Camila Massae Sato

**Diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana causada por
espécies diferentes de *Leishmania***

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional**

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

**São Paulo
2017**

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Sato, Camila Massae

Diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de Leishmania / Camila Massae Sato. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA. 2. LEISHMANIA. 3. DIAGNÓSTICO. 4. TESTES SOROLÓGICOS. 5. ELISA. 6. ANTÍGENOS.

USP/IMTSP/BIB-19/2017.

A minha Mãe e a minha Avó:

Obrigada por tudo que fizeram por mim
a vida toda para que eu pudesse estudar e ir
atrás dos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que na sua infinita bondade e sabedoria, me concedeu o dom mais precioso: a vida, me deu forças e me amparou, mesmo diante de todos os problemas que surgiram no meio do caminho, me confortou e deu coragem para que eu pudesse seguir em frente e superar minhas dificuldades.

Aos meus pais, Tereza Sato e José Sato, a minha avó Yuriko Ikeno e aos meus irmãos, Lyslaine Sato e Fernando Sato, dos quais recebi amor, e por isso sou infinitamente grata. Ensinaram-me a lutar e viver com dignidade, incentivando-me a seguir com garra. Tantas vezes compartilharam com meu cansaço e preocupação, mas mesmo assim me incentivaram a prosseguir e crescer.

Ao Ailon Filho por todo o carinho e compreensão, e por estar ao meu lado mesmo a quilômetros de distância.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Hiro Goto, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório para a realização deste trabalho, obrigada por todo o cuidado, atenção e paciência que teve comigo neste processo.

Prof^a. Dr^a. Maria Carmen Arroyo Sanchez que sempre teve disponibilidade para ouvir e esclarecer as minhas dúvidas e que com a sua sabedoria soube dar a este percurso um toque de tranquilidade, obrigada pela gentileza e contribuição.

Ao Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso pelas palavras de conforto e por me fazer acreditar que no final tudo dá certo.

Ao Infeccion Disease Research Institute – IDRI – Seattle – USA, em especial ao Prof. Dr. Steven Reed e ao Prof. Dr. Malcolm Duthie pelo fornecimento dos antígenos utilizados neste trabalho e pela troca de informações.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em especial a Mahyumi Fujimori, pela amizade e pela essencial ajuda nos momentos mais frustrantes, a Msc. Beatriz Celeste, Msc. Christiane Ozaki e ao Dr. Eduardo Sanchez, por me explicarem os protocolos utilizados no início do projeto, conhecimentos de suma importância que foram transmitidos para o meu crescimento científico.

Aos colaboradores, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Instituto Evandro Chagas, Instituto Emílio Ribas, Universidade Federal do Pará e a Universidade Nilton Lins, sem os quais não teria sido possível o desenvolvimento desse projeto.

As agências de fomento à pesquisa, CAPES e FAPESP, pela concessão da bolsa parcial que otimizou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, muito obrigada.

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do
céu.”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

Sato CM. Diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de *Leishmania* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e compreende um grupo de doenças que apresentam características clínicas, histopatológicas e imunológicas distintas. O diagnóstico é realizado em base epidemiológica, clínica e patológica, confirmadas por exames parasitológicos positivos e demonstração de hipersensibilidade retardada a antígeno de leishmânia. Os testes sorológicos para o diagnóstico, utilizados até o momento, apresentam várias limitações e por isso é de grande importância identificar proteínas recombinantes de leishmânia, para que sejam testadas como potenciais antígenos para o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico da LTA. Neste estudo, foram utilizadas duas proteínas recombinantes de leishmânia altamente conservadas, Lb8E e Lb6H, derivadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Lb), avaliando a sua capacidade para detectar anticorpos no soro de vários grupos de pacientes por teste imunoenzimático (ELISA). Os antígenos recombinantes reagiram com amostras de 83,3% e 100,0% (Lb6H) dos pacientes com LTA e 95,4% (Lb8E) e 89,4% (Lb6H) dos soros de pacientes de leishmaniose visceral (LV). Em amostras de indivíduos saudáveis, as reações com Lb8E e Lb6H foram altamente específicas. Soros de 219 pacientes com LTA infectados com diferentes espécies de leishmânia prevalentes no Brasil (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi*) e amostras de pacientes com outras infecções parasitárias foram avaliados para a presença de anticorpos anti-rLb6H, obtendo-se sensibilidade de 100,0% nas 219 amostras de LTA e especificidade geral de 93,9% (considerando 68 indivíduos saudáveis e 213 pacientes com outras doenças infecciosas). Além disso, as amostras de outras doenças infecciosas indicaram provável ausência de reação cruzada, pois apenas uma minoria de amostras de pacientes com doença de Chagas possuía anticorpos contra rLb6H e essas respostas foram baixas. Enfim, os resultados obtidos sugerem que a técnica de ELISA utilizando o antígeno rLb6H pode ser considerada para uso na rotina do diagnóstico sorológico da LTA.

Descritores: Leishmaniose cutânea. *Leishmania*. Diagnóstico. Testes sorológicos. ELISA. Antígenos

ABSTRACT

Sato CM. Serologic diagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different species of *Leishmania* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is caused by various species of protozoan of the genus *Leishmania* and comprises a group of diseases that present distinct clinical, histopathological and immunological characteristics. The diagnosis is performed based on epidemiological, clinical and pathological features, supported by positive parasitological tests and presence of delayed hypersensitivity to *Leishmania* antigens. The serological tests used to date have several limitations and therefore it is of great importance to identify recombinant proteins from *Leishmania* so that they can be tested as potential antigens for the development of techniques for the diagnosis of ATL. In this study, two highly conserved *Leishmania* recombinant proteins, Lb8E and Lb6H, derived from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Lb), were used, evaluating their ability to detect antibodies in the serum of several groups of patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Recombinant antigens detected 83.3% (Lb8E) and 100.0% (Lb6H) ATL patients, and 95.4% (Lb8E) and 89.4% (Lb6H) visceral leishmaniasis (VL) patients. These reactions with Lb8E and Lb6H were highly specific in healthy subjects. Sera from ATL patients infected with different species of *Leishmania*, prevalent in Brazil, (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) shawi*) and samples from patients with other parasitic infections were evaluated for the presence of anti-rLb6H antibodies. In 219 ATL, the sensitivity was 100.0% e the general specificity, considering 68 healthy subjects and 213 patients with other infectious diseases. In addition, samples from other infectious diseases indicated a probable lack of cross-reactivity, as only a minority of samples from patients with Chagas disease had antibodies against rLb6H and all of these responses were low. Finally, the results suggest that the ELISA using rLb6H antigen may be considered for routine use for serological diagnosis of ATL.

Descriptors: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania*. Diagnostics. Serological tests. ELISA. Antigen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação atualizada de <i>Leishmania</i> (modificado)	17
Figura 2 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp	18
Figura 3 - Incidência mundial da leishmaniose tegumentar no ano de 2013	19
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	21
Figura 5 - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar	22
Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE do antígeno Lb8E. Massa molecular = 18 kDa	28
Figura 7 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE do antígeno Lb6H. Massa molecular = 79 kDa	28
Figura 8 - Curvas ROC construídas a partir das absorbâncias de amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb8E	39
Figura 9 - Curvas ROC construídas a partir das absorbâncias de amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H	40
Figura 10 - Curvas ROC construídas a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo” calculados para as amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb8E	40
Figura 11 - Curvas ROC construídas a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo” calculados para as amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H	41
Figura 12 - Curva ROC construída a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo” calculados para as 68 amostras positivas para leishmaniose tegumentar e 68 amostras negativas, utilizando o antígeno total de <i>L. major</i> -like	41
Figura 13 - Distribuição dos Índices de Reatividade das amostras de leishmaniose tegumentar estudadas no teste ELISA, empregando o antígeno recombinante Lb6H (a) e o antígeno total de <i>L. major</i> -like (b),	

considerando os *cut-offs* calculados a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*” das amostras de soro de indivíduos sadios e com LT, empregadas na construção das curvas ROC 45

Figura 14 - Distribuição dos Índices de Reatividade das 213 amostras de outras doenças no teste ELISA, empregando o antígeno recombinante Lb6H (a) e antígeno total *L. major*-like (b), considerando os *cut-offs* calculados a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*” das amostras de soro de indivíduos sadios e com LT, empregadas na construção das curvas ROC 46

Figura 15 - Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para LT, para LV e amostra negativa, para o antígeno recombinante Lb6H, em estudo de repetitividade 47

Figura 16 - Distribuição dos índices de reatividade de amostras de LV (a), LT (b) e amostra negativa (c), para o antígeno recombinante Lb6H, em estudo de reprodutibilidade 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com LT	366
Tabela 2 - Conservação de aminoácidos entre espécies de protozoários	377
Tabela 3 - Parâmetros específicos empregados para cada um dos antígenos	388
Tabela 4 - Desempenho dos antígenos frente às amostras empregadas na construção das curvas ROC, considerando diferentes cut-offs	433
Tabela 5 - Positividade do teste ELISA frente a 213 amostras de pacientes com parasitológico positivo para outras doenças infecciosas	455
Tabela 6 - Coeficiente de variação das amostras positivas e negativa no estudo de repetitividade e média dos índices de reatividade das amostras positivas e negativa	477
Tabela 7 - Coeficiente de variação das amostras positivas no estudo de reprodutibilidade e médias dos índices de reatividade das amostras positivas e negativa	499

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	Ácido bicineconínico
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
ELISA	<i>Enzyme-liked immunosorbent assay</i>
FMT – HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
IDRI	<i>Infectious Diseases Research Institute</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
IMT-SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IR	Índice de Reatividade
kDa	kilodaltons
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infatum</i>
<i>L. major-like</i>	<i>Leishmania major-like</i>
LR	Limiar de reatividade
N=	Número de indivíduos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Histórico	15
1.2	Classificação e nomenclatura	16
1.3	Epidemiologia	18
1.4	Agente etiológico e ciclo de vida	20
1.5	Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar	21
1.6	Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	23
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Casuística	27
3.2	Aspectos éticos da pesquisa	28
3.3	Antígenos Recombinantes	28
3.4	Antígeno <i>L. major</i> -like	30
3.5	Padronização do teste imunoenzimático ELISA com antígenos rLb8E, rLb6H e <i>L. major</i> -like	30
3.6	Cálculo do Limiar de Reatividade (<i>cut-off</i>) e do Índice de Reatividade	31
3.7	Testes analíticos	32
3.7.1	Sensibilidade e especificidade	32
3.7.2	Repetitividade	33
3.7.3	Reprodutibilidade	33
3.7.4	Reação cruzada	33
3.8	Outros parâmetros	33
3.9	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Pacientes	35
4.2	Análise dos antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H	35
4.3	Padronização do teste imunoenzimático ELISA	37
4.4	Protocolo final do ELISA-Lb8E, ELISA-Lb6H e ELISA- <i>L. major</i> -like	38
4.5	Cálculo do <i>cut-off</i> e avaliação dos testes ELISA	39

4.6	Reatividade de rLb6H em pacientes com LT causada por diferentes espécies de leishmânia	44
4.7	Análise da reatividade cruzada	45
4.8	Repetitividade	46
4.9	Reprodutibilidade	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	55
	APÊNDICE	68
	ANEXO A	77
	ANEXO B	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. (1, 2). Cerâmicas pré-colombianas (huacos peruanos), datadas aproximadamente de 500 anos d.C., mostram vasos com reprodução de figuras humanas sadias e com diferentes moléstias, destacando-se figuras com mutilações faciais semelhantes a lesões cutâneas (uta) e mucosas (espundia), características de leishmaniose tegumentar (3-5).

Um dos primeiros relatos de leishmaniose no Brasil encontra-se na tese de Júlio C. Tello, “La Antigüedad de la sífilis en el Perú”, de 1909 onde ele descreve a viagem de Frei dom Hipólito Antonio Sánchez Rangel de Fayas y Quiros, realizada em 1827, da cidade de Tabatinga (AM) até o Pará (6). Em sua viagem, o missionário percorreu regiões do vale do rio Amazonas onde observou a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz (7, 8).

Cunningham, em 1885, observou pela primeira vez o parasito pertencente ao gênero *Leishmania*, em material de biopsia de lesão de um paciente com botão do Oriente, como era chamada a doença no Oriente Médio (4). No Brasil, no mesmo ano, Cerqueira identificou lesões de pele semelhantes ao botão do Oriente (9).

Em 1903, Leishman identificou o parasito na biopsia hepática de um paciente. No mesmo ano, Ross classificou o gênero *Leishmania* em honra ao seu descobridor e Wright classificou como *Leishmania tropica* o agente etiológico do botão do Oriente (10, 11).

No entanto, no Brasil, a leishmaniose só foi confirmada pela primeira vez em 1909 por Lindenberg, que encontrou as formas de leishmânia idênticas a *Leishmania tropica* em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior de São Paulo. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, batizou como *Leishmania braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da

“úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (4). Até a década de setenta, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis*. No entanto, já foram identificadas no Brasil, sete espécies causadoras da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (12).

1.2 Classificação e nomenclatura

O gênero *Leishmania* pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae (5, 13, 14), como mostrado na Figura 1. Posteriormente, o gênero *Leishmania* foi subdividido em dois subgêneros: *Viannia* (15) e *Leishmania* (16).

É um protozoário, parasito intracelular caracterizado por apresentar mitocôndria única, que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto (17). É um parasito digenético intercalando seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Durante seu ciclo de vida, apresenta duas formas evolutivas: amastigota e promastigota (Figura 2A e 2B, respectivamente) (2).

As amastigotas não são móveis, possuem estrutura pequena (2 a 6µm de comprimento por 1,5 a 3µm de largura) (14, 18), residem dentro de macrófagos dos hospedeiros vertebrados, são arredondadas ou ovóides, intracelulares obrigatórias que infectam células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos (19). No citoplasma são encontrados vacúolos, núcleo arredondado, cinetoplasto em forma de bastão situado próximo ao núcleo (20). O flagelo, nesta forma, é rudimentar, internalizado e mantido na bolsa flagelar, visualizado apenas em microscópio eletrônico de transmissão (21, 22).

A forma promastigota é extracelular, móvel, comprida e achatada (14 a 20µm de comprimento, por 1,5 a 4µm de largura) (14, 18). Apresenta um longo flagelo que emerge de uma bolsa flagelar (pequena invaginação na região anterior do parasito). Ele é responsável pela mobilidade e fixação do parasito no epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (23). A estrutura deste flagelo é típica de um axonema eucariótico com o característico arranjo de microtúbulos ligados à dineína. O núcleo

Figura 1 - Classificação atualizada de *Leishmania* (modificado)
 Fonte: Akhoundi, 2016

do protozoário é arredondado ou oval e está situado na porção mediana ou anterior do corpo celular (24).

