

RUTH TAMARA VALENCIA PORTILLO

**Validação de teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno
recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose
Tegumentar Americana (LTA)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez

São Paulo

2022

RUTH TAMARA VALENCIA PORTILLO

**Validação de teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno
recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose
Tegumentar Americana (LTA)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Valencia Portillo, Ruth Tamara
Validação de teste imunoenzimático (ELISA)
empregando antígeno recombinante Lb6H para o
diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar
Americana (LTA) / Ruth Tamara Valencia Portillo. --
São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Maria Carmen Arroyo Sanchez.

Descritores: 1.Testes sorológicos 2.Leishmaniose
cutânea 3.Leishmaniose mucocutânea 4.Ensaio de
imunoadsorção enzimática 5.Proteínas recombinantes
6.Leishmania braziliensis

USP/FM/DBD-029/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus queridos pais Carlos e Carmen por me ensinar sempre a seguir para frente, a perseverança da minha mãe e a força de meu pai, amo muito vocês.

Aos meus avós Ruth e Juan por me cuidar e me dar essas palavras de apoio sempre.

Obrigada, por acreditar em mim

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser guia de meu caminho sempre, sem ele eu não estaria aqui agora.

A meus pais, Carlos e Carmen, aos meus avós Ruth e Juan, jamais vou poder devolver o que você faz por mim e Sara e Pablo sou grata por vocês me amar.

A minha orientadora Dra. Maria Carmen, peça indispensável no meu desenvolvimento nesta fase da minha vida. Obrigada Carmen, Deus bendiga sempre você, não tenho palavras para agradecer tudo que você faz por mim.

Aos meus irmãos Karlo e Mia pelas palavras e as mensagens de amor, meus tios Ruth, Juan, Jesus, Esteban e Isabel e a toda minha família pelo apoio dado em cada etapa da minha vida, seus conselhos e palavras de amor fizeram que sempre me sinta em companhia

A Alexis, por toda a compreensão e o carinho, por estar de meu lado em momentos difíceis e me dar a força quando preciso.

A David, Berna e Chris por ser parte importante da minha família brasileira, pelo abraço e alento para seguir avançando

Ao Eduardo Ramos, Orlando Sevillano e Luiza Campos por que chegar a um país diferente é difícil, vocês me ajudaram no processo de chegar, me adaptar e ainda adaptada seguir perguntando se estou bem.

A Edith Kanashiro, Mussya Rocha e Marina Souza pela ajuda desde que cheguei no laboratório, vocês não só me ajudaram na pesquisa com seus conhecimentos se não também na minha vida longe de casa.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para chegar a este momento da minha vida.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Professora Hiro Goto pela oportunidade de ficar em Brasil, confiança e paciência no só no momento da escrita deste trabalho, mas também a sabedoria para resolver as minhas dúvidas no proceso.

Ao professor Angelo Lindoso, Amanda Azevedo e Livia Vieira pela colaboração na coleta das amostras, procura dos pacientes e todo o aprendizado nos dois anos de coleta. Sempre lembrarei de vocês, as minhas segundas feiras não serão as mesmas sem vocês. Obrigada por ser parte deste trabalho e da minha vida.

A Msc Beatriz Celeste do Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, Obrigada Bia não só pelas amostras se não também pela agradável convivência no laboratório.

A Dr. Maria Edileuza Felinto de Brito do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE, pelas amostras dadas para este trabalho, foram muito importantes para conseguir os resultados.

Ao Dr. Jorge Guerra do Instituto de Medicina Tropical, AM e a Msc Nicolle Brandão pela coleta e posterior envio das amostras de Manaus, amostras importantes para o desenvolvimento do projeto.

Aos Drs. Malcolm S. Duthie, Jeffrey Guderian, Steven G. Reed pelo fornecimento dos três lotes de antígeno utilizado no trabalho sem os antígenos este trabalho não seria possível.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira do Instituto Evandro Chagas, PA pelas amostras dadas, foram muito importantes para conseguir os resultados deste trabalho.

À Dra. Anamaria Melo Miranda Paniago da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelas amostras dadas neste trabalho.

A todos aqueles pacientes dos ambulatórios que aceitaram contribuir com este trabalho.

Às amigas do grupo Hiro, Katherine, Paola, Cinthia y Mahyumi, pelo companheirismo, colaboração e conselho no processo de mestrado.

À secretaria da pós-graduação Gislaine Matheus pela paciência e disponibilidade

Ao laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e a todas as personas que trabalham em ele.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ao CAPES pelo apoio financeiro (Número de Processo 88882.376665/2019-01),

Ao LIM-38 (HC-FMUSP)

Muito obrigada!

“O problema em nossa sociedade hoje é acreditar que a educação existe apenas para torná-lo mais inteligente ou com mais recursos. Mas o mais importante é usar esse conhecimento e educação para nos ajudar a compreender a importância de nossas ações e ter disciplina em nossas mentes”. – Dalai Lama

Resumo

Valencia Portillo RT. *Validação de teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma questão em aberto em nosso meio, sendo premente a busca de uma solução. Exames laboratoriais são importantes no diagnóstico de LTA, pois as manifestações clínicas, embora muitas vezes sugestivas, não são patognomônicas, havendo necessidade de dados complementares indicativos da etiologia. Entre os exames laboratoriais disponíveis, até o momento, nenhum parece ter sensibilidade compatíveis para utilização na rotina diagnóstica. Os testes voltados ao encontro de parasitos em amostras provenientes de lesão são considerados teste padrão, mas a sensibilidade não é alta e os testes moleculares voltados à detecção de DNA de *Leishmania* carecem ainda de padronização entre os vários laboratórios. Neste cenário, surge a opção de exames laboratoriais indiretos que detectam a presença de resposta imune à *Leishmania*, exame sorológico ou teste de hipersensibilidade tardia. Entretanto, devido à baixa produção de anticorpos anti-*Leishmania*, os testes sorológicos têm sido pouco utilizados no diagnóstico da LTA. Por outro lado, a resposta imune celular é bem patente e é detectada por teste de Montenegro (hipersensibilidade tardia) e por isso utilizado na rotina clínica. No entanto, este não é mais realizado por descontinuidade na produção do antígeno, trazendo problemas ao diagnóstico de LTA. Visando à utilização no diagnóstico da LTA, foi validado teste sorológico, no formato ELISA, para pesquisa de anticorpos anti-IgG, utilizando três lotes do antígeno recombinante Lb6H, derivado da sequência de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com uma casuística de 1.091 amostras, distribuídas em quatro painéis. No painel de referência (painel 1), composto por 70 amostras de pacientes com as formas cutânea e mucosa e 70 controles sadios, o teste apresentou sensibilidade de 100,0% (IC95%: 94,8-100,0), 95,7% (IC95%: 88,1-98,8) e 98,6% (IC95%: 92,3-99,9) e especificidade de 100,0% (IC95%: 94,8-100,0), 97,1% (IC95%: 90,2-99,5) e 100,0% (IC95%: 94,8-100,0), respectivamente para os lotes A, B e C. O ensaio mostrou-se reprodutível, com coeficiente de variação das amostras positivas $\leq 12,73$ na repetibilidade, $\leq 28,86$ na reprodutibilidade e $\leq 9,05$ na homogeneidade. Na avaliação da estabilidade do antígeno na placa com o tempo, as placas sensibilizadas com o antígeno recombinante mostraram-se estáveis a -20°C e 4°C , por 180 dias e o estudo da estabilidade acelerada (37°C) indicou validade de 12 meses, sem perda de reatividade. Em amostras de pacientes com LTA, provenientes de cinco centros de pesquisa e/ou assistência (painel 2), o teste padronizado apresentou sensibilidade de 79,1% (IC95%: 74,8-82,9), 79,9% (IC95%: 75,6-83,6) e 84,0% (IC95%: 80,0-87,3), respectivamente para os lotes A, B e C. Em amostras de controles sadios, provenientes de quatro áreas com diferentes endemicidades (painel 3), obteve-se especificidade de 75,6% (IC95%: 71,0-80,0); 73,7% (IC95%: 69,0-78,0) e 92,4% (IC95%: 89,2-94,7), respectivamente para os lotes A, B e C. No estudo da reatividade cruzada (painel 4), resultados positivos foram obtidos em 14,5% (IC95%: 9,8-20,7) das amostras de outras doenças com o lote A e 13,9% (IC95%: 9,3-20,0) com os lotes B e C. Com base no bom desempenho diagnóstico e nas características de reprodutibilidade e estabilidade do antígeno, sugere-se a utilização de rLb6H no diagnóstico da LTA.

Descritores: Testes sorológicos; Leishmaniose cutânea; Leishmaniose mucocutânea; Ensaio de imunoadsorção enzimática; Proteínas recombinantes; *Leishmania braziliensis*.

Abstract

Valencia Portillo RT. *Validation of enzyme immunoassay (ELISA) using recombinant Lb6H antigen for the serological diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) diagnosis is an open question in our country, and the search for a solution is urgent. Laboratory tests are essential in diagnosing ATL, as the clinical manifestations, although often suggestive, are not pathognomonic, requiring complementary data indicative of the etiology. Among the laboratory tests available to date, none seems to have compatible sensitivity for use in routine diagnosis. Tests aimed at finding parasites in samples from lesions are considered a standard test, but the sensitivity is not high, and molecular tests aimed at detecting *Leishmania* DNA still lack standardization among the various laboratories. In this scenario, there is the option of indirect laboratory tests that detect the presence of an immune response to *Leishmania*, serological examination, or delayed hypersensitivity test. However, due to the low production of anti-*Leishmania* antibodies, serological tests have been used little in diagnosing ACL. On the other hand, the cellular immune response is quite evident and is detected by the Montenegro test (delayed hypersensitivity) and is therefore used in clinical routine. However, this is no longer performed due to discontinuity in the antigen production, bringing problems to the diagnosis of ACL. Therefore, aiming to be used in the diagnosis of ACL, a serological test was validated, in ELISA format, for the investigation of anti-IgG antibodies, using three batches of the recombinant antigen Lb6H, derived from the *Leishmania (Viannia) braziliensis* sequence, with a series of 1,091 samples, divided into four panels. In the reference panel (panel 1), composed of 70 samples from patients with the cutaneous and mucosal forms and 70 healthy controls, the test showed a sensitivity of 100.0% (95%CI: 94.8-100.0), 95.7% (95%CI: 88.1-98.8) and 98.6% (95%CI: 92.3-99.9), and a specificity of 100.0% (95%CI: 94.8-100.0), 97.1% (95%CI: 90.2-99.5) and 100.0% (95%CI: 94.8-100.0), respectively for batches A, B and C. The assay proved to be reproducible, with a coefficient of variation of positive samples ≤ 12.73 for repeatability, ≤ 28.86 for reproducibility, and ≤ 9.05 for homogeneity. In evaluating the stability of the antigen on the plate with time, the plates sensitized with the recombinant antigen were stable at 4°C and -20°C for 180 days, and the accelerated stability study (37°C) indicated the validity of 12 months, without loss of reactivity. In samples of patients with ACL from five research and care centers (panel 2), the standardized test showed a sensitivity of 79.1% (95%CI: 74.8-82.9), 79.9% (95%CI: 75.6-83.6), and 84.0% (95%CI: 80.0-87.3), respectively for batches A, B, and C. In samples of healthy controls, from four areas with different endemicities (panel 3), specificity of 75.6% (95%CI: 71.0-80.0); 73.7% (95%CI: 69.0-78.0) and 92.4% (95%CI: 89.2-94.7) was obtained, respectively for batches A, B, and C. In the cross-reactivity study (panel 4), positive results were obtained in 14.5% (95%CI: 9.8-20.7) of the samples of other diseases with batch A and 13.9% (95%CI: 9.3-20.0) with batches B and C. Based on the good diagnostic performance and the reproducibility and stability characteristics of the antigen, we suggest using rLb6H in the diagnosis of ATL.

Descriptors: Serological tests; Leishmaniasis, cutaneous; Leishmaniasis, mucocutaneous; Enzyme-linked immunosorbent assay; Recombinant proteins; *Leishmania braziliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Ciclo biológico da *Leishmania* causadora da Leishmaniose tegumentar.25
- Figura 2** - Distribuição da leishmaniose tegumentar (casos de leishmaniose cutânea) no mundo 2020. **Fonte: WHO 2021**27
- Figura 3** – Mapa do Brasil – A. Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* no Brasil; B. Distribuição geográfica dos vetores de *Leishmania* no Brasil. **Fonte: SVS/MS 2021**28
- Figura 4** – Diversas manifestações clínicas das leishmanioses. 1 e 5 - Leishmaniose cutânea localizada; 2 e 6 - Leishmaniose cutânea disseminada, 3 e 8 - Leishmaniose mucosa Fonte particular, 4 e 7 - Leishmaniose cutânea difusa. **Fonte: Prof. José Angelo Lauletta Lindoso**30
- Figura 5** - Equação da reta obtida na curva de calibração do BSA (Albumina de soro bovino)58
- Figura 6** - Análise do perfil eletroforético dos lotes da proteína rLb6H em SDS-PAGE. a - Perfil eletroforético dos três lotes aplicando 3 µg/mL de proteína por poço. b - Perfil eletroforético dos três lotes aplicando 6 µg/mL de proteína por poço. 1 – Lote A; 2 – Lote B; 3 – Lote C59
- Figura 7** - Perfil de reatividade em *Immunoblotting* dos três lotes de rLb6H. 1- Padrão de peso molecular corado com *Ponceau S*. 2-4 - lote A. 5-7- lote B. 8-10 - lote C. 2, 5 e 8 - Padrão positivo de alta reatividade. 3, 6 e 9 - Padrão positivo de baixa reatividade. 4, 7 e 10 – Padrão negativo..... 60
- Figura 8** - Valores de “absorbância percentual do padrão positivo” (ABS%) obtidos no teste ELISA-rLb6H, na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando o painel 1 de amostras de pacientes com LTA (N=70) e indivíduos saudáveis (N=70). A-B-C- Lotes dos antígenos. Os três lotes de rLb6H discriminam significativamente as amostras negativas e as amostras positivas ($p < 0:0001$; teste de Mann–Whitney) 62
- Figura 9** - Curvas *ROC* do teste ELISA-rLb6H construídas a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo”, na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando amostras de pacientes com LTA (N=70) e indivíduos saudáveis (N=70) (Painel 1). A-B-C- Lotes dos antígenos. 1 IC – Intervalo de confiança; 2 p – valor de p.....63
- Figura 10** - Índices de reatividade (IR) das amostras de pacientes com LTA ensaiadas com os lotes A, B e C no ELISA-rLb6H (N=70) e heatmap dos coeficientes de correlação de Spaerman.....65

- Figura 11** - Diagramas de Venn das amostras positivas e negativas testadas no ELISA-rLb6H. A, B, C – lotes de antígeno; Amostras positivas N=70; Amostras negativas N=70 66
- Figura 12** - Distribuição das densidades óticas obtidas das amostras negativas e positivas, ensaiadas por cinco operadores, um em cada dia diferente, pelo ELISA-rLb6H, no estudo de reprodutibilidade, em cada lote de antígeno. A linha azul representa a média obtida por cada operador..... 68
- Figura 13** - Distribuição das densidades óticas obtidas das amostras negativas e positivas, ensaiadas no ELISA-rLb6H, no estudo de repetibilidade, em cada lote de antígeno. Amostra positiva - paciente com LTA (N=1). Amostra negativa - indivíduo saudável (N=1). A linha preta representa a média obtida em cada lote 69
- Figura 14** - Distribuição das densidades óticas obtidas das amostras negativas e positivas, ensaiadas no ELISA-rLb6H, no estudo de homogeneidade, em cada lote de antígeno (cinco repetições para cada amostra). A linha preta representa a média obtida com cada amostra 71
- Figura 15** - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a 4°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma amostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. ABS% - absorbância percentual do padrão positivo..... 73
- Figura 16** - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a -20°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma amostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. ABS% - absorbância percentual do padrão positivo 74
- Figura 17** - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a 37°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma amostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. DO – Densidade ótica obtida da leitura do ELISA. 75
- Figura 18** - Diagramas de Venn das amostras com diagnóstico imunológico positivo (N = 267). IFI – Imunofluorescência indireta; ELISA – teste imunoenzimático; IDR – Intradermorreação de Montenegro 76
- Figura 19** – Diagrama de Venn das amostras com diagnóstico etiológico positivo (N = 218). Exame direto – pesquisa direta do parasito; Cultura – pesquisa após cultura do parasito; IHQ – Imuno-histoquímica; PCR – reação em cadeia da polimerase. ... 77
- Figura 20** – Fluxograma das amostras do painel 3 de validação (amostras de indivíduos saudáveis) 86

Figura 21 - Índice de reatividade das amostras de outras doenças em cada lote. 1 AI – doença autoimune; 2 TX – toxoplasmose; 3 SI - sífilis, 4 PB – paracoccidioidomicose; 5 MA – malária; 6 CH – doença de Chagas; 7 TB – tuberculose; 8 HI – histoplasmosse; 9 FR – presença de fator reumatoide; 10 MO – mononucleose. A linha preta pontilhada representa a divisão entre positivo e negativo. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras do painel 1 (Pacientes com LTA e indivíduos saudáveis), empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC ¹	37
Tabela 2 - Amostras dos pacientes com LTA caracterizadas por espécie infectante (N=45), empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC.....	38
Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes com LTA ¹ cujas amostras foram empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC ²	39
Tabela 4 - Amostras do painel 2 (pacientes com LTA ¹), empregadas na validação do ELISA-rLb6H.....	43
Tabela 5 - Amostras do painel 3 (indivíduos saudáveis), empregadas na validação do ELISA-rLb6H.....	44
Tabela 6 - Amostras do painel 4 (pacientes com outras doenças), empregadas na validação do ELISA-rLb6H	45
Tabela 7 - Parâmetros testados para a padronização do ELISA com os quatro lotes de rLb6H	50
Tabela 8 - Dosagem de conteúdo proteico dos três lotes da proteína rLb6H, obtida pelo método BCA (ácido bicinonínico).....	58
Tabela 9 - Parâmetros escolhidos na padronização do teste ELISA-rLb6H	61
Tabela 10 - Desempenho diagnóstico do ELISA-rLb6H, empregando 70 amostras de pacientes com LTA e de 70 controles sadios (Painel 1).....	64
Tabela 11 – Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do ELISA-rLb6H, ensaiando amostras de pacientes com LTA e de indivíduos saudáveis em dias diferentes e com operador diferente cada dia.....	67
Tabela 12 - Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do ELISA-rLb6H, ensaiando amostra de paciente com LTA e de indivíduo saudável, repetidas 30 vezes.....	69
Tabela 13 - Coeficiente de variação obtidos no estudo da homogeneidade do ELISA-rLb6H, ensaiando em duas amostras de pacientes com LTA e duas de indivíduos saudável, em diferentes cavidades da placa.....	70
Tabela 14 - Dados demográficos dos pacientes com LTA ¹ (Painel 2).....	78
Tabela 15 – Sensibilidade ¹ do ELISA-rLb6H empregando amostras de pacientes com LTA ² (Painel 2).....	79

Tabela 16 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA, de quatro centros de coleta (FMT-HVD ¹ , IIER ² , HCFMUSP ³ e CPqAM ⁴)	81
Tabela 17 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo	82
Tabela 18 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus	82
Tabela 19 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo	83
Tabela 20 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife	83
Tabela 21 – Especificidade ¹ das amostras de controles saudáveis (Painel 3) antes do teste de Chagas ² e FR ³	87
Tabela 22 – Especificidade ¹ das amostras de controles saudáveis (Painel 3) após o teste de Chagas ² e FR ³	87
Tabela 23 - Reatividade cruzada das amostras de pacientes com outras doenças no ELISA-rLb6H, com cada um dos lotes empregados	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(V.)	<i>Viannia</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CV	Coefficiente de variação
DAT	Teste de aglutinação direta
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISA rK39	ELISA com recombinante K39
ELISA r-Lb6H	ELISA com recombinante Lb6H
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR	Fator reumatoide
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IIER	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IR	Índice de reatividade
KDa	Quilo Dalton
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos com Tween 20
PBS-T-L	Solução salina tamponada com fosfatos com Tween 20 e leite

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor
SCMSP	Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1.	Introdução	22
1.1.	Leishmaniose tegumentar: Esboço Histórico	23
1.2.	Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i>	24
1.3.	Epidemiologia da Leishmaniose	26
1.3.1.	Leishmaniose no mundo	26
1.3.2.	Leishmaniose Tegumentar no Brasil	27
1.4.	Manifestações clínicas das leishmanioses	28
1.5.	Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar	30
1.5.1.	Aspectos clínico-epidemiológicos	30
1.5.2.	Aspectos laboratoriais	30
2.	Objetivos	35
3.	Materiais e métodos	37
3.1.	Casuística	37
3.1.1.	Painel de referência	37
3.1.2.	Painel de validação	40
3.1.2.1.	Cálculo da amostragem	40
3.1.2.2.	Critérios de inclusão e de exclusão dos casos de LTA	41
3.1.2.1.	Composição do painel de validação	41
3.2.	Aspectos éticos da pesquisa	46
3.3.	Antígeno recombinante	47
3.4.	Avaliação dos lotes do antígeno rLb6H	47
3.4.1.	Dosagem do conteúdo proteico	47
3.4.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	47
3.4.3.	<i>Immunoblotting</i>	48
3.5.	ELISA com antígeno recombinante Lb6H	49

3.5.1.	Padronização	49
3.5.2.	Cálculo do <i>cut-off</i> do teste ELISA-rLb6H	50
3.6.	Validação do ELISA-rLb6H – amostras do painel de referência	51
3.6.1.	Sensibilidade e especificidade	51
3.6.2.	Reprodutibilidade	51
3.6.3.	Repetibilidade	52
3.6.4.	Homogeneidade	52
3.6.5.	Estabilidade a 4°C e -20°C	52
3.6.6.	Estabilidade acelerada	53
3.7.	Validação do ensaio ELISA-rLb6H - amostras de diferentes áreas endêmicas do país	53
3.8.	Outros testes realizados	54
3.8.1.	ELISA para doença de Chagas	54
3.8.2.	Aglutinação indireta para pesquisa de fator reumatoide	54
3.9.	Análise estatística	54
4.	Resultados	58
4.1.	Avaliação dos lotes de antígeno rLb6H	58
4.1.1.	Dosagem do conteúdo proteico dos lotes de rLb6H	58
4.1.2.	Análise do perfil eletroforético dos lotes de rLb6H em SDS-PAGE	59
4.1.3.	Análise da reatividade dos lotes de rLb6H por reação de <i>Immunoblotting</i>	59
4.2.	Padronização do ELISA com os lotes de rLb6H	60
4.3.	Protocolo final do teste ELISA-rLb6H	61
4.4.	Cálculo do <i>cut-off</i> do teste ELISA-rLb6H	62
4.5.	Validação do ELISA-rLb6H – amostras do painel de referência	64
4.5.1.	Sensibilidade e especificidade	64
4.5.2.	Reprodutibilidade	66
4.5.2.1.	Repetibilidade	67
4.5.3.	Homogeneidade	69

4.5.4.	Estabilidade das placas sensibilizadas às temperaturas de 4°C e -20°C	71
4.5.5.	Estabilidade acelerada	72
4.6.	Validação do ELISA-rLb6H - amostras de diferentes regiões do Brasil	76
4.6.1.	Pacientes com LTA – Sensibilidade	76
4.6.2.	Indivíduos saudáveis – Especificidade	84
4.6.3.	Pacientes com outras doenças – Reação cruzada	88
5.	Discussão	92
6.	Conclusão	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	ANEXO	110

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares, prevalentes em áreas tropicais e subtropicais, podendo-se apresentar sob as formas visceral (LV) e tegumentar (LT) (ALVAR et al., 2012). Os parasitos que causam leishmaniose pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (GRIMALDI et al., 1991; GRIMALDI JR; MCMAHON-PRATT, 1996; LAINSON; SHAW, 2005), gênero *Leishmania*. Das 30 espécies de *Leishmania* conhecidas, em torno de 20 são patogênicas ao homem (TORRES-GUERRERO et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Atualmente, 102 países reportam casos de leishmaniose no mundo; destes, 87 são considerados endêmicos; 14 países têm a maior parte dos casos da leishmaniose visceral e 12 países, de leishmaniose tegumentar; o Brasil é endêmico para ambas as leishmanioses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A leishmaniose tegumentar (LT) compreende um amplo espectro de manifestações clínicas que dependem da espécie de *Leishmania*, bem como da resposta do hospedeiro (GOTO; LINDOSO, 2010; GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014). Com base em suas apresentações clínicas diferentes, a LT é classificada como leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose disseminada, leishmaniose recidiva *cutis* e leishmaniose mucosa (LM) (HERWALDT, 1999; GOTO; LINDOSO, 2010; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). As leishmanias causadoras da LT pertencem aos subgêneros *Leishmania* (LAINSON et al., 1987) e *Viannia*.(ROSS, 1903) Cerca de 20 espécies diferentes são conhecidas como agentes etiológicos com distribuição diferente nas várias partes do mundo (TORRES-GUERRERO et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A LC é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e graves incapacidades (ARONSON et al., 2016). A LM leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

1.1. Leishmaniose tegumentar: Esboço Histórico

As primeiras representações gráficas da LT são cerâmicas achadas no Peru e datam da época pré-colombiana (WEBSIGHT SOLUTION GROUP, 1997). Nestas cerâmicas mostravam-se representações de lábios e narizes mutilados, característica da espundia, hoje conhecida como leishmaniose mucosa (BASANO; CAMARGO, 2004).

Um dos primeiros relatos da leishmaniose no Brasil encontra-se no livro intitulado “La antigüedad de la sífilis en el Perú” (1909), em que Julio C. Tello descreveu a viagem realizada à Amazônia Brasileira em 1827 por um clérigo que observou indivíduos com lesões ulceradas nas pernas e braços “causadas” por mosquitos, assim como lesões destrutivas no nariz e boca (TELLO, 1909; VALE; FURTADO, 2005; FURUSAWA; BORGES, 2014).

Em 1885 no Brasil, Cerqueira observou as lesões da LTA em pacientes na Bahia; entretanto, a princípio não as correlacionou com o botão de Biskra ou botão do oriente, nomes empregados nos países asiáticos (FURUSAWA; BORGES, 2014). Dez anos depois na Itália, Breda observou as mesmas lesões em pessoas provenientes de São Paulo (FURUSAWA; BORGES, 2014). Em 1985, Juliano Moreira relatou, pela primeira vez na Bahia e no Brasil, a ocorrência do botão de Biskra (botão ou úlcera do Oriente ou botão endêmico dos países quentes), descrevendo minuciosamente as formas clínicas (JACOBINA; GELMAN, 2008). Relacionou o botão de Bahia com o botão endêmico dos países quentes levantando a hipótese de que a leishmaniose americana havia sido trazida pelos sírios em alguma incursão em tempos remotos. (VALE; FURTADO, 2005).

Em 1903 James Homer Wright, observou formas de protozoários numa amostra de úlcera cutânea de uma menina da Armênia (Síria) com suspeita de botão de oriente identificando pela primeira vez *Welcosoma tropicum*, depois denominada *Leishmania tropica* (LEE; YOUNG; CASTLEMAN, 2002; STEVERDING, 2017).

No século XX, no estado de São Paulo, o início da construção da estrada de ferro noroeste coincidiu com o início de uma grande epidemia em que as pessoas apresentavam lesões ulceradas mucosas, descritas como úlcera de Bauru (VALE; FURTADO, 2005). Em 1909, Lindenberg identificou formas idênticas à *Leishmania tropica* em um indivíduo que trabalhava na construção da estrada (PESSÔA, S. B.; BARRETTO, 1948). Porém, em 1911, Gaspar

Vianna observou que tratava-se de outra espécie, denominando *Leishmania braziliensis*, o agente etiológico da úlcera de Bauru, nariz de tapir ou ferida brava (VIANNA, 1911).

Em 1926, Montenegro utilizou a intradermorreação no diagnóstico imunológico da LT (BASANO; CAMARGO, 2004). A intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi empregada em inquéritos de prevalência nas áreas endêmicas (SKRABA et al., 2015) e também em estudos clínico-epidemiológicos e assim ajudou a conhecer e acumular conhecimentos sobre a doença (LAINSON, 2010; ATLAS INTERATIVO, 2021). O conceito de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), a qual indica os casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea identificados na América Latina foi acunhado em 1930 (BENCHIMOL et al., 2019).

Até 1960, as classificações das leishmanioses eram baseadas em critérios clínicos e duração da doença. Em 1961, Samuel Pessoa propôs que as subdivisões e variedades deveriam ser baseadas nas regiões onde se pegava a doença (VALE; FURTADO, 2005). Essas subdivisões ganharam impulso e com os avanços da microscopia, biologia molecular, bioquímica e imunologia, ajudaram a fazer a caracterização das leishmanioses (SHAW, 1985).

No Brasil, foram reconhecidas pelo menos sete espécies, cada uma delas com as respectivas manifestações clínicas, vetores, reservatórios, epidemiologia, distribuição geográfica e respostas terapêuticas (VALE; FURTADO, 2005).

1.2. Ciclo Biológico da *Leishmania*

A leishmânia é um parasito digenético, tem duas formas evolutivas no seu ciclo biológico: a forma amastigota e a forma promastigota (HOARE; WALLACE, 1966; BATES, 2007; SUNTER; GULL, 2017). A forma amastigota se caracteriza por ter o corpo ovoide e flagelo interno ou rudimentar, sem movimento, é intracelular obrigatório e mede entre 2,1 e 3,2 μm (HERWALDT, 1999; SUNTER; GULL, 2017). A forma promastigota é morfologicamente alongada, de flagelo livre, extracelular e mede entre 14 e 20 μm (HERWALDT, 1999; SUNTER; GULL, 2017). Os promastigotas encontram-se no intestino dos flebotomíneos (vetor).

O ciclo da *Leishmania* no vertebrado (Figura 1) se inicia com a picada da fêmea de flebotomíneo infetado com *Leishmania*, do gênero *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no caso do velho mundo (BATES; ROGERS, 2004). Durante a alimentação da fêmea

hematófaga, os promastigotas metacíclicos ingressam na corrente sanguínea do hospedeiro. O parasito é fagocitado pelos macrófagos que são atraídos para o lugar pela reação inflamatória da picada. No vacúolo fagocitário do macrófago, os promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária, levando ao rompimento do macrófago, após invadir todo o citoplasma da célula, sendo liberados ao tecido para serem fagocitados novamente. O ciclo no inseto se inicia quando a fêmea de flebotomíneo pica uma pessoa infectada e, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere fagócitos parasitados com amastigotas. No inseto, as amastigotas migram para o tubo digestório e se diferenciam na forma promastigota procíclica, que se diferencia em metacíclica (forma infectante) e migra até a porção anterior do tubo digestório do vetor, até que após um novo repasto sanguíneo, continue com o ciclo. (HANDMAN, 1999; LUPI et al., 2009; GLOBAL HEALTH, 2020) (Figura 1).

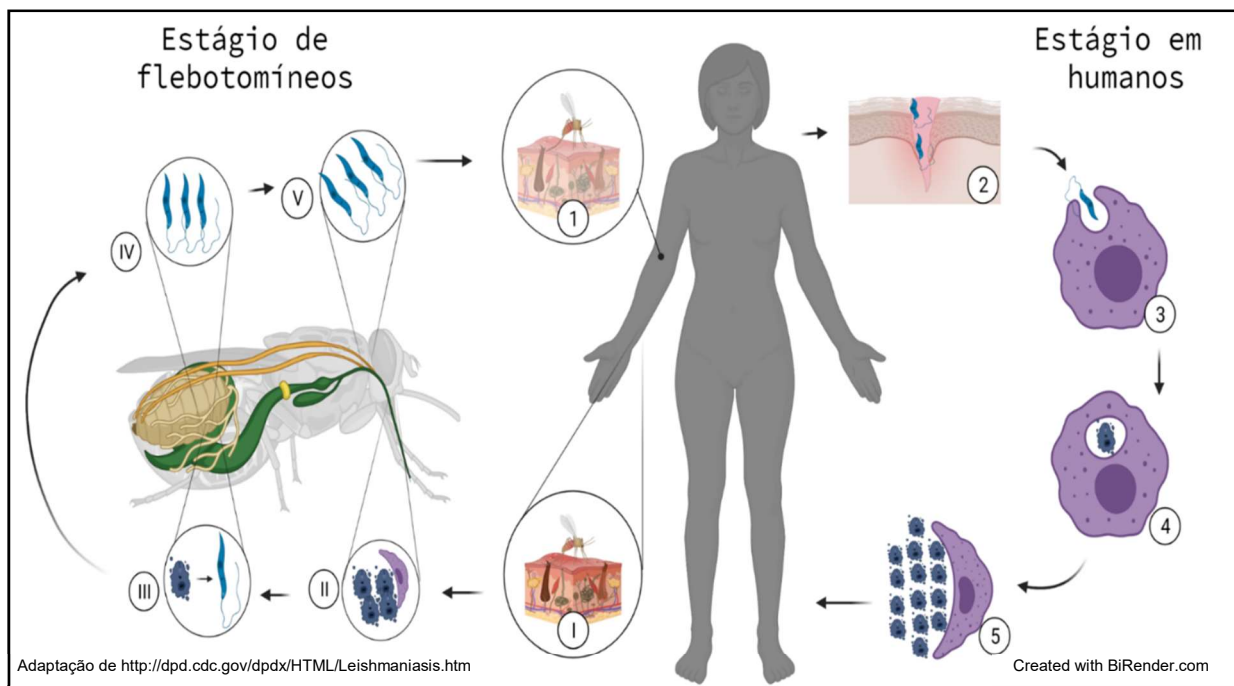


Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* causadora da Leishmaniose tegumentar.
Fonte: Adaptação de <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm> 2021

1.3. Epidemiologia da Leishmaniose

1.3.1. Leishmaniose no mundo

Em 2019, mais de 87% dos casos novos de LT ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A incidência varia entre 600 mil e 1 milhão de novos casos no mundo, anualmente. Mais de 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (Figura 2).

Nas Américas, foram identificadas 15 das 22 espécies de *Leishmania*, sendo a mais prevalente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, seguida de *L. (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*. Outras espécies também estão presentes como *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*, com maior diversidade encontrada na região amazônica (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION 2019, 2019; ORGANIZATION, 2021).

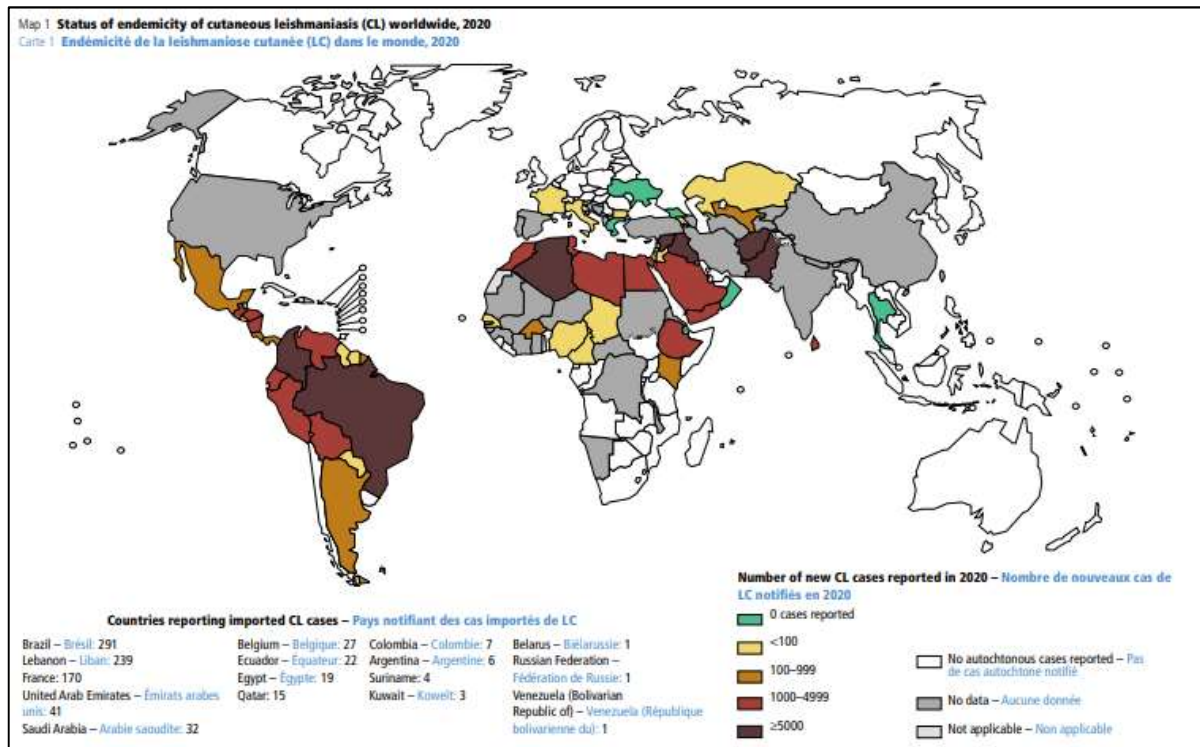


Figura 2 - Distribuição da leishmaniose tegumentar (casos de leishmaniose cutânea) no mundo 2020.
Fonte: WHO 2021

1.3.2. Leishmaniose Tegumentar no Brasil

A leishmaniose tegumentar é importante porque tem uma ampla distribuição, é altamente incidente em países tropicais e subtropicais além da capacidade de causar deformidades no ser humano tendo um efeito psicossocial no indivíduo (YANIK et al., 2004). Em 2020, no Brasil foram reportados 16.347 casos da LTA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021); mais de 40% na região Norte, em torno de 20% no Nordeste, 15% no Centro-Oeste e 10% no Sudeste (MINISTERIO DA SAUDE - SAUDE A - Z, 2019). No Brasil, a LTA é uma doença de notificação compulsória que atinge todos os estados (MACULOSA; AMERICANA; VISCERAL, 2004) (Figura 3A).

