



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Aplicação da reação de polimerase em cadeia e da intradermo reação de Montenegro em novas estratégias diagnósticas para a leishmaniose mucosa**

**Layla Ferraz Farah Emiliano**

Salvador (Bahia)  
Agosto, 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Emiliano, Layla Ferraz Farah

E53

Aplicação da reação da polimerase em cadeia e da intradermo reação de Montenegro em novas estratégias diagnósticas para a leishmaniose mucosa/  
Layla Ferraz Farah Emiliano. Salvador, Bahia: LFF, Emiliano, 2014

VI + 31 p.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira

Palavras chaves: 1. Leishmaniose mucosa. 2. Diagnóstico. 3. Intradermo Reação de Montenegro. 4. Reação de polimerase em cadeia. I. Oliveira, Viviane Sampaio Boaventura. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Aplicação da reação da polimerase em cadeia e da intradermo reação de Montenegro em novas estratégias diagnósticas para a leishmaniose mucosa.

CDU: 616.993-071



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Aplicação da reação de polimerase em cadeia e da intradermo reação de Montenegro em novas estratégias diagnósticas para a leishmaniose mucosa**

**Layla Ferraz Farah Emiliano**

Professor orientador: **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Agosto, 2014

**Monografia:** *Aplicação da reação de polimerase em cadeia e da intradermo reação de Montenegro em novas estratégias diagnósticas para a leishmaniose*, de **Layla Ferraz Farah Emiliano**.

Professor orientador: **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira** (Presidente, Professora orientadora), Professora do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Deboraci Brito Prates**, Professora do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Aurea Angélica Paste**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Andreia Carvalho dos Santos**, Doutoranda do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Patologia (PPgPat) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

## **EQUIPE**

- Layla Ferraz Farah Emiliano, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: laylaffarah@gmail.com;
- Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Vanessa Riesz Salgado, Fundação Oswaldo Cruz/BA;
- Vitor Rosa Ramos de Mendonça, Fundação Oswaldo Cruz/BA;
- Amanda Canário Andrade Azevedo, Santa Casa de Misericórdia da Bahia/Hospital Santa Izabel; e
- Aldina Maria Prado Barral, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

### **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ) BAHIA**

- Laboratório de Imunoparasitologia

### **SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DA BAHIA – HOSPITAL SANTA IZABEL**

- Unidade de Otorrinolaringologia

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Fiocruz Bahia e</li><li>2. Recursos próprios</li></ol> |
|---|

## AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora orientadora, Doutora **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**, pela disponibilidade, paciência e competência nas orientações acadêmicas.
- ◆ À Doutora **Vanessa Riesz Salgado**, pela total disposição e ajuda indispensáveis na realização deste trabalho.
- ◆ Ao Doutorando **Vitor Rosa Ramos de Mendonça**, por compartilhar ideias e conhecimentos técnicos-científicos que muito enriqueceram o trabalho.
- ◆ Aos Doutores **Deboraci Brito Prates**, **Aurea Angelica Paste** e à Doutoranda **Andreia Carvalho dos Santos**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, agradeço pela disponibilidade.
- ◆ À Doutora **Amanda Canário Andrade Azevedo**, por todo auxílio na etapa de coleta de material.
- ◆ À Doutora **Aldina Maria Prado Barral**, pelo apoio ao trabalho realizado em seu laboratório.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>3</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>6</b>
III.1. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses	6
III.2. Aspectos clínicos da leishmaniose mucosa	6
III.3. Diagnóstico da leishmaniose mucosa	7
III.3.1 Sorologia	7
III.3.2. Histopatologia	9
III.3.3 Métodos Moleculares	9
III.3.4. Intradermorreação de Montenegro	9
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>11</b>
IV.1. Desenho do estudo	11
IV.2. Pacientes e Obtenção das Amostras	11
IV.2.1. Critérios diagnósticos	11
IV.2.2 Amostras	12
IV.2.3. Coleta de swab nasal	12
IV.3. Extração de DNA e PCR	13
IV.4. Intradermorreação de Montenegro	14
IV.5. Anatomopatológico com Imunohistoquímica para leishmania	14
IV.6. Análise estatística	15
IV.7. Considerações éticas	15
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
V.1. Características epidemiológicas dos pacientes	16
V.2. Análise da intradermorreação de montenegro em pacientes com leishmaniose mucosa comparado com leshmaniose cutânea, controles de área endêmica ou com	16

portadores de outras granulomatoses nasais

V.3. Análise da reação de polimerase em cadeia (PCR) em amostras de swab nasal para o diagnóstico de leishmaniose mucosa 20