A divisão nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foi baseada na posição ocupada pelo parasito no tubo digestivo do vetor, que pode ser na região peripilária ou suprapilária. As espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino anterior e médio, na região suprapilária. Já as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se no intestino anterior, médio e posterior, na região peripilária (25, 26).

Figura 2 - Formas evolutivas de *Leishmania* spp. A. amastigota. B. promastigota.
Fonte: Brasil, 2010

1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose está entre as seis doenças infecciosas de maior importância no mundo, devido à sua alta potencialidade em causar deformidades e afetar a capacidade produtiva, comprometendo a vida psicossocial e econômica do indivíduo afetado, podendo ser considerada uma doença ocupacional. Endemia emergente, negligenciada e subnotificada, afeta principalmente populações inseridas no ciclo da pobreza e da desigualdade social (27). As leishmanioses ocorram em 98 países distribuídos em cinco dos seis continentes e sua notificação é compulsória em apenas 30 países (Figura 3). Estima-se que ocorram anualmente no mundo 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 (28, 29).

A leishmaniose é classificada de acordo com a região em que ocorre, o “Novo Mundo” (As Américas) ou o “Velho Mundo” (África, Ásia, Europa). 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 (29, 30).

No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (16) e são reconhecidas sete espécies de leishmânia pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, causadoras da LT no homem (5, 31): *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Leishmania (V.) guyanensis*; *Leishmania (V.) naiffi*; *Leishmania (V.) shawi*; *Leishmania (V.) lainsoni*; *Leishmania (V.) lindenbergi* e *Leishmania (L.) amazonensis*.

Os casos de LT são relatados na África, principalmente em Marrocos, Etiópia e Tunísia. No Oriente Médio, a LT ocorre principalmente no Afeganistão, Paquistão, Irã, Iraque, Síria e Arábia Saudita. Na América Latina, há casos de LT principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Mais de 90% das leishmanioses cutâneas ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e 90% das mucocutâneas ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (32, 33).

Figura 3 – Incidência mundial da leishmaniose tegumentar no ano de 2013

Fonte: Organização Mundial da Saúde

1.4 Agente etiológico e ciclo de vida

A transmissão das espécies de leishmânia ao hospedeiro ocorre durante a picada de fêmeas do inseto vetor, o flebótomo, pertencente à ordem díptera; também é conhecido vulgarmente, como “mosquito-palha”, “cangalhinha” e “birigui”. O ciclo evolutivo e a transmissão da leishmânia ocorrem quando flebotomíneos efetuam o repasto sanguíneo em indivíduos ou animais infectados por alguma espécie do gênero *Leishmania* e, juntamente com o sangue e/ou a linfa intersticial, ingerem as formas amastigotas do parasito. Dentro do tubo digestivo do inseto, o parasito sofre mudanças morfológicas que incluem o aparecimento de um flagelo na região anterior, assumindo a forma de um promastigota (34). Nesta fase, a leishmânia se multiplica por divisão binária originando um grande número de parasitos que invadem as porções anteriores do estômago e do proventrículo do inseto vetor. As formas promastigotas do parasito são fagocitadas por células do sistema monocítico do hospedeiro. O fagossomo se une ao lisossoma e, para a sua adaptação às condições do novo ambiente, o parasito se transforma na forma amastigota, forma do parasito que possui um flagelo quase imperceptível. Os parasitos se multiplicam por divisão binária simples até que, por sua quantidade e pela destruição produzida na célula hospedeira, a mesma se rompe e os parasitos são liberados no meio intercelular para serem fagocitados por outros macrófagos, ou ingeridos por insetos flebotomíneos, reiniciando o ciclo. Fatores relacionados às espécies de parasitos e da resposta imune do hospedeiro determinarão um quadro sintomático, com o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar ou visceral (Figura 4) (35, 36).

Figura 4 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp.
Fonte: Organização Mundial de Saúde

1.5 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar

As várias espécies do gênero *Leishmania*, vetores e reservatórios vertebrados, diferentes ambientes geográficos, originam as distintas formas clínicas da LTA, que vão desde formas inaparentes até lesões disseminadas, atingindo a pele e as mucosas (33, 37). A variabilidade genética encontrada em isolados e cepas de *L. (V). braziliensis* é responsabilizada pelo considerável espectro da enfermidade (38).

A LTA apresenta várias formas clínicas (39), de acordo com a espécie de leishmânia envolvida, conforme mostra a Figura 5, e é classificada em (12, 33):

- Leishmaniose cutânea localizada (LC): é a forma mais comum; apresenta ulcerações na pele que são localizadas e geralmente únicas, e podem evoluir para cura espontânea, deixando cicatrizes atróficas com superfície lisa. A úlcera típica apresenta formato ovalado ou arredondado, com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme e bordas elevadas, medindo de alguns milímetros a alguns centímetros.

- Leishmaniose cutânea disseminada (LCD): é caracterizada por inúmeras lesões papulares e de aparência acneiformes distribuídas por várias regiões do corpo, que posteriormente podem ulcerar.

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

•Leishmaniose mucocutânea (LMC) e Leishmaniose mucosa (LM) têm como principal agente etiológico *L. (V.) braziliensis* (40). Na maioria das vezes são secundárias às lesões cutâneas. São caracterizadas por destruição do tecido, envolvendo mucosas e cartilagens. Estas lesões surgem lentamente (41). Na LMC também aparecem lesões na pele.

Figura 5 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar

A) Leishmaniose cutânea localizada; B) Leishmaniose cutânea disseminada; C) Leishmaniose difusa e D) Leishmaniose mucocutânea

Fonte: Goto, 2010 (modificado)

1.6 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em dados epidemiológicos, características clínicas e resultados de testes laboratoriais, que incluem exame parasitológico e ensaios sorológicos (33).

Os exames parasitológicos compreendem pesquisa direta do parasito na lesão, cultura em meio NNN (Neal, Novy e Nicolle), isolamento *in vivo* por inoculação em animais, biópsia e histopatologia. Também são empregados métodos moleculares e métodos imunológicos, como intradermoreação de Montenegro, imunofluorescência indireta (IFI), teste imunoenzimático (ELISA) (12, 33, 42, 43). No entanto, não há um método único que possa ser adotado como padrão ouro para o diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp. (44, 45).

O diagnóstico clínico pode ser realizado com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Porém, o amplo espectro de lesões dificulta esta forma de diagnóstico, tornando-o nem sempre simples ou imediato, e ainda se fazendo necessário o diagnóstico diferencial, uma vez que as úlceras dérmicas formadas pela LTA podem se confundir com enfermidades como: hanseníase, sífilis e tuberculose cutânea (46, 47).

Os exames parasitológicos contemplam as técnicas de esfregaço ou preparações microscópicas realizadas com fragmentos, que permitem a observação direta do parasito, cultivo do material proveniente de lesões e a inoculação em animais (48). A sensibilidade varia de 15 a 90% e depende do tempo de evolução da lesão, sendo menor após 3 meses de evolução, nas formas crônicas e hiperérgicas (45, 49). Quando positivos, dão o diagnóstico de certeza, porém podem ter baixa sensibilidade e são laboriosos (50).

Outra possibilidade para o diagnóstico é o uso de técnicas moleculares que pesquisam fragmentos de DNA do parasito. O ensaio de PCR para *L. infantum* usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, exibindo sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (51, 52). No entanto, em resultados de outro estudo, indicaram que a parasitemia pode ser episódica podendo acarretar baixa quantidade de parasitos no sangue no momento da coleta e, portanto, não detecção pela PCR.

Além disso, as técnicas moleculares necessitam de equipamentos específicos que nem todos os laboratórios possuem (33, 50, 53).

A intradermoreação de Montenegro avalia a resposta de hipersensibilidade celular retardada (4, 54) a antígenos de leishmânia sendo de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitos estão escassos ou ausentes. É bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas, porém, o teste é positivo durante a doença e após a cura, não diferenciando doença atual de pregressa, além de habitualmente ser negativo na forma difusa, e apresentando sensibilidade que varia de 30% a 100% e especificidade em torno de 75% (12, 55, 56).

Os métodos sorológicos para pesquisa de anticorpos antileishmânia no soro de pacientes portadores de LTA não são procedimentos rotineiros para o diagnóstico da forma cutânea localizada, devido à sensibilidade variável ou baixa e reatividade cruzada com outras infecções (57, 58). A IFI utiliza formas promastigotas e apresenta sensibilidade de 80% podendo alcançar 100% na forma mucosa, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa, podendo ter um papel complementar no diagnóstico (59, 60). No entanto, esse valor varia dependendo do técnico que realiza a leitura. A IFI não é facilmente adaptável a estudos soropidemiológicos de grande escala devido às limitações de disponibilidade de parasitos e microscópios de fluorescência (61, 62). O ELISA apresenta alta sensibilidade (92 e 95%) e especificidade (92 e 100%). Trata-se de um método facilmente automatizável, permitindo assim seu emprego em larga escala. Apresenta potencial para ser aplicado no diagnóstico individual e estudos epidemiológicos de LTA, (45, 63).

No entanto, resultados variáveis foram alcançados com métodos sorológicos; a sensibilidade e a especificidade dos métodos dependem do tipo, da fonte, da pureza, da preparação dos antígenos utilizados e da espécie de leishmânia (58, 59, 64-67).

A utilização de extratos totais preparados a partir de cultura do parasito representa grande inconveniente na sorologia da leishmaniose. Visando o aprimoramento dos métodos de sorologia para leishmaniose, antígenos recombinantes vêm sendo desenvolvidos para que se possa obter uma técnica rápida,

mais padronizada e uniforme para o diagnóstico dessa doença (61-63), independente do crescimento do parasito.

Hsp60 de *L. major* (68) foi clonado e testado na Colômbia, onde diferenciou amostras de pacientes com LC de amostras de indivíduos sadios; Hsp70 de *L. braziliensis* (69) foi clonado e testado em pacientes com LM no, Brasil, apresentando 89% de sensibilidade. Mais recentemente, Hsp70 de *L. infantum* foi testado em amostras de LC e LM, sendo considerado promissor, com sensibilidade de 65,0% e especificidade de 92,0% (70). Hsp83 de *L. (L.) infantum* apresentou 100% de reatividade em amostras de LC e LM e ausência de reação cruzada com amostras de soro da doença de Chagas (71). Em estudo mais recente, Hsp83 foi comparado ao extrato total de *L. major*-like no diagnóstico de LV, LC e LM, sendo o antígeno recombinante significativamente mais sensível e específico que o extrato total (72). Esses resultados haviam sinalizado que o antígeno Hsp83 era um antígeno promissor para o diagnóstico das leishmanioses. Entretanto, quando foi aumentada a escala de produção, verificou-se que o antígeno não apresentava a estabilidade necessária para ser utilizado no diagnóstico.

Pelo exposto acima, conclui-se que o diagnóstico da LTA é uma questão ainda em aberto no nosso meio e é premente a busca de uma solução. Neste projeto, propomos a padronização de um teste sorológico, imunoenzimático ELISA, utilizando antígenos recombinantes Lb6H e Lb8E para o diagnóstico da LTA, empregando amostras de regiões onde são prevalentes diferentes espécies de leishmânia.

2 OBJETIVOS

Geral

Avaliar teste imunoenzimático ELISA no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de leishmânias, utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Específicos

1. Padronizar o teste sorológico imunoenzimático ELISA empregando os antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H;
2. Avaliar a sensibilidade do teste ELISA utilizando os antígenos recombinantes em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana causada por diferentes espécies de leishmânia;
3. Avaliar a especificidade e possibilidade de reatividade cruzada do teste ELISA utilizando os antígenos recombinantes em amostras de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com outras doenças infecciosas, respectivamente;
4. Avaliar a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados obtidos no teste ELISA com antígenos recombinantes;
5. Comparar a sensibilidade e especificidade do teste ELISA utilizando antígenos recombinantes e antígeno total (*Leishmania major*-like).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Para a padronização dos testes sorológicos foram utilizadas amostras de soro humano provenientes da Teca de Soros Humanos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT - SP).

Para avaliar a sensibilidade, foram utilizadas 66 amostras de soros de indivíduos pacientes com LV e 68 amostras de pacientes com LT, cujo diagnóstico foi confirmado por exame parasitológico positivo.

Para avaliar a especificidade, foram utilizadas 68 amostras de soros de indivíduos sadios, sem relato de leishmaniose ou deslocamento para área endêmica.

Para avaliar o potencial de reatividade cruzada, foram utilizadas 213 amostras de pacientes com outras patologias: Doença de Chagas (N=91); Histoplasmose (N=4); Malária (N=14); Paracoccidioidomicose (N=22); Toxoplasmose (N=69) e Tuberculose (N=13).

Para os ensaios clínicos, foram utilizadas 219 amostras de soro de pacientes com LTA, cedidas pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT - HVD), Instituto Evandro Chagas (IEC) e Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). Essas amostras foram obtidas de diferentes regiões onde as espécies de leishmânia estão presentes, sendo: região Norte (Manaus - AM e Belém - PA), região Nordeste (Recife - PE) e região Sudeste (São Paulo - SP). Foram utilizados para identificar as espécies infectantes: anticorpos monoclonais (13) (amostras de Belém - PA), PCR-RFPL de Hsp70 (73, 74) (amostras de Manaus - AM) e schizodemas (75) (amostras de Recife - PE).

As 500 amostras empregadas estão devidamente identificadas e armazenadas em freezer -20 ou -80°C.

3.2 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob parecer n° 490.392 – 513/13 (ANEXO A).

Aos pacientes de quem foram colhidos sangue e material de raspagem da borda da lesão, como procedimento de rotina de laboratório, foi perguntado se queriam participar do projeto. Aos que aceitaram, após explicação dos objetivos do projeto, foi solicitado que assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) para que uma amostra fosse submetida aos testes laboratoriais do projeto.

3.3 Antígenos Recombinantes

Os antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H, utilizados neste estudo foram produzidos pelo IDRI (Instituto de Pesquisas de Doenças Infecciosas – Seattle, Estados Unidos). Esses antígenos foram identificados durante o rastreio de *L. braziliensis* na biblioteca de expressão genômica com soro de um paciente com LM (76).

Para a amplificação por PCR, empregaram-se *primers* contendo sítio 5= NdeI, seguido de resíduos que codificam região aminoterminal com cauda de seis resíduos histidina (His6), e sítio 3= EcoRI, seguido de resíduos que codificam o códon terminal. O produto de amplificação do PCR foi digerido com NdeI e EcoRI e ligado ao vetor pET 17b e a seguir transformado em *Escherichia coli* BL-21 para expressão da proteína (77).

O antígeno rLb8E foi purificado a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de agarose Ni-NTA; rLb6H foi purificado a partir dos corpos de inclusão insolúveis. As frações das proteínas foram purificadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A concentração proteica foi avaliada de acordo com o método do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

As figuras 6 e 7 mostram a análise do perfil eletroforético em SDS-PAGE dos antígenos rLb8E e rLb6H, respectivamente.

Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE do antígeno Lb8E. Massa molecular = 18 kDa

Figura 7 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE do antígeno Lb6H. Massa molecular = 79 kDa

3.4 Antígeno *L. major*-like

O extrato total de promastigotas de *L. major*-like (MHO/BR/71/49) foi preparado conforme descrito por Hoshino-Shimizu e colaboradores, com modificações (78-80).

3.5 Padronização do teste imunoenzimático ELISA com antígenos rLb8E, rLb6H e *L. major*-like

A padronização do teste ELISA com os antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H e o extrato total de promastigotas de *L. major*-like, foi realizada em placas de poliestireno de meia área com fundo plano, sendo empregados soros padrão positivo e padrão negativo.

As condições a seguir foram mantidas constantes:

- a) Concentração do antígeno:
 - Antígenos recombinantes: 1 µg/mL
 - Antígeno total: 5 µg/mL
- b) Placas sensibilizadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C
- c) Lavagens com PBS-Tween 20, sendo três e/ou cinco vezes rápidas
- d) Volume de 50 µL de cada diluição do soro
- e) Emprego de um soro padrão positivo e quatro soros padrão negativo em todas as placas
- f) Incubação dos soros por 30 minutos a 37°C em câmara úmida
- g) Volume de 50 µL de conjugado anti-IgG humana-peroxidase
- h) Incubação do conjugado em estufa a 37°C por 30 minutos em câmara úmida
- i) Volume de 50 µL do substrato
- j) Volume de 25 µL da solução de interrupção da reação do cromógeno

As condições abaixo foram variadas a fim de escolher a que fornecia melhor desempenho diagnóstico:

- a) Bloqueio das placas: foram testadas condições sem bloqueio e com bloqueio de 2 horas com solução contendo leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé, Brasil)

- b) Diluição das amostras e do conjugado: utilizou-se solução contendo leite desnatado a 2% e 5%
- c) Diluição das amostras: as amostras de soro humano foram aplicadas nas placas, em duplicata e testadas nas diluições 1/50 e 1/100 (para antígenos recombinantes) e 1/40; 1/80; 1/160; 1/320 e 1/640 (para antígeno total)
- d) Conjugado: conjugado anti-IgG humana-peroxidase, produzido em cabra foi testado nas diluições de 1/10.000, 1/20.000 e 1/30.000
- e) Solução cromógena: foi utilizada a solução de tetrametilbenzidina (TMB), incubando por 7 e 10 minutos à temperatura ambiente e interrupção da reação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N.

3.6 Cálculo do Limiar de Reatividade (*cut-off*) e do Índice de Reatividade

Foram empregados dois procedimentos para cálculo do *cut-off* ou limiar de reatividade (LR) dos testes ELISA-rLb8E, ELISA-rLb6H e ELISA-L. *major*-like e para o cálculo do índice de reatividade (IR) de cada amostra.

a) Método da absorbância das amostras: Para determinação do *cut-off* dos testes ELISA empregando cada um dos três antígenos estudados, foram construídas curvas ROC (*receiver operating characteristic*) a partir das absorbâncias de 68 amostras de pacientes com LT, 66 de pacientes com LV e 68 de indivíduos declarados sadios (81, 82). O IR foi calculado dividindo-se os valores da absorbância de cada amostra pelo valor do *cut-off*. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentavam $IR \geq 1$. O cálculo do IR foi realizado pela aplicação da seguinte equação:

$$IR = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{cut} - \text{off}}$$

b) Método da absorbância percentual do soro padrão positivo(83): Para a construção das curvas ROC para a determinação do *cut-off*, os resultados das amostras (68 amostras de pacientes com LT, 66 de pacientes com LV e 68 de indivíduos declarados sadios) foram expressos como o valor da absorbância de cada amostra dividido pelo valor da absorbância de um soro padrão positivo, multiplicado

por 100, e foi chamado de “*absorbância percentual do padrão positivo*”, e calculado pela seguinte equação:

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

Com esses valores de “*absorbância percentual do padrão positivo*” foram construídas curvas ROC para determinação do *cut-off*. Neste caso, o IR foi calculado dividindo-se a “*absorbância percentual do padrão positivo*” de cada amostra pelo valor do *cut-off*. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentavam $IR \geq 1$. O cálculo do IR foi realizado pela aplicação da seguinte equação:

$$IR = \frac{\text{absorbância \% do padrão positivo}}{\text{cut} - \text{off}}$$

3.7 Testes analíticos

Os testes analíticos foram realizados utilizando os antígenos recombinantes e amostras específicas para cada teste.

3.7.1 Sensibilidade e especificidade

Para o estudo da sensibilidade e especificidade foram utilizadas 68 amostras de pacientes com LT, 66 de pacientes com LV e 68 de indivíduos clinicamente saudáveis.

3.7.2 Repetitividade

Para cada lote de rLb6H, foram ensaiadas, em uma mesma placa, 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo, utilizando o mesmo conjunto de pipetas e o mesmo operador durante todo o teste. Foi calculado o coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{média}}$$

3.7.3 Reprodutibilidade

Para cada lote de rLb6H, foram ensaiadas, por dia em uma mesma placa, 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo. Esse ensaio foi repetido em cinco dias diferentes, variando os operadores e as pipetas das reações. Foi calculado o CV.

3.7.4. Reação cruzada

Foram testadas amostras de soro humano com sorologia positiva para outras doenças infecciosas, com o objetivo de avaliar possíveis reações cruzadas com leishmaniose. As doenças testadas foram: doença de Chagas, Histoplasmose, Paracoccidioidomicose, Malária, Toxoplasmose e Tuberculose.

3.8 Outros parâmetros

- Acurácia:

$$\frac{(\text{verdadeiros positivos} + \text{verdadeiros negativos})}{\text{total de amostras}} \times 100$$

- *Likelihood ratio* do resultado positivo:

$$\frac{\textit{sensibilidade}}{100 - \textit{especificidade}}$$

- *Likelihood ratio* do resultado negativo:

$$\frac{100 - \textit{sensibilidade}}{\textit{especificidade}}$$

- Eficiência:

$$\frac{\textit{sensibilidade} + \textit{especificidade}}{2}$$

3.9 Análise Estatística

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

Os resultados foram analisados utilizando os seguintes programas:

- 1 *Graph Pad Prism 5* – construção das Curvas ROC, cálculos de sensibilidade, especificidade, intervalos de confiança de 95% de probabilidade, *likelihood ratio*, construção de gráficos;
- 2 *Sigma Stat 3.5* – teste de Kruskal-Wallis, para comparação de três ou mais grupos (dados não paramétricos), teste t de Student para comparação de dois grupos (dados paramétricos), teste de correlação de Spearman;
- 3 *Microsoft Office Excel 2016* – confecção de planilhas de dados, construção de gráficos e tabelas, cálculo do coeficiente de variação.

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

O estudo foi composto por 219 amostras de soro de pacientes com LTA, havendo informações demográficas de 190 pacientes, sendo, 136 (63,1%) do sexo masculino e 54 (24,6%) do sexo feminino. A faixa etária dos pacientes variou de 11 a 83 anos.

Em relação às espécies causadoras da infecção, 6 (2,7%) eram *L. (L.) amazonensis*, 115 (52,5%) eram *L. (V.) braziliensis*, 96 (43,8%) eram *L. (L.) guyanensis* e 2 (0,9%) eram *L. (V.) shawi*. A tabela 1 sintetiza os dados referentes ao perfil demográfico dos sujeitos do estudo.

4.2 Análise dos antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H

Os antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H foram derivados de *L. (V.) braziliensis*, apresentando 152 e 657 aminoácidos, respectivamente. Na tabela 2, observa-se que os antígenos possuem >90% de identidade na sequência de aminoácidos com *L. infantum*, agente causador da LV no Brasil, e com *L. major*, agente causador da LC. Os dados de homologia indicam a conservação de Lb8E e Lb6H entre as espécies de leishmânia. A identidade foi reduzida no protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas.

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com LT

Espécie infectante ¹	Sexo ²		Idade (anos)		Duração da Doença (meses)		Apresentação Clínica		
	M	F	Mediana	Min-max ³	Mediana	Min-max	Cutânea	Mucosa	Não identificada
<i>L. amazonensis</i> (N=6)	6	0	34	9–44	96	1,47–300	6	0	0
<i>L. braziliensis</i> (N= 115)	59	40	33	13–78	3	0,03–672	65	34	15
<i>L. guyanensis</i> (N=96)	71	14	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	96	0	0
<i>L. shawi</i> (N=2)	-	-	-	-	-	-	2	-	-

¹N – número de amostras, ²M – masculino; F= feminino, ³Min-max – mínimo-máximo

Tabela 2 - Conservação de aminoácidos entre espécies de protozoários

Espécie	Lb8E				Lb6H			
	aa (N)	aa (C)	aa (Inc)	% (I)	aa (N)	aa (C)	aa (Inc)	% (I)
<i>L. braziliensis</i>	152	-	-	-	657	-	-	-
<i>L. infantum</i>	152	140	12	92	653	606	51	92
<i>L. major</i>	152	140	12	93	654	608	49	93
<i>T. cruzi</i>	147	120	32	85	657	560	97	85

N – Número, C – compatível, Inc – incompatível, I – identidade

4.3 Padronização do teste imunoenzimático ELISA

Foram testados vários parâmetros experimentais para definir a melhor condição para a realização do teste ELISA utilizando os antígenos recombinantes e o antígeno total. Para verificar se os antígenos seriam reconhecidos pelo soro dos pacientes com LTA um teste inicial foi realizado.

Verificamos que os melhores resultados obtidos foram com: soro diluído 1/100 (antígenos recombinantes), 1/160 (antígeno total) e conjugado 1/20.000 (todos os antígenos). Em relação ao diluente das amostras e conjugado, observaram-se melhores resultados com PBS Tween Leite 2% para todos os antígenos. O melhor tempo de incubação com o cromógeno (TMB), para todos os antígenos, foi de 7 minutos.

A partir destas definições foram testados os soros positivos, negativos e de indivíduos com outras doenças para que se pudesse calcular a sensibilidade e especificidade do teste ELISA para diagnóstico da LTA.

Na tabela 3, encontram-se as condições de teste selecionadas após a padronização empregada para cada antígeno.

Tabela 3 - Parâmetros específicos empregados para cada um dos antígenos

	Lb8E e Lb6H	<i>L. major</i>-like
Concentração do antígeno (µg/mL)	1	5
Diluinte da amostra e do conjugado	PBS Tween Leite 2%	PBS Tween Leite 2%
Diluição das amostras	1/100	1/160
Diluição do conjugado	1/20.000	1/20.000
Tempo de cromógeno (minutos)	7	7

4.4 Protocolo final do ELISA-Lb8E, ELISA-Lb6H e ELISA-*L. major*-like

Placas de poliestireno Costar *High Binding* 3690, de meia área (Corning Incorporated, New York, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL/poço dos antígenos rLb8E e rLb6H diluídos a 1 µg/mL e do antígeno total de *L. major*-like diluído a 5 µg/mL em tampão/bicarbonato 0,06 M, pH 9,6. Após a sensibilização, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C, em câmara úmida e depois foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2 contendo Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (PBS-T).

O bloqueio foi realizado com 125 µL/poço de PBS-T contendo leite desnatado a 5% (PBS-T-L 5%). As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas em câmara úmida e lavadas três vezes com PBS-T.

As amostras foram diluídas a 1/100 (para os antígenos recombinantes) ou 1/160 (para o antígeno total de *L. major*-like), em PBS-T-L 2%, aplicadas nas placas em duplicata (50 µL/poço) e incubadas a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. Após esta incubação as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T.

O conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) foi diluído a 1/20.000 em PBS-T-L 2% (50 µL/poço) e posteriormente foi incubado a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Após esta incubação as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T.

Para a revelação da reação, foram adicionados 50 µL/poço do cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina) (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), incubando-se por 7 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente. A reação foi

interrompida pela adição de 25 μL /poço de H_2SO_4 2N. As absorbâncias foram medidas em leitor de ELISA (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland) a 450 nm.

4.5 Cálculo do *cut-off* e avaliação dos testes ELISA

A partir dos valores de absorbância das 68 amostras positivas de LT, 66 amostras positivas de LV e 68 de indivíduos saudáveis foram construídas curvas ROC, para determinar o *cut-off* para cada antígeno.

As figuras 8 e 9 mostram as curvas ROC dos antígenos rLb8E e Lb6H, respectivamente, construídas a partir das absorbâncias de amostras de soro de indivíduos normais e com LV e LT.

Figura 8 - Curvas ROC construídas a partir das absorbâncias de amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb8E (a) 66 positivas para LV e 66 negativas, (b) 68 positivas para LT e 68 negativas

Figura 9 - Curvas ROC construídas a partir das absorbâncias de amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H (a) 66 positivas para LV e 66 negativas, (b) 68 positivas para LT e 68 negativas

As figuras 10 e 11 mostram as curvas ROC dos antígenos rLb8E e rLb6H, respectivamente, construídas a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as amostras de soro de indivíduos normais e com LV e LT.

Figura 10 - Curvas ROC construídas a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb8E (a) 66 positivas para LV e 66 negativas, (b) 68 positivas para LT e 68 negativas

Figura 11 - Curvas ROC construídas a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as amostras positivas para leishmaniose e amostras negativas, utilizando o antígeno recombinante Lb6H

(a) 66 positivas para LV e 66 negativas, (b) 68 positivas para LT e 68 negativas

A figura 12 mostra a curva ROC do antígeno total de *L. major*-like, construída a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as amostras de soro de indivíduos normais e positivas para leishmaniose tegumentar.

Figura 12 - Curva ROC construída a partir dos valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as 68 amostras positivas para leishmaniose tegumentar e 68 amostras negativas, utilizando o antígeno total de *L. major*-like

Na tabela 4, encontram-se os valores do *cut-off* e os parâmetros de desempenho do teste ELISA com os antígenos rLb8E, rLb6H e *L. major*-like.

Empregando amostras de LT e controles negativos, o ELISA-rLb8E apresentou sensibilidade e especificidade de 83,3%, considerando o *cut-off* de 36,52. Já o ELISA-rLb6H mostrou uma melhor performance, detectando 100,0% das amostras de pacientes com LT, com especificidade de 98,5%, em controles negativos, considerando o *cut-off* de 16,02. Essa sensibilidade foi superior à obtida no ELISA-*L. major*-like, que detectou anticorpos em 91,2% dos casos de LT, com especificidade de 95,6% em controles negativos, considerando o *cut-off* de 10,00.