O vetor responsável pela transmissão de *Leishmania* nas Américas pertence ao gênero *Lutzomyia*, comumente conhecido como mosquito-palha, tatuquira, birigui, asa dura, asa branca, cangalha, cangalhinha, entre outros (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD., 2019). Tem aproximadamente 0,5 cm de comprimento, pernas delgadas e longas, assim como o corpo densamente piloso. A distribuição no território brasileiro é ampla, todos os estados têm pelo menos uma espécie do vetor (Figura 3B).

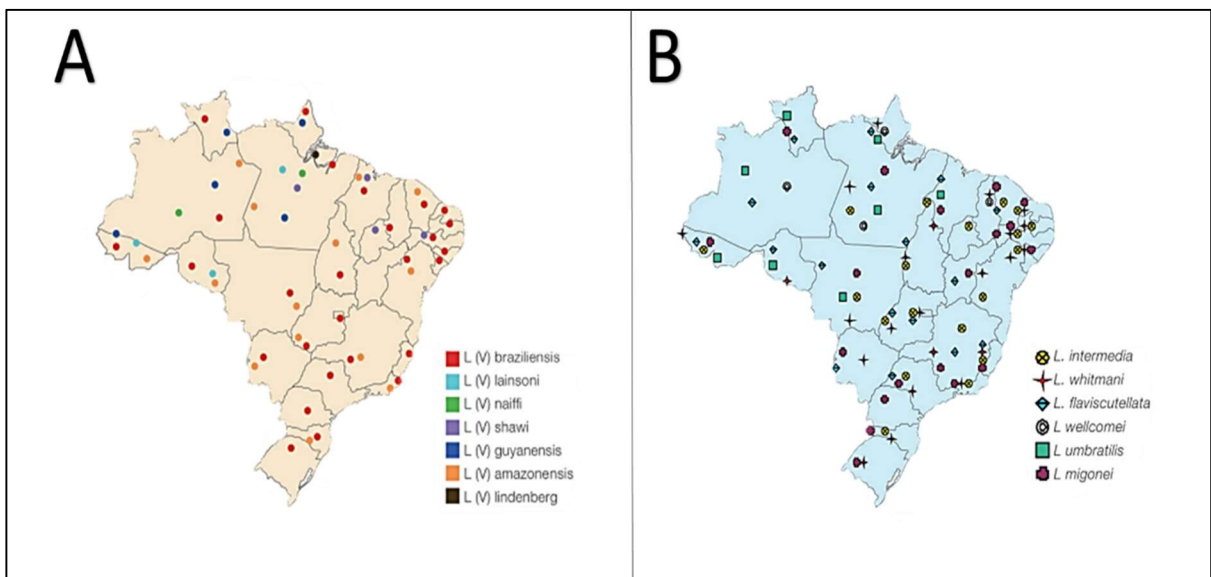


Figura 3 – Mapa do Brasil – A. Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* no Brasil; B. Distribuição geográfica dos vetores de *Leishmania* no Brasil. **Fonte:** SVS/MS 2012

A partir da década dos anos 80, houve um aumento no número de casos registrados no Brasil. Desde 1990 até 2014, observaram-se registros acima de 20.000 casos por ano e a partir de 2015, quando ocorreram 19.395 casos, as cifras vêm caindo ligeiramente (MINISTERIO DA SAUDE - SAUDE A - Z, 2019). Entretanto, o Brasil é um dos dez países endêmicos para LTA, segundo a Organização Mundial da Saúde (RUIZ-POSTIGO et al., 2021).

1.4. Manifestações clínicas das leishmanioses

O espectro da evolução da infecção e manifestação clínica são amplos (PEREIRA et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Uma mesma espécie de *Leishmania* pode

causar diferentes manifestações clínicas ou até ser assintomática (subclínica) (MURRAY et al., 2005).

Os sinais clínicos podem ser lesões primárias localizadas, lesões disseminadas, lesões difusas ou lesões mucosas (Figura 4) (ATLAS INTERATIVO, 2021).

A manifestação clínica sugestiva relacionada com a leishmaniose cutânea é aquela que se inicia após a picada do flebotómio. No local da picada aparece a mácula, que evolui a pápula, se desenvolve a nódulo (massa dérmica que contém os macrófagos vacuolados com parasitos e infiltrado linfocitário). À medida que os nódulos crescem, em seu centro, ocorre uma reação granulomatosa induzida pela resposta imune do hospedeiro, dando como resultado uma úlcera, que cresce tornando-se crostosa, de bordas elevadas, arredondada, de fundo limpo e indolor (MURRAY et al., 2005; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

No caso das manifestações clínicas sugestivas da leishmaniose mucosa, elas se iniciam com um eritema ulcerado nas narinas, evoluindo para perfuração de septo até atingir lesões destrutivas. Podem até atingir faringe ou laringe, desfigurando a face do paciente em muitos casos de forma notável (ALIAGA et al., 2003).

As manifestações clínicas sugestivas, face a dados epidemiológicos, levantam a suspeita de LT, que será confirmada ou não com a ajuda de dados laboratoriais. Embora o início da lesão possa ser semelhante, a forma final da manifestação da doença está relacionada a processos imunológicos do hospedeiro (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO; COUTINHO, 2014).



Figura 4 – Diversas manifestações clínicas das leishmanioses. 1 e 5 - Leishmaniose cutânea localizada; 2 e 6 - Leishmaniose cutânea disseminada, 3 e 8 - Leishmaniose mucosa, 4 e 7 - Leishmaniose cutânea difusa. **Fonte: Prof. José Angelo Lauletta Lindoso/ OPAS 2021**

1.5. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar

1.5.1. Aspectos clínico-epidemiológicos

No diagnóstico da LTA, os dados epidemiológicos e as manifestações clínicas sugestivas são empregadas na definição de caso suspeito. No entanto, a variedade das manifestações clínicas da LTA, podem se assemelhar às de outras doenças que apresentam lesões ulceradas e não ulceradas de pele como na hanseníase, paracoccidiodomicose, sífilis, tuberculose cutânea (GOTO; LINDOSO, 2010; ORGANIZATION, 2010), podendo dificultar diagnósticos rápidos e precisos, fundamentais para iniciar o tratamento rapidamente e controlar a doença. Deste modo, outros parâmetros são necessários para a confirmação do diagnóstico.

1.5.2. Aspectos laboratoriais

Entre os métodos laboratoriais, exames voltados ao encontro de parasitos em amostras provenientes de lesão (por microscopia óptica ou cultura do parasito em meios de

cultura), são considerados teste padrão, mas a positividade não é alta. O exame histopatológico também apresenta baixa sensibilidade, que pode aumentar (76,1%) com a imuno-histoquímica para a detecção de *Leishmania* (GONZALEZ et al., 2019). Apesar da alta especificidade, baixa sensibilidade do exame direto e histopatológico é constatada especialmente em países do Novo Mundo, onde casos crônicos e LM são frequentes (GOTO; LINDOSO, 2010). Os testes moleculares voltados à detecção de DNA de *Leishmania* carecem ainda de padronização entre os vários laboratórios, além de serem complexos, caros e necessitarem de equipamento sofisticado e técnico especializado, o que restringe seu uso a centros de referência e de pesquisa. Essas limitações tornam o cenário de diagnóstico de LTA restrito, particularmente em locais com recursos escassos.

Neste cenário, surge a opção de exames laboratoriais indiretos, como a reação de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) e a sorologia anti-*Leishmania* para pesquisa de infecções por *Leishmania*, detectando-se a resposta ou o produto da resposta imune (REED et al., 1986; VELAND et al., 2010).

O teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*, conhecido como teste cutâneo de Montenegro, foi o teste imunológico mais utilizado na rotina clínica para o diagnóstico da LTA no Brasil, dada a sua sensibilidade e especificidade, embora não indicasse somente lesão ativa atual, mas também infecção passada (REITHINGER et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2010). Mesmo em pacientes com parasitológico negativo, se o resultado do teste de Montenegro fosse positivo, o diagnóstico de leishmaniose era estabelecido em indivíduos com dado epidemiológico compatível e lesão sugestiva, e indicava-se o tratamento (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No momento atual, o teste de Montenegro não é mais realizado pela descontinuidade da produção do antígeno, e os pacientes são tratados com base em diagnóstico de suposição, considerando os dados epidemiológicos, clínicos e exames histopatológicos, muitas vezes sem uma indicação segura de infecção por *Leishmania*. Esta situação traz problemas no diagnóstico de LTA, principalmente nos casos de evolução crônica onde os parasitos na lesão são escassos. Esta situação traz uma consequência preocupante, uma séria ameaça à saúde dos pacientes, pois as drogas utilizadas apresentam efeitos colaterais sérios.

Os testes sorológicos podem apresentar vantagens para o diagnóstico da LTA, pois empregam amostra menos invasiva em relação à biópsia de pele, podem ser automatizados e utilizados no *point-of-care* (LÉVÊQUE et al., 2020; FREIRE et al., 2021). A

imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* = ELISA) com antígeno de *L. major*-like são empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral. Entretanto, na leishmaniose cutânea, nos estudos mais antigos apresentavam baixa sensibilidade (GUIMARAES; CELESTE; FRANCO, 1990), levando à não realização de sorologia para o diagnóstico de rotina nesses pacientes. No Novo Mundo, os estudos iniciais com LTA, com amostragem grande, do Norte e Nordeste do Brasil, mostraram uma baixa sensibilidade de 27,7%, utilizando o IFI e 66,9% pelo ELISA (GUIMARAES; CELESTE; FRANCO, 1990), para as amostras de leishmaniose cutânea. Sensibilidade mais alta de 56,7% para IFI e 93,3% para ELISA foi obtida para pacientes com leishmaniose mucocutânea (GUIMARAES et al., 1989).

Embora a resposta de anticorpos, em geral, seja considerada gênero específica, os resultados podem sugerir ainda variação da resposta conforme as espécies de *Leishmania* que infectam os pacientes. Com amostras de pacientes com leishmaniose cutânea, infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, utilizando antígenos de *L. (L.) amazonensis* em testes sorológicos, os títulos nos pacientes com *L. (V.) braziliensis* eram mais baixos que naqueles infectados com *L. (V.) guyanensis* (ROMERO et al., 2005).

O desenvolvimento de ensaios sorológicos sensíveis para o diagnóstico de LTA é de suma importância para orientar o manejo e o tratamento adequados dos pacientes. Do ponto de vista do desenvolvimento e reprodutibilidade do produto, também é desejável ter antígenos recombinantes como alternativas aos antígenos brutos que requerem crescimento de parasitos, com suas limitações e dificuldades. Para leishmaniose visceral, os ensaios utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania* já estão integrados na rotina diagnóstica e testes rápidos imunocromatográficos estão disponíveis para serem utilizados nos locais de atendimento dos pacientes (CUNNINGHAM et al., 2012). Para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar, no entanto, não há consenso e não estão incorporados os métodos sorológicos. Visto que pacientes com LC produzem baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* (TORRES-GUERRERO et al., 2017), há um interesse em desenvolver testes sorológicos que apresentem elevadas sensibilidades.

Na tentativa de obter teste mais sensível para o diagnóstico da LTA, independentemente da espécie causadora, e que não se baseie em cultivo de parasitos, vários pesquisadores vêm estudando antígenos recombinantes. Recente revisão sistemática analisou 38 trabalhos, que empregaram plataformas de sorologia com diferentes antígenos, para o

diagnóstico da LT (FREIRE et al., 2021). Destes estudos, 22 foram realizados no Brasil com um número de amostras de casos de LT ou LC/LM que variou entre 24 e 219, com mediana de 53,5 e percentil 75% de 65; o número de controles variou entre 10 e 281, com mediana de 70 e percentil 75% de 125, demonstrando que a maioria dos estudos empregou pequeno número de amostras positivas. Além disso, a sensibilidade e especificidade foram variáveis. Por exemplo, Souza et al. (2013), testando seis antígenos recombinantes, em amostras de LC obtiveram sensibilidades entre 50,6-77,8% e em amostras controle de área endêmica e não-endêmica, especificidade entre 53,4-72,7% (SOUZA et al., 2013). Por outro lado, Celeste et al. (2014) empregaram ELISA-rHsp83 com amostras de LTA e de controles sadios, obtendo sensibilidade e especificidade de 100,0%, respectivamente (CELESTE et al., 2014). Entretanto, devido à instabilidade do antígeno, os estudos com rHsp83 foram descontinuados.

Em estudo recente, nosso grupo avaliou o desempenho de antígenos recombinantes de *Leishmania* para o diagnóstico sorológico de LTA causada por diferentes espécies de *Leishmania*. Com antígenos recombinantes Lb6H e Lb8E, derivados de sequência gênica de *L. (V.) braziliensis*, em ensaio imunoenzimático ELISA, foram avaliadas amostras das regiões Norte, Nordeste e Sudeste, onde prevalecem espécies diferentes de *Leishmania*. Nesse estudo, o antígeno rLb6H apresentou desempenho melhor, obtendo-se sensibilidade de 100,0% em amostras de pacientes com LTA, infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, e especificidade de 98,5%, em controles sadios (SATO et al., 2017).

Com esses resultados e devido à ausência de consenso em relação ao diagnóstico sorológico da LTA, vislumbramos a possibilidade da utilização de ELISA com antígeno recombinante Lb6H de *L. (V.) braziliensis* (ELISA-rLb6H) no diagnóstico de rotina para LTA e propomos neste projeto validar teste ELISA-rLb6H, que viria a preencher essa lacuna para o estabelecimento mais seguro de diagnóstico de LTA.

OBJETIVOS

2. Objetivos

➤ Geral

Validar o teste ELISA com o antígeno recombinante (r) Lb6H de *L. (V.) braziliensis* para a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no diagnóstico da LTA.

➤ Específicos

- ❖ Avaliar o desempenho de três lotes de antígeno rLb6H, empregando painel de referência (pacientes com leishmaniose tegumentar e controles sadios).
- ❖ Estudar a reprodutibilidade, repetibilidade e homogeneidade do ELISA-rLb6H em cada lote de antígeno e entre os lotes.
- ❖ Estudar a estabilidade das placas sensibilizadas em diferentes condições de armazenamento, no decorrer do tempo.
- ❖ Validar o ensaio ELISA-rLb6H com amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar, controles com outras patologias e controles sadios, obtidas em diferentes áreas endêmicas do país, colhidas tanto retrospectivamente, quanto prospectivamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Casuística

3.1.1. Painel de referência

O painel de referência foi constituído a partir de amostras armazenadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-FMUSP, que fazem parte do Biorrepositório da Prof. Dra. Hiro Goto (pacientes de LTA) e da Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez (indivíduos saudáveis), que será denominado Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP. A Tabela 1 descreve as características do Painel 1, que consta de amostras de pacientes com LTA (N=70) e de indivíduos saudáveis (N=70) e que foi empregado para a construção das Curvas ROC (*receiver operating characteristic*), cálculo da sensibilidade, especificidade e *cut-off*.

Tabela 1- Amostras do painel 1 (Pacientes com LTA e indivíduos saudáveis), empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC¹

Painel 1	Local	N ²	Coleta	Diagnóstico
Pacientes LTA³	Belém, PA (IEC ⁴)	14	2014 e 2015	-Caracterização da espécie por anticorpos monoclonais
	Manaus, AM (FMT-HVD ⁵)	4	2014 e 2015	-Caracterização da espécie por PCR – RFLP Hsp70
	Recife, PE (CPqAM ⁶)	21	2014 e 2015	-Caracterização da espécie por esquizodema
	São Paulo, SP (IIER ⁷)	6	2013 a 2015	-Caracterização da espécie por clivagem com enzimas de restrição – Hae III
	São Paulo, SP (IIER e HCFMUSP ⁸)	25	1996 a 2019	-Clínico-Epidemiológico complementado por diagnóstico laboratorial
Indivíduos saudáveis	São Paulo, SP (Hemocentro de São Paulo)	70	1997 e 1999	-Aptos a doar sangue, de acordo com os critérios clínico-epidemiológicos e negativos nos testes da rotina de Banco de Sangue

1 – ROC *receiver operating characteristic*; 2 – N número de amostras; 3 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 4 – IEC Instituto Evandro Chagas, Belém, PA; 5 – FMT-HVD Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado; 6 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes, FIOCRUZ, Recife, PE; 7 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 8 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

As 31 amostras de pacientes com LTA, estocadas no Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP e coletadas em São Paulo, correspondem a excedentes de material colhido de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da FMUSP (HCFMUSP) (N=13) e no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo (IIER) (N=18). Esses pacientes eram procedentes de ou tinham passagem por várias cidades do estado de São Paulo e do Brasil, onde ocorria a LTA.

Em 45 (64,3%) das 70 amostras de pacientes com LTA, foram identificadas as seguintes espécies: *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis* (Tabela 2). Os dados demográficos dos pacientes com LTA do painel 1 encontram-se na tabela 3.

As 70 amostras de indivíduos saudáveis estocadas no Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP foram obtidas de doadores do Hemocentro de São Paulo, que não apresentavam sintomas sugestivos de leishmaniose, nem sinais sugestivos de qualquer outra doença infecciosa, estando aptos a doar sangue, de acordo com os critérios clínico-epidemiológicos e negativos nos testes da rotina de Banco de Sangue quando as amostras de sangue foram coletadas.

Tabela 2 - Amostras dos pacientes com LTA¹ caracterizadas por espécie infectante (N=45), empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC²

Espécie infectante	Número de amostras	Forma clínica	Localidade
<i>L. (V.) guyanensis</i>	5	LC ³ / LCDB ⁴	Belém, Manaus
<i>L. (V.) shawi</i>	2	LCDB	Belém
<i>L. (V.) braziliensis</i>	32	LC / LM ⁵ / LCD ⁶	Belém, Recife, São Paulo
<i>L. (L.) amazonensis</i>	6	LC / LCAD ⁷	Belém

1 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 2 – ROC receiver operating characteristic; 3 – LC Leishmaniose cutânea; 4 – LCDB Leishmaniose cutânea disseminada borderline; 5 – LM Leishmaniose mucosa; 6 – LCD Leishmaniose cutânea disseminada, 7 – LCAD Leishmaniose cutânea anérgica disseminada

Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes com LTA¹ cujas amostras foram empregadas no ELISA-rLb6H para construção das curvas ROC²

Local ³	Sexo ⁴			Idade (anos)			Duração da doença (Meses)			Apresentação clínica	
	M	F	NI ⁵	Mediana	Min – Max ⁶	NI	Mediana	Min - Max	NI	Cutânea	Mucosa
Belém, PA – IEC⁷ (N=14)	6	NI	8	34	9 - 44	8	NI	NI	14	12	2
Manaus, AM - FMT-HVD⁸ - (N=4)	4	0	0	30,5	18 - 47	0	NI	NI	4	4	0
Recife, PE – CPqAM⁹ (N=21)	12	9	0	26	17 - 65	0	2	0,5 - 3	1	21	0
São Paulo, SP – IIER¹⁰ e HCFMUSP¹¹ - (N=31)	17	14	0	55	32 - 84	5	12	1 - 636	15	15	16
Total	39	23	8	39,5	9 - 84	13	3	0,5 - 636	34	52	18

1 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 2 – ROC receiver operating characteristic; 3 – Local onde as amostras foram colhidas; 4 – M Masculino, F Feminino; 5 – NI Não informado; 6 – Min–Max Mínimo–Máximo; 7 – IEC Instituto Evandro Chagas, Belém, Para, PA; 8 – FMT-HDV Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM; 9 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE; 10 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 11 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

3.1.2. Painel de validação

Foram selecionadas amostras caracterizadas e estocadas (colhidas retrospectivamente) e amostras frescas (colhidas prospectivamente).

3.1.2.1. Cálculo da amostragem

O número mínimo de casos e controles para serem incluídos no estudo de validação foi calculado, conforme a fórmula de Banoo et al., 2006 (BANOO et al., 2006) e Smith et al., 2015 (SMITH; MORROW; ROSS, 2015).

$$N = (Z_1 + Z_2)^2 \times \frac{p \times (1 - p)}{(p - p_0)^2}$$

Onde:

N = número de amostras para o estudo da sensibilidade/especificidade.

Z1 = 1,96 para $\alpha=0,05$ e Intervalo de Confiança de 95% de probabilidade (IC 95%).

Z2 = 1,28 para poder do teste de 90%.

p = sensibilidade/especificidade, obtidas no estudo anterior, medidas como índice.

p₀ = sensibilidade/especificidade, mínimas aceitáveis para a aplicação do teste.

O tamanho da amostra depende da sensibilidade/especificidade esperada, da precisão e poder esperados. Na padronização do ensaio (SATO et al., 2017), foi obtida sensibilidade de 100,0% (IC 95%, 98,3-100,0) em amostras pacientes com LTA; especificidade de 98,5% (IC 95% 92,1-100,0), em amostras de indivíduos saudáveis, 92,0% (IC 95% 87,5-95,3), em amostras de pacientes com outras infecções, e 93,6% (IC 95% 90,1-96,2), considerando os indivíduos saudáveis e os pacientes com outras infecções.

Entretanto, quando se utilizam os testes na rotina de laboratório, em que não se têm as amostras de referência e em que as endemicidades da LTA e de outras doenças são variadas, nem sempre os testes apresentam os resultados condizentes com a sensibilidade e especificidade esperadas. Por segurança, para o cálculo da amostragem necessária, considerou-se sensibilidade e especificidade de 90%, margem inferior do intervalo de confiança de 95% de 85% e um poder do teste de 90%. Neste caso, um tamanho de amostra de, no mínimo, 377 casos e 377 controles foi necessário.

$$N = (1,96 + 1,28)^2 \times \frac{0,90 \times (1 - 0,90)}{(0,90 - 0,05)^2}$$

Foram empregadas 393 amostras de soro de pacientes com LTA e 392 amostras de controles sadios e 166 com outras doenças, tais como Doença de Chagas, histoplasrose, malária, paracoccidiodomicose, sífilis, toxoplasmose, tuberculose, doença autoimune, fator reumatoide e mononucleose.

3.1.2.2. Critérios de inclusão e de exclusão dos casos de LTA

Os critérios de inclusão dos casos de LTA foram: o paciente devia ser proveniente de área endêmica para LTA, com diagnóstico clínico (diferentes formas clínicas) e pelo menos um dos seguintes testes positivo: parasitológico, histopatológico com presença de parasitos, PCR, teste de Montenegro ou prova terapêutica. Tanto as amostras prospectivas quanto as retrospectivas foram obtidas de pacientes da rotina clínica e os dados dos pacientes e resultados de outros testes foram pesquisados nos prontuários médicos, simulando a utilização do teste no *point-of-care*. Nesse processo, foi mantido o anonimato dos pacientes.

Os critérios de exclusão de casos de LTA foram: apresentar outras infecções concomitantes, estar coinfectados com HIV, apresentar outras condições que levem à imunossupressão, mulheres grávidas.

3.1.2.1. Composição do painel de validação

O painel de validação foi composto por um total de 951 amostras, divididas em três painéis. Painel 2, com 393 amostras de soro de pacientes com LTA (Tabela 4). Painel 3, com 392 amostras de controles residentes em áreas de diferentes endemicidades, sendo 185 amostras de indivíduos saudáveis residentes em São Paulo, SP; 32 amostras de controles de Manaus, AM; 90 amostras de moradores no município de Três Lagoas, MS e 85 amostras de controles de Engenheiro Marsilac, situado no extremo sul do município de São Paulo (Tabela 5). Painel 4, com 166 amostras de pacientes com outras doenças (Tabela 6).

Os 393 pacientes de LTA, cujas amostras foram empregadas na validação do ELISA-rLb6H, apresentavam dados epidemiológicos compatíveis e clínica sugestiva de LTA. Além disso, a maioria dos pacientes foi positiva por um ou mais testes laboratoriais. Na Tabela 4, está explicitado o número de pacientes positivos nos exames empregados à época do diagnóstico. As amostras de Manaus, frescas e recém-colhidas, foram fornecidas pelo Prof. Dr. Jorge Guerra da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - Universidade do Estado do Amazonas (Manaus/AM); os pacientes eram procedentes de várias cidades do estado. As amostras de Recife, caracterizadas e estocadas, foram fornecidas pela Dra. Maria Edileuza Felinto Brito do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Recife/PE); os pacientes eram procedentes de várias cidades do estado.

As amostras de pacientes com LTA, estocadas no Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP foram coletadas em São Paulo e correspondem a excedente do material colhido de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da FMUSP (N=45) e na Santa Casa de São Paulo (N=69). Em relação ao Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER), parte das amostras eram frescas e recém-colhidas (N=36) e outra parte, estava estocada no Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP (N=100). Os pacientes eram procedentes de ou tinham passagem por várias cidades do estado de São Paulo e do Brasil, onde ocorria a LTA.

Tabela 4 - Amostras do painel 2 (pacientes com LTA¹), empregadas na validação do ELISA-rLb6H

Amostras LTA			
Local	N²	Coleta	Diagnóstico
Manaus, AM - FMT-HVD³	63	2020 e 2021	-Exame direto positivo e cultura positiva – N=27 -Exame direto positivo – N=29 -Clínico-Epidemiológico e sorologia – N=6 -Clínico-Epidemiológico – N=1
Recife, PE – CPqAM⁴	80	2015 e 2016	-Exame direto positivo e/ou cultura positiva e/ou PCR positivo – N=62 -IDRM ⁸ e/ou exame direto positivo e/ou PCR positivo – N=16 -Clínico-Epidemiológico – N=1
São Paulo, SP – HCFMUSP⁵	45	1996 a 1999	-Imuno-Histoquímica positiva – N=1 -IDRM positiva – N=25 -Imuno-Histoquímica positiva e IDRM positiva – N=5 -Clínico-Epidemiológico e sorologia positiva – N=14
São Paulo, SP – IIER⁶	136	2002 a 2021	-Exame direto positivo e/ou cultura positiva e/ou PCR positivo e/ou Imuno-Histoquímica positiva – N=86 -IDRM positiva – N=18, sendo N=13 positivos por teste etiológico -Prova terapêutica positiva – N=30 -Clínico-Epidemiológico e sorologia positiva – N=12 -Clínico-Epidemiológico – N=3
São Paulo, SP – SCMSP⁷	69	2004 a 2014	-Clínico-Epidemiológico e sorologia positiva – N=65 -Clínico-Epidemiológico – N=4

1 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 2 – N número de amostras; 3 – FMT-HVD Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM; 4 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE; 5 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 6 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 7 – SCMSP Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP; 8 – IDRM Intradermorreação de Montenegro

Tabela 5 - Amostras do painel 3 (indivíduos saudáveis), empregadas na validação do ELISA-rLb6H

Indivíduos saudáveis			
Local	N¹	Coleta	Diagnóstico
São Paulo, SP	185	1997 a 2020	-Indivíduos assintomáticos considerados saudáveis por exame clínico ou autodeclaração
Três Lagoas, MS	90	2003	-Indivíduos saudáveis, assintomáticos durante um ano após a coleta, residentes em área de transmissão de LV
Engenheiro Marsilac, São Paulo, SP	85	2008	-Indivíduos saudáveis, assintomáticos no momento da coleta, residentes em área de transmissão de LT
Manaus, AM	32	2021	-Indivíduos saudáveis, residentes em área de transmissão de LT, com sorologia negativa no momento da coleta

1 – N número de amostras

As amostras de São Paulo, SP, as de Três Lagoas, MS e as de Engenheiro Marsilac, São Paulo, SP fazem parte do Biorrepositório SORO-IMT-FMUSP. Os controles de São Paulo incluídos no estudo não apresentavam sintomas sugestivos de leishmaniose ou de qualquer outra doença infecciosa, quando as amostras de sangue foram coletadas. As amostras de Três Lagoas, área de transmissão para LV, foram colhidas de indivíduos que tinham sorologia negativa para LV (DAT, ELISA-rK39) e eram assintomáticos. As amostras de Engenheiro Marsilac, bairro da capital de São Paulo, foram colhidas de indivíduos saudáveis e assintomáticos.

As amostras de Manaus, frescas e recém-colhidas, foram fornecidas pelo Prof. Dr. Jorge Guerra da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - Universidade do Estado do Amazonas (Manaus/AM).

Para a avaliação da interferência de anticorpos contra outras doenças, que potencialmente podem reagir cruzadamente com rLb6H, 166 amostras positivas para outras

doenças (Painel 4) foram testadas no ELISA-rLb6H. Essas amostras, estavam estocadas no Biorrepositório SORO-IMT-FM-USP e haviam sido obtidas de pacientes da cidade de São Paulo.

Tabela 6 - Amostras do painel 4 (pacientes com outras doenças), empregadas na validação do ELISA-rLb6H

Pacientes com outras doenças			
Painel 4	N¹	Coleta	Diagnóstico
Doença autoimune	20	2005	-IFI positivo com células <i>HEp</i> - teste de anticorpo antinúcleo
Doença de Chagas	23	2006 e 2007	-Sorologia positiva - ELISA - hemaglutinação -TESAcruzi
Fator reumatoide	25	2005	-Positivo para Teste do látex
Histoplasmose	5	2011 a 2020	-Detecção das bandas “M” e “H em teste de imunodifusão dupla
Malária	11	1986 a 2008	-Parasitemia positiva na gota espessa para <i>Plasmodium vivax</i> ou <i>P. falciparum</i>
Mononucleose	9	2005	-Positivo para anticorpos contra o vírus <i>Epstein-Barr</i>
Paracoccidiodomicose	30	2006	-Positivo por dupla imunodifusão e imunoeletoforese de contracorrente
Sífilis	13	2005	-Positivo em testes treponêmicos (<i>FTA-Abs</i> - hemaglutinação - <i>Western blotting</i>)
Toxoplasmose	20	2005	-ELISA – IgG positivo com avidéz variável
Tuberculose	10	2001 e 2002	-Baciloscopia positiva para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cultura – biópsia)

1 – N número de amostras

3.2. Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto atende às resoluções CNS 466, de 12/12/2012 e CNS 441, de 12/05/2011.

Inicialmente, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, classificando-o sob o número CEP-IMT 000346 e indicando a necessidade de encaminhá-lo ao CEP da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), para aprovação final. No CEP da FMUSP, recebeu CAAE: 83450418.8.0000.0065, sendo aprovado em 07/03/2018 (Número do Parecer: 2.530.363), com emenda aprovada em 21/06/2018 (Número do Parecer: 2.729.336) (ANEXO A).

O Projeto foi submetido aos CEPs das instituições colaboradoras (ANEXO B):

- Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife/PE), CAAE: 83450418.8.3006.5190. Situação: aprovado em 07/05/2018 (Número do Parecer: 2.638.758).
- Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Manaus/AM), CAAE: 83450418.8.3001.0005. Situação: aprovado em 06/04/2018 (Número do Parecer: 2.584.959).
- Universidade do Estado do Amazonas (Manaus/AM), CAAE: 83450418.8.3008.5016. Situação: aprovado em 28/05/2018 (Número do Parecer: 2.679.177).
- Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo (São Paulo/SP). CAAE: 83450418.8.30085.0061. Situação: aprovado em 27/03/2019 (Número do Parecer: 3.226.302).
- Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (São Paulo/SP). CAAE: 83450418.8.3016.5479. Situação: aprovado em 09/03/2022 (Número do Parecer: 5.282.023).

O projeto empregou amostras colhidas prospectiva e retrospectivamente, no caso das amostras prospectivas, antes da coleta das amostras, foram explicados os objetivos do projeto e, após a prévia aceitação, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C).

Devido à pandemia tivemos uma mudança no número de amostras enviadas de cada local para nosso laboratório, pelo que tivemos que recorrer a uma emenda no CEP do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAPPesq), sendo aprovada a emenda em 07/05/2021 (Número do Parecer: 4.717.914) (ANEXO D).

3.3. Antígeno recombinante

O antígeno rLb6H foi desenvolvido e produzido a partir de uma biblioteca genômica de *L. (V.) braziliensis* (79 kDa) obtida da expressão genômica de um paciente com LM. Os *primers* para a reação de PCR tinham o sítio 5=NdeI, seguido de uma região amino terminal com cauda de seis resíduos de histidina (His 6) e o sítio 3=EcoRI, seguido pelos resíduos que codificam o códon terminal. O produto do amplificado pelo PCR foi ligado ao vetor pET 17b e transformado em *Echerichia coli* BL-21 para a expressão proteica (SKEIKY et al., 1995; SATO et al., 2017).

3.4. Avaliação dos lotes do antígeno rLb6H

Foram utilizados três lotes do antígeno rLb6H (A, B, C), a fim de verificar se havia uniformidade no desempenho do antígeno produzido em diferentes partidas, para utilização no teste ELISA (ANVISA, 2006). Os lotes de rLb6H foram produzidos pelo *Infectious Disease Research Institute* (IDRI), Seattle, EUA (SKEIKY et al., 1995; SATO et al., 2017).

3.4.1. Dosagem do conteúdo proteico

As concentrações proteicas foram determinadas pelo método BCA (ácido bicinconínico) *Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Para tanto, foi construída uma curva de calibração, cuja equação foi empregada para o cálculo das concentrações dos lotes do antígeno rLb6H.

3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os lotes do antígeno rLb6H foram analisados por meio de SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes, segundo protocolo descrito por Laemmli (1970) (LAEMMLI, 1970). As amostras do antígeno foram homogeneizadas com tampão de amostra:

60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto pH 6,8; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 0,01% de azul de bromofenol; 5% de β -mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 10% com SDS. A eletroforese foi efetuada a 15 mA, por cerca de 1 h 30 min em tampão tris-glicina: 3% de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, 1% de dodecil sulfato de sódio, 14% de glicina, incluímos um padrão de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, Lituânia), para confirmar o tamanho das proteínas que migraram. Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie Blue R-250* (BioRad, EUA), sob suave agitação, à temperatura ambiente por 1 hora e descorados com tampão descorante: 30% de metanol, 7% de ácido acético e água ultrapura q.s.p., por 18 horas.

3.4.3. *Immunoblotting*

As bandas obtidas em SDS-PAGE 6 μ g/mL de antígeno foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Trans-Blot*[®] 0,45 μ m (BioRad, EUA), utilizando o aparato de transferência em sistema úmido (BioRad Laboratories, EUA), sob corrente elétrica constante de 300 mA por 1 hora em tampão de transferência: 250 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, pH 8,3; 192 mM de glicina; 20% de metanol v/v, segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Uma vez feita a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (Sigma-Aldrich, EUA) para coloração do padrão molecular, sendo bloqueadas com solução 5% de leite desnatado em 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), por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi submetida à reação empregando 3 soros humanos, dois positivos para leishmaniose tegumentar (controle positivo fraco e forte) e um soro de paciente sadio (controle negativo), diluídos 1:100 em solução de leite desnatado 5% em PBS-T. Após incubação por 2 horas, sob agitação, a membrana foi lavada com PBS-T por 3 vezes de 5 minutos cada. Uma vez lavada, a membrana foi incubada sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente com IgG de cabra anti-IgG de humano conjugado à peroxidase (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) diluído 1:10.000 em solução PBS-T-leite 5%, por 2 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Após incubação, as membranas foram lavadas de novo três vezes e depois foram reveladas com uma solução contendo 3,3'-diaminobenzidine (DAB):

0,005 g de DAB, 9 ml de PBS, 10 µL de peróxido de hidrogênio. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.5. ELISA com antígeno recombinante Lb6H

3.5.1. Padronização

Para a padronização da reação ELISA (SATO et al., 2017) com os três lotes de antígeno e conjugado novos, foram utilizados soros humanos de referência, sendo amostras de pacientes com LTA (N=6) e de indivíduos saudáveis (N=3).

Para a geração do protocolo final testamos as seguintes condições: três concentrações de antígeno (0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL), duas concentrações de leite desnatado como diluente de amostra e do conjugado (2% e 5%), duas diluições de amostra (1/50 e 1/100), três diluições de conjugado Calbiochem (1/10.000, 1/20.000 e 1/30.000) e dois tempos de incubação com cromógeno (7 min e 10 min) (tabela 7).