**VI. DISCUSSÃO 21**

**VII. CONCLUSÕES 23**

**VIII. SUMMARY 24**

**IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25**

**X. ANEXOS 29**

X.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa 29

X.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 30



## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** - Valores de intra dermo reação de Montenegro em pacientes com LM e controles 17
- Figura 2** - Curva ROC para análise dos valores de intradermo reação de Montenegro de 18  
pacientes com leishmaniose mucosa (LM) em relação a diferentes controles
- Tabela 1** - Características epidemiológicas dos pacientes 16
- Tabela 2** - Valores (mm) de intra dermo reação de Montenegro (IDRM) nos diferentes grupos 17  
de pacientes
- Tabela 3** - Relação de sensibilidade e especificidade para cada valor de intradermo reação de 19  
Montenegro de pacientes com leishmaniose mucosa versus controle de área endêmica
- Tabela 4** - Relação de sensibilidade e especificidade utilizando o valor de intradermo reação 20  
de Montenegro de 9mm como ponto de corte em pacientes com leishmaniose mucosa versus  
controles sadios de área endêmica e controles com outras granulomatoses
- Tabela 5** - Análise comparativa do teste de PCR em amostras de swab nasal de pacientes com 20  
leishmaniose mucosa e controles com outras patologias nasais, utilizando-se dois primers

## I. RESUMO

A leishmaniose mucosa (LM) é marcada pelo desenvolvimento de lesões, as quais em sua grande maioria, encontram-se restritas ao nariz. O diagnóstico precoce da LM permite o tratamento correto e evita o desenvolvimento de lesões destrutivas. Entretanto, o mesmo geralmente é estabelecido de forma tardia. A evolução clínica da LM costuma ser lenta, com apresentação clínica inicial semelhante a várias doenças granulomatosas nasais. Além disso, a falta de um único método diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade, dificulta a confirmação diagnóstica. Nesse trabalho avaliamos duas novas alternativas diagnósticas para LM. A PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção de DNA de leishmania foi feita à partir de amostras de swab nasal de pacientes com LM, leishmaniose cutânea (LC) e de controles (voluntários normais e portadores de outras doenças nasais). Nesse teste, dois primers de DNA (150/152 e LVB1) de leishmania foram comparados quanto a sensibilidade e especificidade na detecção de LM. Os primers 150/152 e LVB1 apresentaram respectivamente 67% e 55% de sensibilidade e ambos apresentaram 100% de especificidade, quando analisados pacientes com LM e outras patologias nasais. A outra alternativa diagnóstica avaliada foi o estabelecimento de um novo ponto de corte no exame de reação intradérmica de Montenegro (IDRM), modificando os critérios de positividade, com objetivo de aumentar a especificidade do teste. As medidas, em milímetro, da IDRM de pacientes e controles foram analisadas através de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para detecção do ponto de corte com maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LM. O valor da IDRM de 8,5 mm foi identificado como o melhor resultado para o diagnóstico de LM, quando comparado com controles de área endêmica (sensibilidade 95,8% com IC=78,8 a 99,9 e especificidade 96,92% com IC=89,3 a 99,63) e com o grupo com outras granulomatoses nasais (sensibilidade de 95,8% - IC = 78,88 a 99,89 e especificidade de 100% - IC: 59,04 a 100,0). Para efeito prático de mensuração ao exame, foi analisado o valor aproximado de IDRM  $\geq$  9mm como ponto de corte para positividade do teste. Nesse caso, os valores de sensibilidade e especificidade, quando considerado o grupo controle de área endêmica, foram de aproximadamente 94% e 97%, respectivamente. Quando considerado o grupo de outras granulomatoses como controle, os valores de sensibilidade e especificidade foram 100% em ambos. Com esses resultados concluímos que: o valor maior que 9mm aumenta a especificidade da IDRM para o diagnóstico de LM, sugerindo que este seja o novo valor a ser considerado como ponto de corte para positividade; o primer 150/152 tem maior sensibilidade que o primer LVB1 para o diagnóstico de LM; a PCR realizada em amostras de swab nasal é um método que apresenta boa sensibilidade e especificidade, tendo a vantagem sobre a biópsia por ser não invasivo.