Da mesma forma, foi avaliado o desempenho do ELISA-rLb8E e ELISA-rLb6H em amostras de soros de pacientes com LV e indivíduos saudáveis. Com ELISA-rLb8E, a sensibilidade foi 95,4% e a especificidade foi 92,4%, considerando o *cut-off* de 39,13. Empregando ELISA-rLb6H, a sensibilidade foi 89,4% e a especificidade foi 95,3%, considerando o *cut-off* de 6,13.

Os valores de sensibilidade e especificidade citados acima foram obtidos a partir da construção de curvas ROC utilizando os valores da “*absorbância percentual do padrão positivo*”, calculados para as amostras de soro de indivíduos normais e positivas para LT ou LV.

Tabela 4 - Desempenho dos antígenos frente às amostras empregadas na construção das curvas ROC, considerando diferentes *cut-offs*

Pos - N	Neg - N	Antígenos	Cut-off	S% (IC 95%)	E% (IC 95%)	J	A	LR +	LR -	E
LV		Lb8E	0,112	89,4(79,4-95,6)	93,9(85,2-98,3)	83,3	89,0%	14,75	0,11	91,7
66	66		0,104	95,4(87,3-99,0)	92,4(83,2-97,5)	87,9	91,2%	12,60	0,05	94,0
			39,13*	95,4(87,3-99,0)	92,4(83,2-97,5)	87,9	93,2%	12,60	0,05	94,0
LT			0,115	80,9(69,5-89,4)	86,1(75,3-93,5)	67,0	81,6%	5,83	0,22	83,5
68	68		0,135	77,9(66,2-87,1)	93,8(85,0-98,3)	71,8	86,0%	12,68	0,23	86,0
			36,52*	83,3(72,1-91,4)	83,3(72,1-91,4)	66,7	83,3%	5,00	0,20	83,3
LV		Lb6H	0,177	89,4(79,4-95,6)	95,3(86,9-99,0)	84,7	92,3%	19,05	0,11	92,3
66	66		6,13*	89,4(79,4-95,6)	95,3(86,9-99,0)	84,7	92,3%	19,05	0,11	92,3
			0,196	100,0(94,7-100,0)	98,5(92,1-100,0)	98,5	99,3%	68,02	0	99,3
LT			0,293	100,0(94,7-100,0)	100,0(94,7-100,00)	100,0	100,0%	I	0	100,0
68	68		16,02*	100,0(94,7-100,0)	98,5(92,1-100,0)	98,5	99,3%	68,02	0	99,3
			24,03	100,0(94,7-100,0)	100,0(94,7-100,0)	100,0	100,0%	I	0	100,0
LT		L. major-like	10,00*	91,2(81,8-96,7)	95,6(87,6-99,1)	86,8	91,2%	20,67	0,10	93,4
68	68									

Pos – amostras positivas empregadas no cálculo do *cut-off*; Neg – amostras negativas empregadas no cálculo do *cut-off*; N – número de amostras

S% – sensibilidade; E% – especificidade; IC 95% – intervalo de confiança de 95% de probabilidade; J – índice de Younden; A – acurácia; LR + - *likelihood ratio* positivo; LR - - *likelihood ratio* negativo; E – eficiência; I – infinito

LV – leishmaniose visceral, LT – leishmaniose tegumentar

* - *Cut-off* escolhido

4.6 Reatividade de rLb6H em pacientes com LT causada por diferentes espécies de leishmânia

Como o objetivo do estudo é o diagnóstico da LT, a partir deste ponto utilizamos apenas o rLb6H, que havia fornecido melhor desempenho diagnóstico.

Tendo demonstrado que os anticorpos contra rLb6H estavam presentes nos soros de pacientes com LT, investigamos a reatividade em amostras de pacientes cuja espécie infectante de leishmânia havia sido definida. Os anticorpos anti-Lb6H foram detectados em todos os casos de LT (IC 95%, 98,3-100,0), causados por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. As duas amostras de pacientes com *L. (V.) shawi*, foram fortemente reativas, apresentando alto índice de reatividade (IR = 13,1 e 9,2), conforme mostra a Figura 13.

A magnitude da resposta aos antígenos variou, dependendo das espécies infectantes; os pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* (mediana IR=3,6) apresentaram níveis mais baixos de anticorpos do que os pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis* (mediana IR=7,7) e *L. (V.) braziliensis* (mediana IR=4,5) (Kruskal-Wallis, $p=0,0003$). Com o antígeno total *L. major*-like, foram detectadas níveis mais elevados em pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis* (mediana IR=12,9) do que com *L. (V.) braziliensis* (mediana IR=5,5) ou *L. (V.) guyanensis* (mediana IR=4,7) (Kruskal-Wallis, $p=0,0088$).

Quando as respostas ao antígeno rLb6H foram comparadas com as respostas ao antígeno total *L. major*-like, demonstrou-se mais uma vez que o antígeno recombinante era mais reativo com soros de pacientes com LT do que o antígeno total. Os anticorpos anti-*L. major*-like foram detectados em apenas 90,9% (IC 95%, 86,3-94,0) dos soros de pacientes com LT (Figura 13).

Figura 13 - Distribuição dos Índices de Reatividade das amostras de leishmaniose tegumentar estudadas no teste ELISA, empregando o antígeno recombinante Lb6H (a) e o antígeno total de *L. major*-like (b), considerando os *cut-offs* calculados a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo”, das amostras de soro de indivíduos saudáveis e com LT, empregadas na construção das curvas ROC

La – *Leishmania amazonensis*; Lb – *Leishmania braziliensis*; Lg – *Leishmania guyanensis*, Ls - *Leishmania shawi*

4.7 Análise da reatividade cruzada

Após analisar a sensibilidade dos antígenos com soros de pacientes com LT, foi verificado se o antígeno rLb6H e o antígeno total *L. major*-like apresentavam reação cruzada com outras patologias, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 - Positividade do teste ELISA frente a 213 amostras de pacientes com parasitológico positivo para outras doenças infecciosas

Doença	N	ELISA-rLb6H		ELISA- <i>L. major</i> -like	
		Reatividade (%)	IC 95%	Reatividade (%)	IC 95%
Doença de Chagas	91	17 (18,7)	12,0–27,9	69 (75,8)	66,1–83,5
Histoplasmose	4	0 (0,0)	0,0–49,0	2 (50,0)	15,0–85,0
Malária	14	0 (0,0)	0,0–21,1	6 (42,9)	21,4–67,4
Paracoccidioidomicose	22	0 (0,0)	0,0–14,9	4 (18,2)	7,3–38,5
Toxoplasmose	69	0 (0,0)	0,0–5,3	15 (21,7)	13,6–32,8
Tuberculose	13	0 (0,0)	0,0–22,8	3 (23,1)	8,2–50,3
Total	213	17 (8,0)	5,0–12,4	99 (46,7)	39,9–53,2

IC 95% – Intervalo de confiança de 95% de probabilidade, N – número de amostras

Avaliando a especificidade do ELISA-rLb6H frente a amostras de pacientes com outras doenças infecciosas, das 91 amostras de pacientes com Doença de Chagas, 74 (81,3%) estavam abaixo do limiar de reatividade e 17 (18,7%) reagiram fracamente com IR variando de 1,0 a 2,2. Esses resultados contrastam com os obtidos no ELISA-*L. major*-like, em que 75,8% das amostras de doença de Chagas foram positivas. Além disso, pelo menos duas amostras de cada uma das outras doenças avaliadas possuíam foram reagentes ao antígeno total, conforme mostra a Figura 14.

Figura 14 - Distribuição dos Índices de Reatividade das 213 amostras de outras doenças no teste ELISA empregando o antígeno recombinante Lb6H (a) e antígeno total *L. major*-like (b), considerando os *cut-offs* calculados a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo”, das amostras de soro de indivíduos sadios e com LT, empregadas na construção das curvas ROC
CH–Doença de Chagas; HIS–Histoplasrose; MAL–Malária; PB–Paracoccidioidomicose; TOXO–Toxoplasmose; TB–Tuberculose

4.8 Repetitividade

A figura 15 mostra a distribuição dos valores de IR da amostra positiva para LV, para LT e amostra negativa, utilizadas no estudo de repetitividade do teste ELISA com o antígeno recombinante Lb6H.

Figura 15 - Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para LT, para LV e amostra negativa, com o antígeno recombinante Lb6H, em estudo de repetitividade

As amostras positivas foram reagentes em todas as replicatas e a média dos IR da amostra positiva de LT foi significativamente maior que a de LV (Teste t, $p < 0,0001$).

Observaram-se CV (Tabela 6) bem baixos para as amostras de LT e de LV. A amostra negativa apresentou CV mais elevado devido à baixa reatividade observada em todas as replicatas, tendo os IRs baixos, variando entre 0,01 e 0,02. Ainda assim, foi bem menor que o admissível (20%) (84).

Tabela 6 - Coeficiente de variação das amostras positivas e negativa no estudo de repetitividade e média dos índices de reatividade das amostras positivas e negativa

Amostra	CV	Média
LV	0,70%	1,21
LT	0,60%	3,20
Negativa	7,80%	0,02

LV – leishmaniose visceral, LT – leishmaniose tegumentar

CV – Coeficiente de variação

4.9 Reprodutibilidade

Para a avaliação da reprodutibilidade, as amostras positivas e negativa foram avaliadas em 5 dias diferentes alterando os operadores e as pipetas das reações, empregando o antígeno recombinante Lb6H. A figura 16 está representando o resultado desta avaliação e a tabela 7 traz os coeficientes de variação.

Figura 16 - Distribuição dos índices de reatividade de amostras de LV (a), LT (b) e amostra negativa (c), para o antígeno recombinante Lb6H, em estudo de reprodutibilidade

As amostras positivas foram reagentes em todas as replicatas e a mediana dos IR da amostra positiva de LT foi significativamente maior que a de LV (Teste t, $p < 0,0001$).

Observaram-se CV (Tabela 7) bem baixos para as amostras de LT e de LV. A amostra negativa apresentou baixa reatividade em todas as replicatas, tendo os IRs muito baixos. Por esse motivo não se calculou o CV da amostra negativa.

Tabela 7 - Coeficiente de variação das amostras positivas no estudo de reprodutibilidade e médias dos índices de reatividade das amostras positivas e negativa

Amostra	CV	Média
LV	1,65%	1,21
LT	3,54%	3,15
Negativa	NC	0,02

LV – leishmaniose visceral, LT – leishmaniose tegumentar, NC – não calculado

CV – Coeficiente de variação

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico das leishmanioses é realizado considerando os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. As suas variadas manifestações clínicas se assemelham com sinais e sintomas de outras doenças, fungos e infecções por micobactérias, dificultando o diagnóstico (85).

Vários métodos têm sido utilizados para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar (LT), incluindo investigação direta da presença do parasito e testes de imunodeteção. Apesar da detecção do parasito ser considerada o padrão ouro do diagnóstico das leishmanioses, os vários métodos para esse fim apresentam, em geral, problemas relacionados à sua sensibilidade, especialmente em lesões mais antigas onde os parasitos são escassos (33). Devido a isso, recorre-se a testes indiretos. Tanto a reação de hipersensibilidade tardia a antígenos de leishmânia (teste de Montenegro), como a sorologia antileishmânia são testes indiretos para detecção de infecções por leishmânia, detectando-se a resposta ou o produto da resposta imune (86, 87).

A utilização do diagnóstico por teste de Montenegro é limitado, pois indica não só infecção atual, mas também uma infecção anterior. Neste contexto, a avaliação da resposta imune humoral na LT tem sido geralmente abordada por testes sorológicos e os mais utilizados atualmente são IFI, ELISA e western blot, mas também apresentam problemas relacionados à sua sensibilidade e/ou especificidade, de acordo com os antígenos empregados (88).

De um modo geral, os ensaios sorológicos para leishmaniose cutânea são limitados devido à baixa sensibilidade; portanto, não são considerados para uso em diagnóstico de rotina. Em algumas instituições, os ensaios sorológicos utilizam derivados de promastigotas de leishmânia produzidos *in house*; um impedimento é a cultura de algumas espécies, tal como *L. (V.) braziliensis* (89-91). A preocupação em relação à utilização do antígeno total em testes ELISA refere-se ao comportamento de cepas de leishmânia em diferentes meios de cultura. Estudos mostram que pode ocorrer expressão de diferentes epítomos antigênicos quando os parasitos são cultivados em meios com formulações diferentes (92-95).

Por isso, é fundamental dispor de testes com antígenos padronizados, com reprodutibilidade e possibilidade de produção em larga escala para um diagnóstico correto e rápido (45, 96).

Uma alternativa pode ser a utilização de antígenos recombinantes que, além de não necessitar do crescimento do parasito, tem vantagens, tais como uma produção mais padronizada e uniforme. Nas últimas décadas, um número crescente de proteínas recombinantes foi descrito como candidatas para o diagnóstico de leishmaniose. Embora existam várias técnicas disponíveis, nenhuma ainda apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (97-101).

A proteína de choque térmico (HSP) 60 de *L. major* (68) e Hsp 70 de *L. braziliensis* (69) foram clonados e os produtos testados usando amostras de leishmaniose cutânea e mucocutânea da Colômbia com resultados promissores. Nosso laboratório, ao longo dos anos, vem trabalhando no desenvolvimento do diagnóstico sorológico utilizando antígenos recombinantes. Os estudos demonstraram uma alta sensibilidade e especificidade com amostras de LT e LV em teste ELISA utilizando o antígeno rHsp83 de *Leishmania infantum* (72). O antígeno recombinante apresentava grande potencial para detecção de anticorpos para auxiliar no diagnóstico de LT, possibilitando seu uso como antígeno para teste ELISA para leishmanioses em geral e especificamente em leishmaniose tegumentar, independente da espécie causadora. No entanto, o antígeno rHsp83 apresentou instabilidade e degradação, impedindo a padronização de um método de diagnóstico.

Um antígeno ideal para o diagnóstico da leishmaniose deve identificar todos os pacientes, com mínimo possível de reatividade cruzada (102-104).

Neste estudo, foram testados em ensaios imunoenzimáticos os antígenos recombinantes Lb8E e Lb6H, derivados de *Leishmania (V.) braziliensis* em soros de pacientes com leishmaniose. Embora ambos os antígenos apresentassem um desempenho muito bom (alta sensibilidade e especificidade para a infecção por leishmânia), testes iniciais indicaram que rLb6H teve uma maior capacidade para reagir com anticorpos do soro de pacientes com LT.

A reatividade do antígeno rLb6H com amostras de soro de pacientes com LV não constitui necessariamente um problema importante para o diagnóstico e tratamento de doentes com LT, uma vez que as apresentações clínicas de LV e LT

são tipicamente distintas. Todavia, podem ocorrer casos de coinfeção HIV/*Leishmania* que podem ter manifestações incomuns (105), mas uma resposta de anticorpos positiva nesta situação pode levar à utilização de métodos de detecção direta para a verificação das espécies de leishmânia que infectam.