Sensibilizaram-se placas de poliestireno *high binding* de 96 poços (meia área), (Costar, Corning Incorporated, New York, EUA), com 50 µL/poço de cada um dos lotes de antígeno, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M pH 9,6, nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL. Após a incubação *overnight* a 4°C, em câmara úmida, procedeu-se à lavagem das placas, três vezes com PBS-T. Bloquearam-se as placas com 125 µL/poço de PBS-T contendo leite desnatado (Molico, Nestlé) a 2% e 5% (PBS-T-L 2% e 5%), com incubação a 37°C por 2 horas em câmara úmida, seguida de lavagem três vezes com PBS-T. Diluíram-se as amostras selecionadas 1/50 e 1/100 em PBS-T-L 2% e 5%. Após aplicação das diluições das amostras em duplicata (50 µL/poço), incubaram-se as placas a 37°C em câmara úmida, durante 30 minutos, seguindo-se a lavagem cinco vezes com PBS-T. Testaram-se três diluições do conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) 1/10.000, 1/20.000 e 1/30.000, cada uma em PBS-T-L 2% e 5% (50 µL/poço). Após incubação a 37°C em câmara úmida por 30 minutos, procedeu-se à lavagem cinco vezes com PBS-T. Para a revelação da reação, utilizou-se o cromógeno TMB/H₂O₂ (Tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio) (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (50 µL/poço), incubando as placas 7 min e 10 min; para a interrupção da reação utilizou-se H₂SO₄ 2N (25 µL/poço). Procedeu-se

à leitura das absorvâncias a 450 nm, empregando leitor de ELISA (*Multiskan Go* -Thermo Scientific, Finland).

Tabela 7 - Parâmetros testados para a padronização do ELISA com os quatro lotes de rLb6H

PARÂMETROS TESTADOS	
Concentração do antígeno	0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL
Diluyente da amostra e do conjugado	Leite desnatado a 2% e 5%
Diluição da amostra	1/50 e 1/100
Diluição do conjugado	1/10.000, 1/20.000 e 1/30.000
Tempo de incubação com cromógeno	7 min e 10 min

3.5.2. Cálculo do *cut-off* do teste ELISA-rLb6H

O *cut-off* do teste ELISA-rLb6H com cada um dos três lotes de antígeno foi calculado utilizando a Curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) empregando amostras de pacientes com LTA (N=70) e de indivíduos saudáveis (N=70). As curvas *ROC* foram construídas a partir dos valores das absorvâncias dos soros normalizadas em relação à absorvância do padrão positivo que foi ensaiado em duplicata em todas as placas do teste ELISA-rLb6H. Portanto, para cada amostra foi calculada a “*absorvância percentual do padrão positivo*” (ABS%):

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

Calculou-se o índice de reatividade (IR) dividindo-se os valores da “*absorvância percentual do padrão positivo*” de cada amostra pelo valor do *cut-off*, considerando-se o teste reagente quando $IR \geq 1$. Empregou-se a seguinte equação:

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

3.6. Validação do ELISA-rLb6H – amostras do painel de referência

A validação tem como objetivo avaliar o desempenho do teste em relação à utilidade médica dos resultados obtidos e estabelecer condições ideais de uso do teste (sensibilidade, especificidade, acurácia, reatividade cruzada com outras doenças, reprodutibilidade, estabilidade das placas). Na definição dos parâmetros para validação deve-se considerar a finalidade do uso do produto (MENEGHISSE, 2007).

3.6.1. Sensibilidade e especificidade

Ensaíram-se 70 amostras de pacientes com LTA e 70 amostras de indivíduos saudáveis (painel 1), cujas características encontram-se na tabela 1.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{(\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{(\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})}$$

3.6.2. Reprodutibilidade

Ensaíram-se 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo, na mesma placa, em cinco dias diferentes. Cada dia um operador diferente realizou os ensaios. A reprodutibilidade foi avaliada calculando-se o coeficiente de variação (CV) das densidades ópticas (DO), que deve ser menor que 25%.

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

3.6.3. Repetibilidade

Foram ensaiadas 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo, na mesma placa. A repetibilidade foi avaliada calculando-se o CV dos valores de DO, que deve ser menor que 20%.

3.6.4. Homogeneidade

Ensaíram-se na mesma placa, 15 replicatas de uma amostra de soro positivo e 15 replicatas de uma amostra de soro negativo, distribuídas em diferentes regiões da placa. Calculou-se o CV, que ser menor que 20%.

3.6.5. Estabilidade a 4°C e -20°C

Foram sensibilizadas 10 placas-teste com cada um dos três lotes de antígeno recombinante e a metade foi armazenada em freezer a -20°C e a outra metade, em geladeira a 4°C. Foi considerado como dia “zero” o dia da sensibilização das placas. Essas placas ficaram em temperatura controlada até o momento do uso (MENEGHISSE, 2007).

As placas-controle de cada lote foram sensibilizadas um dia antes do teste. Os testes foram realizados nos dias 1, 7, 30, 90 e 180, a partir da sensibilização das placas-teste.

Para o teste da estabilidade, ensaiaram-se um controle negativo e um controle positivo em triplicata e um painel de 12 amostras de pacientes positivos para LTA com títulos variados e 9 amostras de indivíduos saudáveis, em duplicata.

Para a avaliação da estabilidade das placas de cada lote, e em cada temperatura de armazenamento, foram construídos gráficos de regressão linear baseados nos valores absorvância perceptual de padrão positivo (ABS %) relação ao tempo de armazenamento, tanto para as placas teste como para as placas controle.

$$\text{Fórmula da regressão linear: } Y = ax + b$$

Onde:

Y = Valor estimado da variável dependente (ABS %)

x = Valor estimado da variável independente (tempo de armazenamento)

a = Inclinação da reta

b = Intercepto (valor de Y quando $x=0$)

3.6.6. Estabilidade acelerada

Para o estudo da estabilidade acelerada quatro placas foram sensibilizadas com cada um dos três lotes de antígeno recombinante e armazenadas em estufa a 37°C. As 12 amostras positivas e 9 amostras negativas foram testadas nos dias 1, 3, 5 e 7, a partir da sensibilização das placas-teste. A placa controle foi sensibilizada um dia antes da data de experimento.

Para a avaliação da estabilidade das placas de cada lote, foram construídos gráficos de regressão linear baseados nos valores de absorbância de cada amostra em relação ao tempo de armazenamento, tanto para as placas teste como para as placas controle.

3.7. Validação do ensaio ELISA-rLb6H - amostras de diferentes áreas endêmicas do país

Após a validação inicial com o painel de referência, o teste ELISA-rLb6H foi validado utilizando três painéis de amostras de soros de casos e controles obtidas em diferentes regiões do Brasil.

Foram empregados os seguintes painéis de amostras:

- Painel 2 – amostras de 393 pacientes com LTA residentes em Pernambuco (CPqAM), Amazonas (FMT-HVD) e São Paulo (IIER, HCFMUSP e SCMSP).
- Painel 3 – amostras de 392 indivíduos sadios residentes em Manaus (FMT-HVD), Mato Grosso do Sul (Três Lagoas), São Paulo (diversos municípios), São Paulo (bairro de Engenheiro Marsilac).
- Painel 4 – amostras de 166 pacientes com outras doenças, como doença de chagas, histoplasmose, malária, paracoccidiodomicose, toxoplasmose, tuberculose, sífilis, doença autoimune, mononucleose e com presença de fator reumatoide.

As características das amostras empregadas na validação estão descritas na casuística (item 3.1.2.1) e tabelas 4 a 6.

3.8. Outros testes realizados

3.8.1. ELISA para doença de Chagas

Com a finalidade de descartar possível reatividade inespecífica devida a anticorpos de doença de Chagas (SÁNCHEZ et al., 2001; CABALLERO et al., 2007; BRACAMONTE et al., 2020), as amostras dos painel 3 foram testadas para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi*, empregando ELISA com antígeno recombinante, da marca BioClin (BioClin Quibasa Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais), conforme a bula do fabricante (QUIBASA QUÍMICA BÁSIC, 2021).

3.8.2. Aglutinação indireta para pesquisa de fator reumatoide

Com a finalidade de descartar possível reatividade inespecífica devida a presença de fator reumatoide, as amostras do painel 3 foram submetidas a teste de aglutinação indireta, empregando partículas de látex revestidas com IgG humana. O kit usado foi da marca Wama Diagnóstica (Wama Produtos para Laboratório Ltda, São Carlos, SP, Brasil), e a técnica empregada para o ensaio foi conforme a bula do fabricante (WAMA PRODUTOS PARA LABORATÓRIO, 2011).

3.9. Análise estatística

Empregando os valores das absorbâncias das amostras do painel de referência (casos de LTA e controles saudáveis), foram construídas as curvas *ROC* para cada um dos lotes do antígeno recombinante. A partir dessas curvas *ROC* foram determinados os valores de corte ou *cut-off*, a sensibilidade, a especificidade e os intervalos de confiança de 95% de probabilidade.

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

Os resultados foram avaliados empregando os softwares estatísticos:

MICROSOFT OFFICE EXCEL 360: Elaboração de planilhas de dados, gráficos e tabelas

GRAPHPAD PRISM 5: Construção de curvas *ROC*, cálculos de sensibilidade, especificidade, intervalos de confiança de 95% de probabilidade, regressão linear, cálculos da equação da reta e construção de gráficos, teste exato de Fisher, teste qui-quadrado, teste de Mann-Whitney, teste de Kruskal–Wallis, coeficiente de correlação de Spearman

SOFTWARE RSTUDIO versão 1.4.1106: Teste Q de Cochran, diagramas de Venn, teste de McNemar

QUICKCALCS – GRAPHPAD: Intervalos de confiança de 95% de probabilidade

Outros parâmetros calculados (FARBER, 1990; MENEGHISSE, 2007; FERREIRA; MORAES, 2013; VAZ et al., 2018):

- Índice de Youden (J) - $\text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 100$
- Acurácia - $\frac{(\text{verdadeiros positivos} + \text{verdadeiro negativos})}{\text{total de amostras}} \times 100$
- Razão de verossimilhança do resultado positivo - $\frac{\text{sensibilidade}}{100 - \text{especificidade}}$
- Razão de verossimilhança do resultado negativo - $\frac{100 - \text{sensibili}}{\text{especificidade}}$
- Eficiência - $\frac{\text{sensibilidade} + \text{especificid}}{2}$

A razão de verossimilhança de um teste positivo ($RV+$) >1 indica evidência para a doença. A razão de verossimilhança de um teste negativo ($LR-$) <1 indica evidência de ausência de doença. $RV+ >10$ e $RV- <0,1$ indicam forte evidência para a doença ou ausência de doença, respectivamente (DEEKS; ALTMAN, 2004; FURUKAWA et al., 2008). A interpretação das razões de verossimilhança é intuitiva: quanto maior a razão de verossimilhança positiva, maior a probabilidade de doença; quanto menor a razão de verossimilhança negativa, menor a probabilidade de doença. (ATTIA, 2003). Quando a especificidade foi 100%, a $RV+$ não foi

calculada.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Avaliação dos lotes de antígeno rLb6H

4.1.1. Dosagem do conteúdo proteico dos lotes de rLb6H

As concentrações proteicas dos lotes do antígeno rLb6H, foram obtidas a partir da equação da reta construída pela curva de calibração do BSA (Albumina de soro bovino) (Figura 5). As concentrações foram 697 $\mu\text{g/mL}$, 727 $\mu\text{g/mL}$ e 514 $\mu\text{g/mL}$ correspondentes aos lotes A, B e C, respectivamente (Tabela 8). Somente o lote C apresentou concentração próxima à informada pelo IDRI, que era 500 $\mu\text{g/mL}$. Estas concentrações foram usadas em todos os nossos experimentos.

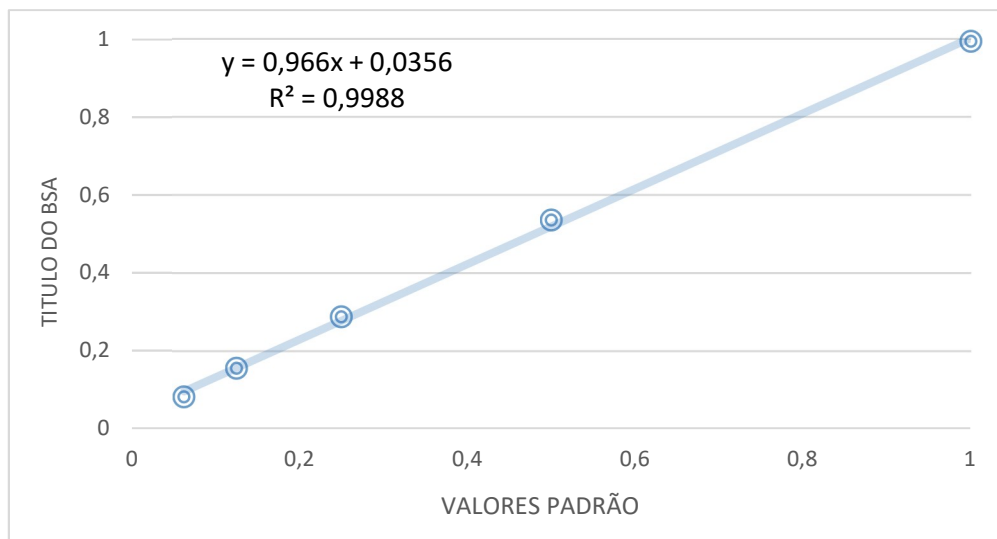


Figura 5 - Equação da reta obtida na curva de calibração do BSA (Albumina de soro bovino)

Tabela 8 - Dosagem de conteúdo proteico dos três lotes da proteína rLb6H, obtida pelo método BCA (ácido bicinconínico)

Dosagem proteica em $\mu\text{g/mL}$	
Lote A	697
Lote B	727
Lote C	514

4.1.2. Análise do perfil eletroforético dos lotes de rLb6H em SDS-PAGE

Os resultados do perfil eletroforético em SDS-PAGE são observados na Figura 6, onde está evidente a presença da banda correspondente ao recombinante Lb6H, que se situa entre as massas moleculares de 97 kDa e 66 kDa, com a massa esperada de, aproximadamente, 79 kDa. Na Figura 6a encontram-se os resultados aplicando o antígeno diluído a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e na Figura 6b, com o antígeno a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nas canaletas 1, 2 e 3 estão os lotes A, B e C, respectivamente, tanto na Figura 6a como na 6b. No lote C, a banda apareceu como um dímero, o que aparentemente não afetou o desempenho do antígeno.

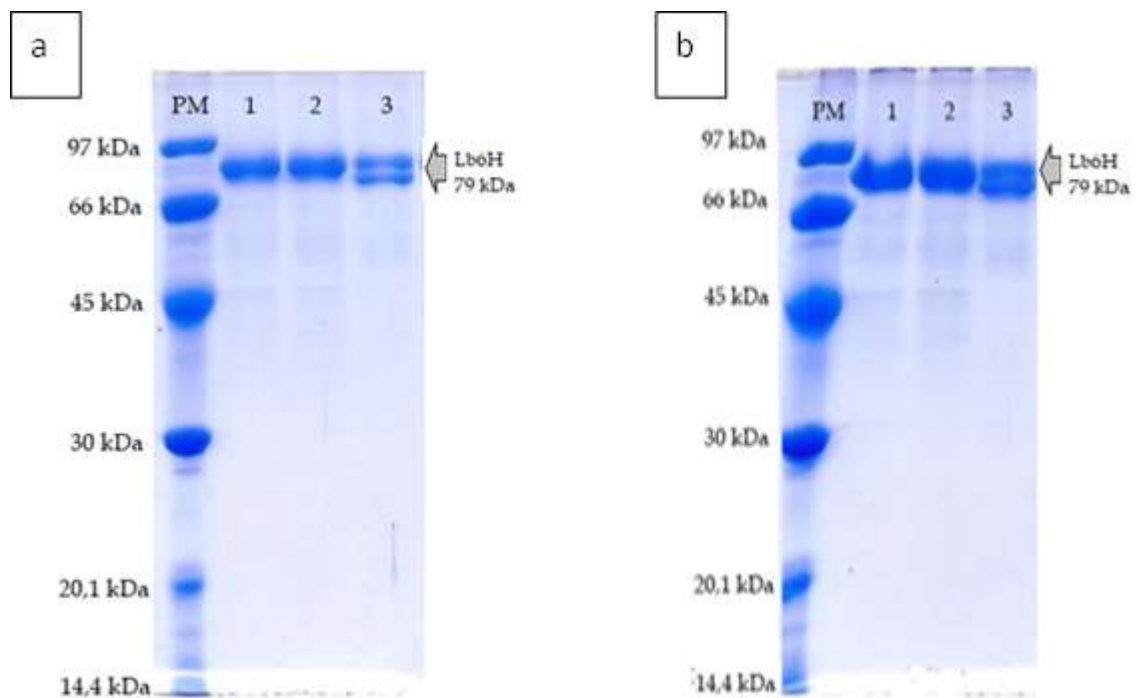


Figura 6 - Análise do perfil eletroforético dos lotes da proteína rLb6H em SDS-PAGE. a - Perfil eletroforético dos três lotes aplicando 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína por poço. b - Perfil eletroforético dos três lotes aplicando 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína por poço. 1 – Lote A; 2 – Lote B; 3 – Lote C

4.1.3. Análise da reatividade dos lotes de rLb6H por reação de *Immunoblotting*

Na Figura 7, estão os resultados obtidos após a reação de *Immunoblotting*; as fitas 2-4 referem-se ao lote A, 5-7 ao lote B e 8-10 ao lote C. Nas fitas 2, 5, e 8, observa-se uma forte reação entre o controle positivo de título alto e a banda de interesse (79 KDa,

aproximadamente). Nas fitas 3, 6, e 9, a reação pode ser observada com menor intensidade, pois foram ensaiadas com o controle positivo de título baixo. No caso das fitas 4, 7 e 10, ensaiadas com o controle negativo, nenhuma banda foi observada, evidenciando a ausência de reação. Nesta avaliação, se demonstrou tanto a sensibilidade dos nossos lotes com soros positivos quanto a especificidade com o soro negativo.

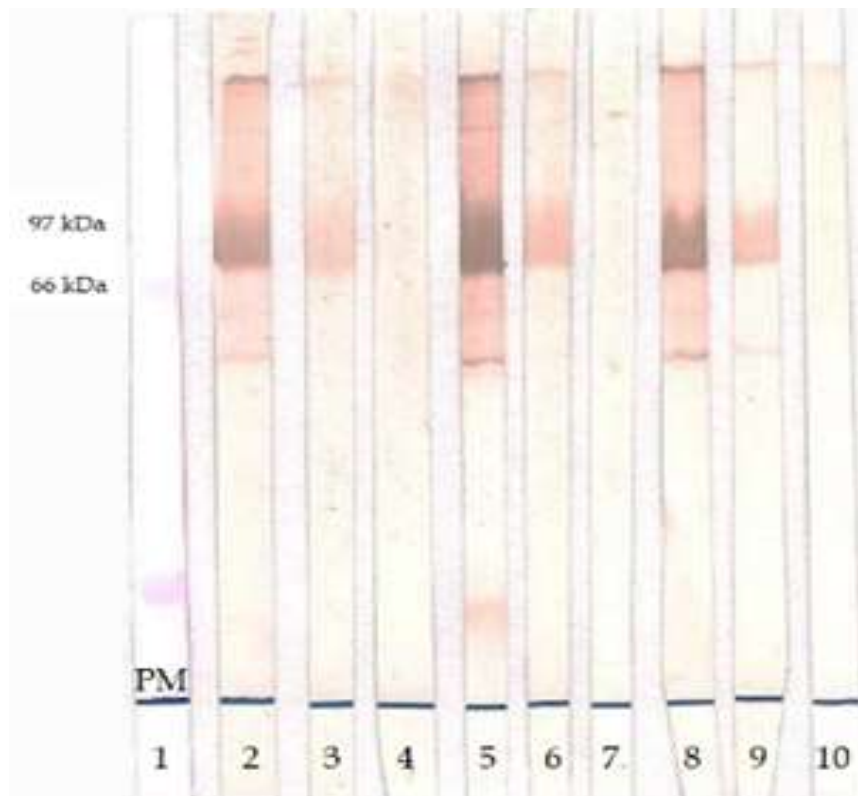


Figura 7 - Perfil de reatividade em *Immunoblotting* dos três lotes de rLb6H. 1- Padrão de peso molecular corado com *Ponceau S*. 2-4 - lote A. 5-7- lote B. 8-10 - lote C. 2, 5 e 8 - Padrão positivo de alta reatividade. 3, 6 e 9 - Padrão positivo de baixa reatividade. 4, 7 e 10 - Padrão negativo

4.2. Padronização do ELISA com os lotes de rLb6H

Após a análise de cada parâmetro testado com os três lotes, verificou-se que as melhores condições para realizar o ELISA-rLb6H foram: 1,0 µg/mL de rLb6H como concentração de antígeno para a sensibilização das placas, 5% de leite desnatado como diluente de amostra e conjugado, diluição dos soros a 1/100, diluição do conjugado a 1/30.000 e tempo

de incubação do TMB de 10 min. Estas condições foram aplicadas para todos os lotes de rLb6H (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros escolhidos na padronização do teste ELISA-rLb6H

PARÂMETROS ESCOLHIDOS	
Concentração do antígeno	1,0 µg/mL
Diluyente da amostra e do conjugado	Leite desnatado a 5%
Diluição da amostra	1/100
Diluição do conjugado	1/30.000
Tempo de incubação com cromógeno	10 min

4.3. Protocolo final do teste ELISA-rLb6H

As placas de poliestireno de ½ área com fundo plano (Costar, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno rLb6H (1 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, por 18h a 4°C. Após a incubação em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-T e bloqueadas 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 após, lavadas três vezes com PBS-T. As amostras foram diluídas a 1/100 em PBS-T-L 5% e aplicadas nas placas em duplicata (50 µL/poço). Após incubação a 37°C em câmara úmida durante 30 min, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T. O conjugado anti-IgG humano-peroxidase (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) foi diluído a 1/30.000 em PBS-T-L 5% e, após aplicação de 50 µL/poço, as placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 30 min. Após, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T. Para revelar a reação foram adicionados 50 µL/poço do cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina) (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e incubaram-se as placas ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL/poço de H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram medidas em leitor de ELISA (*Multiskan GO*, Thermo Scientific, Finland) a 450 nm.

4.4. Cálculo do *cut-off* do teste ELISA-rLb6H

A figura 8 apresenta os valores de “absorbância percentual do padrão positivo” (ABS%) obtidos no teste ELISA-rLb6H, na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando o painel 1 de amostras de pacientes com LTA (N=70) e indivíduos saudáveis (N=70). Os três lotes de rLb6H discriminam significativamente as amostras negativas e as amostras positivas ($p < 0:0001$; teste de Mann–Whitney).

As Curvas *ROC*, construídas para os três lotes de antígeno rLb6H, empregando os valores da “absorbância percentual do padrão positivo“, obtidos no teste das amostras dos pacientes do painel 1, encontram-se na figura 9, onde estão as áreas sob as curvas e os valores de *p* mostrando que o ELISA-rLb6H discrimina os doentes dos sadios.

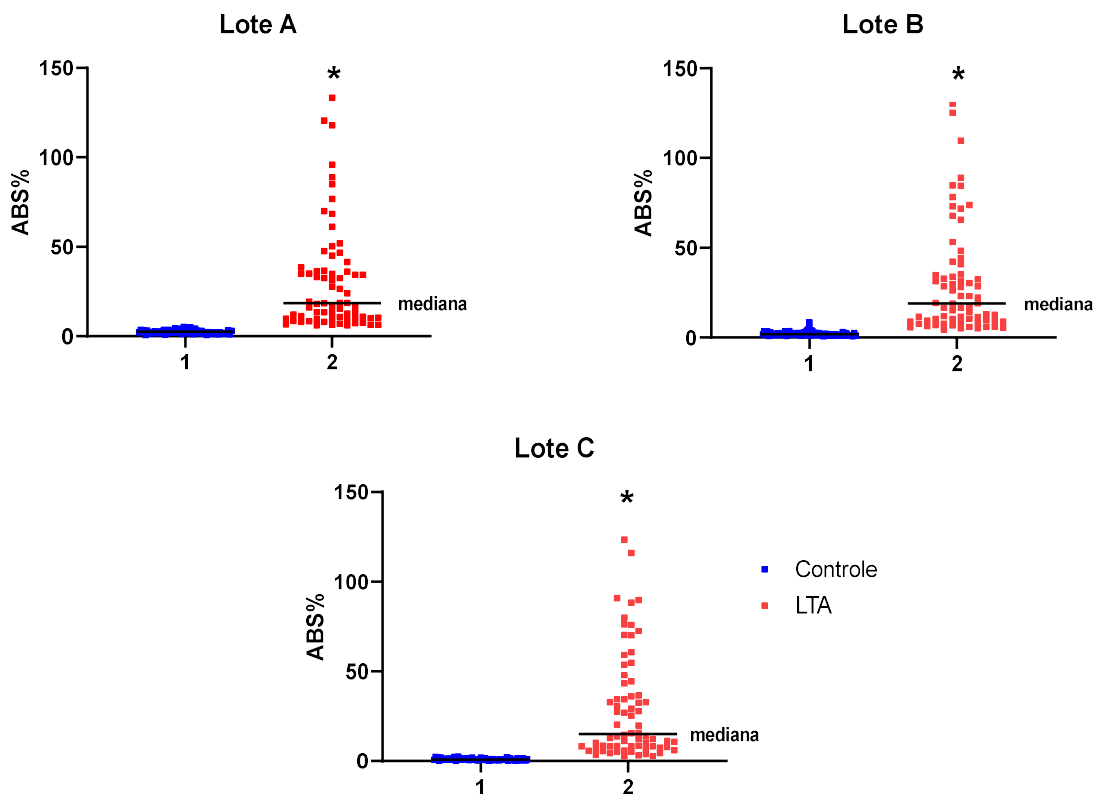


Figura 8 - Valores de absorbância percentual do padrão positivo (ABS%) obtidos no teste ELISA-rLb6H, na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando no painel 1 (N=140). A-B-C- Lotes dos antígenos, 1 - Controle, indivíduos saudáveis (N=70), 2 - LTA, amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (N=70).

(* $p < 0:0001$ em relação ao controle; teste de Mann–Whitney)

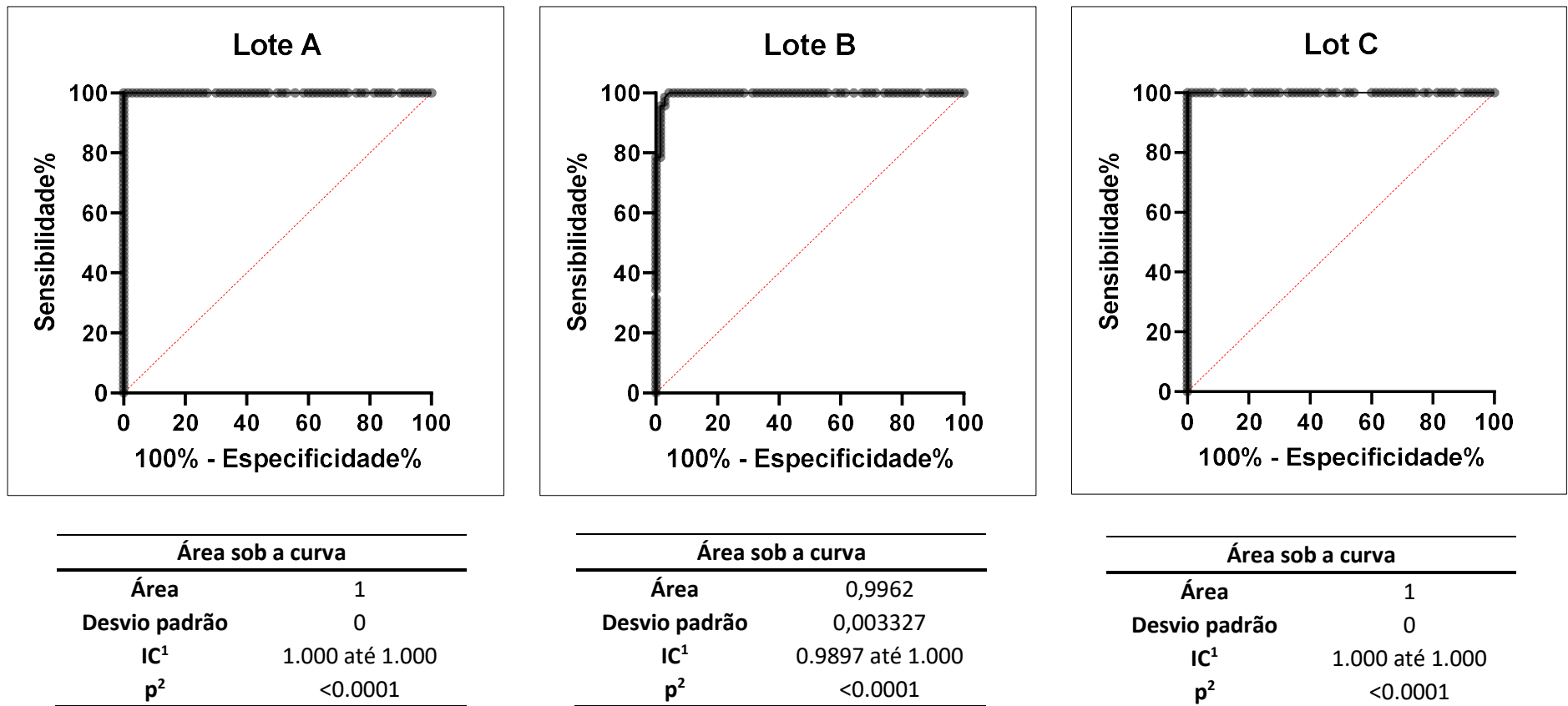


Figura 9 - Curvas ROC do teste ELISA-rLb6H construídas a partir dos valores da “absorbância percentual do padrão positivo”, na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando amostras de pacientes com LTA (N=70) e indivíduos saudáveis (N=70) (Painel 1). A-B-C- Lotes dos antígenos. 1 IC – Intervalo de confiança; 2 p – valor de p

4.5. Validação do ELISA-rLb6H – amostras do painel de referência

4.5.1. Sensibilidade e especificidade

O ELISA-rLb6H apresentou sensibilidade de 100,0% (IC 95%: 94,8-100,0), 95,7% (IC 95%: 88,1-98,8) e 98,6% (IC 95%: 92,3-99,9) e especificidade de 100,0% (IC 95%: 94,8-100,0), 97,1% (IC 95%: 90,2-99,5) e 100,0% (IC 95%: 94,8-100,0), respectivamente para os lotes A, B e C. Esses resultados indicam que os três lotes do antígeno rLb6H discriminam eficientemente amostras positivas e amostras negativas ($p < 0,0001$; teste de Mann–Whitney).

Do total de pacientes, 74,3% tinham a forma cutânea e 25,7%, a forma mucosa. Os lotes A e C detectaram as 52 amostras de LC, enquanto o lote B não detectou uma amostra de LC recidiva e uma de LC localizada. Entre as amostras de LM, o lote B não detectou uma amostra de paciente com 50 anos de evolução da doença e o lote C, não detectou uma amostra caracterizada como *L. braziliensis*, que teve reação limítrofe com os demais lotes.

Na Tabela 10, encontram-se os valores do *cut-off* e os parâmetros de desempenho diagnóstico dos lotes. Não houve diferença significativa (teste Q de Cochran) na sensibilidade ($p = 0,173$) e na especificidade ($p = 0,135$), entre os três lotes empregados no ELISA-rLb6H.

Tabela 10 - Desempenho diagnóstico do ELISA-rLb6H, empregando 70 amostras de pacientes com LTA e de 70 controles sadios (Painel 1)

Lotes	<i>Cut-off</i>	S% (IC 95%)	E% (IC 95%)	J	A	RV+	RV-	E
A	5,7	100,0 (94,8 – 100,0)	100,00 (94,8 – 100,0)	1,00	100,0%	NC	0,00	100,0
B	5,6	95,7 (88,1 – 98,8)	97,1 (90,2 – 99,5)	0,93	96,4%	33,5	0,04	96,4
C	2,8	98,6 (92,3 – 99,9)	100,0 (94,8 – 100,0)	0,99	99,3%	NC	0,01	99,3

S% – sensibilidade; E% – especificidade; IC 95% – intervalo de confiança de 95% de probabilidade; J – índice de Youden; A – acurácia; RV + - razão de verossimilhança positiva; RV - - razão de verossimilhança negativa; E – eficiência

A figura 10 mostra a distribuição dos índices de reatividade das amostras positivas empregadas na curva *ROC* para os três lotes de antígeno no ELISA-rLb6H, comparados dois a dois (figura 10a – 10c). Na figura 10d está o *heatmap* dos coeficientes de correlação de Spearman.

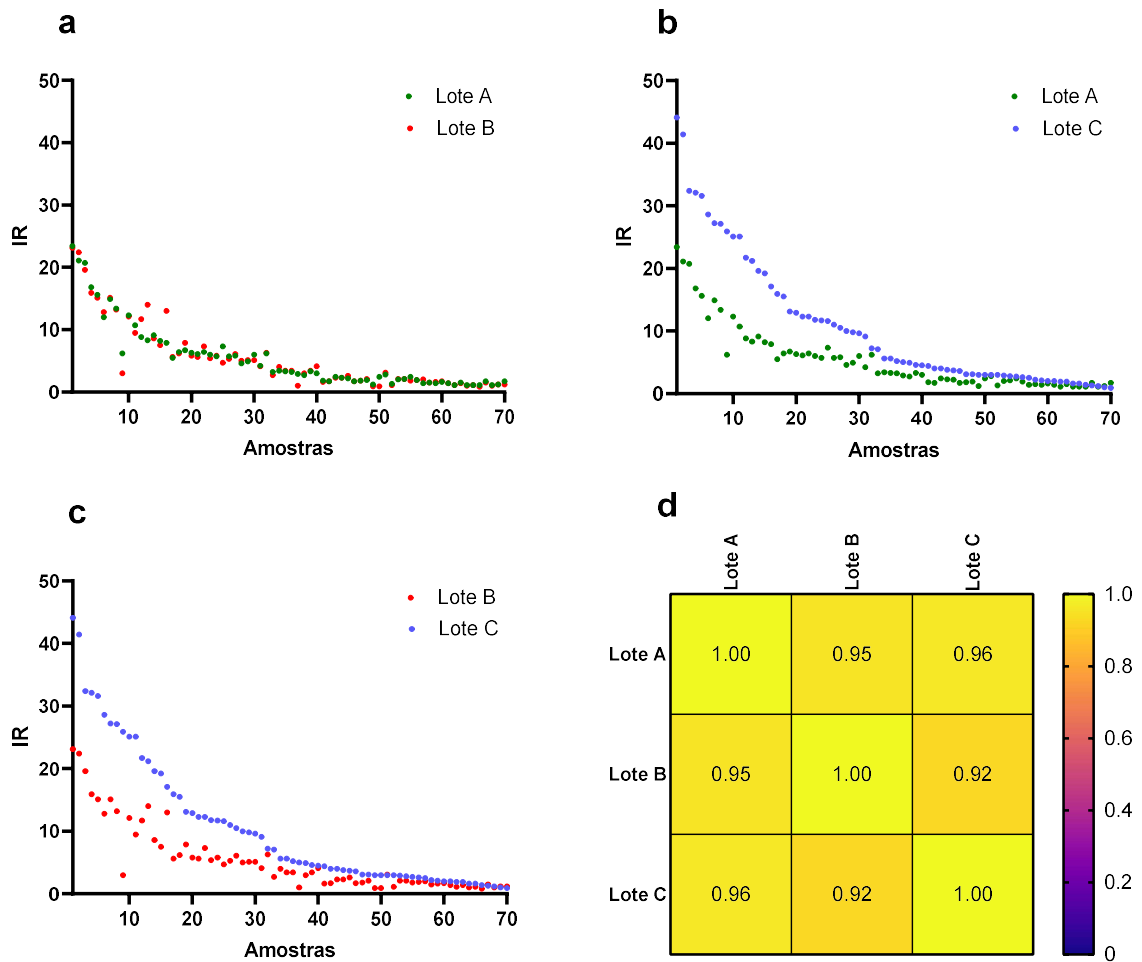


Figura 10 - Índices de reatividade (IR) das amostras de pacientes com LTA ensaiadas com os lotes A, B e C no ELISA-rLb6H (N=70) e *heatmap* dos coeficientes de correlação de Spearman
a, b, c – Distribuição dos valores de IR; d – *heatmap* dos coeficientes de correlação de Spearman entre os IR nos três lotes

Na figura 11, encontram-se os diagramas de Venn com os resultados das amostras positivas (Figura 11a) e negativas (figura 11b) testadas no ELISA-rLb6H pelos três lotes estudados, mostrando a concordância entre os três lotes.