Palavras chave: 1. Leishmaniose mucosa. 2. Diagnóstico. 3. Intradérmica reação de Montenegro. 4. Reação de polimerase em cadeia.

## II. OBJETIVOS

### PRINCIPAL:

Investigar duas novas alternativas para aprimorar o diagnóstico da leishmaniose mucosa (LM): o exame de PCR de amostras de swab nasal e o estabelecimento de um novo ponto de corte do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM).

### ESPECÍFICOS:

1. Analisar a sensibilidade e especificidade do PCR de amostras de swab nasal no diagnóstico de LM utilizando dois primers de DNA de leishmania..
2. Identificar um novo ponto de corte para delimitar resultados positivos no exame de IDRM de pacientes com LM garantindo maior especificidade e sensibilidade do teste.

### III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

#### III.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que pode acometer tanto a pele e mucosa – leishmaniose tegumentar (LT) - quanto as vísceras - leishmaniose visceral (LV) (Sharma & Singh, 2008). Estima-se que 12 milhões de pessoas em 80 países apresentem leishmaniose tegumentar ou visceral, com aproximadamente 400.000 novos casos por ano (Lessa et al., 2007). LT é endêmica no Brasil e na América Latina e inclui a leishmaniose cutânea (LC), cutânea-difusa (LCD) e mucosa (LM).

No Brasil a LM é causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis* e menos frequentemente por *L. amazonensis* e ocorre em cerca de 3% dos pacientes que desenvolvem LC, concomitante ou até anos após a resolução da doença cutânea (Marsden et al., 1984). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 1 milhão de casos de leishmaniose tegumentar foram reportados nos últimos 5 anos e mais do que 5000 novos casos foram registrados no Brasil em 2012 (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>).

#### III.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE MUCOSA

A razão pela qual alguns indivíduos com lesão cutânea por leishmania apresentam tardiamente lesão mucosa não é conhecida. Fatores tanto do hospedeiro quanto relacionados ao parasito parecem favorecer o desenvolvimento da doença mucosa (Carvalho et al., 1994). A presença de lesões acima da cintura pélvica, úlceras cutâneas de grande tamanho e tratamento inadequado da leishmaniose cutânea parecem constituir fator de risco para o desenvolvimento de leishmaniose mucosa (Llanos Cuentas, 1984). A presença de reativação espontânea, transmissão por órgãos transplantados e casos em pacientes imunodeprimidos sugerem a persistência do parasita mesmo após o tratamento (Schubach et al., 2001). A forma de disseminação do parasita do sítio cutâneo da picada do inseto transmissor até a mucosa também não é conhecida. Acredita-se que no homem a propagação da doença, desde a lesão cutânea até o nariz, pode ocorrer por via linfática, hematogênica (através de metástases) e raramente pelo contato direto da mucosa com a lesão cutânea (Scott, 1985). A área vascular ao nível do septo nasal anterior (zona de Kiesselbach) parece oferecer condições favoráveis ao desenvolvimento das formas amastigotas e, segundo alguns autores, a temperatura mais baixa ao nível do nariz e das zonas de passagem do bolo alimentar favorecem a instalação da leishmania nestas regiões (Scott, 1985). Apesar da doença mucosa habitualmente ser secundária à lesão cutânea, pode ocorrer acometimento primário da mucosa (Scott, 1985).

Como sugerido por Boaventura et al. (2006), é possível que muitos pacientes com LC que desenvolvem posteriormente LM, já apresentem alterações nasais no momento do diagnóstico da lesão cutânea primária. Entretanto, a avaliação da mucosa nasal não é feita rotineiramente nos pacientes portadores de LC, fator que impede o diagnóstico precoce de LM.