A maioria dos estudos sorológicos sobre a leishmaniose é desenvolvida para LV, uma vez que a imunidade humoral é geralmente exacerbada em pacientes infectados com espécies viscerotrópicas de leishmânia (106).

No presente estudo, o rLb6H apresentou ótimos valores de sensibilidade e especificidade, obtendo-se 100,00% e 98,53%, respectivamente, para a detecção de anticorpos em soros de pacientes com LT e indivíduos sadios. Além disso, o grupo estudado consistiu-se de amostras de pacientes com LT de diferentes regiões endêmicas do Brasil, causadas pelas espécies prevalentes na região. A LT predominou entre indivíduos do sexo masculino; estes índices estão de acordo com dados do Ministério da Saúde de que 74% dos casos da doença ocorrem entre homens e que a maioria da população afetada é adulta (12).

As variações das espécies de leishmânia podem trazer diferenças de sensibilidade e especificidade dos testes. Esta questão foi abordada em um estudo que utilizou teste com preparações do antígeno de *L. (L.) amazonensis*, apresentando baixa sensibilidade utilizando amostras de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando sensibilidade por reação de IFI de 79,6% e 71,7% e por ELISA de 98,2% e 85,0%, respectivamente. Além disso, para ambos os testes os títulos com amostras de pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* foram significativamente mais baixos do que com as amostras de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* (67).

Vale ressaltar que em nosso estudo, a reatividade com rLb6H foi maior com amostras de pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis*, seguidos por aqueles infectados com *L. (L.) braziliensis*, em seguida, *L. (V.) guyanensis*. Portanto, nossos dados sugerem que a quantidade de anticorpo em circulação pode ser dependente das espécies de leishmânia envolvidas.

Nos casos de sorologia positiva, os títulos médios são significativamente mais elevados nos pacientes que apresentam lesões múltiplas, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitos. Após o tratamento e cura,

os títulos tendem a cair ou desaparecer em alguns meses (107, 108). Esses dados sugerem variações de níveis de anticorpos antileishmânia dependentes das apresentações clínicas da doença (109), mas no presente estudo, os dados disponíveis não nos permitiram abordar esse aspecto.

Embora nossos dados também indiquem que os níveis de reatividade variaram consideravelmente entre os grupos de pacientes quando a duração da doença foi mais longa, o resultado do teste de correlação de Spearman ($r=0,052$, $p=0,7192$), não detectou correlação significativa.

Analisando as reações cruzadas obtidas no presente trabalho percebe-se que *Trypanosoma cruzi* é o agente que apresentou maior reatividade no teste com antígeno total *L. major*-like no ELISA. Alguns estudos relatam que a utilização do antígeno total limita a especificidade propiciando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (110, 111). O estudo com soros de outras doenças com o rLb6H indicou que a proteína recombinante fornece maior especificidade para soros de LT, comparado com antígeno total *L. major*-like. Nossos resultados mostraram que o antígeno rLb6H apresentou reação cruzada apenas com uma minoria de soros de pacientes com doença de Chagas, representando 18,7%, porém exibiram respostas de baixo nível. Este fato pode ser justificado pelo elevado grau de homologia do antígeno rLb6H entre *L. braziliensis* e *T. cruzi*, porém não se pode excluir a possibilidade de que os pacientes de Chagas fossem também infectados com leishmânia.

De modo geral, o rLb6H apresentou melhor desempenho entre os antígenos. É importante ressaltar a necessidade de produção de novos testes ELISA para o diagnóstico da LT, pelo fato da escassez de estudos direcionados para esta forma da doença. A maior parte dos estudos relacionados à detecção da leishmaniose visa o diagnóstico da LV, tanto da forma humana quanto canina. Na forma canina, observa-se que a sensibilidade e especificidade encontradas utilizando-se antígenos recombinantes em teste ELISA foram respectivamente 100% e 98% (112), 88 e 95% (113), 76 a 100% e 90 a 97% (114) e 75 e 90% (115). Na LV humana a sensibilidade e especificidade foram de 100% e 100% (116), 76 a 100% e 90 a 97% (114), 81% e 100% (117).

O teste ELISA possui vantagens na aplicação em imunodiagnóstico da leishmaniose, pois apresenta versatilidade, por seus resultados não serem dependentes do observador e pode ser adaptado à automação, permitindo seu emprego em larga escala (118). A obtenção de antígenos recombinantes para diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias é promissor já que proporcionam reprodutibilidade dos testes.

Nossos dados demonstram que o antígeno rLb6H apresentou alta sensibilidade e especificidade quando testado com amostras de pacientes com LT e baixa reatividade cruzada com soro de pacientes com doença de Chagas, o que o torna alvo promissor para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. A investigação futura do antígeno rLb6H em outras metodologias sorológicas torna-se interessante. Visando à realização de diagnósticos em locais com poucos recursos, testes imunocromatográficos poderiam ser realizados, tendo como vantagens, o simples manuseio e o resultado fornecido em pouco tempo, além de fácil interpretação. Dessa forma o antígeno recombinante seria impregnado em membranas, caso os anticorpos antileishmânia fossem presentes nas amostras, se ligariam ao conjugado que por sua vez, correria pela membrana ligando ao antígeno, determinando o surgimento de uma banda.

Os resultados verificados neste estudo demonstram a importância desse novo antígeno recombinante para o diagnóstico da leishmaniose, visando dar um passo à frente nesse contexto.

6 CONCLUSÃO

a) Utilizando-se o antígeno recombinante Lb6H foi padronizado o teste imunoenzimático ELISA (ELISA-rLb6H) para a pesquisa de anticorpos IgG na leishmaniose tegumentar americana (LTA), que apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia adequados para o diagnóstico sorológico, mostrando-se superior que o antígeno recombinante Lb8E;

b) Por apresentar excelente desempenho em soros de pacientes com LT causadas pelas espécies prevalentes de leishmânia em diferentes regiões, o teste ELISA-rLb6H mostrou que poderá ser utilizado no diagnóstico da LT em todo o Brasil;

c) O teste ELISA-rLb6H apresentou mínima reatividade em amostras de soros de pacientes com outras doenças infecciosas;

d) A reprodutibilidade e repetitividade dos resultados do teste ELISA-rLb6H foi compatível com os valores desejados para o diagnóstico sorológico;

e) Devido à baixa reatividade em pacientes com doença de Chagas, o teste ELISA-rLb6H será de grande utilidade para o diagnóstico da LTA, mesmo em regiões onde coexistam ambas as infecções.

REFERÊNCIAS

1. Lainson R. Leishmania e leishmaniose, com particular particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*. 1997;11(1):29-40.
2. Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. 2003;55:34-7.
3. ANGELA CRISTINA RAPELA MEDEIROS ACRM, ANA MARIA FERREIRA ROSELINO AMFR. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. *An Bras Dermatol*. 1999;74(4).
4. Basano SdA, Camargo LMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7:328-37.
5. Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. 2005.
6. Tello JC. La Antigüedad de la sífilis en el Perú. Lima, Peru: Universidad Mayor de San Marcos; 1909.
7. Vale ECSd, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2005;80:421-8.
8. Furusawa GP, Borges MF. Colaboração para o conhecimento do histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na Vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. *Revista de Patologia Tropical*. 2014;43(1):7-25.
9. Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia médica*. Parasitologia médica: Guanabara Koogan; 1982.
10. Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India*. 1994 Jul-Aug;7(4):196, 201-2. PubMed PMID: 7950961. Epub 1994/07/01. eng.
11. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Feb;34(2 Pt 1):257-72. PubMed PMID: 8642091. Epub 1996/02/01. eng.
12. Brasil. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
13. Grimaldi G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World Leishmania species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996 Jan-Feb;91(1):37-42. PubMed PMID: 8734946. Epub 1996/01/01. eng.

14. Grimaldi G, Jr., Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. 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 Jun;44(6):645-61. PubMed PMID: 1858968. Epub 1991/06/11. eng.
15. Ross R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. *Br Med J.* 1903 Nov 14;2(2237):1261-2. PubMed PMID: 20761169. Pubmed Central PMCID: PMC2514667. Epub 1903/11/14. eng.
16. Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, Classification and Geographical Distribution*: Academic Press; 1987.
17. Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews.* 1993 Jul;6(3):230-50. PubMed PMID: 8358705. Pubmed Central PMCID: PMC358284. Epub 1993/07/01. eng.
18. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000 Apr;16(4):142-4. PubMed PMID: 10725899. Epub 2000/03/22. eng.
19. Rey L. O complexo “*Leishmania braziliensis*” e as Leishmaniases tegumentares americanas. In: Rey L. – Rey: *Parasitologia*. 2001b;3^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.;p. 227-39.
20. Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 2002;8(4):297-318. PubMed PMID: 11860368. Epub 2002/02/28. eng.
21. Souza CSF. *As Leishmanioses*. 1997.
22. Cavalcanti DP, Thiry M, de Souza W, Motta MCM. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology.* 2008;130(6):1177.
23. Pessoa SB, Martins AV. *Leishmanioses tegumentares*. Koogan RdJG, editor 1988. p.78-87 p.
24. Silva OV. Avaliação do Teste de Aglutinação Direta (TAD) no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE; 2003.
25. Lainson R, Shaw JJ. *New World Leishmaniasis*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: John Wiley & Sons, Ltd; 2010.

26. Guimarães VCFV. Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco: MsC Dissertation; 2011.
27. Secundino NFC, Freitas VC, Pimenta PFP. A Biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas* 2011. p. 90-101.
28. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PloS one. 2012;7(5):e35671. PubMed PMID: 22693548. Pubmed Central PMCID: PMC3365071. Epub 2012/06/14. eng.
29. WHO. Control of the leishmaniasis 2014.
30. Schonian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011 Apr;138(4):405-25. PubMed PMID: 21078222. Epub 2010/11/17. eng.
31. Gontijo B, Carvalho MdLRd. *Leishmaniose tegumentar americana*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36:71-80.
32. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):293-307. PubMed PMID: 22632640. Epub 2012/05/29. eng.
33. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr;8(4):419-33. PubMed PMID: 20377337. Epub 2010/04/10. eng.
34. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):439-45. PubMed PMID: 16843727. Epub 2006/07/18. eng.
35. NEVES DP. *Parasitologia humana*. 13 ed. São Paulo 2016.
36. Rey L. *Parasitologia*. 3ª ed 2001.
37. Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. *Leishmaniose tegumentar americana*. In: Atheneu, editor. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo 1999. p. 39-64.
38. Bacellar O, Machado P, Carvalho E. Resposta imune na leishmaniose tegumentar humana. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas* 2011. p. 113-6.

39. Organization WH. Tropical Diseases Research (TDR). Leishmaniasis disease information 2016.
40. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegao de Camargo R, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Sep;23(9):1026-34. PubMed PMID: 19453817. Epub 2009/05/21. eng.
41. Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007;73:843-7.
42. Skraba CM, Pedroso RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SM, Lonardoni MV, et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014 Apr;78(4):411-7. PubMed PMID: 24485589. Epub 2014/02/04. eng.
43. Gomes CM, Mazin SC, Santos ER, Cesetti MV, Bachtold GA, Cordeiro JH, et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Apr;110(2):157-65. PubMed PMID: 25946238. Pubmed Central PMCID: PMC4489445. Epub 2015/05/07. eng.
44. de Andrade AS, Gomes RF, Fernandes O, de Melo MN. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 2001 Mar 30;78(3):261-7. PubMed PMID: 11311189. Epub 2001/04/20. eng.
45. Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. *Braz J Infect Dis*. 2009 Feb;13(1):47-52. PubMed PMID: 19578630. Epub 2009/07/07. eng.
46. Gontijo B, Carvalho MdL. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(1):71-80.
47. Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Journal of dermatological case reports*. 2013 Jun 30;7(2):31-41. PubMed PMID: 23858338. Pubmed Central PMCID: PMC3710675. Epub 2013/07/17. eng.
48. Ríos JM. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de leishmaniasis cutánea. *Rev Méd Cient* 2010;23(2):22-37.
49. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff Mde F, Figueira Lde P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous

Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol*. 2016 Aug;167:1-6. PubMed PMID: 27119738. Epub 2016/04/28. eng.

50. 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. *International journal of dermatology*. 2009 Apr;48(4):404-8. PubMed PMID: 19335428. Epub 2009/04/02. eng.

51. Nuzum E, White F, 3rd, Thakur C, Dietze R, Wages J, Grogl M, et al. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. *J Infect Dis*. 1995 Mar;171(3):751-4. PubMed PMID: 7876635. Epub 1995/03/01. eng.

52. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin J-M, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(1):236-40.

53. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1999 Jun;37(6):1953-7. PubMed PMID: 10325353. Pubmed Central PMCID: PMC84994. Epub 1999/05/15. eng.

54. Skraba CM, de Mello TF, Pedroso RB, Ferreira EC, Demarchi IG, Aristides SM, et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 Jul-Aug;48(4):437-44. PubMed PMID: 26312935. Epub 2015/08/28. eng.

55. Fagundes A, Antonio L, Schubach A, Marzochi KB, Fagundes A. Comparison between in vivo measurement of the Montenegro skin test and paper recording. *International journal of dermatology*. 2012 May;51(5):618-9. PubMed PMID: 22515591. Epub 2012/04/21. eng.

56. Gomes CM, Paula NA, Moraes OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2014 Sep-Oct;89(5):701-9. PubMed PMID: 25184908. Pubmed Central PMCID: PMC4155947. Epub 2014/09/04. eng.

57. 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1979;73(3):289-92. PubMed PMID: 382470. Epub 1979/01/01. eng.

58. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 1995;21(2):123-52. PubMed PMID: 7639932. Epub 1995/01/01. eng.

59. Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009 Apr;103(4):383-9. PubMed PMID: 19211118. Epub 2009/02/13. eng.
60. Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL, Cuce LC, Belda W, Jr. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67(6):643-8. PubMed PMID: 2699277. Pubmed Central PMCID: PMC2491305. Epub 1989/01/01. eng.
61. Marzochi M, Coutinho S, Sabroza P, de Souza W. Indirectimmunofluorescence Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepaguá region (Rio de Janeiro): comparative study of results observed in 1974 and 1978. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 1980;22:149-55.
62. Mendonca SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988 Jul-Sep;83(3):347-55. PubMed PMID: 3078345. Epub 1988/07/01. eng.
63. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Mar;40(3):1037-43. PubMed PMID: 11880434. Pubmed Central PMCID: PMC120257. Epub 2002/03/07. eng.
64. el Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989 May-Jun;83(3):334-7. PubMed PMID: 2617579. Epub 1989/05/01. eng.
65. Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*. 1990;68(1):39-43. PubMed PMID: 2189584. Pubmed Central PMCID: PMC2393007. Epub 1990/01/01. eng.
66. Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007 Nov;14(11):1409-15. PubMed PMID: 17761525. Pubmed Central PMCID: PMC2168175. Epub 2007/09/01. eng.