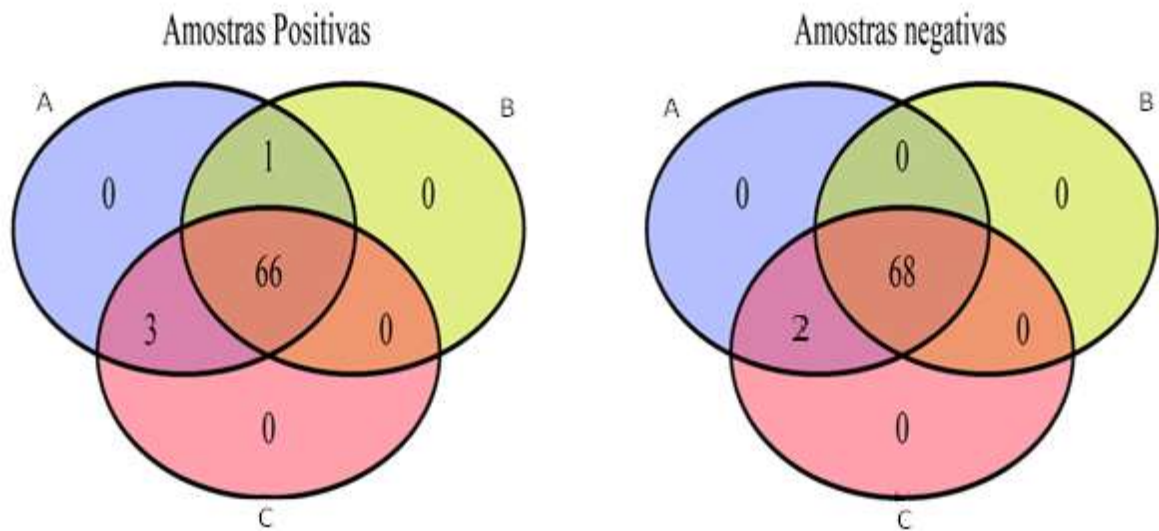


Figura 11 - Diagramas de Venn das amostras positivas e negativas testadas no ELISA-rLb6H. A, B, C – lotes de antígeno; Amostras positivas N=70; Amostras negativas N=70

4.5.2. Reprodutibilidade

Os resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade com 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo, na mesma placa, em cinco dias diferentes e com um operador diferente cada dia, estão na tabela 11 e figura 12.

Como pode ser visto na tabela 11, os valores de DO obtidos com a amostra positiva tem coeficiente de variação (CV) menor que 25%. No caso dos resultados das amostras negativas, o CV foi maior que 25%, devido a que as DO obtidas nessas amostras foram muito baixas e mesmo pequenas variações aumentam o valor do CV. Vale ressaltar que as amostras utilizadas neste ensaio foram as mesmas para cada operador e para cada lote de antígeno.

A Figura 12 apresenta os resultados da DO obtidos por cada operador em cada lote de rLb6H.

Tabela 11 – Resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade do ELISA-rLb6H, ensaiando amostras de pacientes com LTA e de indivíduos saudáveis em dias diferentes e com operador diferente cada dia

	Lote - A		Lote - B		Lote - C	
	P ⁴	N ⁵	P	N	P	N
Média¹	0,34	0,03	0,34	0,02	0,30	0,03
DP²	0,08	0,01	0,07	0,01	0,05	0,01
CV³	22,86	30,57	21,05	62,46	17,97	49,96

1 – Média das densidades ópticas (DO); 2 - DP Desvio padrão; 3 - CV Coeficiente de variação; 4 – P amostras de pacientes com LTA (N=10); 5 – N amostras de indivíduos saudáveis (N=10)

4.5.2.1. Repetibilidade

Os resultados obtidos no estudo da repetibilidade com 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de amostra de soro negativo, na mesma placa, estão na tabela 12 e figura 13.

Como pode ser visto na tabela 12, os valores de DO obtidos com as amostras positiva e negativa tem CV menor que 20%, ficando dentro do esperado para todos os lotes. Na figura 13, observam-se os valores de DO obtidos para cada lote de rLb6H.

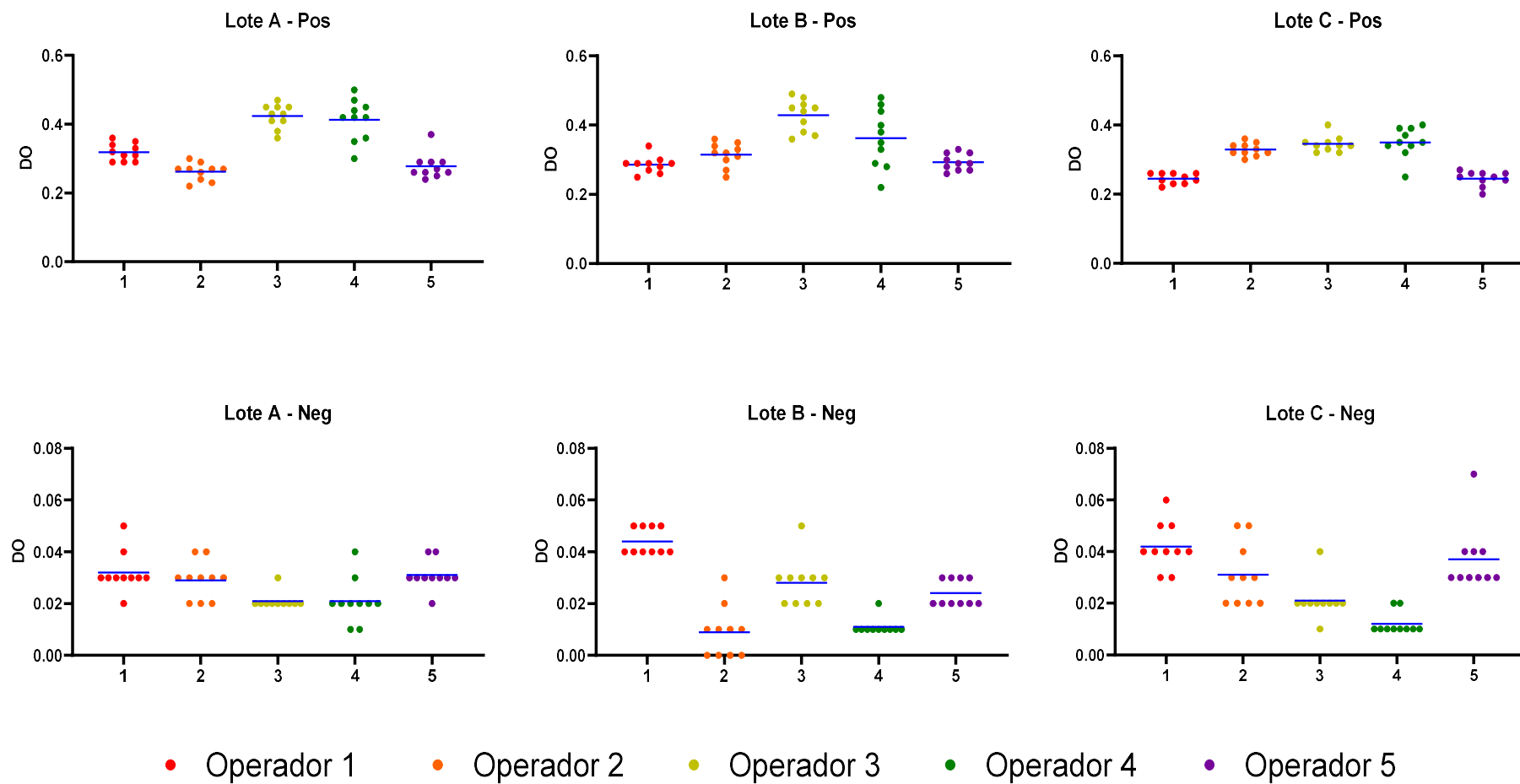


Figura 12 - Distribuição das densidades ópticas obtidas das amostras negativa e positiva, ensaiadas por cinco operadores, um em cada dia diferente, pelo ELISA-rLb6H, no estudo de reprodutibilidade, em cada lote de antígeno. Linha azul - média obtida por cada operador

Tabela 12 - Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do ELISA-rLb6H, ensaiando amostra de paciente com LTA e de indivíduo saudável, repetidas 30 vezes

	Lote A		Lote B		Lote C	
	P ³	N ⁴	P	N	P	N
Média ¹	0,72	0,03	0,57	0,04	0,81	0,03
DP ²	0,09	0,00	0,07	0,01	0,07	0,00
CV ³	12,73	17,29	12,04	17,48	8,20	13,88

1 – Média das densidades ópticas (DO); 2 - DP Desvio padrão; 3 - CV Coeficiente de variação; 4 - P amostras de pacientes com LTA (N=1); 5 – N amostras de indivíduos saudáveis (N=1)

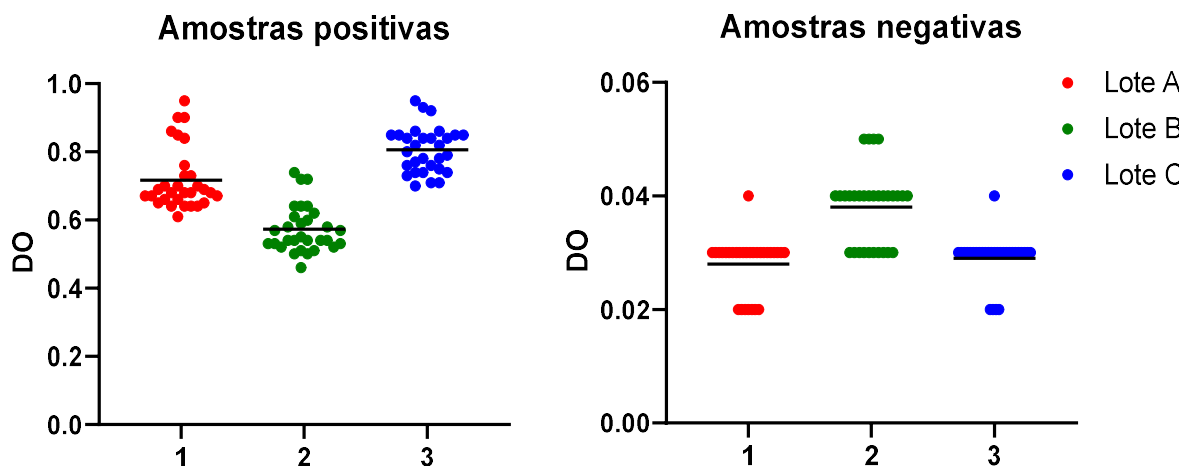


Figura 13 - Distribuição das densidades ópticas obtidas das amostras negativas e positivas, ensaiadas no ELISA-rLb6H, no estudo de repetibilidade, em cada lote de antígeno. Amostra positiva - paciente com LTA (N=1). Amostra negativa - indivíduo saudável (N=1). Linha preta - média obtida em cada lote

4.5.3. Homogeneidade

Os resultados obtidos no estudo de homogeneidade, quando a mesma amostra foi aplicada em 15 cavidades diferentes da placa, estão na tabela 13, que mostra o CV com a amostra positiva e negativa utilizada. Com a amostra positiva, obteve-se CV menor que 20%, dentro do esperado para todos os três lotes. Com a amostra negativa, o CV ficou um pouco

acima de 20%, devido aos baixos valores de DO obtidos e a maior influência de variações nos valores. Na figura 14, observam-se os valores de DO obtidos para cada lote de rLb6H.

Tabela 13 - Coeficiente de variação obtidos no estudo da homogeneidade do ELISA-rLb6H, ensaiando em duas amostras de pacientes com LTA e duas de indivíduos saudáveis, em diferentes cavidades da placa

	Lote A		Lote B		Lote C	
Positivos						
	P1 ³	P2	P1	P2	P1	P2
Média¹	0,42	1,17	0,51	1,33	0,50	1,32
DP²	0,03	0,07	0,04	0,12	0,04	0,06
CV³	6,80	5,67	7,44	9,05	8,12	4,17
Negativos						
	N1 ⁴	N2	N1	N2	N1	N2
Média¹	0,04	0,04	0,03	0,04	0,02	0,02
DP²	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
CV³	17,25	23,50	25,12	23,52	34,98	25,76

1 – Média das densidades ópticas (DO); 2 - DP Desvio padrão; 3 - CV Coeficiente de variação; 4 - P amostras de pacientes com LTA (N=2); 5 – N amostras de indivíduos saudáveis (N=2)

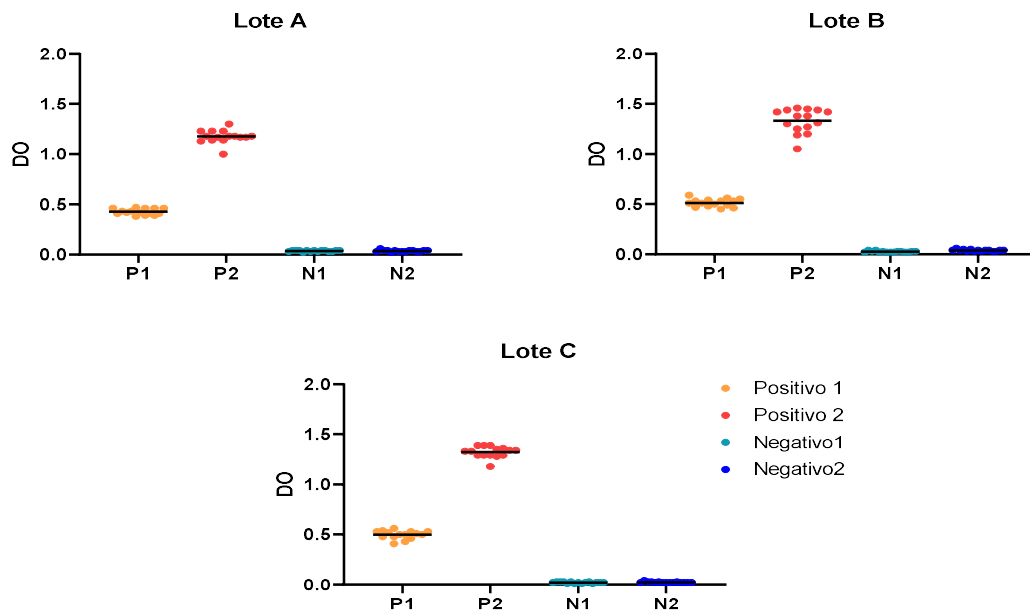


Figura 14 - Distribuição das densidades ópticas obtidas das amostras negativas e positivas, ensaiadas no ELISA-rLb6H, no estudo de homogeneidade, em cada lote de antígeno (cinco repetições para cada amostra). P1 e P2– amostras positivas. N1 e N2 – amostras negativas. A linha preta - média obtida com cada amostra

4.5.4. Estabilidade das placas sensibilizadas às temperaturas de 4°C e -20°C

Considerando as 12 amostras positivas testadas em placas armazenadas à temperatura de 4°C, foi observada queda significativa de reatividade (regressão linear, $p < 0,05$) em duas amostras, sendo uma com o lote B e uma com o lote C. Com as placas armazenadas a -20°C, observou-se queda significativa em uma amostra com o lote B.

Entre as nove amostras negativas testadas em placas armazenadas à temperatura de 4°C, observou-se aumento de reatividade (regressão linear, $p < 0,05$), em sete amostras, sendo uma com o lote A e seis com o lote B. Com as placas armazenadas a -20°C, não foi observado nenhum aumento significativo na reatividade das amostras.

Em nenhum dos casos, as amostras positivas se negativaram ou as negativas se positivaram, mostrando estabilidade do antígeno durante o armazenamento de 180 dias.

Nas figuras 15 e 16, estão os gráficos de regressão linear construídos a partir dos resultados de ABS% de uma amostra positiva e uma negativa testadas com os três lotes de

antígeno, A, B e C, após armazenamento das placas a 4°C e -20°C. O anexo E contém todos os gráficos construídos.

4.5.5. Estabilidade acelerada

Considerando as 12 amostras positivas e as nove negativas testadas em placas armazenadas à temperatura de 37°C, não foi observada nenhuma queda significativa de reatividade (regressão linear, $p > 0,05$) nos sete dias de experimento, o que, segundo a literatura corresponde a 12 meses de armazenamento em condições normais (MENEGHISSE, 2007).

Na figura 17 apresentamos os gráficos de regressão linear construídos a partir dos resultados das DO de uma amostra positiva e uma negativa testadas com os três lotes de antígeno, A, B e C, após armazenamento das placas a 37°C. O anexo F contém todos os gráficos construídos.

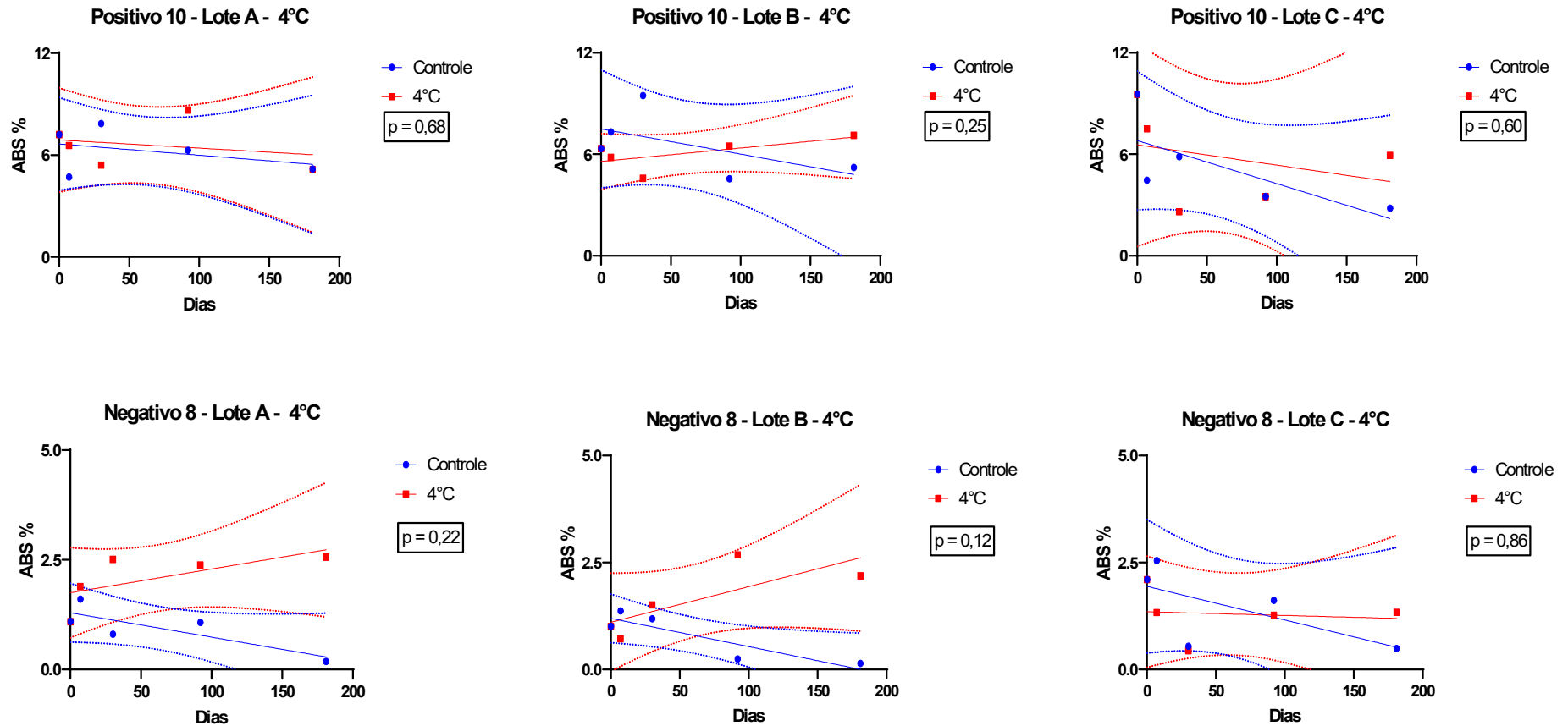


Figura 15 - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a 4°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma amostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. ABS% - absorvância percentual do padrão positivo

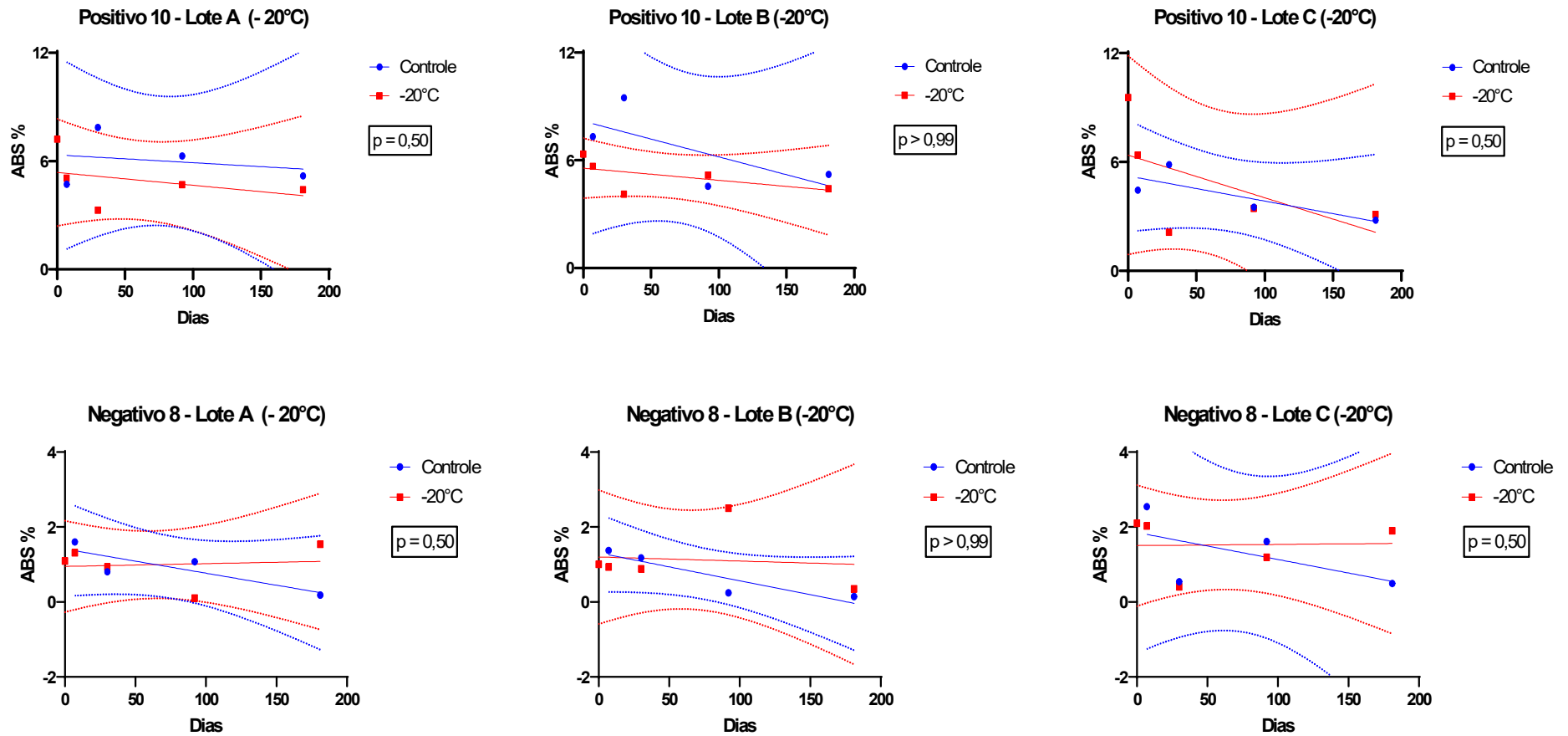


Figura 16 - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a -20°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma a mostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. ABS% - absorvância percentual do padrão positivo

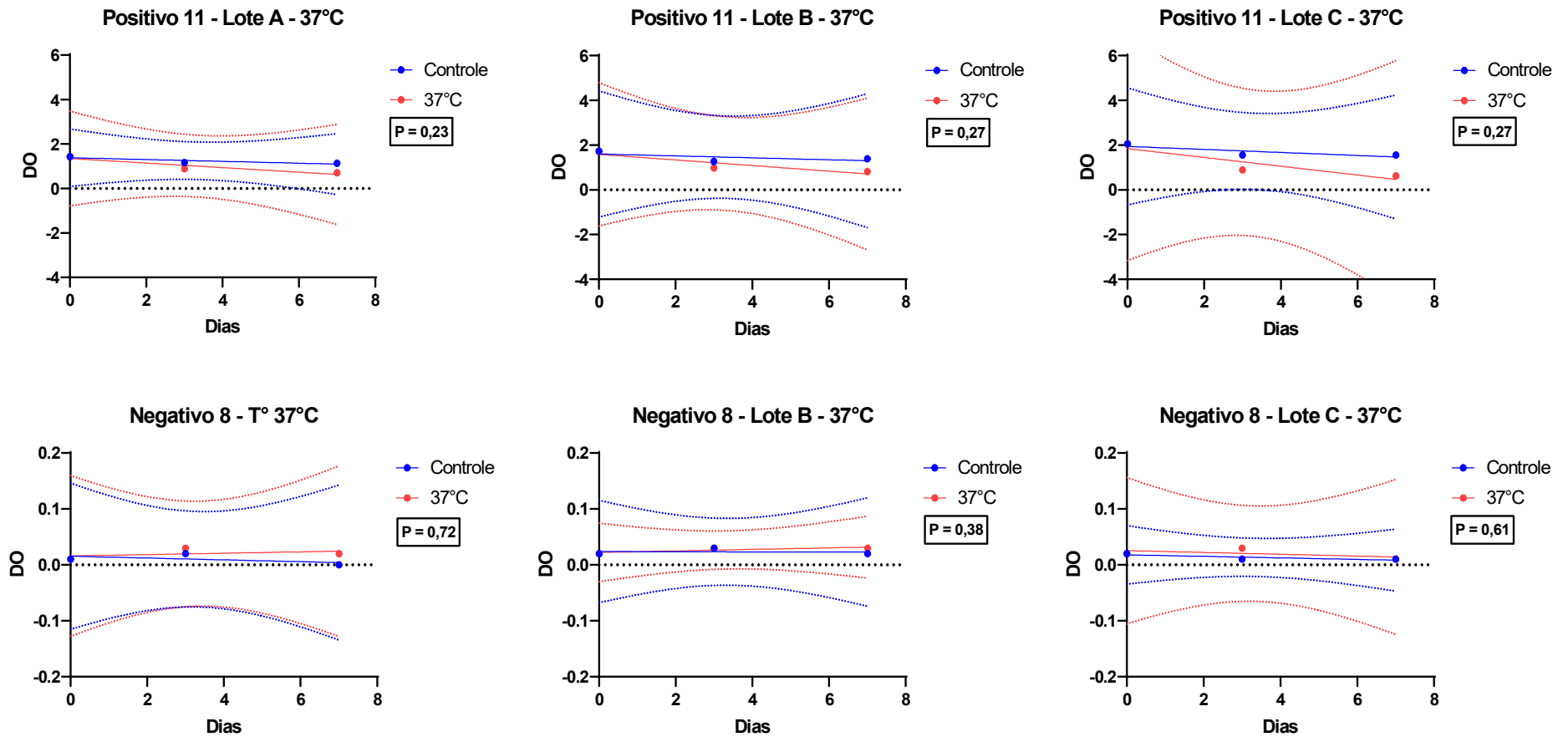


Figura 17 - Estabilidade do antígeno rLb6H em placas sensibilizadas e armazenadas a 37°C. Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas e sensibilizadas um dia antes (controle). Teste de uma amostra positiva e uma negativa com os três lotes do antígeno. DO – Densidade óptica obtida da leitura do ELISA.

4.6. Validação do ELISA-rLb6H - amostras de diferentes regiões do Brasil

4.6.1. Pacientes com LTA – Sensibilidade

Os resultados obtidos na validação do ELISA-rLb6H empregando as 393 amostras de pacientes com LTA foram analisados de acordo com a procedência e características clínico-laboratoriais. Em relação ao local de obtenção das amostras, houve cinco centros participantes, como descrito em Materiais e Métodos. Quanto às características clínico-laboratoriais, as amostras foram distribuídas por diagnóstico imunológico (IFI, ELISA, IDRM) (Figura 18), diagnóstico etiológico (exame direto, cultura, imuno-histoquímica, PCR) (Figura 19) e por sucesso na prova terapêutica. Os diagramas de Venn mostram as concordâncias entre os testes.

Em resumo, 56,7% apresentavam, pelo menos, um teste etiológico positivo; 68,9% tinham sido positivos por, pelo menos um teste sorológico; 7,6% tinham prova terapêutica positiva e 2,3% apresentavam critério clínico-epidemiológico.

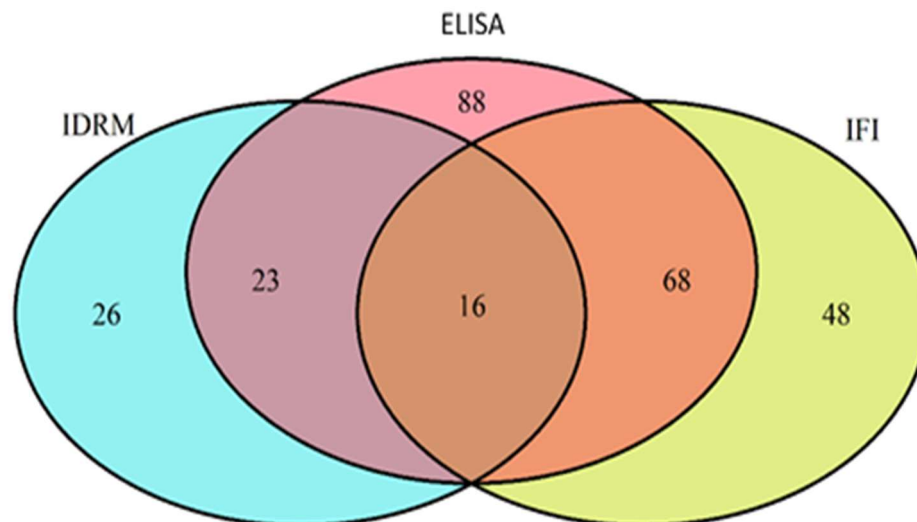


Figura 18 - Diagramas de Venn das amostras com diagnóstico imunológico positivo (N = 269). IFI – Imunofluorescência indireta; ELISA – teste imunoenzimático; IDRM – Intradermorreação de Montenegro

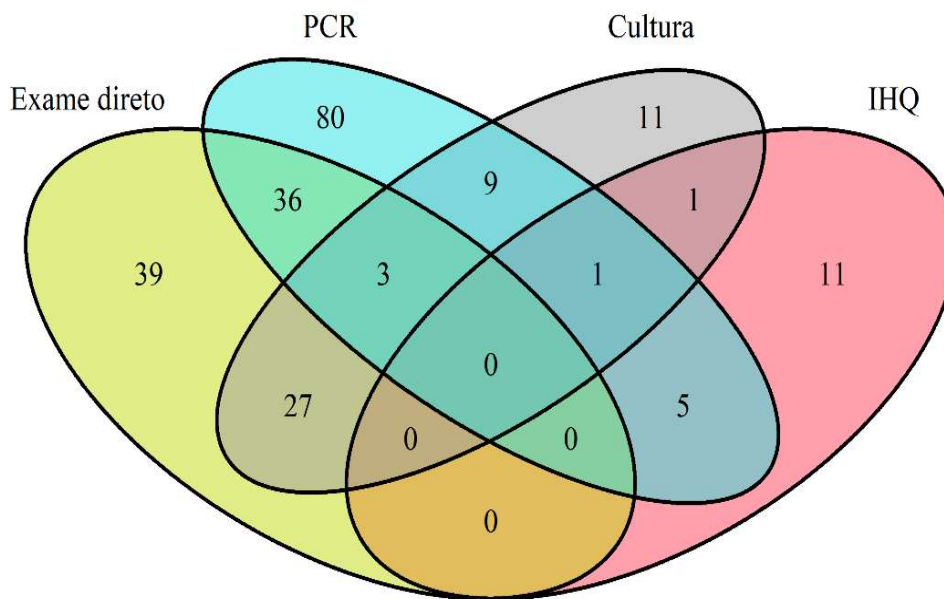


Figura 19 – Diagrama de Venn das amostras com diagnóstico etiológico positivo (N = 223). Exame direto – pesquisa direta do parasito; Cultura – pesquisa após cultura do parasito; IHQ – Imuno-histoquímica; PCR – reação em cadeia da polimerase.

A tabela 14 contém os dados do perfil demográfico por local dos 393 pacientes com LTA, por local de coleta, sendo, 276 (70,2%) do sexo masculino e 117 (29,8%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 5 até 85 anos, com mediana de 40. A duração da doença foi calculada em meses, variando de 0,27 a 480 meses, com mediana de 2. Em relação à forma clínica, 247 (62,8%) pacientes tinham leishmaniose cutânea e 87 (22,1%), leishmaniose mucosa e 59 (15,0%) eram LTA.

A tabela 15 apresenta a sensibilidade do ELISA-rLb6H, quando se testaram amostras do painel 2 de validação, empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas ROC do painel de referência (painel 1).

Nas amostras de Manaus da FMT-HVD (N=63) obtiveram-se sensibilidades de 76,2%; 69,8% e 93,7% para os lotes A, B e C, respectivamente.

No caso do estado de São Paulo, SP, as amostras do IIER (N=136) forneceram sensibilidades de 81,6%; 80,9% e 83,8% para cada um dos lotes; as amostras do HCFMUSP (N=45), 64,4% para o lote A e 75,6% para os lotes B e C; as da SCMSp, 71,7% para o lote A, 87,0% para o lote B e 84,0% no lote C.

Com as amostras provenientes de Recife do CPqAM (N=80) obtiveram-se sensibilidades de 85,0% para o lote A; 82,5% para o lote B e 81,3% para o lote C.

Tabela 14 - Dados demográficos dos pacientes com LTA¹ (Painel 2)

Local ²	Sexo ³		Idade (anos)			Duração da doença (Meses)			Apresentação clínica	
	M	F	Mediana	Min – Max ⁴	NI ⁵	Mediana	Min - Max	NI	Cutânea	Mucosa
Manaus, AM - FMT-HVD⁶ (N=63)	51	12	45	20 - 76	0	1	0,5 - 120	0	61	2
São Paulo, SP – IIER⁷ (N=136)	92	44	45	7 - 85	3	6	1 - 480	96	75	61
São Paulo, SP – HCFMUSP⁸ (N=45)	27	18	34	5 - 83	31	NI	NI	45	32	13
São Paulo, SP – SCMSP⁹ (N=69)	45	24	56	17 - 84	25	NI	NI	69	NI	11
Recife, PE – CPqAM¹⁰ (N=80)	61	19	28	7 - 66	1	2	0,27 - 36	1	79	1
Total	276	117	40	5 - 85	60	2	0,27 - 480	211	247	87

1 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 2 – Local onde as amostras foram colhidas; 3 – M Masculino, F Feminino; 4 – Min–Max Mínimo–Máximo; 5 – NI Não informado; 6 – FMT-HDV Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM; 7 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 8 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 9 – SCMSP Santa Casa da Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP; 10 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE

Tabela 15 – Sensibilidade¹ do ELISA-rLb6H empregando amostras de pacientes com LTA² (Painel 2).

Lotes	<i>Cut - off</i>		Manaus, AM - FMT-HVD ⁵ (N=63)	São Paulo, SP – IIER ⁶ (N=136)	São Paulo, SP – HCFMUSP ⁷ (N=45)	São Paulo, SP – SCMSP ⁸ (N=69)	Recife, PE – CPqAM ⁹ (N=80)
A	5,7	S ³ %	76,2	81,6	64,4	71,7	85,0
		(IC 95%) ⁴	(63,8 - 86,0)	(74,0 - 87,7)	(48,8 - 78,1)	(68,3 - 88,4)	(75,3 - 92,0)
B	5,6	S %	69,8	80,9	75,6	87,0	82,5
		(IC 95%)	(57,0 - 80,8)	(73,3 - 87,1)	(60,46 - 87,1)	(76,7 - 93,9)	(72,4 - 90,1)
C	2,8	S %	93,7 [§]	83,8	75,6	84,0	81,3
		(IC 95%)	(84,5 - 98,2)	(76,5 - 89,6)	(60,46 - 87,1)	(73,3 - 91,8)	(71,0 - 89,1)

1 – calculada empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas *ROC* construídas com amostras do painel de referência; 2 – LTA leishmaniose tegumentar americana; 3 – S Sensibilidade; 4 – IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade; 5 – FMT-HDV Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM; 6 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 7 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 8 – SCMSP Santa Casa da Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP; 9 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE

[§]p = 0,0005, teste Q de Cochran, sensibilidade do lote C significativamente maior que dos lotes A e B

Os três lotes do antígeno recombinante apresentaram desempenho semelhante ($p > 0,05$, teste Q de Cochran), nas amostras de Recife e São Paulo. Nas amostras de Manaus, obteve-se sensibilidade significativamente maior com o lote C ($p = 0,0005$, teste Q de Cochran). Não foi observada diferença significativa na sensibilidade do teste, com as amostras dos diferentes centros, nos lotes A, B e C, respectivamente ($p = 0,0780$; $p = 0,1330$; $p = 0,1259$, teste qui-quadrado).

