less than one month in weeks)
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 (≤5mm 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"/>	
Ulcerative change			
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 (> 5mm diameter, palpable elevation with central ulceration)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2-5 <input type="checkbox"/>	
Other features associated with acute lesion(s)			
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"/>	
Sequelae from resolved or resolving lesion(s)			
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 () sim () não
Teve leishmaniose cutânea pregressa () sim () não
Localização das lesões: () nariz () palato mole () faringe () face () laringe () septo nasal () 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 coinfectado 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
Paracoccidioidomicose
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, paracoccidioidomicose, toxoplasmose e tuberculose, esporotricose, etc

Critérios de Exclusão

- 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.
-