67. Romero GA, de la Gloria Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macedo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* or *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Brazil. *Acta Trop*. 2005 Jan;93(1):49-56. PubMed PMID: 15589797. Epub 2004/12/14. eng.
68. Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R, Reiner NE. *Leishmania* major: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol*. 1997 Mar;85(3):249-63. PubMed PMID: 9085922. Epub 1997/03/01. eng.
69. Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones*. 1996 Sep;1(3):177-87. PubMed PMID: 9222603. Pubmed Central PMCID: PMC248477. Epub 1996/09/01. eng.
70. Souza AP, Soto M, Costa JM, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PloS one*. 2013;8(6):e66110. PubMed PMID: 23776617. Pubmed Central PMCID: PMC3680450. Epub 2013/06/19. eng.
71. Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Nov;37(11):1591-3. PubMed PMID: 15517072. Epub 2004/11/02. eng.
72. Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LG, Lima Costa FA, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniases. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 May;90(5):860-5. PubMed PMID: 24615136. Pubmed Central PMCID: PMC4015579. Epub 2014/03/13. eng.
73. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of clinical microbiology*. 2004 May;42(5):2294-7. PubMed PMID: 15131217. Pubmed Central PMCID: PMC404633. Epub 2004/05/08. eng.
74. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jul;41(7):3147-53. PubMed PMID: 12843055. Pubmed Central PMCID: PMC165364. Epub 2003/07/05. eng.

75. Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995 Feb;89(1):17-23. PubMed PMID: 7741590. Epub 1995/02/01. eng.
76. Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun*. 1995 Oct;63(10):4105-14. PubMed PMID: 7558326. Pubmed Central PMCID: PMC173577. Epub 1995/10/01. eng.
77. Sato CM, Sanchez MC, Celeste BJ, Duthie MS, Guderian J, Reed SG, et al. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different *Leishmania* Species. *Journal of clinical microbiology*. 2017 Feb;55(2):495-503. PubMed PMID: 27927927. Pubmed Central PMCID: PMC5277519. Epub 2016/12/09. eng.
78. Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Nagasse TK. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978 Jul-Aug;20(4):208-12. PubMed PMID: 103172. Epub 1978/07/01. eng.
79. Guimaraes MC, Celeste BJ, Camargo ME, Diniz JM. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 May-Jun;25(3):108-12. PubMed PMID: 6351228. Epub 1983/05/01. eng.
80. Guimaraes MC, Celeste BJ, de Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 Sep;30(5):942-7. PubMed PMID: 6792937. Epub 1981/09/01. eng.
81. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med*. 2000 May 30;45(1-2):23-41. PubMed PMID: 10802332. Epub 2000/05/10. eng.
82. Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BdB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad saúde colet (Rio J)*. 2003;11(1):7-31.
83. Hasker E, Kansal S, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Singh RP, et al. Latent infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):e2053. PubMed PMID: 23459501. Pubmed Central PMCID: 3573094. Epub 2013/03/06. eng.
84. Meneghisse CS. Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e Produção de kit Imunodiagnóstico: Universidade de São Paulo; 2007.

85. Pinero J, Martinez E, Pacheco R, Aragon Z, De Armas F, Del Castillo A, et al. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1999 May 25;73(1):21-9. PubMed PMID: 10379813. Epub 1999/06/24. eng.
86. Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, Valencia BM, Veland N, Miranda-Verastegui C, et al. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Aug;83(2):345-50. PubMed PMID: 20682880. Pubmed Central PMCID: PMC2911183. Epub 2010/08/05. eng.
87. Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorenzo R, Lisboa A, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Jan;35(1):79-85. PubMed PMID: 3946739. Epub 1986/01/01. eng.
88. Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Mar-Apr;41(2):135-41. PubMed PMID: 18545832. Epub 2008/06/12. eng.
89. Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Jan;35(1):72-8. PubMed PMID: 3080918. Epub 1986/01/01. eng.
90. Celeste BJ, Guimaraes CS, Corrales EM. Peroxidase antibody test for mucocutaneous leishmaniasis serology. Performance indexes and comparison with a fluorescent antibody test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1988 Nov-Dec;30(6):411-4. PubMed PMID: 3075341. Epub 1988/11/01. eng.
91. Choudhry A, Puri A, Guru PY, Saxena RP, Saxena KC. An indirect fluorescent antibody (IFA) test for the serodiagnosis of Kala-Azar. *J Commun Dis*. 1992 Mar;24(1):32-6. PubMed PMID: 1296950. Epub 1992/03/01. eng.
92. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jul;15(3):374-89. PubMed PMID: 12097246. Pubmed Central PMCID: PMC118086. Epub 2002/07/05. eng.
93. Muniaraj M. Paradoxical drug sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes: an in vitro study by Agar elution and 96 well plate methods. *J Commun Dis*. 2007 Dec;39(4):255-6. PubMed PMID: 18697599. Epub 2008/08/14. eng.
94. Rodrigues Ide A, da Silva BA, dos Santos AL, Vermelho AB, Alviano CS, Dutra PM, et al. A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of

infective promastigote forms. *Parasitol Res.* 2010 Apr;106(5):1249-52. PubMed PMID: 20177905. Epub 2010/02/24. eng.

95. Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. In vitro cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. *Acta Trop.* 2002 Jul;83(1):37-42. PubMed PMID: 12062791. Epub 2002/06/14. eng.

96. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Sep;7(9):581-96. PubMed PMID: 17714672. Epub 2007/08/24. eng.

97. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 Jul;3(4):387-91. PubMed PMID: 8807201. Pubmed Central PMCID: PMC170355. Epub 1996/07/01. eng.

98. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology.* 1998 Jan;36(1):58-63. PubMed PMID: 9431920. Pubmed Central PMCID: PMC124807. Epub 1998/02/12. eng.

99. de Souza CM, Silva ED, Ano Bom AP, Bastos RC, Nascimento HJ, da Silva Junior JG. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol.* 2012 Jan;34(1):1-7. PubMed PMID: 21929686. Epub 2011/09/21. eng.

100. de Souza Dias S, da Costa Pinheiro PH, Katz S, dos Santos MR, Barbieri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Feb;72(2):126-32. PubMed PMID: 15741546. Epub 2005/03/03. eng.

101. Rafati S, Hassani N, Taslimi Y, Movassagh H, Rochette A, Papadopoulou B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* 2006 Oct;13(10):1104-10. PubMed PMID: 17028214. Pubmed Central PMCID: PMC1595312. Epub 2006/10/10. eng.

102. Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996 May-Jun;38(3):177-85. PubMed PMID: 9163981. Epub 1996/05/01. eng.

103. Coelho EA, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, de Jesus Pereira NC, et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 Jan 15;215:63-71. PubMed PMID: 26790739. Epub 2016/01/23. eng.

104. Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhaes RD, Diniz JL, Costa LE, et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2015 Nov;22(11):1187-96. PubMed PMID: 26376929. Pubmed Central PMCID: PMC4622107. Epub 2015/09/18. eng.
105. Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol*. 2009 Feb;160(2):311-8. PubMed PMID: 19187345. Epub 2009/02/04. eng.
106. Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003 Sep;3(5):657-67. PubMed PMID: 14510185. Epub 2003/09/27. eng.
107. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*. 1926;13(2):187-94.
108. Chiari CdA, Mayrink W, Magalhães P. Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1973;15(5):298-303.
109. Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in the Brazilian Amazon region. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010 Aug;104(8):529-35. PubMed PMID: 20538310. Epub 2010/06/12. eng.
110. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007 Aug;14(8):1045-9. PubMed PMID: 17522327. Pubmed Central PMCID: PMC2044488. Epub 2007/05/25. eng.
111. Matos HJd, Pinto AYdN, Miranda AMM, Silva FLC, Ramos FLdP. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2015;6:65-8.
112. Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007 May;14(5):544-8. PubMed PMID: 17314229. Pubmed Central PMCID: PMC1865621. Epub 2007/02/23. eng.

113. Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi G, Jr., Penido ML, Gazzinelli RT, et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5(9):e1310. PubMed PMID: 21931874. Pubmed Central PMCID: PMC3172188. Epub 2011/09/21. eng.
114. Oliveira GG, Magalhaes FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR, et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Dec;85(6):1025-34. PubMed PMID: 22144438. Pubmed Central PMCID: PMC3225146. Epub 2011/12/07. eng.
115. Chavez-Fumagalli MA, Martins VT, Testasica MC, Lage DP, Costa LE, Lage PS, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2013 Jun;20(6):835-41. PubMed PMID: 23554466. Pubmed Central PMCID: PMC3675975. Epub 2013/04/05. eng.
116. Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jeronimo SM, Bezerra G, Soto M, et al. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005 Oct;12(10):1164-7. PubMed PMID: 16210478. Pubmed Central PMCID: 1247827. Epub 2005/10/08. eng.
117. Costa MM, Penido M, dos Santos MS, Doro D, de Freitas E, Michalick MS, et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1622. PubMed PMID: 22629475. Pubmed Central PMCID: PMC3358334. Epub 2012/05/26. eng.
118. Murrell K, Fayer R, Dubey J. Parasitic organisms. *Advances in meat research (USA)*. 1986.

APÊNDICE

(Artigo Publicado)

doi: 10.1128/JCM.01904-16

AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGYJournal of
Clinical Microbiology®

IMMUNOASSAYS

Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different *Leishmania* Species

Camilla Massae Sato,^a Maria Carmen Arroyo Sanchez,^a Beatriz Julieta Celeste,^a Malcolm S. Duthie,^b Jeffrey Guderian,^b Steven G. Reed,^b Maria Edileuza Felinto de Brito,^c Marliane Batista Campos,^d Hella Valeria de Souza Encarnação,^e Jorge Guerra,^f Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita,^g Suzana Kanawati Pinheiro,^g Rajendranath Ramasawmy,^h Fernando Tobias Silveira,^{d,h} Marina de Assis Souza,^{a,c} Hiro Goto^{a,h}

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, USA; Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center-Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Pernambuco, Brazil; Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil; Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil; Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brazil; Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil; Universidade Federal do Pará/Núcleo de Medicina Tropical, UFPA/NMT, Pará, Brazil; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT American tegumentary leishmaniasis (ATL) (also known as cutaneous leishmaniasis [CL]) is caused by various species of protozoa of the genus *Leishmania*. The diagnosis is achieved on a clinical, epidemiological, and pathological basis, supported by positive parasitological exams and demonstration of leishmanin delayed-type hypersensitivity. Serological assays are not routinely used in the diagnosis because many are considered to have low sensitivity and the particular *Leishmania* species causing the disease can lead to variable performance. In the present study, we generated recombinant versions of two highly conserved *Leishmania* proteins, *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*-derived Lb6E and Lb6H, and evaluated both in enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Recombinant Lb6H (rLb6H) had better performance and reacted with 100.0% of the ATL and 89.4% of the VL samples. These reactions with rLb6H were highly specific (98.5%) when compared against those for samples from healthy control individuals. We then assessed rLb6H against sera from ATL patients infected with different species of *Leishmania* prevalent in Brazil [*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, and *L. (V.) guyanensis*] and samples from patients with other infectious diseases. In analyses of 500 sera, ELISA using rLb6H detected all 219 ATL samples (sensitivity of 100.0%) with an overall specificity of 93.9% (considering healthy individuals and other infectious diseases patients). Only a minority of samples from Chagas disease patients possessed antibodies against rLb6H, and all of these responses were low (with a highest reactivity index of 2.2). Taken together, our data support further evaluation of rLb6H and the potential for its routine use in the serological diagnosis of ATL.

KEYWORDS ELISA, diagnostics, immunoserology, recombinant antigen, tegumentary leishmaniasis

Leishmaniasis are the variety of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Numerous *Leishmania* species are distributed worldwide, causing a wide range of disease manifestations (1–3). The clinical forms of the disease depend predominantly on

Received 14 September 2016 Returned for modification 10 October 2016 Accepted 9 November 2016

Accepted manuscript posted online 7 December 2016

Citation Sato CM, Sanchez MCA, Celeste BJ, Duthie MS, Guderian J, Reed SG, de Brito MEF, Campos MB, de Souza Encarnação HV, Guerra J, de Mesquita TGR, Pinheiro SK, Ramasawmy R, Silveira FT, de Assis Souza M, Goto H. 2017. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. J Clin Microbiol 55:495–503. <https://doi.org/10.1128/JCM.01904-16>.

Editor Peter Gilligan, UNC Health Care System

Copyright © 2017 Sato et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Hiro Goto, hgoto@usp.br.

* Present address: Hiro Goto, Laboratório de Soroprevalência e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

TABLE 1 Demographic data for ATL patients

Parasite ^a	Sex ^b		Age (yr)		Disease duration (mo)		Clinical presentation (no.)		
	M	F	Median	Min-max ^c	Median	Min-max	Cutaneous	Mucosal	Unidentified
<i>L. amazonensis</i> (n = 6)	6	0	34	9–44	96	1.47–300	6	0	0
<i>L. braziliensis</i> (n = 115)	59	40	33	13–78	3	0.03–672	65	34	15
<i>L. guyanensis</i> (n = 96)	71	14	Not known	Not known	Not known	Not known	96	0	0

^an, number of samples.^bM, male; F, female.^cMin-max, minimum to maximum.

the infecting species but are also influenced by the genetic background and immune response of the host. The infection may be asymptomatic or present across a spectrum of clinical manifestations, ranging from localized, disseminated, diffuse or recidiva cutaneous, or mucosal forms, or with involvement of organs such as liver and spleen in cases of visceral leishmaniasis (VL) (3). More than 350 million people, in 88 countries, are at risk of *Leishmania* infection, and 12 million people are estimated to be infected. The annual incidence is 1.5 million cases for cutaneous leishmaniasis (CL) and 500,000 for VL (4).

American tegumentary leishmaniasis (ATL) (also known as cutaneous leishmaniasis) is characterized by chronic and often latent infection. In some cases, after the appearance of an initial cutaneous lesion, multiple cutaneous lesions (disseminated leishmaniasis) and/or mucosal lesions (mucosal leishmaniasis) can arise as the parasites disseminate through blood and the lymphatic system. The clinical manifestations of ulcerated and nonulcerated lesions during ATL can be similar to those of diseases such as leprosy, paracoccidioidomycosis, syphilis, and cutaneous tuberculosis, among others (5). Laboratory testing is therefore desirable to confirm the diagnosis of ATL. While direct parasite detection is considered confirmatory for the diagnosis of leishmaniasis, direct detection methods have demonstrated low sensitivity that only rises to 88% when they are combined with labor-intensive immunohistochemistry (5). Thus, other indirect immunoassays, such as delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigens (leishmanin test) and serological anti-*Leishmania* antibody tests, are sometimes used (6, 7).