Considerando as 393 amostras de pacientes com LTA, obteve-se sensibilidade de 79,1% (IC 95%: 74,8-82,9), 79,9% (IC 95%: 75,6-83,6) e 84,0% (IC 95%: 80,0-87,3), respectivamente para os lotes A, B e C, ($p = 0,0358$, teste Q de Cochran).

Em relação às formas clínicas, os lotes A e B não apresentaram diferença significativa na porcentagem de detecção das amostras de LC e LM ($p \geq 0,432$, teste exato de Fisher), enquanto o lote C foi mais sensível na detecção de anticorpos na forma cutânea ($p = 0,0215$, teste exato de Fisher).

Quando foram comparadas as sensibilidades obtidas com as amostras de LTA do painel de referência ($N=70$) com as obtidas com o painel de validação ($N=393$), observou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os dois painéis (teste qui-quadrado com correção de Yates), com os três lotes de antígeno (lote A, $p < 0,0001$; lote B, $p = 0,0006$; lote C, $p = 0,0021$).

A tabela 16 apresenta as amostras que foram negativas por testes realizados em quatro centros de coleta (FMT-HVD, IIER, HCFMUSP e CPqAM) e que foram reagentes com o ELISA-rLb6H. Observa-se que das amostras positivas no ELISA-rLb6H, não haviam sido detectadas, em torno de 25% pela IFI, ao redor de 10% pela cultura e exame direto e cerca de 7% pela IHQ, ELISA-*L. major*-like e PCR.

Devido a que os testes diagnósticos empregados foram diferentes entre os centros, as tabelas 17 a 20 apresentam as amostras negativas pelos testes realizados em cada centro de coleta (FMT-HVD, IIER, HCFMUSP e CPqAM) e que foram positivas no ELISA-rLb6H. No IIER de São Paulo, das amostras positivas no ELISA-rLb6H, não haviam sido detectadas, mais de 60% pela IFI-*L. major*-like, quase 20% pelo ELISA-*L. major*-like e IHQ, em torno de 10% pelo exame direto e ao redor de 7% pela cultura e PCR. Na FMT-HVD de Manaus, entre as amostras positivas no ELISA-rLb6H, entre 4,6% e 8,3% não haviam sido detectadas na cultura e de 0,0% a 3,4% pela IFI-*L. braziliensis*. No HCFMUSP de São Paulo, das amostras positivas

no ELISA-rLb6H, não haviam sido detectadas, ao redor de 60% pela IFI-*L. major*-like, em torno de 6% pelo ELISA-*L. major*-like, entre 2,9% e 6,9% pela IHQ e entre 3,5% a 11,8% pela IDR. No CPqAM de Recife, das amostras positivas no ELISA-rLb6H, não haviam sido detectadas em torno de 40% pela cultura, ao redor de 25% no exame direto e entre 7,7% e 10,6% pelo PCR.

Tabela 16 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA, de quatro centros de coleta (FMT-HVD¹, IIER², HCFMUSP³ e CPqAM⁴)

Exames com resultados negativos	Amostras reagentes no teste ELISA-rLb6H		
	N ⁵ (%) IC 95% ⁶		
	Lote A ⁷	Lote B ⁸	Lote C ⁹
Exame direto	28 (9,0%) 6,3 - 12,7	27 (8,6%) 5,9 - 12,3	30 (9,1%) 6,4 - 12,7
Cultura	39 (12,5%) 9,3 - 16,7	39 (12,4%) 9,2 - 16,6	39 (11,8%) 8,7 - 15,8
IHQ¹⁰	23 (7,4%) 4,9 - 10,9	23 (7,3%) 4,9 - 10,8	23 (7,0%) 4,7 - 10,3
PCR¹¹	14 (4,5%) 2,6 - 7,5	16 (5,1%) 3,1 - 8,2	13 (3,9%) 2,3 - 6,7
IDRM¹²	3 (1,0%) 0,2 - 2,9	4 (1,3%) 0,4 - 3,4	7 (2,1%) 0,9 - 4,4
IFI¹³	81 (26,1%) 21,5 - 31,2	81 (25,8%) 21,3 - 30,9	85 (25,8%) 21,3 - 30,7
ELISA¹⁴	24 (7,7%) 5,2 - 12,3	21 (6,7%) 4,4 - 10,1	25 (7,6%) 5,1 - 11,0

1 – FMT-HDV Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM; 2 – IIER Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, SP; 3 – HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 4 – CPqAM Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 5 – Número de amostras, 6 – IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade, 7 – Lote A (n=311), 8 – Lote B (n=314), 9 – Lote C (n=330), 10 - IHQ Imuno-histoquímica, 11 – PCR reação em cadeia da polimerase, 12 – IDR. Intradermorreação de Montenegro, 13 - IFI Imunofluorescência indireta, 14 - ELISA teste imunoenzimático

Tabela 17 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo

Exames com resultados negativos	Amostras reagentes no teste ELISA-rLb6H		
	N ¹ (%) IC 95% ²		
	Lote A ³	Lote B ⁴	Lote C ⁵
Exame direto	12 (10,8%) 6,2 - 18,1	11 (10,0%) 5,5 - 17,2	13 (11,4%) 6,7 - 18,7
Cultura	8 (7,2%) 3,5 - 13,8	8 (7,3%) 3,5 - 13,9	8 (7,0%) 3,4 - 13,4
IHQ⁶	21 (18,9%) 12,7 - 27,3	21 (19,1%) 12,8 - 27,5	22 (19,3%) 13,0 - 27,6
PCR⁷	8 (7,2%) 3,5 - 13,8	9 (8,2%) 4,2 - 15,0	8 (7,0%) 3,4 - 13,4
IDRM⁸	2 (1,8%) 0,1 - 6,7	2 (1,8%) 0,1 - 6,8	2 (1,7%) 0,1 - 6,6
IFI⁹	63 (56,8%) 47,5 - 65,6	61 (55,4%) 46,1 - 64,4	64 (56,1%) 47,0 - 64,9
ELISA¹⁰	22 (19,8%) 15,7 - 31,2	19 (17,3%) 11,3 - 25,5	23 (20,2%) 13,8 - 28,5

1 - Número de amostras positivas para o ELISA rLb6H, 2 - IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade, 3 - Lote A (n=111), 4 - Lote B (n=110), 5 - Lote C (n=114), 6 - IHQ Imuno-histoquímica, 7 - PCR reação em cadeia da polimerase, 8 - IDRM Intradermoreação de Montenegro, 9 - IFI Imunofluorescência indireta, 10 - ELISA teste imunoenzimático.

Tabela 18 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus

Exames com resultados negativos	Amostras reagentes no teste ELISA-rLb6H		
	N ¹ (%) IC 95% ²		
	Lote A ³	Lote B ⁴	Lote C ⁵
Cultura	4 (8,3%) 2,8 - 20,1	2 (4,6%) 0,4 - 16,0	3 (5,1%) 1,2 - 14,5
IFI⁶	1 (2,1%) 0,0 - 11,9	0 (0,0%) 0,0 - 9,6	2 (3,4%) 0,3 - 12,2

1 - Número de amostras positivas para o ELISA rLb6H, 2 - IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade, 3 - Lote A (n=48), 4 - Lote B (n=44), 5 - Lote C (n=59), 6 - IFI Imunofluorescência indireta

Tabela 19 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo

Exames com resultados negativos	Amostras reagentes no teste ELISA-rLb6H		
	N ¹ (%) IC 95% ²		
	Lote A ³	Lote B ⁴	Lote C ⁵
IDRM⁶	1 (3,5%) 0,0 - 18,6	2 (5,9%) 0,7 - 20,1	4 (11,8%) 4,1 - 27,2
IHQ⁷	2 (6,9%) 0,9 - 23,0	2 (5,9%) 0,7 - 20,1	1 (2,9%) 0,0 - 16,2
IFI⁸	17 (58,6%) 40,7 - 74,5	20 (58,8%) 42,2 - 73,7	21 (61,8%) 45,0 - 76,1
ELISA⁹	2 (6,9%) 0,9 - 23,0	2 (5,9%) 0,7 - 20,1	2 (5,9%) 0,7 - 20,1

1 - Número de amostras positivas para o ELISA rLb6H, 2 - IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade, 3 - Lote A (n=29), 4 - Lote B (n=34), 5 - Lote C (n=34), 6 - IDRM Intradermorreação de Montenegro, 7 - IHQ Imuno-histoquímica, 8 - IFI Imunofluorescência indireta, 9 - ELISA teste imunoenzimático

Tabela 20 – Amostras reagentes pelo teste ELISA-rLb6H e negativas nos exames realizados para o diagnóstico dos pacientes de LTA no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife

Exames com resultados negativos	Amostras reagentes no teste ELISA-rLb6H		
	N ¹ (%) IC 95% ²		
	Lote A ³	Lote B ⁴	Lote C ⁵
Exame direto	16 (23,5%) 14,9 - 34,9	18 (27,3%) 17,9 - 39,1	17 (26,1%) 19,4 - 38,0
Cultura	27 (39,7%) 28,9 - 51,6	28 (42,4%) 31,2 - 54,4	28 (43,1%) 31,7 - 55,2
PCR⁶	6 (8,8%) 3,8 - 18,3	7 (10,6%) 4,9 - 20,6	5 (7,7%) 2,9 - 17,2

1 - Número de amostras positivas para o ELISA rLb6H, 2 - IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade, 3 - Lote A (n=68), 4 - Lote B (n=66), 5 - Lote C (n=65), 6 - PCR reação em cadeia da polimerase

4.6.2. Indivíduos saudáveis – Especificidade

As tabelas 16 e 17 apresentam a especificidade do ELISA-rLb6H, empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas *ROC* construídas com o painel de referência, quando se testaram amostras do painel 3 de validação.

Com as 392 amostras de indivíduos saudáveis, provenientes das regiões diferentes endemicidades, o ELISA-rLb6H apresentou uma especificidade inicial que variava entre 61,2% até 85,4% para o lote A; 56,8% até 83,8% no lote B e 81,1% até 96,5% para o lote C (tabela 16). Após a triagem para doença de Chagas e presença de fator reumatoide (FR), foram excluídas 23 amostras, sendo 14 de São Paulo, uma de Três Lagoas e oito de Engenheiro Marsilac. As especificidades excluindo-se as 23 amostras reagentes para doença de Chagas e FR estão relatadas na tabela 17.

Entre as 18 amostras reagentes para Doença de Chagas, oito, sete e uma eram positivas no ELISA-rLb6H, respectivamente para os lotes A, B e C. Das quatro amostras com fator reumatoide positivo, duas eram positivas no lote A uma no lote B e nenhuma com o lote C. A amostra positiva para fator reumatoide e Doença de Chagas era reagente apenas com o lote B.

Considerando as 369 amostras de indivíduos saudáveis, obteve-se especificidade de 75,6% (IC 95%: 71,0-80,0); 73,7% (IC 95%: 69,0-78,0) e 92,4% (IC 95%: 89,2-94,7), respectivamente para os lotes A, B e C, ($p < 0,0001$; teste Q de Cochran), sendo o lote C significativamente mais específico que os lotes A e B.

A figura 20 mostra o fluxograma das amostras do painel 3, antes e após os testes para Doença de Chagas e pesquisa de FR.

Comparando as tabelas 16 e 17, verifica-se que os valores de especificidade obtidos, excluindo-se as amostras reagentes para Doença de Chagas e FR, são semelhantes ($p > 0,738$, teste exato de Fisher).

Nos três lotes estudados foi observada diferença significativa na especificidade do teste, com as amostras dos diferentes centros ($p < 0,0001$, teste qui-quadrado). Com o lote A, o teste foi mais específico nas amostras de São Paulo e Manaus; com o lote B, observou-se maior especificidade com as amostras de São Paulo e com o lote C, nas amostras de São Paulo,

Engenheiro Marsilac e Manaus. Comparando os resultados por centro, observou-se maior especificidade com o lote C em São Paulo, Engenheiro Marsilac e Manaus ($p \leq 0,001$, teste Q de Cochran) e em Três Lagoas, os três apresentaram diferença significativa entre eles ($p < 0,0001$, teste Q de Cochran) (Tabela 17).

Comparando as especificidades obtidas com as amostras de indivíduos saudáveis do painel de referência ($N=70$) e as obtidas com o painel de validação ($N=369$), observou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os dois painéis (teste qui-quadrado com correção de Yates), com os três lotes de antígeno (lotes A e B, $p < 0,0001$; lote C, $p = 0,0344$).

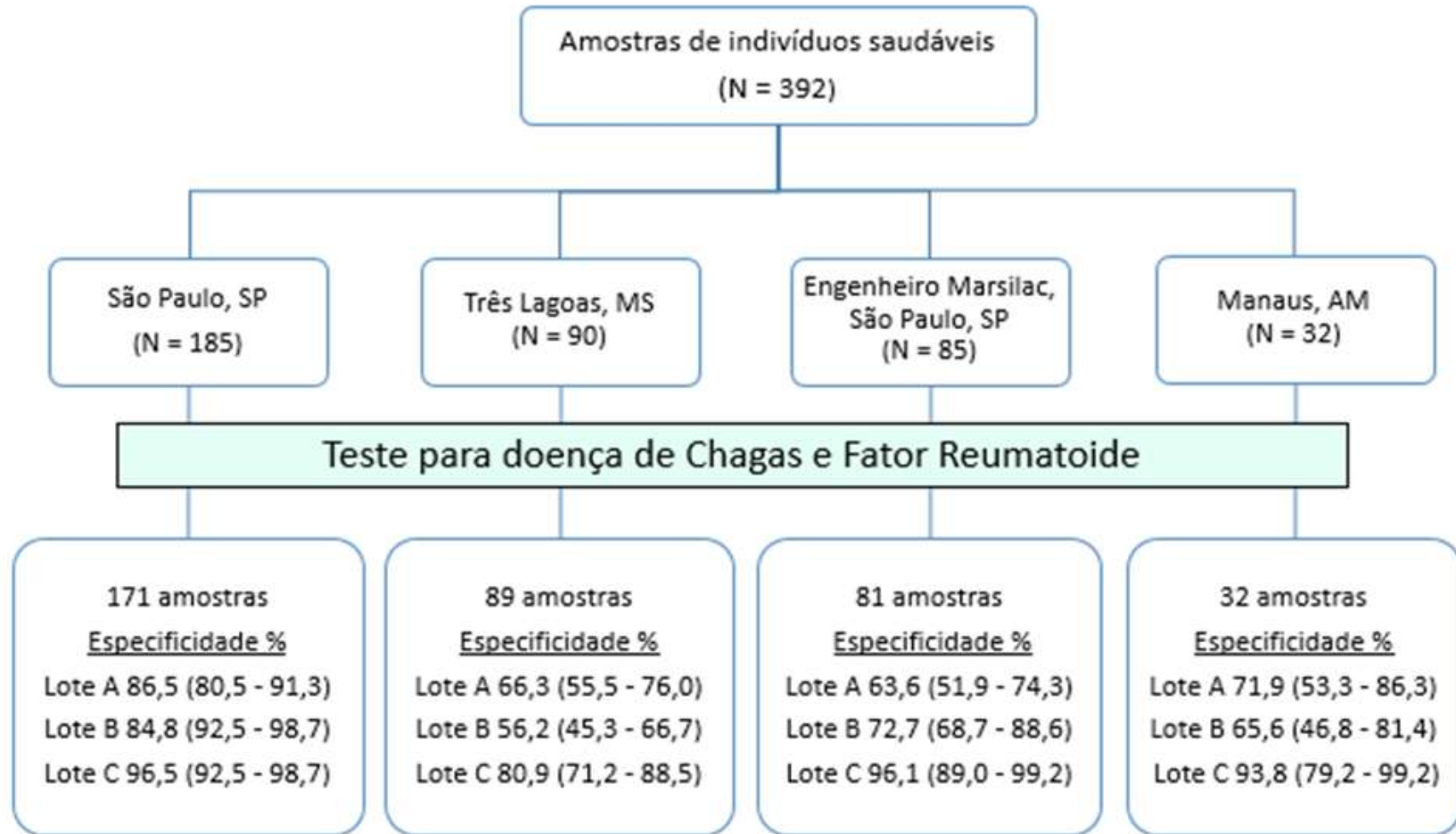


Figura 20 – Fluxograma das amostras do painel 3 de validação (amostras de indivíduos saudáveis)

Tabela 20 – Especificidade¹ das amostras de controles saudáveis (Painel 3) antes do teste de Chagas² e FR³

Lotes	Cut - off		São Paulo, SP (N = 185)	Três Lagoas, MS (N = 90)	Engenheiro Marsilac, São Paulo, SP (N = 85)	Manaus, AM (N = 32)
A	5,7	E ⁴ % (IC 95%) ⁵	85,4 (79,5 - 90,1)	65,6 (54,8 - 75,3)	61,2 (50,0 - 71,6)	71,9 (53,3 - 86,3)
B	5,6	E % (IC 95%)	83,8 (77,7 - 88,8)	55,6 (44,7 - 66,0)	70,6 (59,7 - 80,0)	65,6 (46,8 - 81,4)
C	2,8	E % (IC 95%)	96,2 (92,4 - 98,5)	81,1 (71,5 - 88,6)	96,5 (90,0 - 99,3)	93,8 (79,2 - 99,2)

1 – Calculada empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas *ROC* construídas com amostras do painel de referência; 2 – Teste de Chagas, ELISA com antígeno recombinante; 3 – FR fator reumatoide; 4 – E especificidade; 5 – IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade

Número total de amostras = 392

Tabela 21 – Especificidade¹ das amostras de controles saudáveis (Painel 3) após o teste de Chagas² e FR³

Lotes	Cut - off		São Paulo, SP (N = 171)	Três Lagoas, MS (N = 89)	Engenheiro Marsilac, São Paulo, SP (N = 77)	Manaus, AM (N = 32)
A	5,7	E ⁴ % (IC 95%) ⁵	86,5 (80,5 - 91,3)	66,3 (55,5 - 76,0)	63,6 (51,9 - 74,3)	71,9 (53,3 - 86,3)
B	5,6	E % (IC 95%)	84,8 (92,5 - 98,7)	56,2 (45,3 - 66,7)	72,7 (68,7 - 88,6)	65,6 (46,8 - 81,4)
C	2,8	E % (IC 95%)	96,5 [§] (92,5 - 98,7)	80,9 [§] (71,2 - 88,5)	96,1 [§] (89,0 - 99,2)	93,8 ^{&} (79,2 - 99,2)

1 – Calculada empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas *ROC* construídas com amostras do painel de referência; 2 – Teste de Chagas, ELISA com antígeno recombinante; 3 – FR fator reumatoide; 4 – E especificidade; 5 – IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade

[§] p < 0,0001 (teste Q de Cochran), lote C em relação a lotes A e B

[&] p = 0,001 (teste Q de Cochran), lote C em relação a lotes A e B

[§] p < 0,0001, (teste Q de Cochran), lote C em relação a lotes A e B; lote B em relação a lote A

Número total de amostras = 369

4.6.3. Pacientes com outras doenças – Reação cruzada

A tabela 18 apresenta os resultados de reatividade cruzada do ELISA-rLb6H, empregando os valores de *cut-off* obtidos a partir das curvas *ROC* do painel de referência, quando se testaram amostras do painel 4 de validação com 166 amostras de diversas doenças (tabela 7).

Das amostras testadas, 24 reagiram com o lote A e 23 com os lotes B e C. Com o lote A, as doenças com maior reatividade cruzada foram tuberculose e histoplasmosose com 60,0%. Nos lotes B e C, foi malária com 36,4% e tuberculose com 30,0% e 40,0%, respectivamente (Tabela 18 e Figura 21).

Nesse grupo, a especificidade foi de 85,5% (IC 95%: 79,3-90,1) para o lote A e 86,1% (IC 95%: 80,0-90,6) para os lotes B e C. Não foi observada diferença significativa entre a reatividade cruzada obtida pelos três lotes ($p = 0,974$, teste Q de Cochran).

Tabela 22 - Reatividade cruzada das amostras de pacientes com outras doenças no ELISA-rLb6H, com cada um dos lotes empregados

Doença	NT ¹	Lote A		Lote B		Lote C	
		N ² (%) ³	IC 95% ⁴	N (%)	IC 95%	N (%)	IC 95%
Doença autoimune	20	1 (5,0)	0,0 – 25,4	3 (15,0)	4,4 – 36,9	0 (0,0)	0,0 – 19,0
Toxoplasmose	20	0 (0,0)	0,0 – 19,0	0 (0,0)	0,0 – 19,0	1 (5,0)	0,0 – 25,4
Sífilis	13	1 (7,7)	0,0 – 35,4	1 (7,7)	0,0 – 35,4	0 (0,0)	0,0 – 26,6
Paracoccidioidomicose	30	5 (16,7)	6,9 – 34,0	4 (13,3)	4,7 – 30,30	7 (23,3)	11,5 – 41,2
Malária	11	1 (0,1)	0,0 – 39,9	4 (36,4)	16,0 – 64,8	4 (36,4)	15,0 – 64,8
Chagas	23	2 (8,7)	1,2 – 28,0	3 (13,0)	3,7 – 33,0	2 (8,7)	1,2 – 28,0
Tuberculose	10	6 (60,0)	31,2 – 83,3	3 (30,0)	10,3 – 60,8	4 (40,0)	16,7 – 68,8
Histoplasmose	5	3 (60,0)	22,9 – 88,4	0 (0,0)	0,0 – 48,9	1 (20,0)	2,0 – 64,0
Fator reumatoide	25	5 (20,0)	8,4 – 39,6	5 (20,0)	8,4 – 39,6	4 (16,0)	5,8 – 35,3
Mononucleose	9	0 (0,0)	0,0 – 34,5	0 (0,0)	0,0 – 34,5	0 (0,0)	0,0 – 34,5
Total	166	24 (14,5)	9,8 – 20,7	23 (13,9)	9,3 – 20,0	23 (13,9)	9,3 – 20,0

1 - NT número total de amostras de cada doença; 2 - N número de amostras reagentes; 3 - % porcentagem de reagentes; 4 - IC 95% intervalo de confiança de 95% de probabilidade

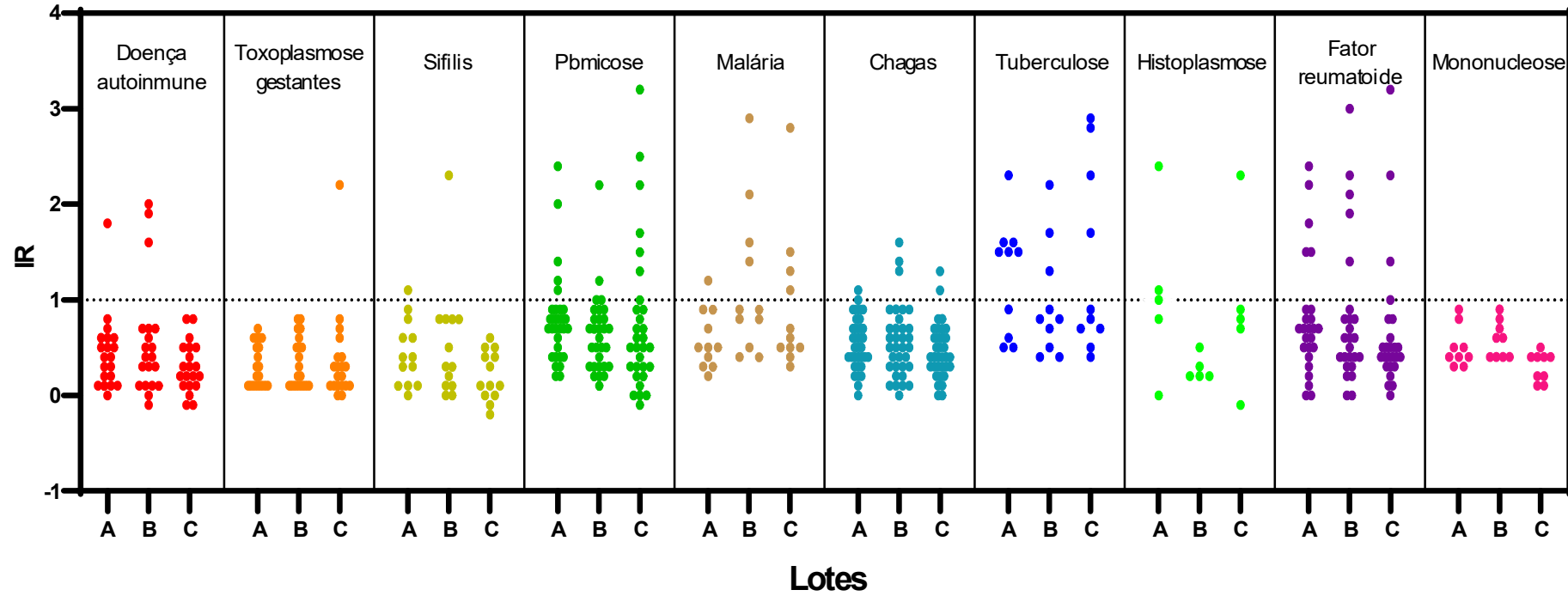


Figura 21 - Índice de reatividade das amostras de outras doenças em cada lote. A linha preta pontilhada representa a divisão entre positivo e negativo

DISCUSSÃO

5. Discussão

Este estudo avaliou o desempenho do antígeno recombinante Lb6H derivado da sequência gênica de *L. (V.) braziliensis* em plataforma ELISA, para potencial aplicação na prática clínica, visando auxiliar no diagnóstico da LTA, uma vez que, até o momento, não há um teste diagnóstico único padrão-ouro (ARONSON; JOYA, 2019; FREIRE et al., 2021) e, portanto, quanto mais ferramentas tivermos, mais rápido e confiável será o diagnóstico da LTA.

O diagnóstico da LTA baseia-se num tripé EPIDEMIOLOGIA-CLÍNICA-LABORATÓRIO. Os aspectos clínico-epidemiológicos são fundamentais, mas necessitam da confirmação laboratorial para fechar o diagnóstico, devido principalmente aos aspectos clínicos variados que nem sempre são patognomônicos da doença (ROCHA; CAMPOS, 2006).

Em relação aos testes disponíveis para o diagnóstico da LTA, os métodos que pesquisam o agente etiológico da infecção tendem a ser altamente específicos, quando realizados dentro dos padrões de boas práticas de qualidade. Entretanto, apresentam desvantagens, pois necessitam de coleta invasiva para a obtenção das amostras, de médicos treinados para a coleta de biópsias e de profissionais especializados para o processamento do material colhido/realização dos exames (pesquisa direta, cultura, histopatológico, anatomopatológico e PCR) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD., 2019). Além disso, a sensibilidade desses ensaios diagnósticos depende do número de parasitos na lesão (geralmente inversamente proporcional à duração da lesão), da espécie de *Leishmania* e do tipo de lesão (úlcera muitas vezes tem o maior rendimento) (ARONSON; JOYA, 2019). Baixa sensibilidade do exame direto e histopatológico tem sido descrita em casos crônicos e de LM (GOTO; LINDOSO, 2010), recomendando-se a realização de vários ensaios usando uma amostra de uma lesão cutânea de aparência ativa (ARONSON et al., 2016). Os testes moleculares, embora promissores, necessitam padronização entre os vários laboratórios que os executam, além de serem complexos e caros, o que restringe seu uso a centros de referência e de pesquisa e dificulta sua aplicação no *point-of-care*, em locais com carência de recursos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD., 2019)

Os métodos imunológicos, como a reação de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* (teste de Montenegro) e os métodos sorológicos que pesquisam anticorpos anti-*Leishmania* representam tanto uma alternativa quanto um complemento ao diagnóstico etiológico da LTA.

O teste de Montenegro era um importante aliado no diagnóstico da LTA; porém, a descontinuidade na produção do antígeno levou a uma lacuna para a confirmação da doença, particularmente em locais com recursos escassos. Principalmente nos casos de evolução crônica, onde os parasitos na lesão são escassos, os pacientes, não raro, são tratados com base em diagnóstico de suposição, levando em conta os dados epidemiológicos, clínicos e exames histopatológicos, muitas vezes sem uma indicação segura de infecção por *Leishmania*, constituindo-se em agravante com séria ameaça à saúde dos pacientes, pois as drogas utilizadas apresentam efeitos colaterais sérios (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD., 2019). Por outro lado, em áreas endêmicas, a positividade da IDRM varia entre 20 e 30% na ausência de lesão ativa ou cicatriz, pois o teste pode ser positivo em indivíduos curados, assintomáticos, que receberam antígeno de Montenegro anteriormente, alérgicos ao diluente, com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase wirchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ATLAS INTERATIVO, 2021).

Do ponto de vista do desenvolvimento e reprodutibilidade do teste, optou-se pelo antígeno recombinante Lb6H, que em estudo anterior de nosso grupo apresentou um bom desempenho (SATO et al., 2017), sendo uma alternativa aos antígenos brutos que requerem crescimento de parasitos, com suas limitações e dificuldades (GOTO; LINDOSO, 2010).

Em relação à casuística de nosso estudo, o grande número de amostras de pacientes com LTA e de controles utilizado foi um importante diferencial, em comparação com a maior parte dos estudos realizados no Brasil, que empregaram pequeno número de amostras, principalmente de pacientes com LTA, como descrito em recente revisão sistemática (FREIRE et al., 2021). Outro aspecto importante deste estudo foi a caracterização detalhada da maioria dos pacientes e das amostras, conferindo maior robustez aos resultados obtidos. Além disso foram analisadas amostras de diferentes localidades do Brasil.

No presente estudo, obteve-se desempenho diagnóstico concordante com o obtido em trabalho anterior que empregou outro lote do mesmo antígeno (SATO et al., 2017). Com as amostras do painel de referência (painel 1 - N = 140), a sensibilidade foi 100,0%, 95,7% e 98,6%; a especificidade foi 100,0%, 97,1% e 100,0%; a acurácia foi 100,0%, 96,4% e 99,3%, respectivamente para os lotes A, B e C. Não houve diferença significativa entre os lotes tanto em relação à sensibilidade quanto à especificidade ($p > 0,1$, teste Q de Cochran). Os elevados valores de coeficiente de Spearman obtidos ($\rho \geq 0,92$) comprovam a correlação entre os índices

de reatividade das amostras positivas nos três lotes. Além disso, o elevado valor de razão de verossimilhança positiva (33,5) obtido com o lote B (único lote em que a especificidade não foi 100,0%) indicou forte evidência para doença, e os baixos valores de razão de verossimilhança negativa ($< 0,04$), indicaram ausência de associação com a presença da doença (DEEKS; ALTMAN, 2004; FURUKAWA et al., 2008). É oportuno ressaltar a importância da razão de verossimilhança na prática clínica, pois permite que o clínico quantifique a probabilidade de doença para qualquer paciente. Além disso, seus valores não dependem da prevalência da doença, como ocorre com os valores preditivos positivo e negativo e, portanto, não variam em diferentes populações (ATTIA, 2003).

A aplicação segura de um teste diagnóstico depende não apenas da sensibilidade e especificidade, mas também de outras características. Segundo o “Manual para regularização de produtos para diagnóstico *in vitro* na ANVISA” (GEVIT; ANVISA, 2012), é importante conhecer a precisão das medições que é fornecida pela repetibilidade, reprodutibilidade e homogeneidade do teste. Nas amostras positivas dos três lotes utilizados, o ELISA-rLb6H mostrou-se reprodutível, com coeficiente de variação $\leq 12,73\%$ na repetibilidade, $\leq 22,86\%$ na reprodutibilidade e $\leq 9,05\%$ na homogeneidade, valores dentro do recomendado, de acordo com a literatura disponível (MENEGHISSE, 2007). Em relação às amostras negativas, nos três lotes empregados, os valores do coeficiente de variação foram $> 25\%$ na reprodutibilidade e $> 20\%$ na homogeneidade, o que se justifica pelo fato de que a imprecisão (erro) de uma medida aumenta com a diminuição da concentração do analito (no caso, anticorpos anti-Lb6H), levando a um maior coeficiente de variação nas repetições (CROWTHER, 2000).

O estudo da estabilidade das placas sensibilizadas com o antígeno rLb6H é fator imprescindível para o desenvolvimento do teste e muito importante para estabelecer um prazo de validade do produto (WHO, 2013). Além disso, caso o antígeno não se mostre estável, é possível implementar melhorias na sua produção. Na avaliação da estabilidade dos três lotes do antígeno recombinante na placa com o tempo, as placas sensibilizadas mostraram-se estáveis por 180 dias, quando armazenadas a -20°C e 4°C . A estabilidade a 4°C traz benefício no armazenamento e transporte das placas sensibilizadas. No estudo da estabilidade acelerada, as placas se mantiveram estáveis, sem perda de reatividade, até sete dias de armazenamento a 37°C , indicando validade de 12 meses (MENEGHISSE, 2007).

Quando os três lotes de antígeno rLb6H foram validados com amostras de pacientes com LTA de diferentes regiões do Brasil (painel 2 – $N = 393$), a sensibilidade foi 79,1%, 79,9%

e 84,0%, respectivamente para os lotes A, B e C ($p = 0,0358$, teste Q de Cochran), sendo o lote C mais sensível. Embora as amostras fossem oriundas de diferentes áreas endêmicas, de um modo geral, observou-se um desempenho semelhante do teste em relação à sensibilidade nos diferentes centros de coleta ($p > 0,05$, teste qui-quadrado). Por outro lado, o lote C foi mais sensível que os demais em Manaus ($p = 0,0005$, teste Q de Cochran).

Com as amostras de controles saudáveis residentes em áreas de diferentes endemicidades (painel 3 – $N = 392$), após a triagem para doença de Chagas e presença de fator reumatoide ($N = 369$), a especificidade foi 75,6%, 73,7% e 92,4%, respectivamente para os lotes A, B e C ($p < 0,0001$, teste Q de Cochran), sendo o lote C significativamente mais específico que os lotes A e B. De modo diferente do obtido com a sensibilidade, nos três lotes estudados houve diferença significativa na especificidade do teste, com as amostras dos diferentes centros ($p < 0,0001$, teste qui-quadrado e $p \leq 0,001$, teste Q de Cochran). A justificativa para os níveis mais baixos de especificidade encontrados em Três Lagoas, MS (56,2% a 80,9%), Manaus, AM (65,65% a 93,8%) e no bairro de Engenheiro Marsilac, SP (63,6% a 96,1%) pode estar relacionada com as características de endemicidade das áreas. Embora todos os participantes fossem assintomáticos, pode haver casos de cura espontânea e de infecções subclínicas, que seriam detectados como falsos-positivos (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Três Lagoas é um município endêmico para LV (LOPEZ et al., 2021) e sabe-se que rLb6H também detecta anticorpos da forma visceral (SATO et al., 2017), Manaus é endêmico para LTA e o bairro de Engenheiro Marsilac fica no extremo sul do município de São Paulo, possui grande área de Mata Atlântica e apresentou vários casos de LTA na época da obtenção das amostras (DA SILVA et al., 2012). Já com as amostras de indivíduos do município de São Paulo, obteve-se especificidade variando de 84,8% a 98,5%, o que pode ser explicado pelo fato da região não ser endêmica para LTA (LISBOA et al., 2021).

Os resultados de outros autores mostram grande variabilidade de sensibilidade e especificidade empregando antígenos recombinantes e totais na pesquisa de anticorpos na LTA. Com HSp70 de *L. braziliensis*, em plataforma ELISA, em pacientes com formas cutânea e mucosa da mesma espécie de leishmania, relatou-se sensibilidade de 14% a 84%, em amostras de Cuzco, Peru e especificidade de 92% a 100% em soros de residentes na Espanha e no Peru (ZURITA et al., 2003). Empregando amostras de Belo Horizonte, MG, com formas cutânea e mucosa, causadas por *L. braziliensis*, autores relataram sensibilidade de 63% a 94%, com Hsp83.1 de *L. braziliensis* e especificidade de 90% a 96% em amostras de área não endêmica de Belo Horizonte (MENEZES-SOUZA et al., 2014). Com antígeno total de promastigotas de

L. braziliensis e *L. amazonensis*, a sensibilidade variou de 19% a 81%, em amostras de Belo Horizonte, MG e Vitória, ES e a especificidade, de 58 a 71%, em amostras de Uberlândia, MG (GOMES-SILVA et al., 2008). Com amastigotas de *L. braziliensis*, a sensibilidade foi 98% em amostras de áreas endêmicas da Argentina e a especificidade foi de 98,4% em amostras do Japão (BRACAMONTE et al., 2020).