Mais de 90% das lesões de mucosa estão restritas ao nariz (Marsden et al., 1984), com aspecto granuloso, erosões, acometendo mais frequentemente o septo nasal anterior e a cabeça do corneto inferior. Os sintomas mais precoces da leishmaniose mucosa são obstrução nasal, rinorréia hialina e epistaxe, (Marsden et al., 1984) sendo encontrada hiperemia, edema da mucosa do septo anterior e nodulações ao exame físico. Em poucos dias ou meses, pode ocorrer perfuração do septo e espessamento da pele do nariz, acarretando o aumento de volume da pirâmide nasal. A infiltração edematosa do revestimento e das estruturas de sustentação do nariz é conhecida como “nariz de anta”. Em razão da agressão tecidual pode haver comprometimento de todo o nariz, lábio superior, palato, faringe e laringe, provocando graves deformidades e mutilações, impedindo a alimentação, dificultando a respiração e a fonação. (Marsden 1996; Costa et al. 1986).

As alterações detectadas no exame físico dos pacientes com LM - eritema, edema, infiltração, erosão e ulceração, podendo estar recobertas por exudato mucopurulento e crostas em caso de infecção secundária - são comuns a várias doenças infecciosas e inflamatórias nasais, o que torna o diagnóstico diferencial difícil (Boaventura et al., 2009). Assim os exames complementares são essenciais para complementação diagnóstica.

### III.3. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE MUCOSA

O diagnóstico efetivo e precoce é um passo determinante para evitar deformidades na face e disfunção no trato respiratório superior. Para estabelecer o diagnóstico de LM utiliza-se vários critérios, incluindo os aspectos clínicos citados, os dados epidemiológicos e resultados de testes laboratoriais como sorologia, estudo histopatológico e métodos moleculares.

A epidemiologia positiva dos indivíduos que moram em áreas endêmicas é evidente, mas constitui uma informação importante para o diagnóstico em viajantes que passaram algum tempo em áreas endêmicas de leishmaniose. Como os aspectos clínico-epidemiológicos não são patognomônicos de LM, são necessários exames complementares incluindo avaliação da resposta imune celular e humoral ao antígeno de leishmania e métodos de detecção *in situ* de parasitas (Boaventura et al., 2009).

#### III.3.1. SOROLOGIA

A Imunofluorescência indireta (IFA) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são os testes sorológicos mais utilizados para diagnóstico de leishmaniose, tendo sua principal aplicação na suspeita de leishmaniose visceral (LV), devido a grande concentração de anticorpos no soro destes pacientes (Saravia et al., 1989). O uso destas técnicas para o sorodiagnóstico da LT é limitado, pois ao contrário dos pacientes de LV, as concentrações de anticorpos anti-leishmania nestes pacientes é baixa (Arevalo, 2011). Apesar disso, muitas vezes apresentam sensibilidade superior aos testes parasitológicos de rotina (Kar, 1995). Entre as técnicas imunodiagnósticas indiretas, ELISA ganhou espaço, pois é de fácil execução e não invasiva, podendo ser utilizada em grande escala, considerando que a alta prevalência de leishmaniose se dá em áreas pobres e em países em desenvolvimento (Mabey, 2004).

A técnica de ELISA frequentemente utiliza o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Apesar de altos valores de sensibilidade, apresenta reação cruzada com epítomos de outros parasitas e nem sempre há reprodutibilidade nos resultados (Deniau et al., 2003). Para tentar contornar esse problema, muitos pesquisadores estão se dedicando a aumentar a efetividade do ELISA, utilizando antígenos recombinantes de leishmania, através de antígenos isolados, buscando eliminar a reação cruzada aumentando a sensibilidade e especificidade. Além disso, estes antígenos possuem a vantagem de terem sua produção mais padronizada e uniformizada (Goto & Lindoso, 2010). Barroso-Freitas et al. (2009), utilizando antígeno homólogo de *L. braziliensis* e antígeno tipo *L. major*, observaram os valores de 95,7% e 78,7% de sensibilidade e 100% e 82,8% de especificidade, respectivamente, em pacientes com LTA (74 pacientes com LC e 20 pacientes com LM). Em pacientes com LM, ELISA realizado com antígeno de *L. braziliensis* apresentou sensibilidade de 100%, já com o antígeno de *L. major*, a sensibilidade foi de 75%. Souza et al. (2013), encontraram maior reatividade contra antígenos recombinantes em soros de pacientes com LM quando comparados com soros de pacientes com LC, principalmente contra o antígeno rHSP70 (positivo em 80% dos pacientes com LM e 51,9% dos pacientes com LC). Este antígeno mostrou melhor performance em pacientes com LM (AUC: 0,894,  $p < 0,0001$ , LR: 4,57), quando comparado com outros antígenos recombinantes. rHSP70 apresentou também reação cruzada com soros de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (20%) e doença de Chagas (10%). Celeste et al. (2014) testaram a sensibilidade do antígeno recombinante Hsp83 em amostras de soros de pacientes com LC, LM e LV, assim como em pacientes com outras doenças infecciosas (chagas, blastomicose, histoplasmose, aspergilose, cromomicose, toxoplasmose, citomegalovirose, malária e tuberculose) e avaliou a reação cruzada. Os autores obtiveram o valor de 100% de sensibilidade para detecção de LC, LM e LV, e 100% de especificidade com as amostras de doença de Chagas.