The most commonly used serological assays for the diagnosis of leishmaniasis are indirect immunofluorescence assays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), and Western blots. Initial studies with a large number of samples from ATL/CL patients from northern and northeastern Brazil reported low sensitivities of both an indirect immunofluorescence assay (27.7%) and an ELISA (66.9%) (8). Higher sensitivities were observed with mucosal leishmaniasis (ML), at 56.7% and 93.3%, respectively (9). While the performance of these tests seems to be improving, the sensitivities have been highly variable (75 to 96%) (10).

A sensitive serological assay for the diagnosis of ATL could guide the proper management and treatment of patients. From the perspective of product development and reproducibility, it would be desirable to have recombinant antigens as alternatives to crude antigens that require parasite growth. For VL, assays using recombinant *Leishmania* antigens are already integrated into the diagnostic routine, and immunochromatographic rapid tests are available to be used at the point of care (11). For diagnosis of ATL/CL, however, there is no consensus on the use of serological assays and on the preferred antigens.

We previously generated promising results with ATL and VL using *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* recombinant Hsp83 (rHsp83) antigen (12), although in that study the ATL samples had no characterization of causative *Leishmania* species. In the present study, we aimed to determine the capacity of recombinant *Leishmania* antigens for the serological diagnosis of ATL caused by different species of *Leishmania*. *Leishmania braziliensis*-derived recombinant Lb6H (rLb6H) and Lb8E (rLb8E) antigens were generated and used in antibody-detection ELISA evaluating samples from the northern, northeastern, and southeastern areas of Brazil where different *Leishmania* species prevail. Our data, obtained with 219 patient samples (see Table 1 for the demographic

TABLE 2 Amino acid conservation across protozoan parasites

Parasite	Results for 6H:				Results for 8E:			
	No. of aa ^a	No. of matched aa	No. of mismatched aa	% Identity	No. of aa	No. of matched aa	No. of mismatched aa	% Identity
<i>L. braziliensis</i>	657				152			
<i>L. infantum</i>	653	606	51	92	152	140	12	92
<i>L. major</i>	654	608	49	93	152	140	12	92
<i>T. cruzi</i>	657	560	97	85	147	120	32	79

^aaa, amino acid.

data for patients), indicate 100.0% sensitivity for the confirmation of ATL and 93.9% specificity compared against data for samples from healthy individuals and other infectious diseases patients. Our results raise the possibility of using ELISA with rLb6H (ELISA-rLb6H) in the routine diagnosis for ATL/CL.

RESULTS

Conservation of potential serodiagnostic proteins across *Leishmania* species.

We previously reported high sensitivity and specificity for the serodiagnosis of leishmaniasis using *L. (L.) infantum* rHsp83 (12). While this protein was found to be unstable (degraded and yielding inconsistent results over time), the data indicated the potential of using conserved *Leishmania* proteins in antibody detection assays to assist in the diagnosis of ATL/CL. We therefore evaluated the amino acid sequences of two selected *L. (Viannia) braziliensis* proteins, rLb8E and rLb6H, across available *Leishmania* sequences. Each of the proteins exhibited >90% identity at the amino acid level with homologs in *L. infantum*, the causative agent of VL in Brazil, and *L. major*, a causative agent of CL (Table 2). Identity was slightly reduced in the related kinetoplastid protozoan parasite that is also endemic in Brazil, *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Homology data thereby indicate the conservation of Lb8E and Lb6H across *Leishmania* species and suggest their potential as targets of the infection-induced antibody response.

Detection of antigen-specific antibodies in sera from leishmaniasis patients. In an initial testing round, we contrasted the ability of rLb8E and rLb6H to detect antibodies in sera from leishmaniasis patients against control samples from healthy individuals. Antigen-specific IgG was detected by ELISA and measured in 68 samples from ATL patients (a subset of group I) and 68 samples from healthy individuals (group III), and receiver operating characteristic (ROC) curves were generated (Fig. 1 A, B, and C). With use of the cutoff values determined by ROC curves as providing the best performance characteristics for each antigen, anti-rLb8E IgG was detected in 83.3% of the ATL cases with a specificity of 83.3% (Table 3). Anti-rLb6H IgG was detected in all (100.0%) of the ATL/CL cases with a specificity of 98.5%. This sensitivity was actually improved over that obtained with crude *L. major*-like antigens, which detected antibodies in 91.2% of the ATL/CL cases at a reduced specificity of 95.6%.

We similarly evaluated the ability of rLb8E and rLb6H to detect antibodies in sera from VL patients (Fig. 1D and E). Antibodies against rLb8E were found in 95.4% and antibodies against rLb6H in 89.4% of the VL patient sera tested (Table 3). These responses were detected at specificities of 92.4% and 95.3% for rLb8E and rLb6H, respectively. Taken together, these data indicated that rLb6H was an excellent candidate for ATL diagnosis that warranted further investigation.

Reactivity of rLb6H with sera from ATL cases caused by various *Leishmania* species. Having demonstrated that antibodies against rLb6H were present in the sera of clinically diagnosed ATL patients, we further investigated reactivity by assessing responses in ATL patients for whom the infecting *Leishmania* species was defined (group I, Table 3). Anti-Lb6H antibodies were readily detected in all ATL cases (95% confidence interval [CI], 98.3 to 100.0) caused by infection with either *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, or *L. (V.) guyanensis* (Fig. 2). Samples from 2 patients infected with *L. (V.) shawi* were strongly reactive, presenting high reactivity index (RI) values (RI =

FIG 1 Receiver operating characteristic (ROC) curves to determine ELISA performance. In the top panels, antigen-specific antibody ELISAs were developed with samples from ATL patients ($n = 68$) and healthy subjects ($n = 68$) and are contrasted: (A) ELISA-rLb6E considered a cutoff 36.5, (B) ELISA-rLb6H considered a cutoff 16.0, and (C) ELISA-*L. major*-like considered a cutoff 10.0. In the bottom panels, antigen-specific antibody ELISAs were developed with samples from visceral leishmaniasis patients ($n = 66$) and healthy subjects ($n = 66$): (D) ELISA-rLb6E considered a cutoff 39.1 and (E) ELISA-rLb6H considered a cutoff 6.1.

13.1 and 9.2) (data not shown in Fig. 2). Interestingly, the magnitude of responses varied, depending on the infecting species, with patients infected with *L. (V.) guyanensis* (median RI = 3.6) having weaker responses than patients infected with *L. (L.) amazonensis* (median RI = 7.7) and *L. (V.) braziliensis* (median RI = 4.5). For *L. major*-like antigens, stronger responses were detected with patients infected with *L. (L.) amazonensis* (median RI = 12.9) than with *L. (V.) braziliensis* (median RI = 5.5) or *L. (V.) guyanensis* (median RI = 4.7). When responses against rLb6H were contrasted against those detected by *L. major*-like antigens, it was again apparent that the recombinant antigen was more reactive with sera from ATL patients than the crude antigens (Fig. 2A and B). Anti-*L. major*-like antibodies were detected in 90.9% (95% CI, 86.3 to 94.0) of the ATL patient sera tested. Thus, this expanded analysis further supports the potential of using rLb6H for the serodiagnosis of ATL/CL.

rLb6H has minimal reactivity with serum samples from other infectious diseases. Considering the very high sensitivity of the ELISA-rLb6H in detecting ATL cases, we were concerned that this might have arisen at the expense of specificity. We therefore evaluated specificity under more stringent conditions, assessing the ELISA-rLb6H with 213 serum samples from patients with other infectious diseases. Among 91

TABLE 3 Diagnostic performance of antigens as determined by ROC curves

Presentation ^a	Antigen	Cutoff	% sensitivity (95% CI) ^b	% specificity (95% CI)	% accuracy
ATL	rLb6E	36.5	83.3 (72.1–91.4)	83.3 (72.1–91.4)	83.3
	rLb6H	16.0	100.0 (94.7–100.0)	98.5 (92.1–100.0)	99.2
	<i>L. major</i> -like	10.0	91.2 (81.8–96.7)	95.6 (87.6–99.1)	91.1
VL	rLb6E	39.1	95.4 (87.3–99.0)	92.4 (83.2–97.5)	93.1
	rLb6H	6.1	89.4 (79.4–95.6)	95.3 (86.9–99.0)	92.3

^aSamples used in the calculation of the cutoff versus control samples from healthy individuals. ATL, American tegumentary leishmaniasis; VL, visceral leishmaniasis.

^b95% CI, 95% probability confidence interval.

FIG 2 Antigen-specific responses among patients with American tegumentary leishmaniasis (ATL) (A, B) or other infectious diseases (C, D). Antigen-specific antibodies were developed for rLb6H (A, C) and *L. major*-like proteins (B, D). Serum samples were from ATL patients (group I) and individuals diagnosed with other infectious diseases (group II: Chagas disease [CH], $n = 91$; histoplasmosis [HIS], $n = 4$; malaria [MAL], $n = 14$; paracoccidioidomycosis [PB], $n = 22$; toxoplasmosis [TOXO], $n = 69$; and tuberculosis [TB], $n = 13$). The horizontal line in each plot represents the cutoff at a reactivity index of 1. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks: $P = 0.0003$ (A) and $P = 0.0088$ (B); Dunn's multiple comparison test: $P < 0.05$ (A, B).

samples from Chagas disease patients, 74 (81.3%) were below the threshold and 17 (18.7%) were low positive (the reactivity index ranged from 1.0 to 2.2) (Fig. 2C and D). These results were in stark contrast with those generated with *L. major*-like antigens, for which a majority (75.8%) of Chagas disease samples reacted. In addition, at least two samples from each of the other diseases assessed possessed antibodies that could bind *L. major*-like antigens (Table 4). Thus, without, or with minimal, interference from other potentially confounding pathogens, the ELISA-rLb6H appears suitable for the serodiagnosis of ATL/CL.

TABLE 4 Antigen-specific antibodies in sera of patients with potentially confounding infectious diseases

Disease	No. of samples	ELISA-rLb6H		ELISA- <i>L. major</i> -like	
		No. reactive (%)	95% CI ^a	No. reactive (%)	95% CI
Chagas disease	91	17 (18.7)	12.0–27.9	69 (75.8)	66.1–83.5
Histoplasmosis	4	0 (0.0)	0.0–49.0	2 (50.0)	15.0–85.0
Malaria	14	0 (0.0)	0.0–21.1	6 (42.9)	21.4–67.4
Paracoccidioidomycosis	22	0 (0.0)	0.0–14.9	4 (18.2)	7.3–38.5
Toxoplasmosis	69	0 (0.0)	0.0–5.3	15 (21.7)	13.6–32.8
Tuberculosis	13	0 (0.0)	0.0–22.8	3 (23.1)	8.2–50.3
Total	213	17 (8.0)	5.0–12.4	99 (46.7)	39.9–53.2

^a95% CI, 95% probability confidence interval.

DISCUSSION

Diagnosis of ATL/CL can be difficult due to its varied clinical manifestations that have similarities with fungal and mycobacterial infections, among other diseases (13). To date, laboratory tests such as parasitological and histopathological exams have exhibited low sensitivity and the diagnostic utility of the leishmanin (delayed-type hypersensitivity) test is limited because it indicates not only current infection but also prior infection. The general belief has been that serological assays for ATL/CL would be limited by low sensitivity, and they have not therefore been considered for use in routine diagnosis. Serological assays are, however, used in some institutions although many work with antigens produced in-house from *Leishmania* promastigotes grown in culture, such that a universal, standardized antigen is lacking (14–16).

In recent decades, an increasing number of recombinant proteins have been described as candidates for the diagnosis of leishmaniasis (17–21). In general, however, the sensitivity of these antigens has been low and has not warranted further development into serologic tests that can be widely used. We previously obtained high sensitivities and specificities for ELISA using *Leishmania* (*L.*) *infantum* rHsp83 against ATL and VL samples (12). The rHsp83 antigen is unstable and degrades, however, and this has precluded its further development into a standardized diagnostic method. rHsp83 did provide proof of concept for the potential of antibody detection assays to assist the diagnosis of ATL and indicated the importance of identifying new and highly conserved proteins among different species of *Leishmania* to provide antigens for detection of antibodies in sera of ATL patients. We therefore evaluated the reactivity of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*-derived rLb8E and rLb6H antigens in sera from leishmaniasis patients in this study. While both antigens performed very well (high sensitivity and specificity for *Leishmania* infection), initial testing indicated that rLb6H had a greater capacity than rLb8E to react with serum antibodies of ATL patients. Reactivity with VL samples does not necessarily constitute a major problem for the diagnosis and management of patients since the clinical presentations of VL and ATL/CL are typically distinct. Exceptions may occur in cases of HIV-*Leishmania* coinfection that may have unusual manifestations (22), but a positive antibody response in this situation may prompt the use of direct detection methods for verification of the infecting *Leishmania* species and appropriate management of the patient.

In the present study, the performance of rLb6H was indicated to be excellent, yielding 100.0% sensitivity and 98.5% specificity (versus healthy controls) for the detection of antibodies in sera from ATL patients. Furthermore, our cohort consisted of samples of patients from different *Leishmania*-endemic regions of Brazil for whom ATL was caused by the particular species of *Leishmania* prevalent to the region. Previous reports have suggested that variations in assay sensitivity may occur due to the infecting *Leishmania* species. When *L. (L.) amazonensis* antigen preparations were used for assaying, sensitivities were observed to be slightly lower with samples from patients infected by *L. (V.) guyanensis* than from patients infected by *L. (V.) braziliensis*: 79.6% and 71.7% by indirect immunofluorescence assay and of 98.2% and 85.0% by ELISA, respectively. Furthermore, for both tests, the titers with samples from *L. (V.) guyanensis*-infected patients were significantly lower than those with samples from *L. (V.) braziliensis*-infected patients (23). It is noteworthy that the reactivity against rLb6H observed in our study tended to be higher with samples from patients infected with *L. (L.) amazonensis*, followed by those infected with *L. (L.) braziliensis* and then those infected with *L. (V.) guyanensis*. Thus, our data suggest that the amount of circulating antibody may be dependent upon the *Leishmania* species involved. There are data suggesting variations of anti-*Leishmania* antibody levels dependent on clinical presentations of the disease (24), but in the present study, the available data did not allow us to address this aspect, which will be further explored. Although our data also suggested that reactivity levels varied considerably among groups of patients when the duration of disease was longer, no correlation was detected (Spearman correlation, $r = 0.052$, $P = 0.7192$).