Na análise de interferência para avaliar a reatividade cruzada do ELISA-rLb6H, nosso estudo obteve 14,5% (24/166) de reações positivas para o lote A e 13,9% (23/166) para os lotes B e C. As doenças que apresentaram maior número de reações positivas foram tuberculose, histoplasmose e malária, as quais haviam sido previamente relatadas com reatividade cruzada para antígenos brutos e recombinante de *Leishmania* (SOUZA et al., 2013; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A doença de Chagas é um importante interferente quando se utilizam extratos brutos de *Leishmania*, como referido por vários autores. Por exemplo, com antígenos de amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi observada cerca de 100% de reatividade cruzada (BRACAMONTE et al., 2020); com antígenos de promastigotas de *L. infantum chagasi*, foram relatados 63,0% de positivos (SOUZA et al., 2013); com promastigotas de *L. major-like*, 75,8% das amostras de doença de Chagas foram reagentes (SATO et al., 2017). No presente estudo, obteve-se reação positiva em 8,7% (2/23) das amostras de doença de Chagas com os lotes A e C e 13,0% (3/23) lote B, valores semelhantes ao obtido com rHsp70 (10%), que foi o recombinante mais específico entre os testados por Souza (SOUZA et al., 2013). Foi observada reatividade cruzada com anticorpos desenvolvidos contra infecções que podem apresentar sinais clínicos semelhantes aos da LC/LM, tais como tuberculose, paracoccidiodomicose, histoplasmose e sífilis, indicando a necessidade de um exame clínico minucioso para encontrar sinais sugestivos de outras doenças (ATLAS INTERATIVO, 2021). Em relação à malária e doença de Chagas, a importância de seu estudo está relacionada à sobreposição de áreas endêmicas.

Em relação às formas clínicas, o ELISA-rLb6H detectou 81,9%, 80,3% e 89,3% dos casos de LC e 85,9%, 83,8% e 78,8% dos casos de LM, respectivamente com os lotes A, B e C. Os lotes A e B não apresentaram diferença significativa na porcentagem de detecção das amostras de LC e LM ($p \geq 0,4420$, teste exato de Fisher), enquanto o lote C foi mais sensível na detecção de anticorpos na forma cutânea ($p = 0,0104$, teste exato de Fisher). Salienta-se o bom desempenho do ELISA-rLb6H em pacientes com LM, visto que o diagnóstico é mais difícil nesta forma porque tem poucos parasitos na lesão (GOTO; LINDOSO, 2010; ATLAS INTERATIVO, 2021). Embora com pequeno número de amostras, resultados semelhantes

foram obtidos em estudo com Hsp70 de *Leishmania (V.) braziliensis*, em 30 pacientes com LC e 20 com LM, com positividade de 83,3% e 85,0%, respectivamente (ZURITA et al., 2003).

Em pacientes com LTA, verificou-se que quantidade considerável de amostras positivas no teste ELISA-rLb6H não havia sido detectada pelos testes diagnósticos empregados nos centros de coleta. Em alguns centros, os testes de identificação etiológica, como exame direto, chegaram a ter cerca de 25% de resultados negativos, cultura até 40%, IHQ ao redor de 20%, PCR cerca de 10%. Com relação aos testes sorológicos, a IFI-*L. major*-like teve cerca de 60% de resultados negativos e o ELISA-*L. major*-like, cerca de 20% de resultados negativos frente ao ELISA-rLb6H positivo. Pode-se afirmar que a grande maioria, senão todas essas amostras positivas no ELISA-rLb6H, são verdadeiro-positivas, pois dos 393 pacientes estudados, apenas nove tiveram diagnóstico baseado em critério clínico-epidemiológico e os demais, foram positivos por um ou mais testes, como mostrado na metodologia. Além disso, dos 30 pacientes com prova terapêutica positiva, cerca de 80% foram detectados no ELISA-rLb6H. Portanto, esses achados mostram a necessidade de se contar com novos testes que possam complementar o diagnóstico da LTA (GONZALEZ et al., 2019), surgindo como opção o ELISA-rLb6H, que aumentaria a disponibilidade do acesso e estabelecendo um diagnóstico oportuno e mais seguro da LTA.

Devemos salientar que o diagnóstico da LTA deve ser feito na apresentação clínica mais precoce para evitar as complicações da doença crônica (ESPIR et al., 2016), visto que nas Américas, a LC tende a ser mais severa e com longos períodos de evolução (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD., 2019). Estudos sugerem que 5% das formas cutâneas podem evoluir para forma mucosa, podendo chegar a 20% em áreas endêmicas (HANDLER et al., 2015) o que mostra a importância do diagnóstico precoce e de se dispor de métodos diagnósticos que possam ser aplicados em locais com pouca infraestrutura, com recursos escassos e que, de preferência, não necessitem de coleta invasiva, nem metodologia molecular. Neste contexto, o desempenho de ELISA-rLb6H credencia este teste como um bom teste complementar no diagnóstico da LTA

Os resultados deste estudo, empregando amostras de diferentes regiões do Brasil, permitem afirmar que, na ausência do teste de Montenegro, o ELISA-rLb6H poderia ser uma alternativa ao diagnóstico da LTA, como corroborado por diversos autores. Estudos aplicando teste de Montenegro em 38 pacientes do Amazonas com lesões cutâneas com suspeita clínica de LC, referiram positividade de 77,0% (ESPIR et al., 2016). Relato de estudo em Brasília,

citou sensibilidade de 88,2% em 79 pacientes com LTA e especificidade de 60,0% em 20 controles sadios (PINHEIRO et al., 2020). No Rio de Janeiro, foi relatada a sensibilidade de 89,1% em 136 amostras de pacientes com LTA e a especificidade de 71,4% em 110 controles de não LTA (FAGUNDES; SILVA, 2007).

Com base no bom desempenho diagnóstico, nas características de reprodutibilidade, estabilidade do antígeno sugere-se a utilização de rLb6H no diagnóstico da LTA.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

- a) O teste ELISA com antígeno recombinante Lb6H foi validado para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana;
- b) Em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e controles sadios, o ELISA-rLb6H bom desempenho diagnóstico, com elevada sensibilidade, especificidade e acurácia, nos três lotes empregados, demonstrando uniformidade, característica importante de um teste para diagnóstico;
- c) O ELISA-rLb6H apresentou características de repetibilidade, reprodutibilidade e homogeneidade dentro dos padrões exigidos para testes sorológicos
- d) As placas sensibilizadas com o antígeno recombinante rLb6H mantiveram-se estáveis, sem perda de reatividade, por 180 dias, quando armazenadas a temperaturas de -20°C e 4°C e por 7 dias, quando armazenadas a 37°C;
- e) Em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar de diferentes áreas endêmicas, o ELISA-rLb6H mostrou-se útil na detecção de casos não identificados por outros testes, empregados no diagnóstico inicial;
- f) Em amostras de controles saudáveis provenientes de diferentes regiões do Brasil, a especificidade do ELISA-rLb6H variou com as características de endemicidade do local, sendo mais elevada em área não-endêmica;
- g) Em amostras de outras patologias, o ELISA-rLb6H demonstrou baixa reatividade em amostras de pacientes com Doença de Chagas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIAGA, L. et al. Localized Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. **Medicine**, v. 82, n. 3, p. 147–158, maio 2003. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00005792-200305000-00001>>.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>>.

ANVISA. Guias relacionados à garantia de qualidade. **0 BioRegulations**, 2006.

ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. e202–e264, 15 dez. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/63/12/e202/2645609>>.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, mar. 2019.

ATLAS INTERATIVO. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. [s.l.] Pan American Health Organization, 2021.

ATTIA, J. Moving beyond Sensitivity and Specificity: Using Likelihood Ratios to Help Interpret Diagnostic Tests. **Australian Prescriber**, v. 26, n. 5, p. 111–113, 2003. Disponível em: <<https://www.nps.org.au/australian-prescriber/articles/moving-beyond-sensitivity-and-specificity-using-likelihood-ratios-to-help-interpret-diagnostic-tests>>.

BANOO, S. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. S12, p. S20–S32, dez. 2006. Disponível em: <www.nature.com/reviews/micro>.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans** *Advances in Parasitology* Academic Press, , 2007. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499100>>.

BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, set. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300010&lng=pt&tlng=pt>.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>>.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 1 set. 2004. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=4&issue=6&spage=601>>.

BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, ago. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-81222019000200611&tlng=pt>.

BRACAMONTE, M. E. et al. High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–12, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, p. 189, 2017. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_>.

CABALLERO, Z. C. et al. 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**, v. 14, n. 8, p. 1045–1049, 2007.

CELESTE, B. J. et al. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 860–865, 7 maio 2014. Disponível em: <<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.13-0623>>.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N.; COUTINHO, S. G. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. **Leishmanioses do continente americano**, p. 357–379, 2014. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.7476/9788575415689.23>>.

CROWTHER, J. R. **ELISA Guidebook, The**. New Jersey: Humana Press, 2000. v. 149

CUNNINGHAM, J. et al. A Global Comparative Evaluation of Commercial Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 10, p. 1312–1319, 15 nov. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/55/10/1312/324303>>.

DA SILVA, R. A. et al. Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 3, p. 617–626, 2012.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 17 dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>>.

DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. **BMJ**, v. 329, n. 7458, p. 168–169, 17 jul. 2004. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.329.7458.168>>.

ESPIR, T. T. et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 1–6, ago. 2016.

FAGUNDES, A.; SILVA, D. A. a Reação Intradérmica De Montenegro Na Clínica E Na Epidemiologia Da Leishmaniose. 2007.

FARBER, M. D. Designing Clinical Research. **Retina**, v. 10, n. 4, p. 322, 1990. Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1135243](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1135243)>.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. do L. P. P.-R. de J. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais** Guanabara Koogan, , 2013. .

FREIRE, M. L. et al. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0251956, 27 maio 2021. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0251956>>.

FURUKAWA, T. A. et al. The performance of the Japanese version of the K6 and K10 in the World Mental Health Survey Japan. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 17, n. 3, p. 152–158, set. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mpr.257>>.

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. 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**, v. 43, n. 1, p. 7–25, 9 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/29366>>.

GEVIT, G. de P. D. de uso in vitro-; ANVISA. Manual para regularização de produtos para diagnóstico de uso in vitro na anvisa. p. 108, 2012.

GLOBAL HEALTH, D. of P. D. and M. **Parasites - Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 367–376, ago. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pim.12100>>.

GOMES-SILVA, A. et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 135–141, abr. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000200001&lng=en&tlng=en>.

GONZALEZ, K. et al. Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America. **Parasitology International**, v. 71, n. February, p. 46–52, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.007>>.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis** Infectious Disease Clinics of North America, 2012. .

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis** Expert Review of Anti-Infective Therapy Expert Reviews Ltd., , 2010. .

GRIMALDI, G. et al. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from

Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 645–661, 1 jun. 1991. Disponível em: <<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1991.44.645>>.

GRIMALDI JR, G.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World Leishmania species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 37–42, fev. 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761996000100006&lng=en&tlng=en>.

GUIMARAES, M. C. S. et al. 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**, v. 67, n. 6, p. 643–648, 1989.

GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L. Diagnostic performances indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 1, p. 39–43, 1990.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, dez. 2015.

HANDMAN, E. Cell Biology of Leishmania. In: [s.l.: s.n.]p. 1–39.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385–1386, dez. 1966. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/2121385a0>>.

JACOBINA, R. R.; GELMAN, E. A. Juliano Moreira e a Gazeta Medica da Bahia. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1077–1097, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702008000400011&lng=pt&tlng=pt>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/227680a0>>.

LAINSON, R. et al. Evolution, classification and geographical distribution. In: **Anais...1987**.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, mar. 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections PP - Boston**. [s.l.] Hodder Arnold, 2005.

LEE, R. E.; YOUNG, R. H.; CASTLEMAN, B. James Homer Wright. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, n. 1, p. 88–96, jan. 2002. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00000478-200201000-00011>>.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–10, 2020.

LISBOA, L. A. V. et al. **DOENÇAS TROPICAIS E NEGLIGENCIADAS**. [s.l.] Editora Pasteur, 2021.

LOPEZ, L. F. B. et al. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE TRÊS LAGOAS - MATO GROSSO DO SUL, UMA NOVA REGIÃO ENDÊMICA NO BRASIL. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101213, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867020303408>>.

LUPI, O. et al. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897–925, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962209003132>>.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 1 fev. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962019000100002&lng=en&tlng=en>.

MACULOSA, F.; AMERICANA, L. T.; VISCERAL, L. Resolução SS Nº 59, de 22 de julho de 2004. p. 10–11, 2004.

MENEGHISSE, C. S. **Boas práticas de fabricação e o processo de validação no desenvolvimento e produção de kit imunodiagnóstico**. 2007. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-07052008-170634/>>.

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

MINISTERIO DA SAUDE - SAUDE A - Z. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil; Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LT-Casos.pdf>>.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. [Review] [199 refs]. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=16257344>
<<http://openurl.ac.uk/athens:edu//lfp/LinkFinderPlus/Display?sid=OVID:Ovid+MEDLINE%28R%29&id=pmid:16257344&id=10.1016%2FS0140-6736%2805%2967629-5&issn=0140-6736&isbn=&vo>>.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. [s.l: s.n.]

ORGANIZATION, P. A. H. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos**

clínicos e diagnósticos diferenciais. [s.l.] Pan American Health Organization, 2021.

ORGANIZATION, W. H. The control of leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 6, p. 807–18, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>.

PEREIRA, L. de O. R. et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 665–667, ago. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000500665&lng=en&tlng=en>.

PESSÔA, S. B.; BARRETTO, M. P. Leishmaniose tegumentar americana. **Parasitologia Médica**, 1948.

PINHEIRO, A. B. S. et al. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

QUIBASA QUÍMICA BÁSIC. **Biolisa chagas recombinante**. Disponível em: <https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/IUS_BIOLISA_CHAGAS_RECOMBINANTE_TRILINGUE.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2021.

REED, S. G. et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 1, p. 79–85, 1986. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1986.35.79>>.

REITHINGER, R. et al. **Cutaneous leishmaniasis** *Lancet Infectious Diseases*, set. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309907702098>>.

ROCHA, F. F. da; CAMPOS, M. G. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 389–389, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302006000600015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 49–56, jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X04002086>>.

ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **BMJ**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 14 nov. 1903. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.2.2237.1261>>.

RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis a baseline for the 2030 roadmap Surveillance mondiale de la leishmaniose : 2019-2020 , une période de référence pour la feuille de route à l ' horizon 2030. **RELEVÉ ÉPIDÉMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE**, v. 35, p. 19, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>>.

SÁNCHEZ, B. et al. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western blot for detection of Trypanosoma cruzi antibodies using extracts from Mexican strains as Antigens. **Archives of Medical Research**, v. 32, n. 5, p. 382–388, 2001.

SATO, C. M. et al. Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 495–503, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27927927>>.

SHAW, J. J. Taxonomia do gênero Leishmania – conceito tradicionalista x conceito moderno. In: **Anais Brasileiros de Dermatologia**. [s.l: s.n.]p. 67–72, 1985.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–51, maio 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762004000300001&lng=en&tlng=en>.

SKEIKY, Y. A. et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of Leishmania species and humans. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 4105–4114, out. 1995. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.63.10.4105-4114.1995>>.

SKRABA, C. M. et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 437–444, ago. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000400437&lng=en&tlng=en>.

SMITH, P. G.; MORROW, R. H.; ROSS, D. A. (ed.). **Field Trials of Health Interventions**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

SOUZA, A. P. et al. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using Leishmania Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66110, 12 jun. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066110>>.

STEVERDING, D. **The history of leishmaniasis Parasites and Vectors**, 2017. .

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017.

TELLO, J. C. **La antigüedad de la sífilis en el Perú**. [s.l.] Sanmarti y ca., 1909.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-750/v1>>.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

VALE, E. C. S. do; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, 2005.

VAZ, A. J. et al. **Imunoensaios: Fundamentos e aplicações** Guanabara Koogan, , 2018. .

VELAND, N. et al. Clinical and Demographic Stratification of Test Performance: A Pooled

Analysis of Five Laboratory Diagnostic Methods for American Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 345–350, 5 ago. 2010. Disponível em: <<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2010.09-0414>>.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de Leishmania. In: MÉDICO, B. (Ed.). *Brazil Méd ed. Brazil Médico: Brazil Médico*, 1911. p. 411–412.

WAMA PRODUTOS PARA LABORATÓRIO, L. **Imuno-Látex**. 100. Disponível em: <<https://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/imuno-latex/fr-fator-reumatoide-com-controle-1.pdf>>.

WEBSIGHT SOLUTION GROUP. **As leishmanioses: Histórico**. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>.

WHO. Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. **Who**, n. 814, p. 91, 2013. Disponível em: <https://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf%0Ahttp://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2019. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 464–467, set. 2004.

ZURITA, A. I. et al. CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS HSP70 GENE. DIAGNOSTIC USE OF THE C-TERMINAL FRAGMENT rLb70(513–663). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 372–378, 1 abr. 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0372:CACOTL\]2.0.CO](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0372:CACOTL]2.0.CO)>.

ANEXO

Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP / Faculdade de Medicina FMUSP

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 834504-18.8.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.530.363

Apresentação do Projeto:

O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma clara e objetiva. Trata-se de um estudo multicêntrico, retrospectivo, prospectivo e experimental sem finalidade acadêmica. O estudo será realizado no Laboratório de Seroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil e será coordenado pela Dra. Hiro Goto e terá a participação estrangeira do "Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, EUA". Haverá participação dos seguintes centros de pesquisa no Brasil:

1. Recife-PE - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
2. Corte de Pedra-BA - Universidade Federal do Sul da Bahia
3. Salvador-BA - Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador
4. Manaus-AM - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e Universidade do Estado do Amazonas
5. Belém-PA - Instituto Evandro Chagas e Universidade Federal do Pará
6. Cuiabá-MT - Universidade Federal do Mato Grosso
7. Campo Grande-MS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
8. São Paulo-SP - Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251, 21ª andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.248-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep_fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Protocolo: 3.530.363

Não haverá participação de outros serviços/divisões do HCFMUSP. Serão utilizadas amostras de soro de 240 pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (30 por localidade) e de 376 controles saudáveis e com outras doenças infecciosas, tais como Doença de Chagas, histoplasmosse, malária, paracoccidioidomicose, toxoplasmose e tuberculose (47 por localidade), obtidas nos centros de pesquisas mencionados acima. As amostras de caso e de controle obtidas de diferentes regiões do Brasil serão testadas no ELISA com os três lotes do recombinante Lb6H. A partir desses testes, serão calculados os seguintes parâmetros: Sensibilidade, Especificidade, Reatividade cruzada, Índice de Youden (J), Acurácia e Eficiência.

O pesquisador apresenta carta de anuência e de concordância assinada por todos os participantes da pesquisa. O cronograma de execução e orçamento apresentado são adequados. O estudo será patrocinado pela "Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)".

Objetivo da Pesquisa:

Validar o teste ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-leishmânia para o diagnóstico da LTA, empregando antígeno recombinante Lb6H, empregando amostras de pacientes de áreas endêmicas com diagnóstico clínico/laboratorial de LTA, com outras doenças infecciosas e de controles saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos":

Em relação às amostras de Recife, Corte de Pedra, Salvador, Manaus, Belém e São Paulo, não há riscos, pois, as mesmas foram anteriormente colhidas e encontram-se estocadas nos respectivos laboratórios. As amostras de Cuiabá e Campo Grande serão colhidas prospectivamente. Neste caso, o risco é mínimo, como informado no TCLE.

"Benefícios":

Não haverá benefício direto imediato para os pacientes participantes do estudo. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo poderão indicar a possibilidade de desenvolver um novo teste para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo multicêntrico, retrospectivo, prospectivo e experimental sem finalidade acadêmica. O estudo será realizado no Laboratório de Soropidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil e terá a participação estrangeira do "Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, EUA" e a participação de vários centros de pesquisa no Brasil, conforme citados anteriormente. Não haverá participação de

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 28
Bairro: PAGAEMBU CEP: 01.248-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3633-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 1.030.363

outros serviços/ divisões do HCFMUSP. Serão utilizadas amostras de soro de 240 pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (30 por localidade) e de 376 controles saudáveis e com outras doenças infecciosas, tais como Doença de Chagas, histoplasmose, malária, paracoccidiodomicose, toxoplasmose e tuberculose (47 por localidade), obtidas nos centros de pesquisas mencionados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados de forma satisfatória.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO

Considerações Finais e critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1076286.pdf	16/02/2018 16:33:56		Aceito
Outros	cep_123_formulario_para_cadastro_de_projetos_validacao.pdf	16/02/2018 16:33:29	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MT.docx	15/02/2018 17:31:26	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MS.docx	15/02/2018 17:31:13	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Steve_Reed_termo_traduzido.docx	15/02/2018 17:27:51	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Steve_Reed_termo.pdf	15/02/2018 17:27:26	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Marlana_Batista_Campos_termo.pdf	15/02/2018 17:26:34	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Maria_Edileuza_termo.pdf	15/02/2018 17:26:10	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Marcia_Huelb_termo.pdf	15/02/2018 17:25:50	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Malcolm_Duthie_termo_traduzido.docx	15/02/2018 17:25:35	Hiro Goto	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 36

Bairro: FACSEMBU

CEP: 01.348-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11) 3093-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 1.830.353

Declaração de Pesquisadores	Malcolm_Duthie_termino.pdf	15/02/2018 17:25:04	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Luiz_Henrique_S_Guilmaraes_termino.pdf	15/02/2018 17:24:41	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lucas_F_Carvalho_termino.pdf	15/02/2018 17:24:15	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Jose_Angelo_L_Lindoso_termino.pdf	15/02/2018 17:23:52	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Jorge_Guerra_termino.pdf	15/02/2018 17:23:32	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Fernando_Tobias_Silveira_termino.pdf	15/02/2018 17:23:09	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anamaria_Mello_Miranda_Paniago_termino.pdf	15/02/2018 17:22:40	Hiro Goto	Aceito
Outros	Parecer_CEP_IMT.pdf	15/02/2018 17:22:01	Hiro Goto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	15/02/2018 17:15:41	Hiro Goto	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	15/02/2018 17:14:12	Hiro Goto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	15/02/2018 17:13:39	Hiro Goto	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_validacao.pdf	15/02/2018 17:13:07	Hiro Goto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 07 de Março de 2018

Assinado por:

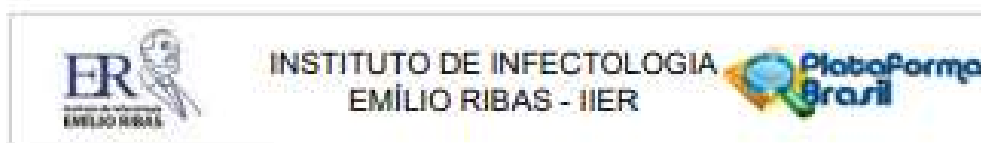
Maria Aparecida Azevedo Kolke Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 36
Bairro: FACAREMBU CEP: 01.248-903
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11) 2663-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

Página 04 de 04

Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP

- Instituto de Infectologia Emilio Ribas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83450418.8.3005.0061

Instituição Proponente: Instituto de Infectologia Emilio Ribas

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.255.860

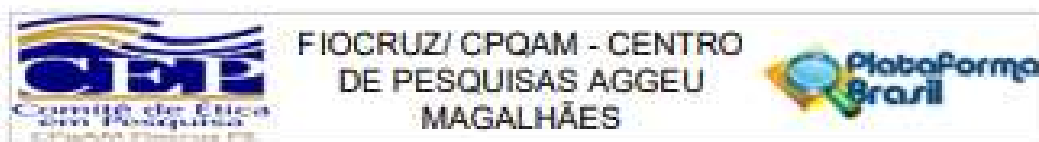
Apresentação do Projeto:

Estudo de validação de método ELISA empregando três lotes de dois antígenos recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Serão utilizadas amostras colhidas em diferentes áreas endêmicas do Brasil, retrospectivamente e prospectivamente, dependendo da região. A obtenção das amostras será multicêntrica e a validação será realizada no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/USP. Serão selecionados 240 casos de LTA e 376 controles, entre indivíduos saudáveis e portadores de outras doenças infecciosas. Trata-se de um estudo multicêntrico, retrospectivo, prospectivo e experimental sem finalidade acadêmica. O estudo será realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil e será coordenado pela Dra. Hiro Goto e terá a participação estrangeira do "Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, EUA". Haverá participação dos seguintes centros de pesquisa no Brasil:

1. Recife-PE - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
2. Corte de Pedra-BA - Universidade Federal do Sul da Bahia
3. Salvador-BA - Instituto Gonçalo Montiz, FioCruz, Salvador
4. Manaus-AM - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo, 185
Cidade: Cerqueira César **CEP:** 01.245-800
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2066-1400 **Fax:** (11)2066-1400 **E-mail:** consubstancia@emilioribas.sp.gov.br

- **FIOCRUZ/ CPQAM – Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb5H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83450418.8.2008.5190

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.638.758

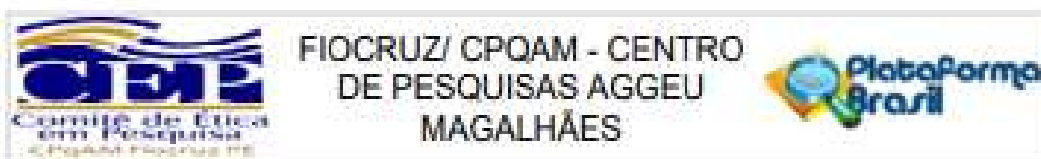
Apresentação do Projeto:

É um Estudo de validação de método ELISA empregando três lotes de dois antígenos recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Serão utilizadas amostras colhidas em diferentes áreas endêmicas do Brasil, retrospectivamente e prospectivamente, dependendo da região. A obtenção das amostras será multicêntrica e a validação será realizada no Laboratório de Seroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/USP. Serão selecionados 240 casos de LTA e 376 controles, entre indivíduos saudáveis e portadores de outras doenças infecciosas.

Objetivo da Pesquisa:

Validar o teste ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-leishmânia para o diagnóstico da LTA, empregando antígeno recombinante Lb5H, empregando amostras de pacientes de áreas endêmicas com diagnóstico clínico/laboratorial de LTA, com outras doenças infecciosas e de controles saudáveis.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.070-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81) 2101-2638 Fax: (81) 2101-2638 E-mail: com.etica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer 2.038.758

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	declaracao_compromisso_relatorios_ao_cep.docx	07/05/2018 10:55:50	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Outros	cep_123_formulario_para_cadastro_de_projetos_validacao.pdf	16/02/2018 16:33:29	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MT.docx	15/02/2018 17:31:26	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MS.docx	15/02/2018 17:31:13	Hiro Goto	Aceito
Outros	Parecer_CEP_IMT.pdf	15/02/2018 17:22:01	Hiro Goto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	15/02/2018 17:13:39	Hiro Goto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

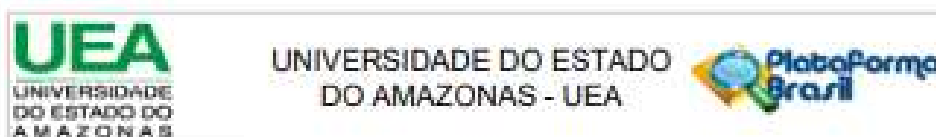
RECIFE, 07 de Maio de 2018

Assinado por:

Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rago, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (51)2101-2639 Fax: (51)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

- Universidade do estado de Amazonas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83450418.8.3008.5016

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.679.177

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador Responsável: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83450418.8.3008.5016

Submetido em: 07/03/2018

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Situação da Versão do Projeto: Em relatório

Localização atual da Versão do Projeto: Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma clara e objetiva. Trata-se de um estudo multicêntrico, retrospectivo, prospectivo e experimental sem

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777

Bairro: Chapada

CNP: 05.050-000

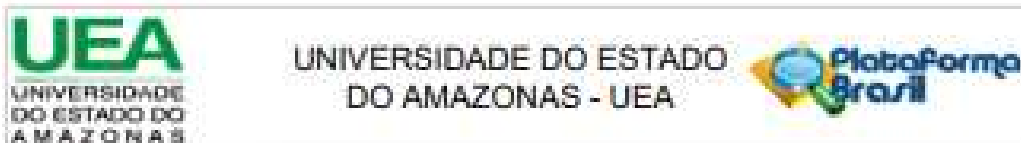
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3878-4008

Fax: (02)3878-4388

E-mail: cep.uea@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.679.177

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	cep_123_formulario_para_cadastro_de_projetos_validacao.pdf	15/02/2018 16:33:29	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MT.docx	15/02/2018 17:31:26	Hiro Goto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_MS.docx	15/02/2018 17:31:13	Hiro Goto	Aceito
Outros	Parecer_CEP_IMT.pdf	15/02/2018 17:22:01	Hiro Goto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	15/02/2018 17:13:39	Hiro Goto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

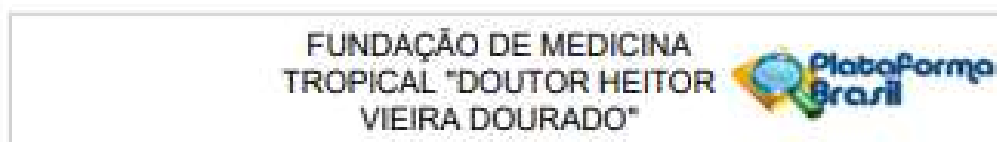
Não

MANAUS, 28 de Maio de 2018

Assinado por:
Manoel Luiz Neto
(Coordenador)

Endereço: Av. Cavalito Leal, 1777
 Bairro: Chapéu CEP: 69.050-030
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3678-4368 Fax: (92)3678-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com

- **FMT-HVD Fundação De Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado" estado de Amazonas**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83450418.8.3001.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MTAM

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.584.959

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo multicêntrico, retrospectivo, prospectivo e experimental sem finalidade acadêmica. O estudo será realizado no Laboratório de Seroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil e será coordenado pela Dra. Hiro Goto e terá a participação estrangeira do "Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, EUA".

Haverá coparticipação dos seguintes centros de pesquisa no Brasil:

1. Recife-PE - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
2. Corte de Pedra-BA - Universidade Federal do Sul da Bahia
3. Salvador-BA - Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador
4. Manaus-AM - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
5. Belém-PA - Instituto Evandro Chagas e Universidade Federal do Pará
6. Cuiabá-MT - Universidade Federal do Mato Grosso

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
 Bairro: D. Pedro I
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br
 CEP: 66.040-000

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.586.889

/ Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	17:13:39	Hiro Goto	Acerto
----------------------------	------------------------	----------	-----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 06 de Abril de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (62)2127-2572 Fax: (62)2127-3572 E-mail: csp@fmi.am.gov.br

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Submissão de Projeto de Pesquisa 1

Instituto de Infectologia Emílio Ribas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Participante com Leishmaniose tegumentar americana)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

BAIRRO: CIDADE: UF:

CEP:

TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

BAIRRO: CIDADE: UF:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Validação de ELISA empregando antígeno recombinante LI6H1 para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

2. DADOS DO INVESTIGADOR PRINCIPAL - FMUSP

PESQUISADOR: Héro Goto

CARGO/FUNÇÃO: Professor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CREMESP 18228

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP

2. DADOS DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL - IIER

PESQUISADOR: José Angelo Landetta Lindoso

CARGO/FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CREMESP 72.601

NOME DA INSTITUIÇÃO: Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Dois anos

_____ RUBRICA PESQUISADOR

_____ RUBRICA PARTICIPANTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARA COLETA DE AMOSTRAS

Prezado(a) senhor(a):

Você está sendo convidado a participar do estudo **"Validação de teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb5H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)"**.

Durante sua participação neste estudo, gostaríamos de coletar uma amostra de sangue, bem como dados do seu prontuário. Seu nome e dados que possam identificá-lo(a) não serão divulgados, mantendo-se o sigilo em todas as fases do estudo.

Antes de concordar em participar deste estudo é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. O(s) autor(es) deverá(ão) responder todas as suas dúvidas antes que você decida participar.

As informações a seguir estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que irá estudar um exame para pesquisar a leishmaniose nos pacientes, para ajudar a melhorar o diagnóstico e agilizar o tratamento.

Você tem o direito de desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou prejuízo em seu tratamento nesta instituição. Este termo também explicará como suas informações serão usadas e quem terá acesso a elas. Se você concordar em participar deste estudo, pediremos que você assine este termo de consentimento. Uma via deste consentimento informado será arquivada com o(a) pesquisador(a) principal e outra via será fornecida a você.

Importância do estudo e objetivos: A leishmaniose tegumentar americana é uma doença infecciosa que ocorre em todo o Brasil, e é causada por diferentes tipos (espécies) do parasito conhecido como *Leishmania*. A doença pode provocar uma ou mais lesões espalhadas em várias partes da pele e, nos casos mais graves, pode atingir mucosas e causar perfurações no nariz ou no céu da boca, sendo muito importante o diagnóstico e o tratamento de forma correta. Neste estudo, o diagnóstico da doença será feito através de um exame no soro (sorologia) que vai pesquisar anticorpos. Sua contribuição, voluntária, para este estudo, será fornecer sangue para ser usado na pesquisa. O objetivo do projeto é estudar o método de diagnóstico do projeto para verificar se ele é capaz de detectar os pacientes com as diferentes formas da leishmaniose tegumentar americana, para no futuro melhorar o diagnóstico e por consequência agilizar o tratamento e cura do paciente.

Relação e descrição dos procedimentos que serão realizados: Sua participação consistirá em uma coleta de 10 mL de sangue (2 tubos pequenos de 5 mL) para realização de sorologia para leishmanioses. Para a coleta do sangue periférico será realizada punção de veia do braço e retirada de 5 mililitros (5 mL) de sangue.

Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos de coleta: Sentirá uma pequena picada da agulha na veia do braço para a coleta de sangue, que pode ficar roxo, mas que sumirá em poucos dias.

Benefícios para o participante: O(A) senhor(a) não receberá nenhum benefício direto ao participar deste projeto de Pesquisa, mas esta pesquisa pode ajudar futuros pacientes que têm a mesma condição ou condição parecida com a sua. Os resultados encontrados neste estudo vão servir para validar o método em estudo para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, para uso futuro.

_____ RUBRICA PESQUISADOR

_____ RUBRICA PARTICIPANTE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Submissão de Projeto de Pesquisa 3

Riscos para o participante: O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O seu nome ou o material que identifique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Os participantes do estudo não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados deste estudo forem divulgados em qualquer forma.

Retenção de amostras: Após a realização da sorologia para diagnóstico de leishmaniose, as amostras serão guardadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, no Biorepositório. Caso haja necessidade de um novo estudo utilizando as amostras colhidas, será aplicado um novo termo de consentimento para que você autorize a utilização da sua amostra.

Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) ou seu médico terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, além de ter acesso aos resultados de exames sempre que solicitado e/ou indicado. Os coordenadores deste estudo são: a Dra. Hiro Goto e o Dr. José Angelo Lauletta Lindoso, que poderão ser encontrados no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº470/500, 4º andar, sala 16, telefone (11) 3061-7023.

Se o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa ou sobre seus direitos, entre em contato com um dos seguintes Comitês de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar – tel: (11) 3061-8004, FAX: (11) 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br.

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas no número (11) 3896-1406 ou através do seguinte endereço: Av. Dr. Arnaldo, 165, São Paulo - SP. Horário de Atendimento: de segunda a sexta-feira de 08-13hs (e-mail: comitedeetica@emilioribas.sp.gov.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 participantes do projeto, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Direito de ser mantido atualizado: O (A) senhor (a) tem direito de ser mantido atualizado (a) 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. Todo o desenvolvimento desta pesquisa será realizado durante o retorno programado pelo ambulatório do hospital para acompanhamento do tratamento. Não haverá necessidade de retorno ao hospital em outras datas/períodos. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional em caso de algum efeito adverso relacionado ao procedimento, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa: O volume de soro que não for utilizado será devidamente guardado em repositório. Caso surja a possibilidade de ser utilizado para outro estudo, o (a) senhor (a) será consultado (a) para consentimento para o uso do material coletado e armazenado.

_____ RUBRICA PESQUISADOR

_____ RUBRICA PARTICIPANTE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Submissão de Projeto de Pesquisa

4

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Validação de ELISA empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)".

O estudo foi explicado com palavras que eu consegui entender, discutir, fazer perguntas e estou satisfeito com as respostas. 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.

Ao assinar este TCLE em duas vias, ficando com uma delas, demonstro que aceitei o convite para participar do estudo "Validação de ELISA empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)".