### III.3.2. HISTOPATOLOGIA

Os achados histopatológicos da leishmaniose mucosa incluem a presença de intenso infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares - macrófagos e linfócitos, infiltração de células gigantes com formação de granulomas. Em menor quantidade, também foram descritos neutrófilos na lâmina própria e na camada subepitelial da mucosa (Amato et al., 2003). A ocorrência de vasculite, trombose e necrose comprometendo a mucosa e a cartilagem também já foi descrita (Amato et al., 2003; Sanguenza et al., 1993). Entretanto, esses achados não são patognomônicos da doença e apenas a detecção *in situ* do agente etiológico constitui o padrão ouro para confirmação diagnóstica. A visualização direta da leishmania na amostra de tecido da LM raramente é possível no estudo histopatológico convencional (Goto & Lindoso, 2010). Além disso, a distribuição dos parasitas não é homogênea no tecido, o que contribui para a perda de sensibilidade desse método parasitológico (Pinero et al., 1999). Como método complementar pode-se utilizar a imunohistoquímica, onde o antígeno parasitário pode ser detectado pela ligação de um anticorpo policlonal anti-leishmania (Oliveira et al., 2005). Entretanto esse método de diagnóstico parasitológico permite a detecção do parasita em apenas cerca de 69% dos casos de LM (Oliveira et al., 2005).

### III.3.3. MÉTODOS MOLECULARES

Vários métodos moleculares foram descritos baseados na amplificação do DNA de *Leishmania* de amostras de tecido de pacientes com leishmaniose (Belli et al., 1998; Aviles et al., 1999; Rodrigue et al., 2002; Weigle et al., 2002). Utilizando fragmentos da lesão de pacientes com LM, a reação de polimerase em cadeia (PCR) tem demonstrado sensibilidade variando de 47,4 a 83,3% (Oliveira et al., 2005). Oliveira et al.(2005) demonstraram que a PCR é uma melhor alternativa para o diagnóstico de LM comparado com métodos parasitológicos e IDRM, com sensibilidade de 97,1% (34 de 35 biópsias examinadas) e a especificidade de 100%. Entretanto esses estudos foram realizados a partir de amostras obtidas por biópsia da lesão. O procedimento invasivo para obtenção do tecido exige a atuação de um especialista, o que limita a aplicação prática do teste em áreas endêmicas geralmente distantes dos grandes centros urbanos.

Como alternativa à biópsia, Boggild et al (2011) realizaram a PCR em material de esfregaço nasal de pacientes peruanos com LM, obtendo sensibilidade e especificidade semelhantes à detecção do parasita em amostra de biópsia. Entretanto a especificidade desse teste não foi avaliada considerando pacientes portadores de outras patologias nasais.

### III.3.4. INTRADERMOREAÇÃO DE MONTENEGRO

Na reação intradérmica de Montenegro (IDRM) avalia-se a resposta imune do paciente à leishmania através da injeção de uma preparação contendo o antígeno do parasita no antebraço do paciente. Considera-se a presença de reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno quando após 48-72 horas o diâmetro da induração no local da inoculação do antígeno é maior que 5mm.