Rigorous evaluation of sera from other diseases against rLb6H indicated that the recombinant protein provided much greater specificity for ATL than that achieved with *Leishmania major*-like total antigen. The only apparent concern arose when sera of patients with Chagas disease were evaluated, with 18.7% of the Chagas disease samples exhibiting low-level responses (the highest reactivity index measured was 2.2). While this is likely a result of cross-reactivity due to the high degree of homology of the 6H antigen between *L. (V.) braziliensis* and *T. cruzi*, we cannot formally exclude the possibility that the Chagas disease patients were also latently infected with *Leishmania*. Any suspicion of coinfection could be further investigated using Chagas disease-specific tests to verify *T. cruzi* infection or parasitological examinations to exclude/confirm *Leishmania* infection. Regardless, the results obtained with the rLb6H antigen are very promising, supporting further evaluation and potential for routine use in the serological diagnosis of ATL.

MATERIALS AND METHODS

Patients and serum samples. Serum samples from 500 Brazilian adults of both sexes were classified into three groups. Group I consisted of 219 samples of ATL patients from regions where different *Leishmania* species are present: the northern city of Manaus, Amazon state, and various cities of Para state; the northeastern city of Recife, Pernambuco state; and the southeastern city of São Paulo, São Paulo state (Table 1). Leishmaniasis was diagnosed by demonstration of a positive leishmanin test (25), histopathology of skin lesions (26, 27), and/or direct identification of *Leishmania* infection by either parasitological exams or PCR (27). The species identified as causative agents of ATL were *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, and *L. (V.) shawi*. Various methods were used to identify the infecting species: monoclonal antibodies (28) (samples from Para state), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) of Hsp70 (29, 30) (samples from Manaus), and schizodemas (31) (samples from Recife). To assess specificity and potential cross-reactivity, group II consisted of 213 samples from patients with other diseases: Chagas disease ($n = 91$), histoplasmosis ($n = 4$), malaria ($n = 14$), paracoccidioidomycosis ($n = 22$), toxoplasmosis ($n = 60$), and tuberculosis ($n = 13$). These latter samples were obtained from other studies, all approved by the ethics committees of the institutions involved. Twenty Chagas disease samples, in particular, were from Montes Claros, Minas Gerais state. Group III consisted of 68 individuals considered healthy by their own assessment and/or clinical exam. The study was approved by the Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (National Council of Ethics on Research) and the Ethics Committee of Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (protocol 490.392).

Antigens. The Lb6H and Lb8E antigens were originally identified during screening of a *L. (V.) braziliensis* genomic expression library with serum from a ML patient (32). Oligonucleotide PCR primers were designed to contain a 5' NdeI site, followed by residues encoding an amino-terminal six-histidine tag, and a 3' EcoRI site following the residues encoding the termination codon. The PCR-amplified product was digested with NdeI and EcoRI and ligated into pET 17b and subsequently transformed into *Escherichia coli* BL-21 host cells for expression. Recombinant Lb6H was purified from the insoluble inclusion bodies, and recombinant Lb8E was purified from the soluble fraction by affinity chromatography using a nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose column. The purified protein fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and quantified using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL).

The total alkaline extract of *L. major*-like (MHOM/BR/71/49) was produced according to the method of Colesta et al. (33).

Recombinant *Leishmania* antigen-specific and *L. major*-like total antigen-specific antibody detection ELISAs. Polystyrene plates were coated with 50 μ l/well of either 1 μ g/ml rLb6H and rLb8E antigens or 5 μ g/ml *L. major*-like total antigen in 0.06 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Plates were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber and then washed three times with 0.01 M phosphate-buffered saline (pH 7.2) containing Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PBS-T). Wells were blocked by adding 125 μ l/well of PBS-T containing 5% skimmed milk (PBS-T-L 5%) and incubating at 37°C for 2 h in a humidified chamber before washing three times with PBS-T. Then, samples diluted either 1/100 (for the recombinant antigen ELISA) or 1/160 (for the total *L. major*-like ELISA) in PBS-T-L 2% were added in duplicate wells (50 μ l/well) and incubated at 37°C in a humidified chamber for 30 min before washing five times with PBS-T. Then 50 μ l/well of goat anti-human IgG peroxidase conjugate (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) diluted 1/20,000 in PBS-T-L 2% was added and incubated at 37°C in a moist chamber for 30 min before the plates were washed five times with PBS-T. Finally, 50 μ l/well of tetramethylbenzidine- H_2O_2 (TMB) single solution (Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added, and the reaction was allowed to progress for 7 min at room temperature under dark conditions before being stopped by the addition of 25 μ l/well of 2 N H_2SO_4 . The spectrophotometric reading of each well was performed at 450 nm using a Multiskan GO instrument (Thermo Scientific, Finland).

Statistical analysis. The sensitivity, specificity, and confidence intervals (95% CI) of each assay were calculated after construction of a receiver operating characteristic (ROC) curve. The cutoff value to discriminate negative and positive samples was determined by ROC curves as providing the best performance following analyses of 68 samples from ATL patients and 68 samples from healthy individuals. The ELISA results were expressed as the optical density (OD) of the test sample divided by the OD

of the positive control in each plate and multiplied by 100, called percentage point positivity (pp) of the positive control (34). For each sample, the reactivity index (RI) was calculated by dividing the pp value per cutoff. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and SigmaStat 3.5 analysis system software (Systat Software, Richmond, CA, USA). The Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by Dunn's multiple comparison test, when appropriate, was used to compare medians. The correlation between reactivity levels and the duration of disease were assessed by Spearman's rank correlation test. Differences were considered statistically significant when P values were <0.05 .

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2015/22075-8 and fellowship 2016/02622-7 to C.M.S.), by CAPES (fellowship to C.M.S.), by Conselho Nacional de Pesquisa (research fellowship to H.G.), and by Laboratórios de Investigação Médica (LIM-38-HC, FMUSP). This research was also supported by funding from the Bill and Melinda Gates Foundation under grants OPP49932 and OPP1084251 and by grant R01AI025038 from NIAID, National Institutes of Health.

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the Bill and Melinda Gates Foundation or the National Institutes of Health.

REFERENCES

- Lainson R, Shaw JJ. 2010. New World leishmaniasis, Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY.
- Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CJ, Titus RG. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209:1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11101.x>.
- Grimaldi G, Jr, Tesh RB. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6:230–250. <https://doi.org/10.1128/CMR6.3.230>.
- Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>.
- Goto H, Lindoso JA. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>.
- Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, Valencia BM, Veland N, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A. 2010. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83:345–350. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0414>.
- Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorenzo R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD, Jr, Jones TC. 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35:79–85.
- Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL. 1990. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ* 68:39–43.
- Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL, Cuca LC, Belda W, Jr. 1989. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ* 67: 643–648.
- Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, Nascimento LD, Marzochi MC, Marzochi KB. 2009. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:383–389. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.019>.
- Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, Mbuchi M, Mukhtar M, Raballo A, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Adams E, Menten J, Peeling R, Boelaert M, WHO/TDR Visceral Leishmaniasis Laboratory Network. 2012. A global comparative evaluation of commercial immuno-chromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 55:1312–1319. <https://doi.org/10.1093/cid/cis716>.
- Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LG, Lima Costa FA, Goto H. 2014. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 90:860–865. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0623>.
- Pinaro J, Martinez E, Pacheco R, Aragon Z, De Armas F, Del Castillo A, Valladares B. 1999. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 73:21–29. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00015-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00015-7).
- Badaro R, Reed SG, Barral A, Orgo G, Jones TC. 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 35:72–78.
- Celeste BJ, Guimaraes CS, Corrales EM. 1988. Peroxidase antibody test for mucocutaneous leishmaniasis serology. Performance indexes and comparison with a fluorescent antibody test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 30:411–414.
- Choudhry A, Puri A, Guru PY, Saxena RP, Saxena KC. 1992. An indirect fluorescent antibody (IFA) test for the serodiagnosis of kala-azar. *J Commun Dis* 24:32–36.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant leishmania P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:387–391.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36:58–63.
- de Souza Dias S, da Costa Pinheiro PH, Katz S, dos Santos MR, Barbieri CL. 2005. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72:126–132.
- Rafati S, Hassani N, Taslimi Y, Movassagh H, Rochette A, Papadopoulos B. 2006. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 13:1104–1110. <https://doi.org/10.1128/CVI.00188-06>.
- de Souza CM, Silva ED, Ano Bom AP, Bastos RC, Nascimento HJ, da Silva Junior JG. 2012. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnosis using recombinant proteins. *Parasite Immunol* 34:1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01334.x>.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Passada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H. 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160:311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08908.x>.
- Romero GA, de la Gloria Orga Orga M, de Farias Guerra MV, Paes MC, de Oliveira Macedo V, de Carvalho EM. 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.005>.
- Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. 2010. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum*

- chagasi infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104:529–535. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.05.002>.
25. Montenegro J. 1926. A cutis-reação na leishmaniose. *An Fac Med S Paulo* 1:323–330.
 26. Guimarães MC, Celeste BJ, de Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM. 1981. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an opimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 30:942–947.
 27. Goto H, Lindoso JAL. 2012. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26:293–307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>.
 28. Grimaldi G, McMahon-Pratt D. 1996. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:37–42.
 29. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K, Dujardin JC. 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 42:2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>.
 30. Marfurt J, Nasaruddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minicodon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 41:3147–3153. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003>.
 31. Cupolillo E, Grimaldi G, Jr, Momen H. 1995. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol* 89:17–23. <https://doi.org/10.1080/00034983.1995.11812924>.
 32. Skalky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacalar O, Carvalho EM, Reed SG. 1995. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun* 63:4105–4114.
 33. Celeste BJ, Guimarães MC, de Souza JM, Bergamaschi DP. 1998. Reproducibility of alkaline antigens of *Leishmania major*-like and *Leishmania (V.) braziliensis* evaluated by IgG-ELISA. Comparison of antigens added of a protein inhibitor (PMSF) or not. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40:287–290.
 34. Hasker E, Kansal S, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Singh RP, Chourasia A, Singh AK, Shankar R, Mantou J, Wilson ME, Boelaert M, Sundar S. 2013. Latent infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2053. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002053>.

ANEXO A

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/12/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **513/13** intitulado: **“DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CAUSADA POR ESPÉCIES DIFERENTES DE LEISHMANIA”** apresentado pelo **INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao **CEP-FMUSP**, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Hiro Goto

Pesquisador (a) Executante: Camila Massae Sato

CEP-FMUSP, 12 de Dezembro de 2013.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM DOENÇAS
TROPICAIS E SAÚDE INTERNACIONAL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: _____
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ____/____/____
 ENDEREÇO: _____ Nº: _____
 APTO: _____ BAIRRO: _____
 CIDADE: _____ CEP: _____
 TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ____/____/____
 ENDEREÇO: _____ Nº: _____
 APTO: _____ BAIRRO: _____
 CIDADE: _____ CEP: _____
 TELEFONE: DDD (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Diagnóstico sorológico de leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de *Leishmania*

PESQUISADOR: Hiro Goto

CARGO/FUNÇÃO: Professor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CREMESP 18.228

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 (dois) anos

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que irá avaliar o teste sorológico com antígenos novos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar humana.

Para que o (a) senhor (a) seja completamente informado sobre o estudo, objetivos e os as finalidades e os procedimentos que serão realizados durante o seu desenvolvimento, apresentamos para seu conhecimento este termo. Por favor, faça quaisquer perguntas e tire todas as dúvidas que tiver antes de concordar em participar deste estudo.

Desenho do estudo e objetivos. A leishmaniose tegumentar americana é uma doença infecciosa, causada por diferentes tipos (espécies) do parasito conhecido como *Leishmania*, que provoca úlceras na pele e mucosas. Nos casos mais graves, pode ocorrer perfurações no nariz ou no céu da boca ou ter lesões espalhadas em várias partes da pele. Para fazer o tratamento, é muito importante a confirmação do diagnóstico. Para diagnosticar a doença é realizado, atualmente, a reação de Montenegro na pele ou é retirado material da ferida (biópsia ou esfregaço) para encontrar o parasito. Esses exames são demorados para se ter os resultados que nem sempre confirmam o diagnóstico. Pode-se fazer um teste com o sangue, com o soro. Esse tipo de exame conhecido como sorologia é considerado pouco útil, porque a reação não é positiva em muitos casos. Neste estudo, vamos utilizar reagentes diferentes para melhorar esse teste sorológico, para confirmar o diagnóstico de leishmaniose tegumentar causada por diferentes tipos do parasito. O teste sorológico melhorado pode ajudar na confirmação do diagnóstico e, desta forma, iniciar seu tratamento de forma mais rápida. Para este estudo, a sua contribuição, voluntária, será fornecendo um pouco de sangue para este teste sorológico.

Descrição dos procedimentos que serão realizados. O (A) senhor (a), para fazer o diagnóstico, provavelmente, fará os testes que são feitos em todos os pacientes. O médico retirará uma amostra da lesão de pele para achar o parasito, pedirá para fazer a reação de Montenegro na pele e vários exames de sangue. Para este estudo novo, além dos exames de sangue que já são feitos normalmente, faremos outro, o teste sorológico utilizando reagentes diferentes.

Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. O (A) senhor (a), para o diagnóstico, provavelmente, fará os testes que são feitos em todos os pacientes. O médico retirará uma amostra da lesão de pele, um pequeno pedaço depois de anestesiado para achar o parasito. Será feita a reação de Montenegro, injetando na pele um antígeno, com uma seringa pequena e que vai ser visto o resultado na pele, dois ou três dias depois. Serão pedidos vários exames de sangue que será retirado da veia periférica por punção. O sangue para este estudo pode ser colhido junto com os outros exames ou separadamente, mas a quantidade não será superior a 5 mililitros.

Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos. A coleta de sangue pode causar dor no momento da picada por agulha e pode deixar pequeno hematoma, mancha, no local. A retirada do material da lesão pode causar dor na hora da injeção da anestesia e ocorrer um pequeno sangramento. A reação de Montenegro pode causar dor na hora da injeção do antígeno.

Benefícios para o participante. Não terá um benefício direto para o paciente porque vamos estudar a reação com novos reagentes. Como acreditamos que o teste sorológico será melhorado para diagnosticar leishmaniose tegumentar, no final do estudo, pode trazer benefícios para outros pacientes com a mesma doença.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr^a. Hiro Goto que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº470/500, 4º andar, sala 3, telefone (11) 3061-7023. Se o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: (11) 3061-8004, FAX: (11) 3061-8004 – e-mail: cep.fm@usp.br

Garantia de retirada de consentimento. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Direito de confidencialidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Direito de ser mantido atualizado. Tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado para esta pesquisa. O material, o soro residual, será armazenado em repositório para quando surjam estudos para melhorar o diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar. Quando for utilizar para outro estudo, o (a) senhor (a) será consultado (a) para consentimento para o uso do material coletado e armazenado para novos estudos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Diagnóstico sorológico de leishmaniose tegumentar causada por espécies diferentes de *Leishmania*”. Eu discuti com a Dr^a. Hiro Goto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do Responsável pelo estudo

Data ____/____/____