Data ___/___/___

Nome legível do participante da pesquisa ou responsável legal pelo participante da pesquisa

Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal pelo participante da pesquisa

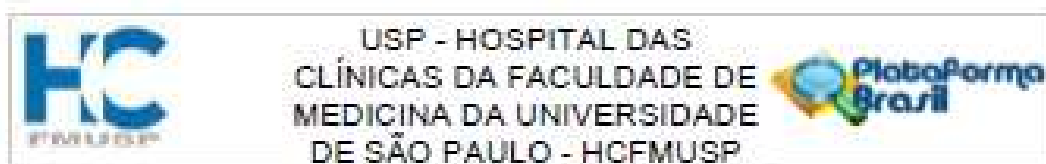
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

Data ___/___/___

Nome legível do Pesquisador que obteve o consentimento

Assinatura do Pesquisador que obteve o consentimento

Anexo D - Parecer consubstanciado do CEP – Adendum



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Pesquisador: Hiro Goto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 83450418.8.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.717.914

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda solicitando o uso de biorepositório de amostras da pesquisadora proponente e dispensa de TCLE para uso de amostras de outros biorepositórios nacionais.

Objetivo da Pesquisa:

Validação do teste imunoenzimático (ELISA) empregando antígeno recombinante Lb6H para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

É uma validação de testes imunoenzimático e não envolve riscos aos pacientes. O uso de biorepositórios adequadamente coletados e consentidos não é problema para o projeto.

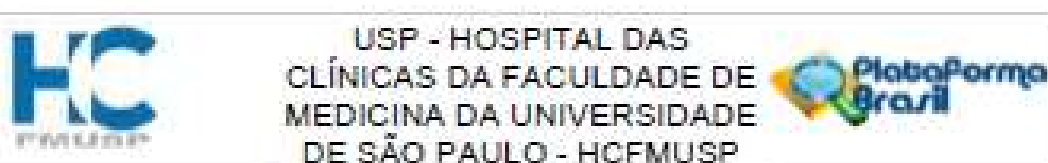
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não acho que deva haver dispensa do TCLE para participantes prospectados individuais. Isto não impede o uso de amostras de biorepositórios de outros pesquisadores ou do mesmo grupo, desde que haja garantia de sigilo.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5ª andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2061-7588 Fax: (11)2061-7595 E-mail: ceppeqadm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.717.014

Pesquisadores	Steve_Reed_termino.pdf	17:27:25	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Marilene_Batista_Campos_termino.pdf	15/02/2018 17:26:34	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Maria_Edileuza_termino.pdf	15/02/2018 17:26:10	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Marcia_Hueb_termino.pdf	15/02/2018 17:25:50	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Malcolm_Duthie_termino_traduzido.docx	15/02/2018 17:25:35	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Malcolm_Duthie_termino.pdf	15/02/2018 17:25:04	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Luiz_Henrique_S_Guilmaraes_termino.pdf	15/02/2018 17:24:41	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lucas_P_Carvalho_termino.pdf	15/02/2018 17:24:15	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Jose_Angelo_L_Lindoso_termino.pdf	15/02/2018 17:23:52	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Jorge_Guerra_termino.pdf	15/02/2018 17:23:32	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Fernando_Tobias_Silveira_termino.pdf	15/02/2018 17:23:09	Hiro Goto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anamaria_Mello_Miranda_Paniago_termino.pdf	15/02/2018 17:22:40	Hiro Goto	Aceito
Outros	Parecer_CEP_IMT.pdf	15/02/2018 17:22:01	Hiro Goto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	15/02/2018 17:15:41	Hiro Goto	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	15/02/2018 17:14:12	Hiro Goto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	15/02/2018 17:13:39	Hiro Goto	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_validacao.pdf	15/02/2018 17:13:07	Hiro Goto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

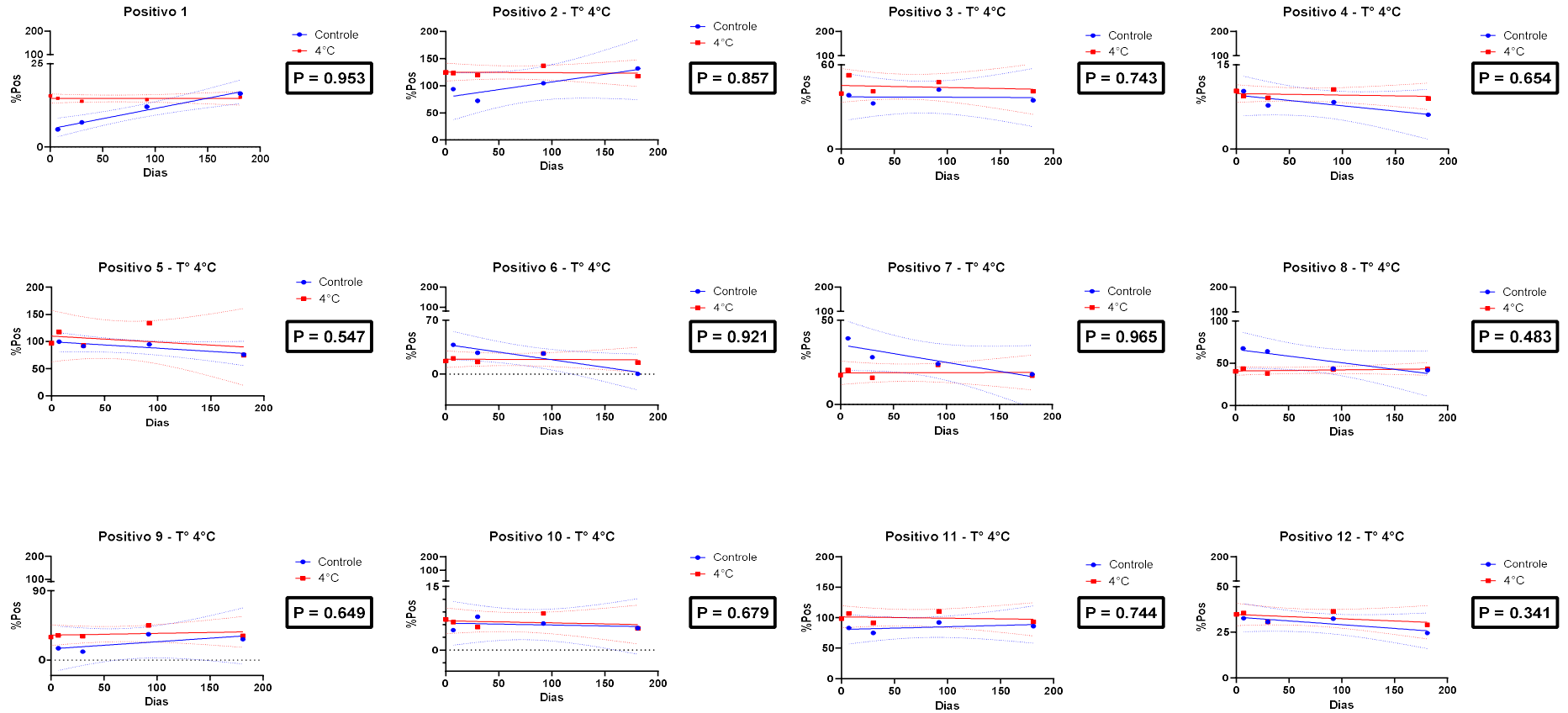
Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7505 Fax: (11)2661-7505 E-mail: cnpesqadm@hc.fm.usp.br

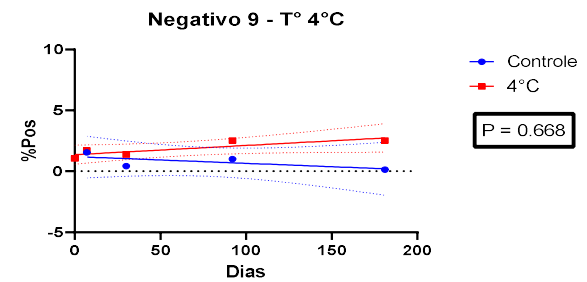
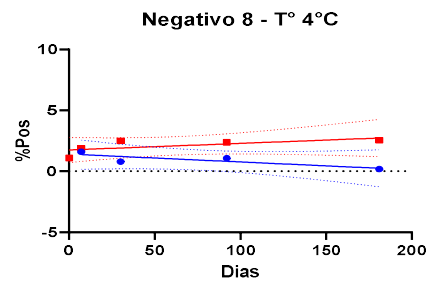
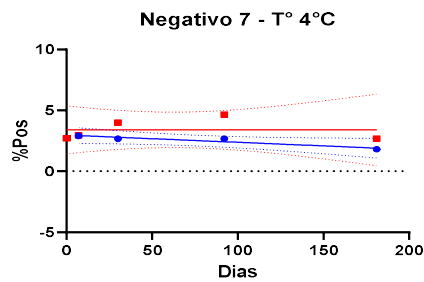
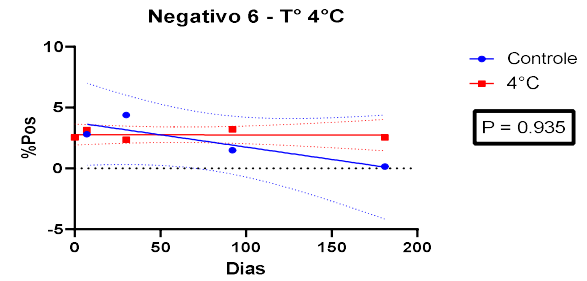
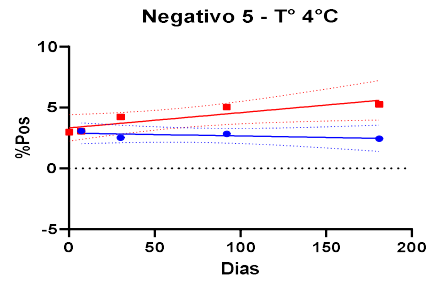
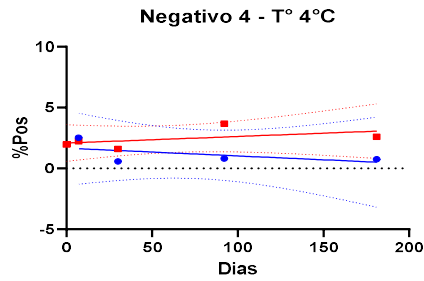
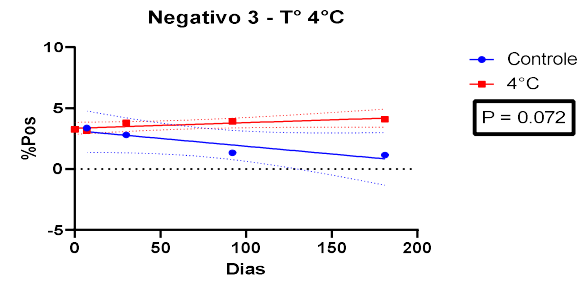
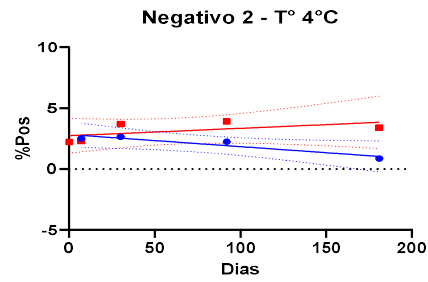
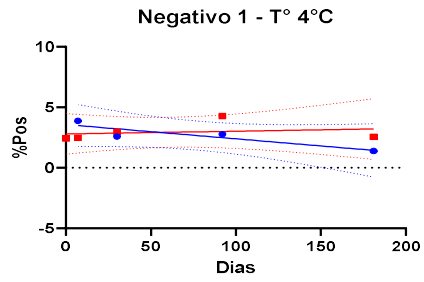
Anexo E

Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas a 4°C/ -20°C e placas sensibilizadas um dia antes (controle).

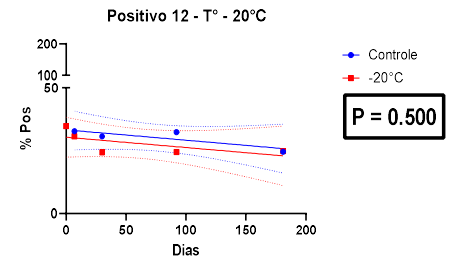
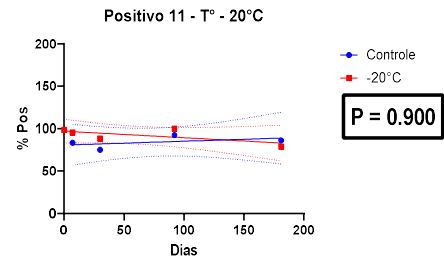
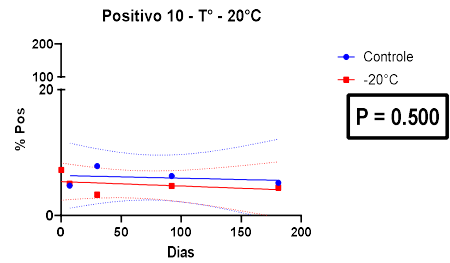
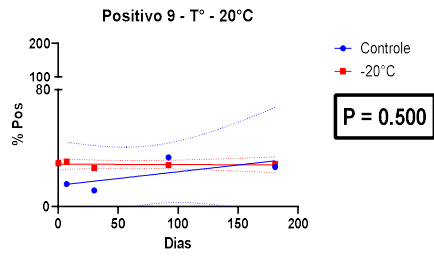
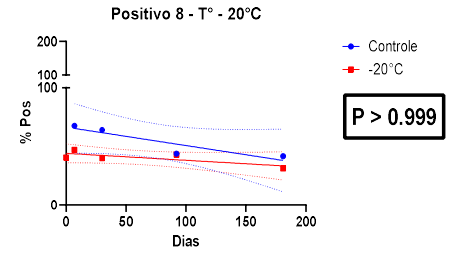
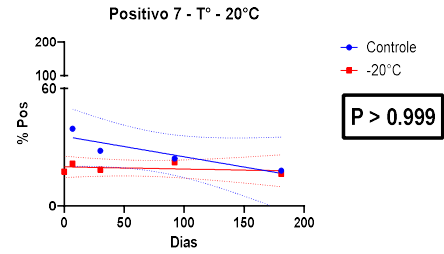
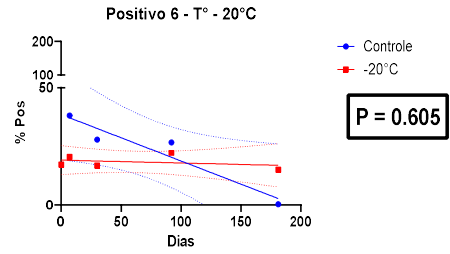
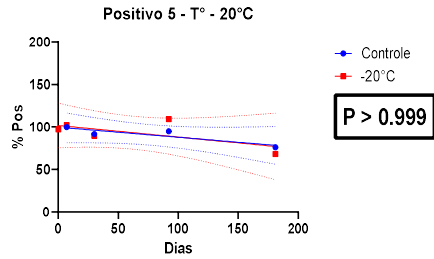
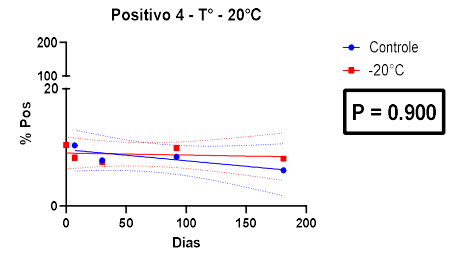
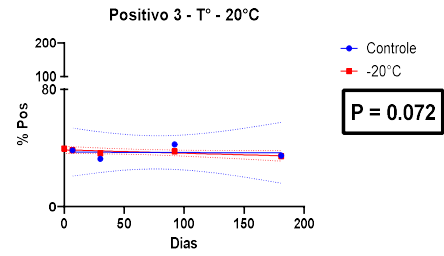
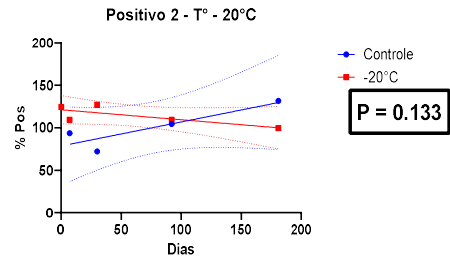
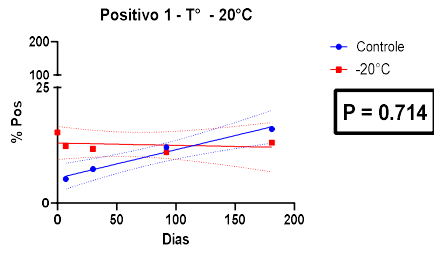
• LOTE A – Positivo 4°C



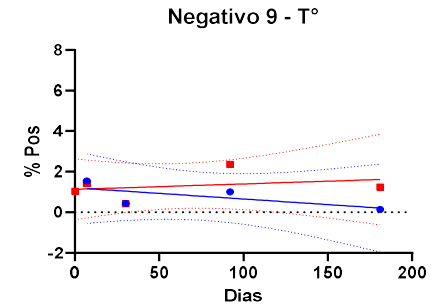
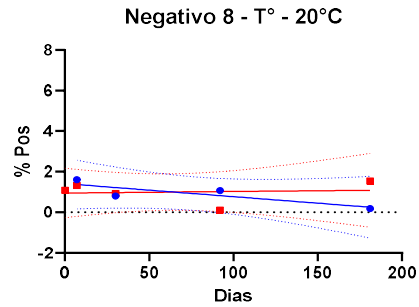
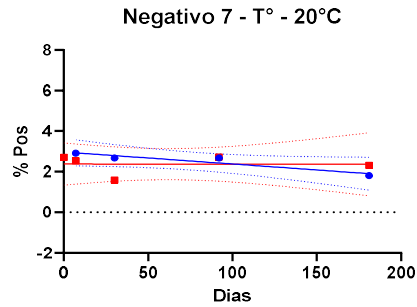
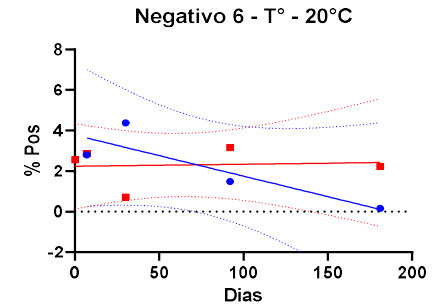
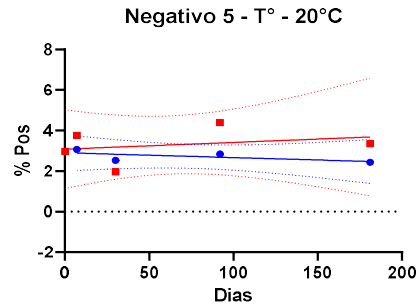
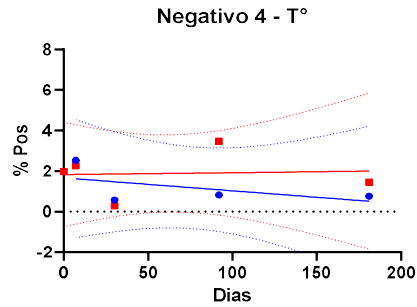
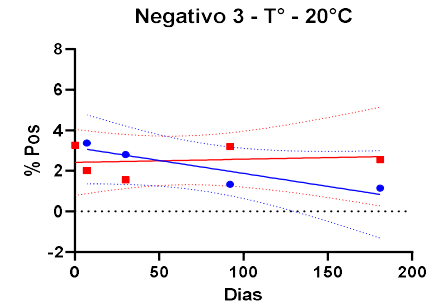
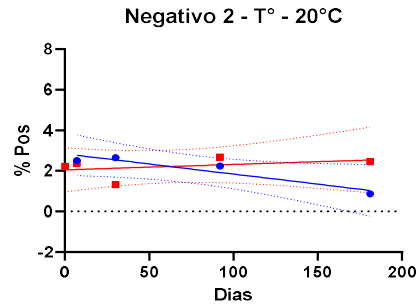
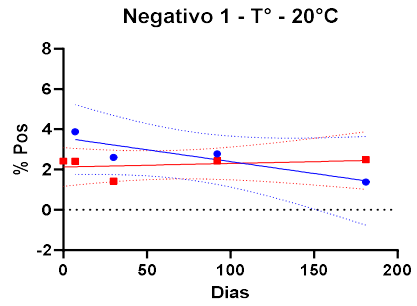
• LOTE A – Negativo 4°C



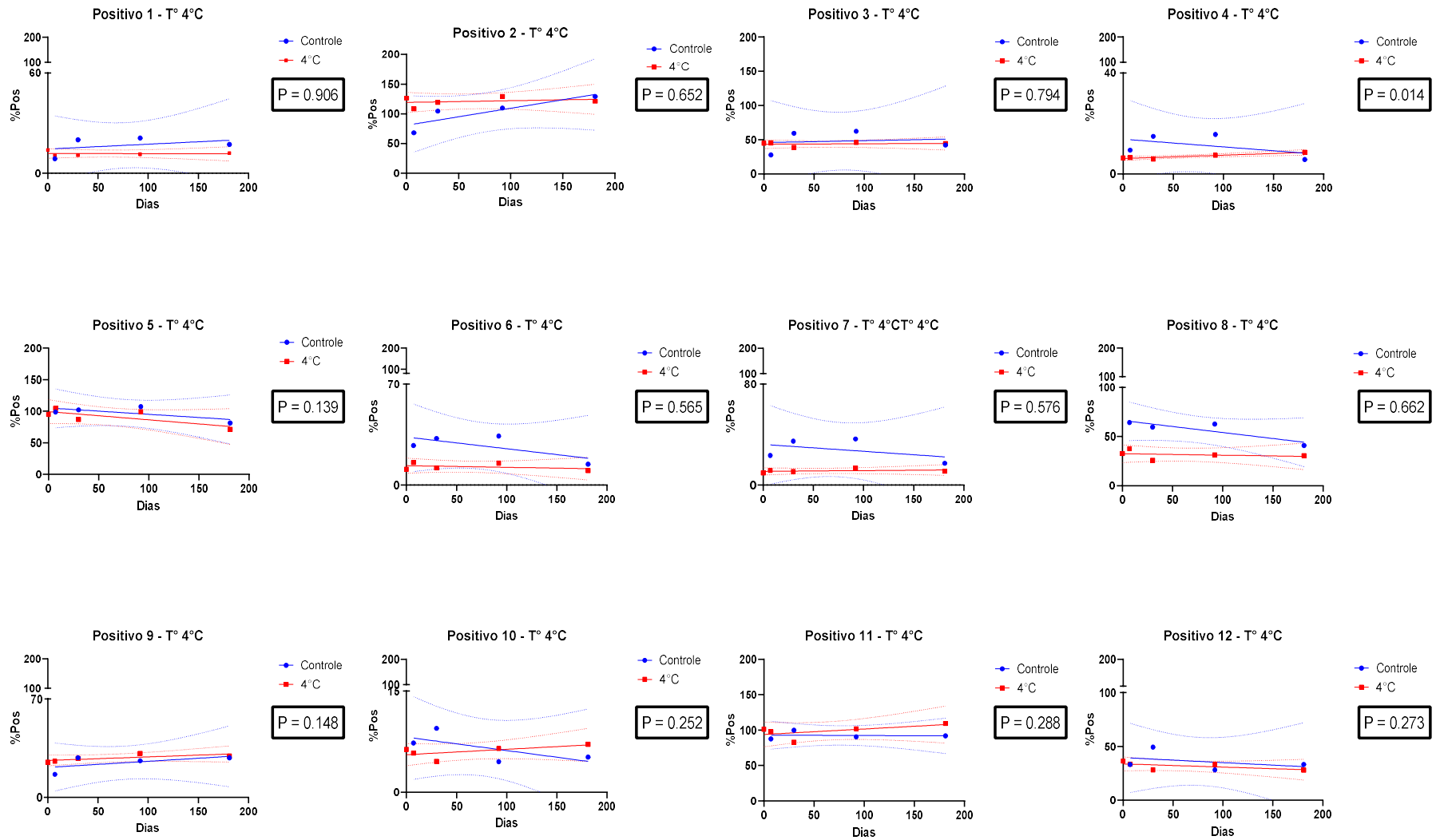
- LOTE A – Positivo -20



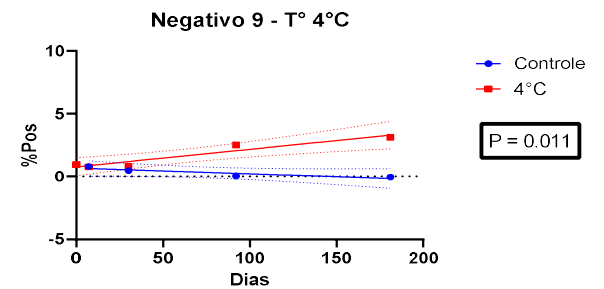
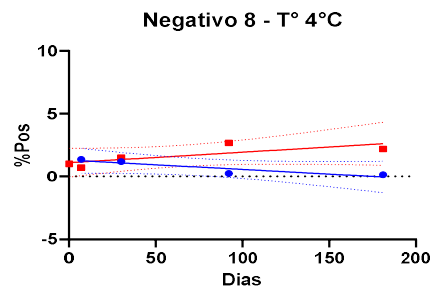
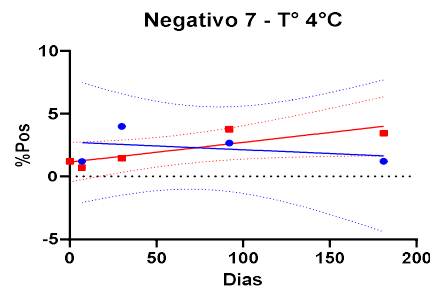
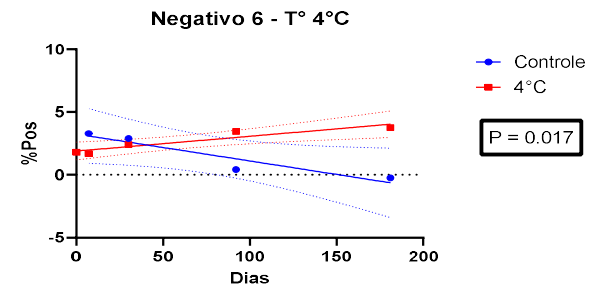
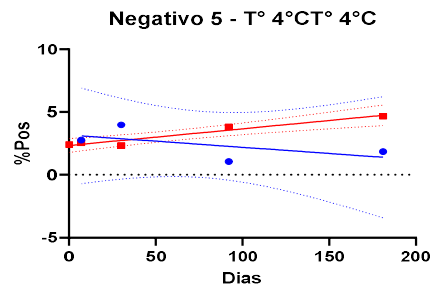
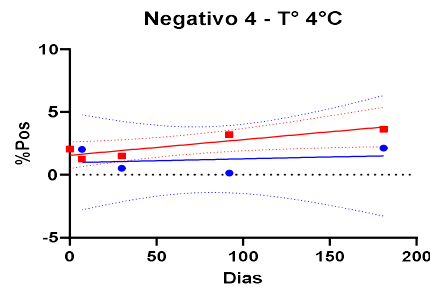
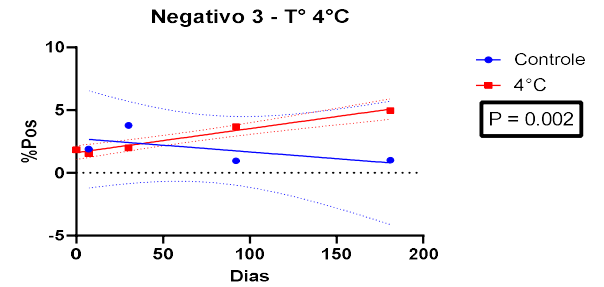
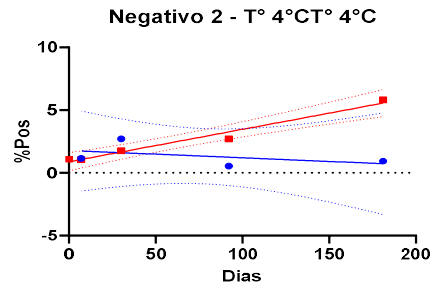
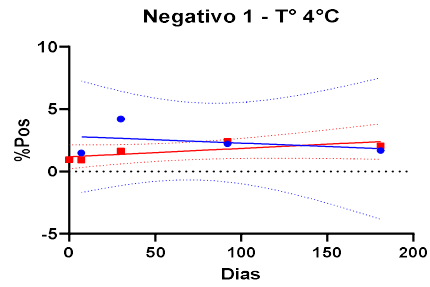
- LOTE A – Negativo -20°C



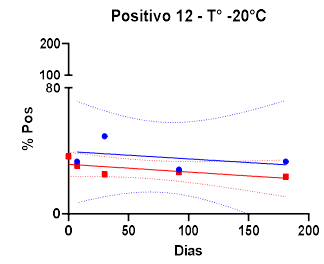
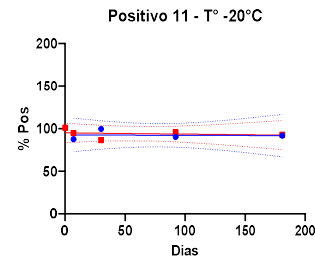
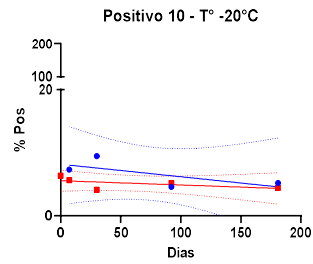
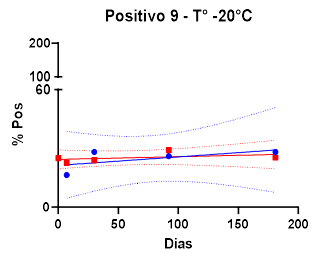
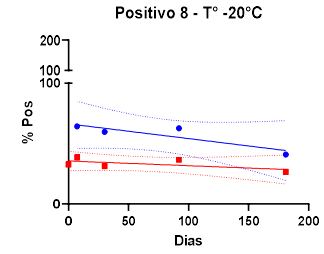
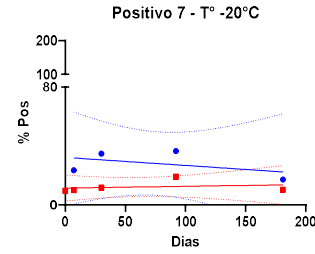
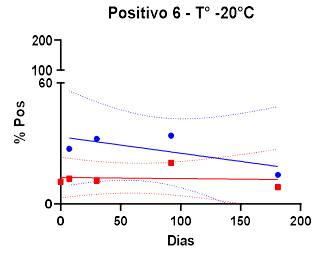
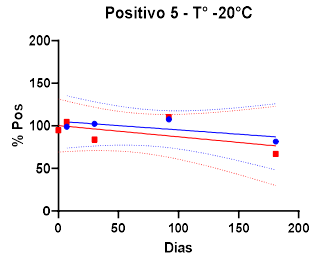
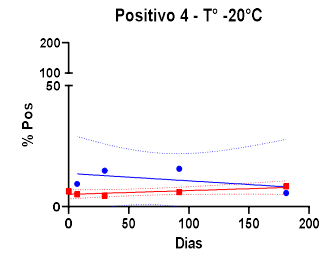
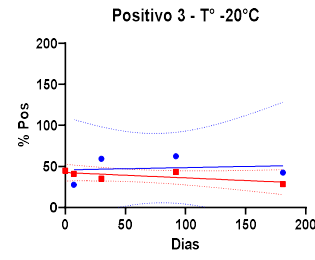
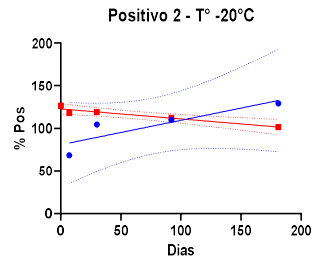
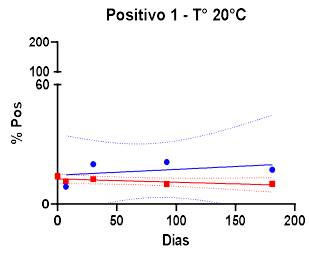
• LOTE B – Positivo 4°C



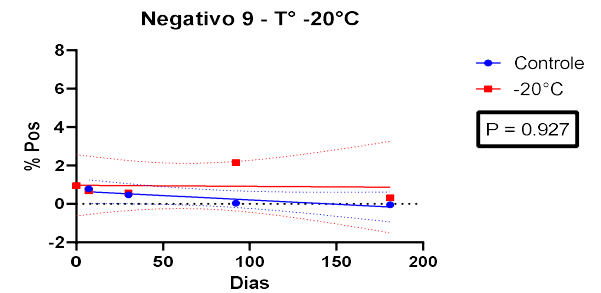
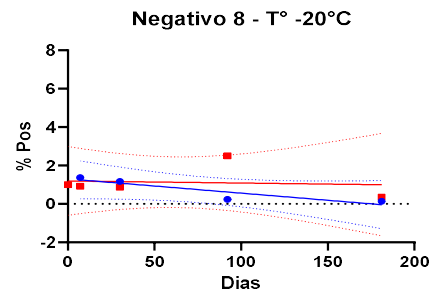
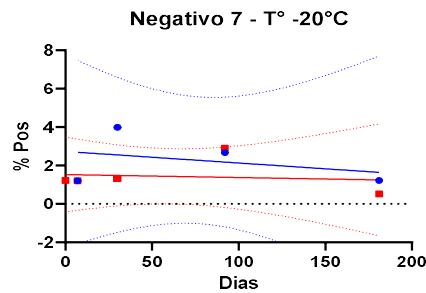
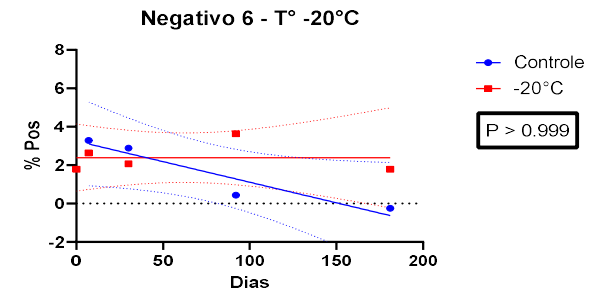
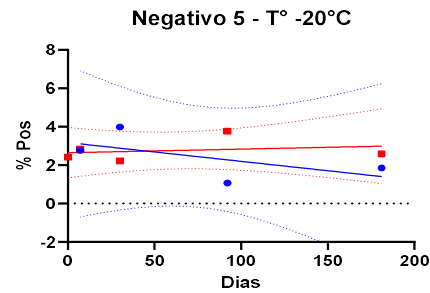
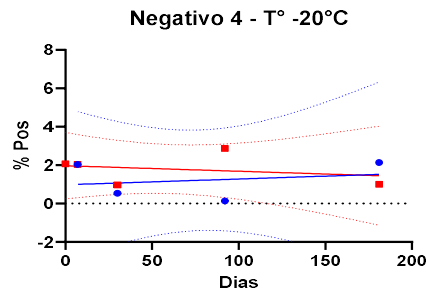
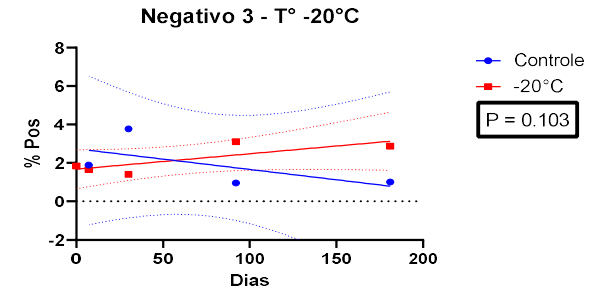
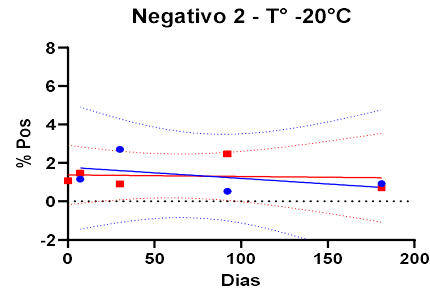
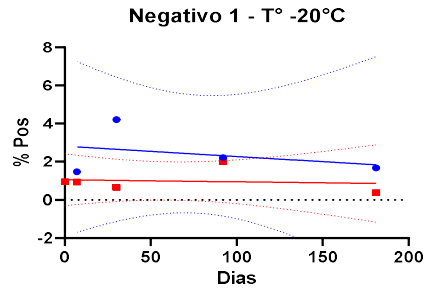
• LOTE B – Negativo 4°C