A presença da IDRM positiva sugere infecção por leishmania, sem distinguir passado ou presente. A IDRM demonstra resultado positivo em pacientes com mais de 19 meses após tratamento e em 75% de indivíduos não infectados sem manifestações da doença no passado, que vivem em áreas endêmicas (Weigle et al., 1987).

Esse teste é amplamente utilizado em associação com dados clínicos e sorológicos no diagnóstico da LM. Entretanto estudos sobre sensibilidade e especificidade da IDRM demonstram grande variação. Oliveira et al. (2005) encontraram resultados positivos em 94,3% dos pacientes com LM. Já no estudo de Boggild et al. (2011), a IDRM apresentou sensibilidade de 69,6% e especificidade de 100% para diagnóstico de LM. Maurer-Cecchini et al. (2009) encontraram IDRM positiva em 94,4% dos pacientes com LM, enquanto Passos et al. (2001) observaram que a positividade ocorria em 78,4% dos casos de LC e LM. Essa variabilidade pode ocorrer em parte pela inexistência de um protocolo padrão para a preparação do antígeno usado na IDRM.

Na LM a resposta de reação de hipersensibilidade tardia parece ser mais intensa que na LC. Passos et al. (2001) identificaram maior frequência de necrose no local de inoculação do antígeno em pacientes com LM quando comparados com pacientes com LC ( $p < 0,001$ ). Maurer-Cecchini et al. (2009) detectaram que a área de induração nos pacientes com LM foi significativamente maior do que em pacientes com LC (13mm vs 9mm, em média). Apesar dessa observação, não existem estudos analisando a sensibilidade e especificidade da IDRM considerando diâmetro maior da área de induração.



## IV. METODOLOGIA

### IV.1. DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de corte transversal utilizando dados de prontuário e amostras de citologia nasal de pacientes e controles oriundos da área endêmica do Vale do Jiquiriçá (Bahia - Brasil) ou do ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital Santa Izabel (Salvador – Bahia – Brasil).

### IV.2. PACIENTES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

#### IV.2.1. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Foram incluídos no estudo, pacientes com diagnóstico de leishmaniose mucosa baseado no somatório de critérios clínicos e epidemiológicos, fibronasolaringofaringoscopia com presença de lesões compatíveis com LM (edema, erosão, perfuração do septo e/ou aspecto granulomatoso), além de IDRMs positivas, sorologia anti-leishmania positiva e/ou presença de leishmania em fragmentos de biópsia detectada por imunohistoquímica ou por PCR (Boaventura et al., 2009).

Foi criado um grupo controle com pacientes portadores de outras patologias nasais cujo aspecto clínico assemelha-se ao de LM. O diagnóstico dessas doenças obedeceu os seguintes parâmetros:

- Hanseníase - alterações mucosas sugestivas de granulomatose, alterações dermatológica e/ou de nervos periféricos e baciloscopia positiva na amostra de pele e/ou mucosa com coloração de Ziehl-Nielsen (Barton, 1975).;

- Sarcoidose - presença de alterações pulmonares na radiografia de tórax com achados histopatológicos de granulomas não caseosos (DeShazo et al., 1999) resposta a tratamento com imunossupressor e exclusão de outras doenças com características clínicas ou histológicas semelhantes (Rottoli et al., 2006).

- Penfigoide cicatricial (Mucous Membrane Pemphigoid - MMP)- lesões em superfícies mucosas, principalmente da cavidade oral, mas também com envolvimento da mucosa nasal com descamação, erosão, eritema e edema associado a áreas de cicatrização manifestada por estrias brancas reticuladas que representam a fibrose da mucosa (Hautarzt, 2002). A confirmação diagnóstica foi obtida por avaliação histológica de biópsia perilesional mostrando clivagem epitélio-subepitélio e células inflamatórias na submucosa com deposição de anticorpos e complemento ao longo da membrana basal na imunofluorescência direta obedecendo critérios descritos previamente (Hautarzt, 2002).