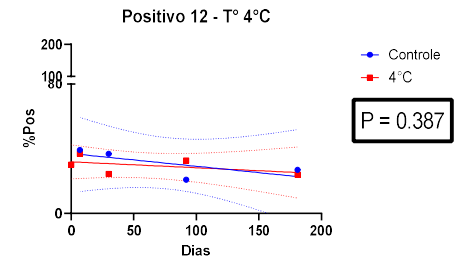
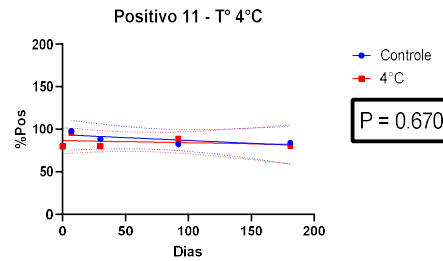
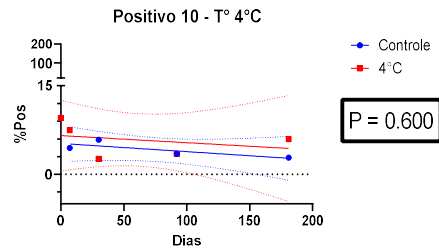
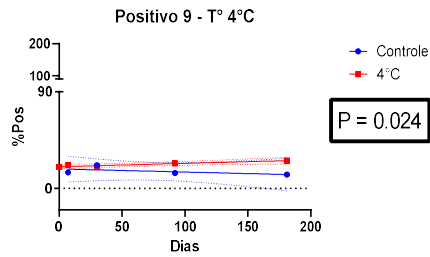
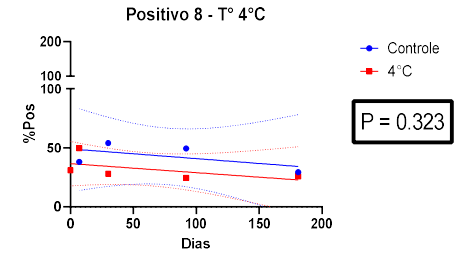
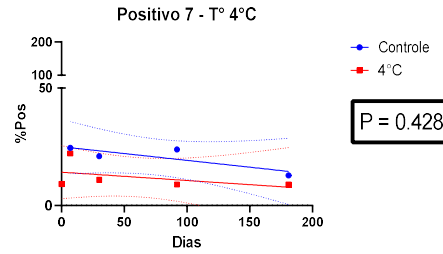
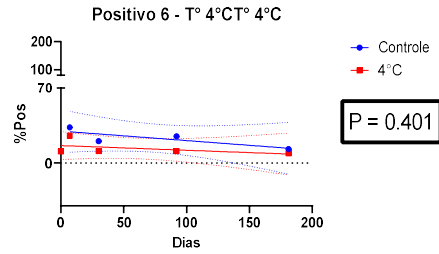
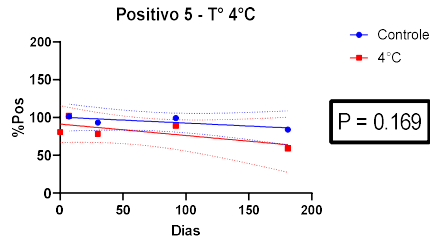
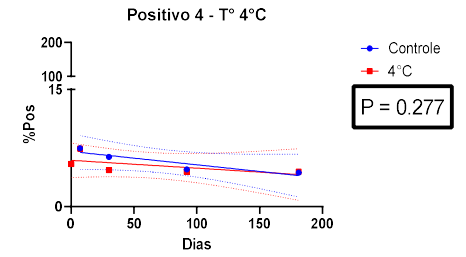
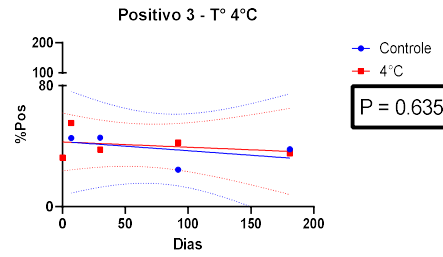
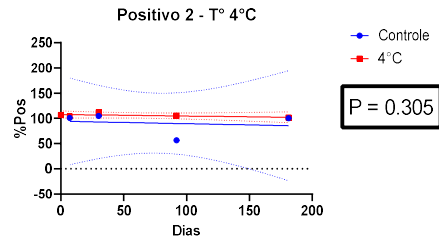
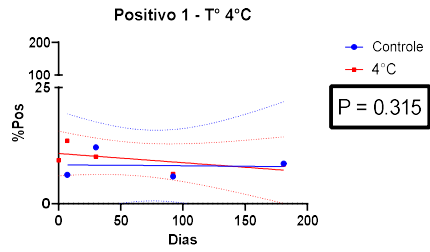
• LOTE B – Positivo -20°C



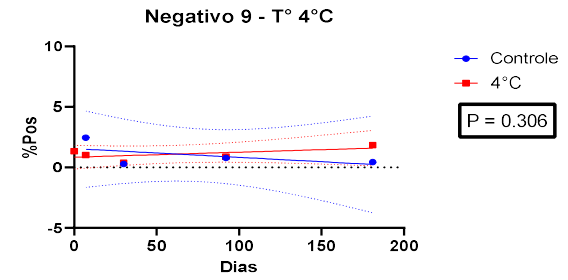
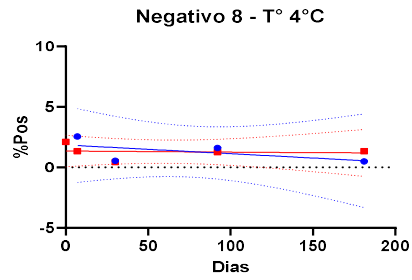
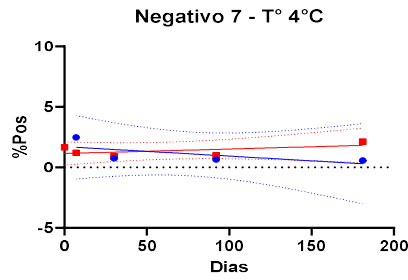
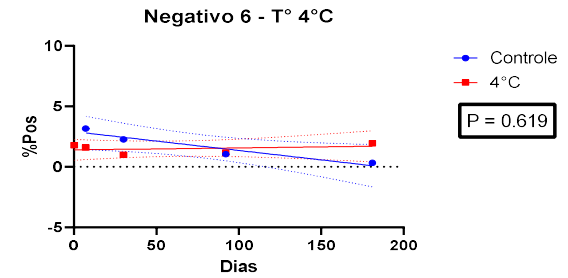
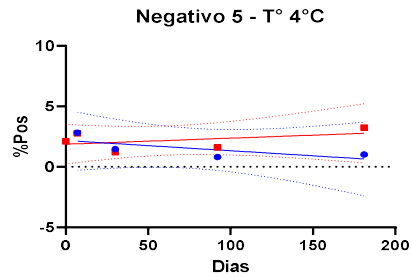
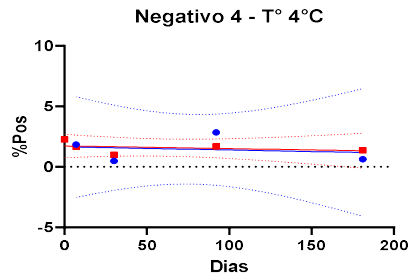
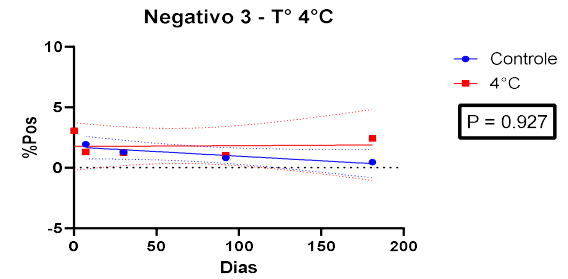
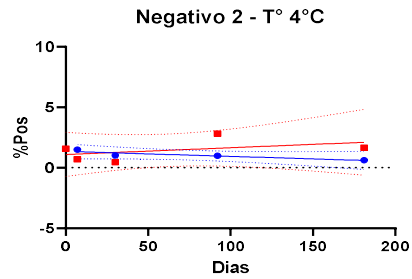
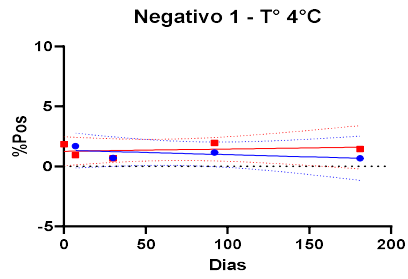
- LOTE B – Negativo -20°C



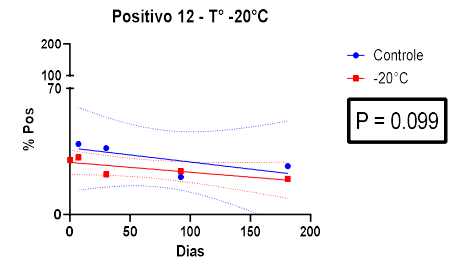
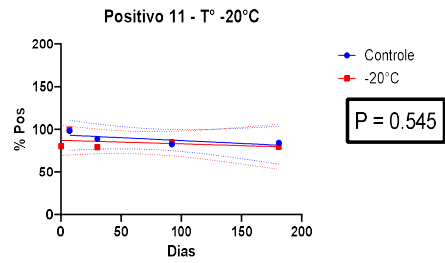
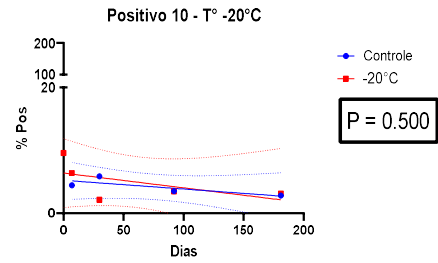
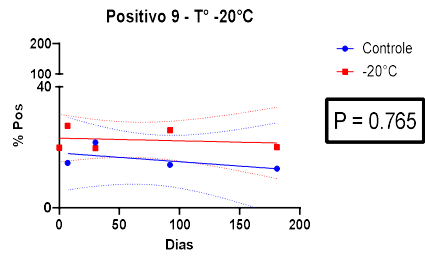
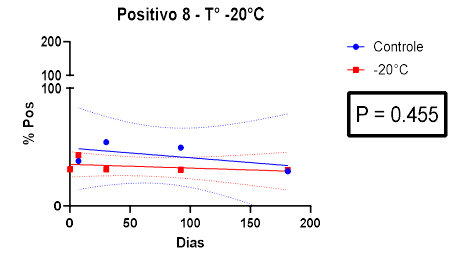
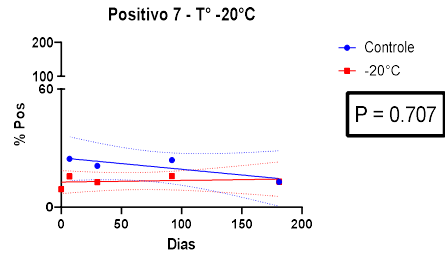
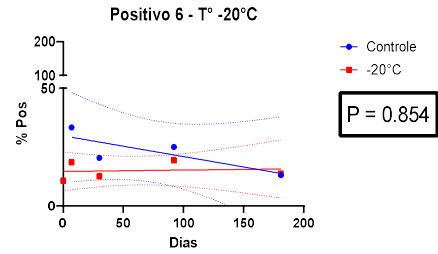
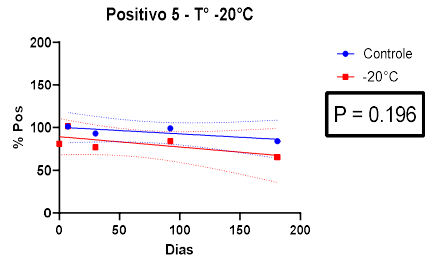
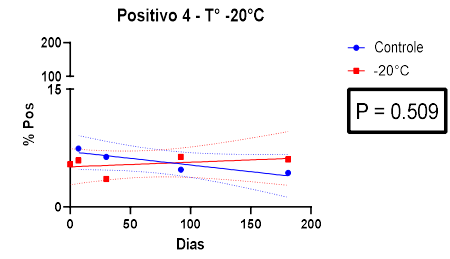
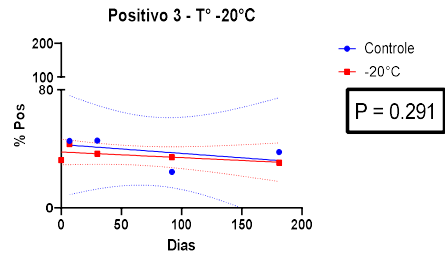
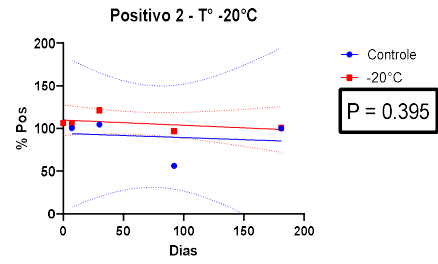
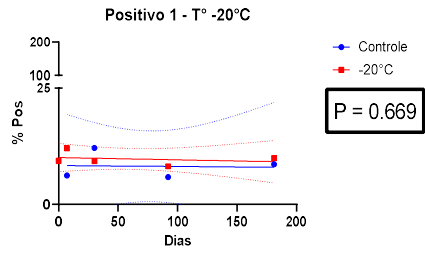
- LOTE C – Positivo 4°C



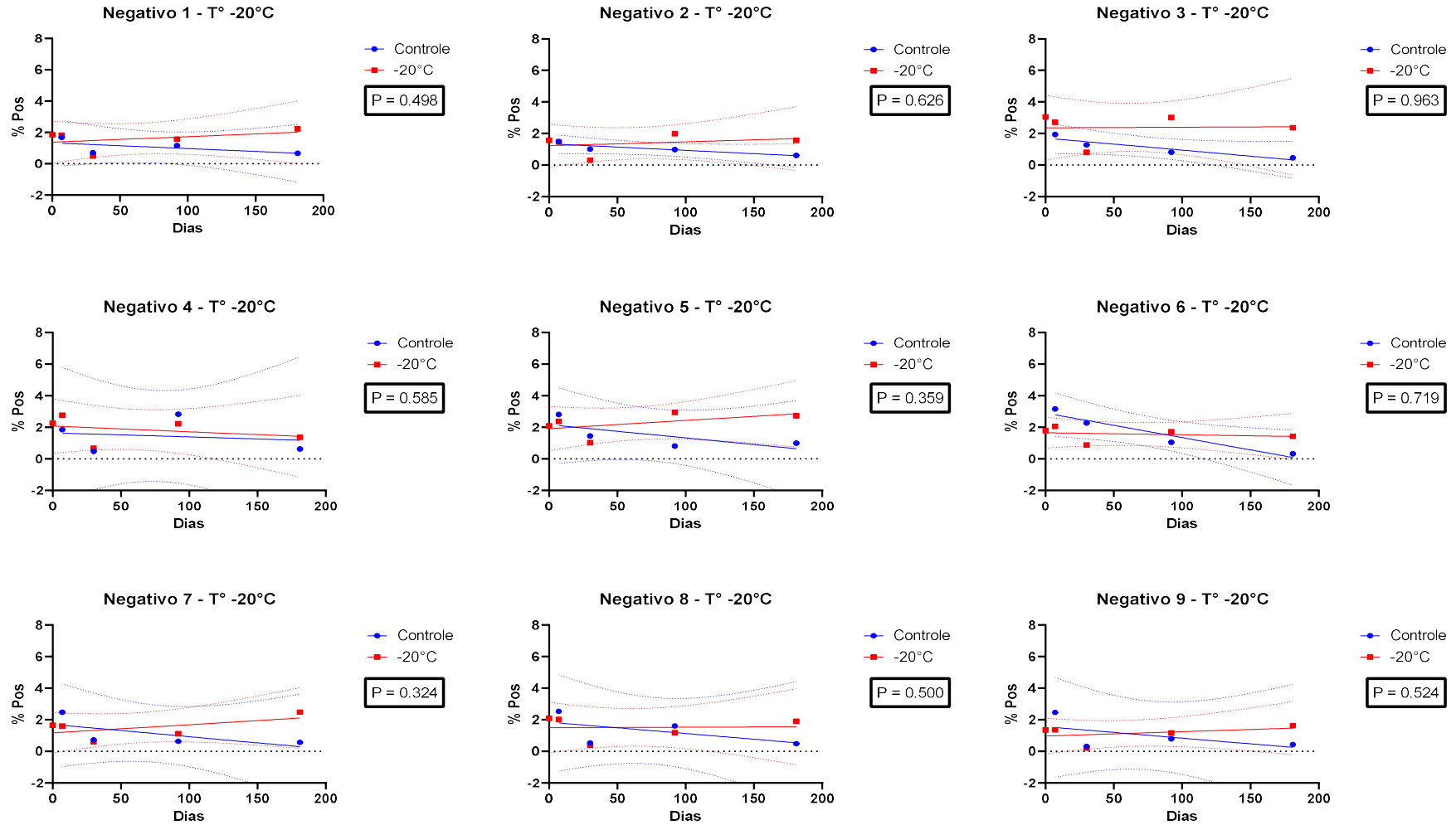
- LOTE C – Negativo 4°C



- LOTE C – Positivo -20°C



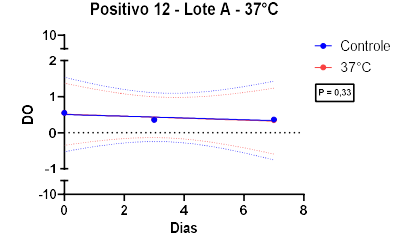
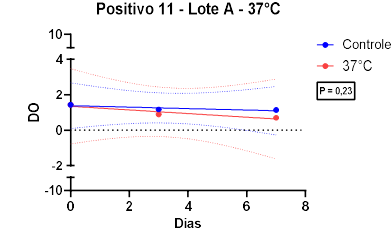
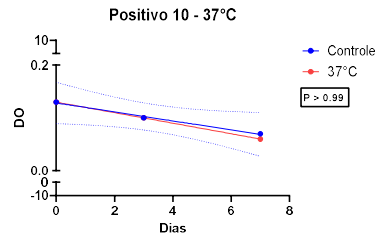
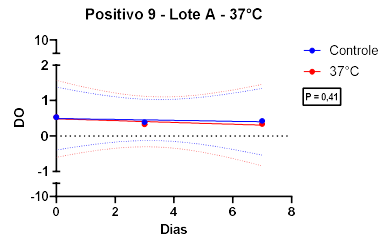
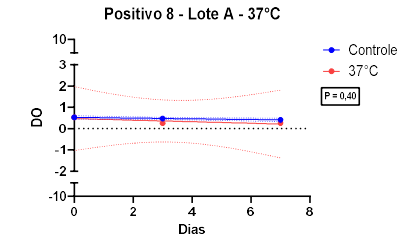
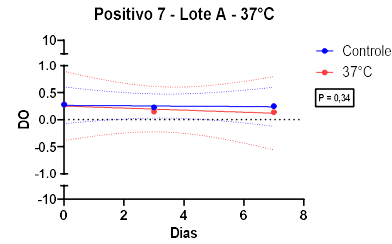
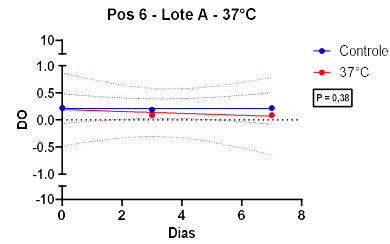
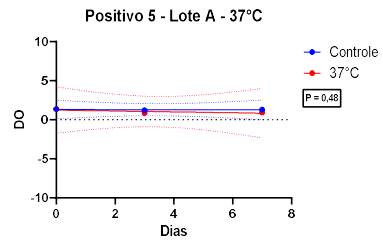
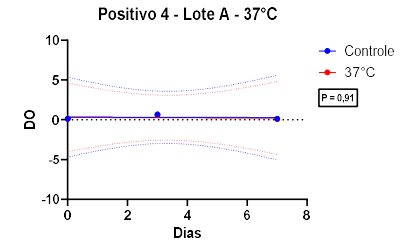
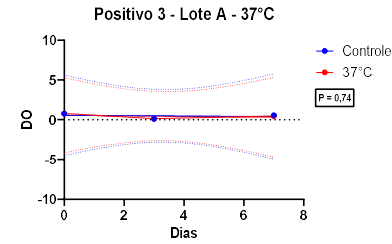
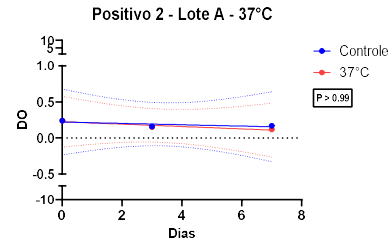
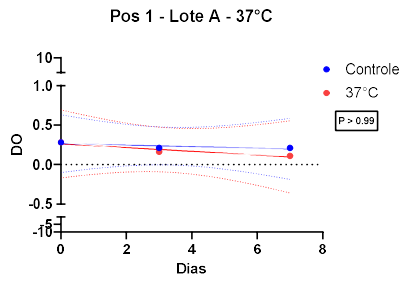
• LOTE C – Negativo -20°C



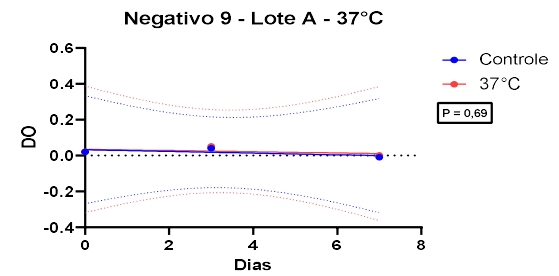
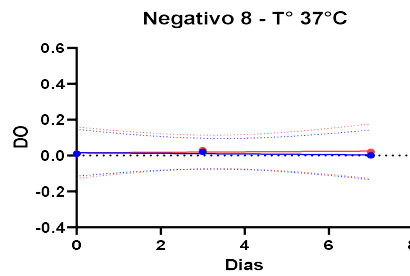
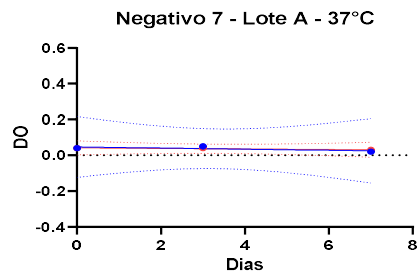
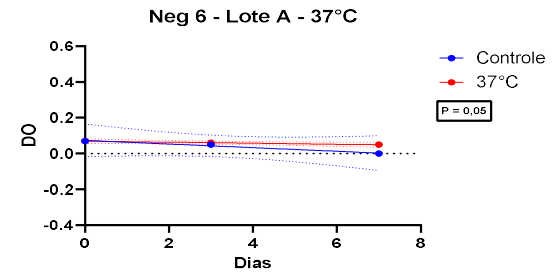
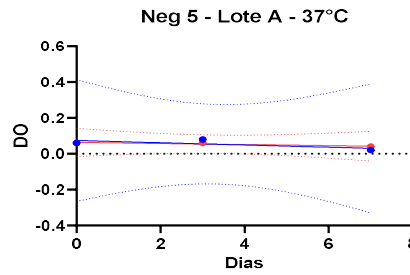
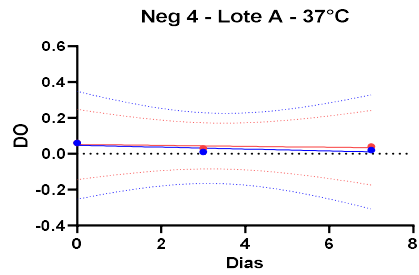
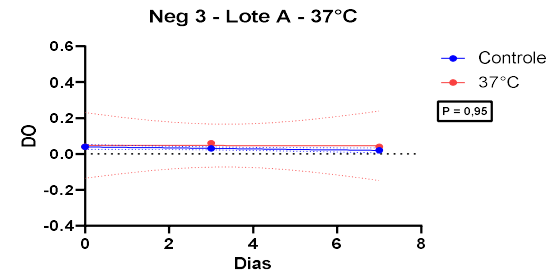
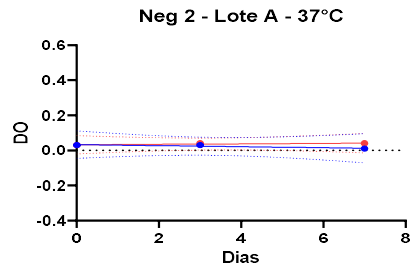
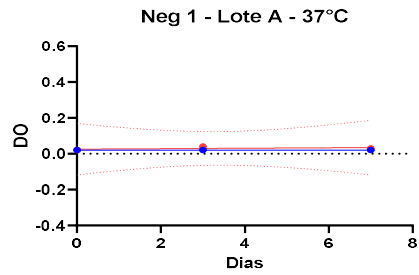
Anexo F

Gráficos de regressão linear empregando placas armazenadas a 37°C e placas sensibilizadas um dia antes (controle).

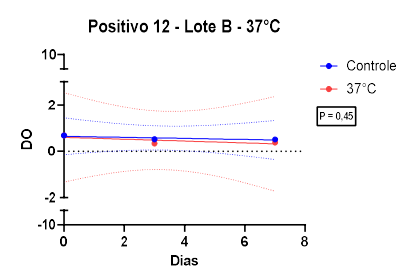
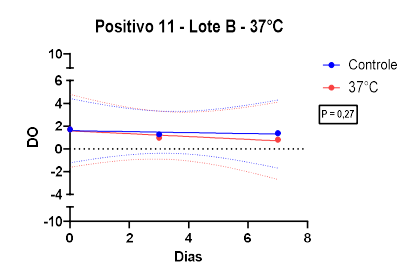
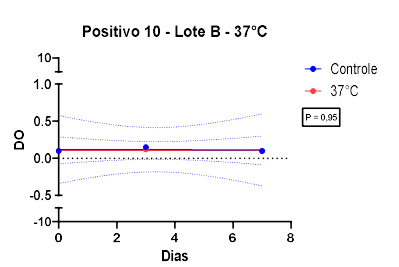
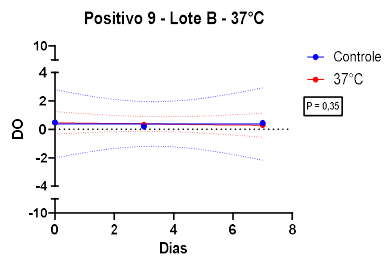
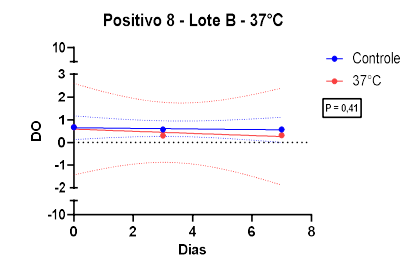
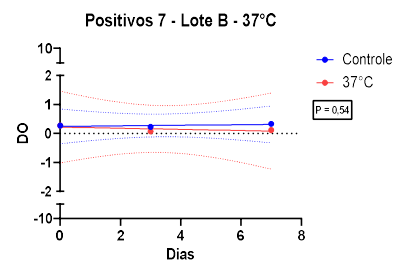
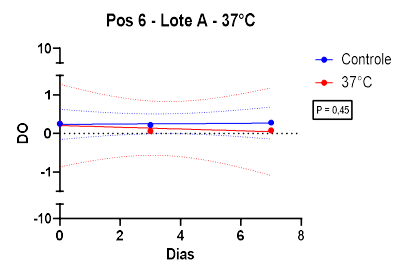
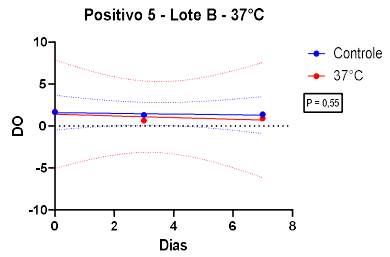
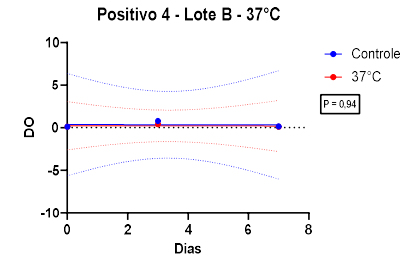
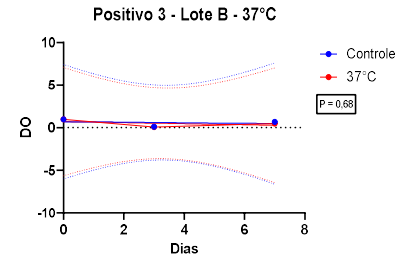
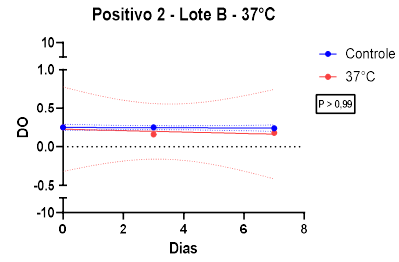
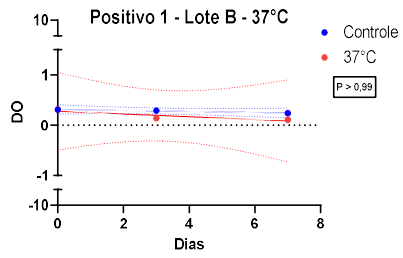
• LOTE A – Positivo 37°C



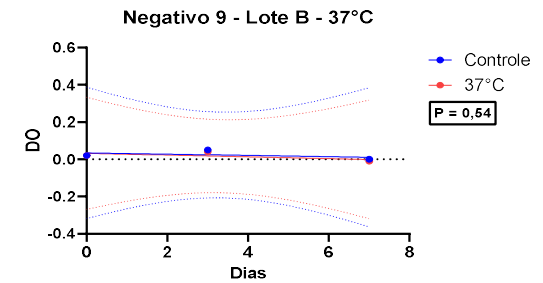
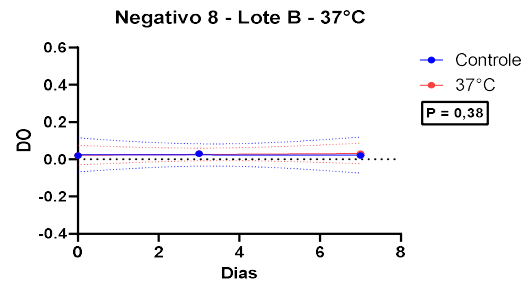
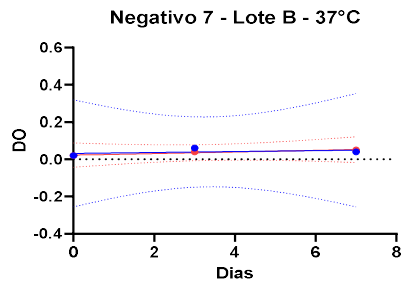
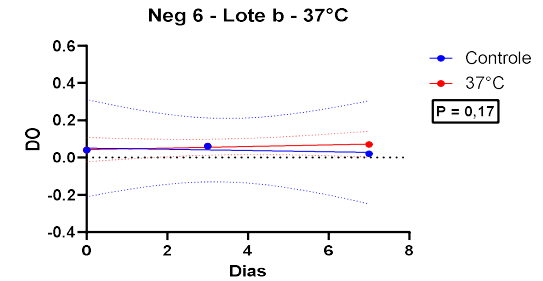
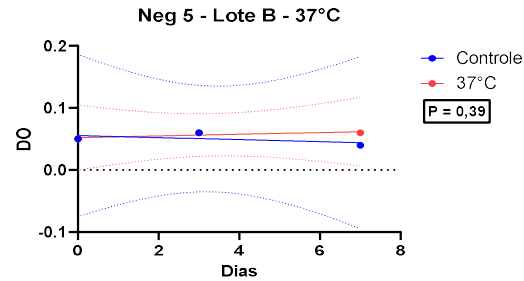
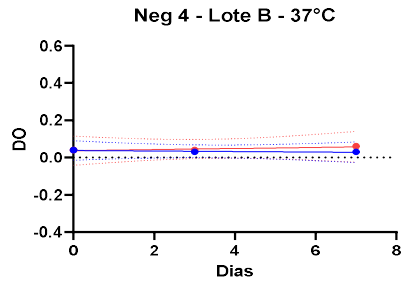
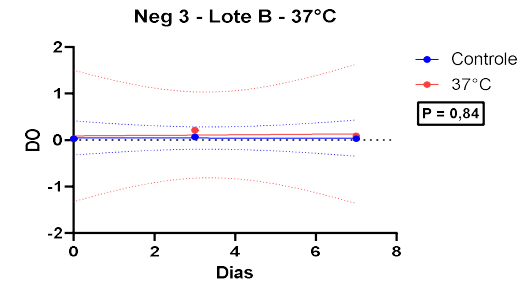
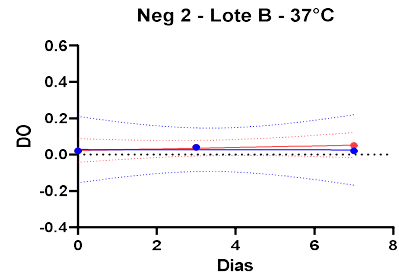
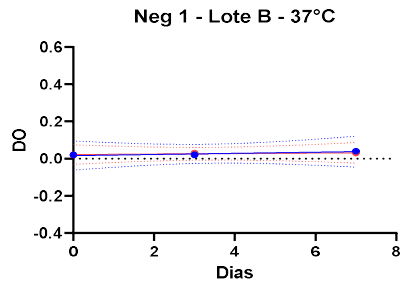
• LOTE A – Negativo 37°C



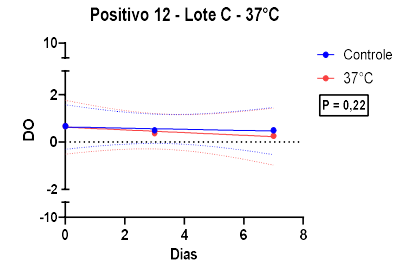
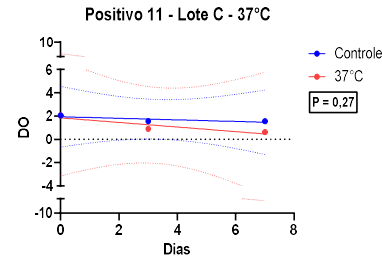
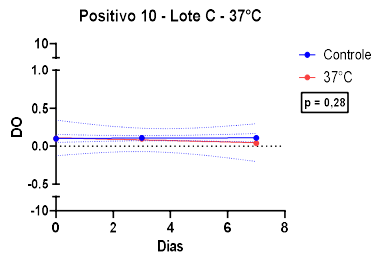
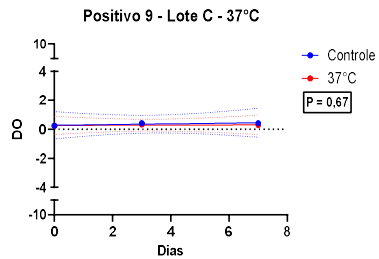
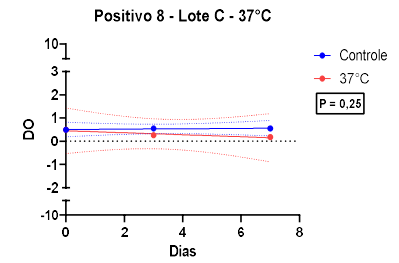
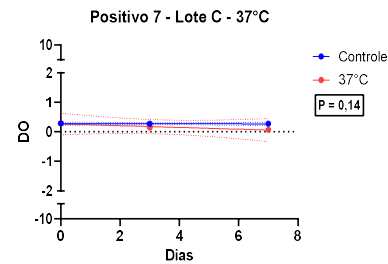
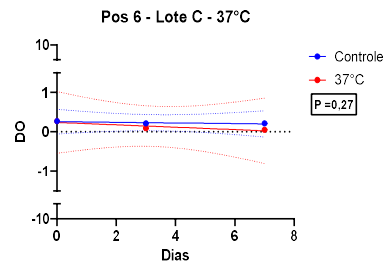
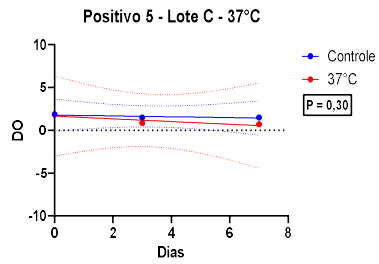
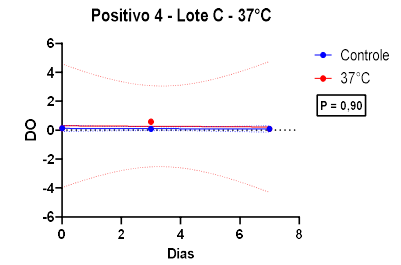
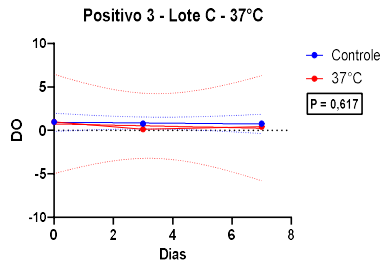
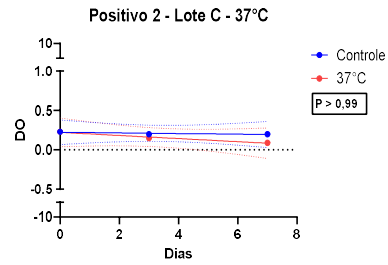
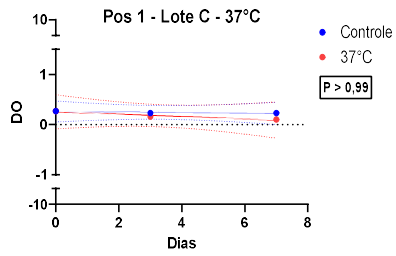
- LOTE B – Positivo 37°C



- LOTE B – Negativo 37°C



- LOTE C – Positivo 37°C



- LOTE C – Negativo 37°C