Para as análises por PCR foram incluídos pacientes com rinite alérgica e/ou infecciosa (viral ou bacteriana). Para o diagnóstico da rinite alérgica, foram utilizados critérios clínicos baseados na presença de sintomas característicos (paroxismos de espirros, rinorréia, obstrução nasal, prurido nasal, gotejamento pós nasal, tosse, irritabilidade e fadiga), história clínica sugestiva (incluindo a presença de fatores de risco: história de atopia, exposição a fumaça de cigarro no primeiro ano, exposição a alérgenos, presença de IgE alérgeno específico) e achados característicos no exame físico (edema e escurecimento infraorbital, linhas acentuadas abaixo da pálpebra inferior, prega nasal transversa, fácies alérgica) e no exame nasal, da orofaringe e otoscopia (palidez e edema de mucosa nasal, tecido linfóide hiperplásico, fluido seroso acumulado através da membrana timpânica) (DeShazo & Kemp, 2014). O diagnóstico das infecções nasais (rinossinusites agudas virais ou bacterianas) também foi baseado em critérios clínicos: presença de rinorréia purulenta, congestão nasal e dor/pressão facial. Alguns sintomas secundários corroboravam o diagnóstico: anosmia, plenitude auricular, tosse e dor de cabeça (Hwang & Getz, 2013).

#### IV.2.2. AMOSTRAS

Todos os sujeitos envolvidos no estudo têm acima de 18 anos.

Dados e materiais dos pacientes e controles foram coletados no ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital Santa Izabel ou no centro de referências para leishmaniose tegumentar no município de Jiquiriçá, no período do estudo ou previamente, durante a execução de outros projetos em nosso laboratório, e encontravam-se disponíveis no banco de dados e de amostras do laboratório LIP (Laboratório de Imunoparasitologia)- CPqGM/Fiocruz, registrados no biorepositório da instituição.

O cálculo amostral foi feito utilizando o programa Biostat. Para comparação de amostras de swab nasal de pacientes com LM e de controles foi utilizado o teste do qui-quadrado, com valor estimado de 26, grau de liberdade de 1 e poder do teste de 0,95 poder do teste de 95%. Para comparação de resultados de IDRMs de pacientes com LM e com LC utilizou-se o teste de Mann-Whitney com estimativa de média (SD) do resultado da IDRMs de 10 ( $\pm 4$ ) para LM e de 6 ( $\pm 3$ ), com relação de uma amostra de LM para uma de LC, com 0,95% de poder do teste e erro alfa de 0.05. O número de amostras necessário foi de 15 para cada grupo.

#### IV.2.3. COLETA DE SWAB NASAL

As amostras de swab nasal foram obtidas de ambas narinas após remoção de crostas com solução fisiológica a 0,9% seguida por fricção da mucosa por três vezes com estilete estéril de algodão (Dalian Goodwood Wooden Products Factory, China). Em seguida, a extremidade de

algodão do estilete foi cortada, inserida em tubo tipo eppendoff contendo EDTA e mantida em temperatura ambiente até extração do DNA. Além do swab nasal, amostras previamente coletadas e obtidas do biorepositório foram colhidas utilizando o Rhino-probe<sup>TM</sup> (ASI – Arlington Scientific, INC.), uma cureta nasal plástica.

#### IV.3. EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

Para extração de DNA das amostras de swab nasal e Rhino-probe<sup>TM</sup> foi utilizado o PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen). As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e centrifugadas a 10000g x 10 min. Após descarte do sobrenadante o pellet resultante foi resuspendido em solução de lise contendo 200µL de TE+ 20µL de Proteinase K +20µL de RNase + 200µL de Purelink genomic lysis. Após incubação a 56°C por 1 hora, foi adicionado 200µL de etanol 100%. Para promover a ligação do DNA extraído à coluna do kit, foi adicionando cerca de 640µL do lisado preparado acima a uma coluna do kit. Após centrifugar a 10000g x 1 minuto à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado em tubo coletor e colocado à coluna sob novo tubo coletor. Foi adicionado 500µL de wash buffer e centrifugado a 10000g x 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida foi descartado o tubo coletor e colocado a coluna sob novo tubo coletor. 500µL de wash buffer 2 foi adicionado e centrifugado a velocidade máxima por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi descartado o tubo coletor e colocado a coluna sob novo tubo eppendorff 250µL e adicionado 30µL de Purelink genomic ellution buffer. As amostras foram então incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugadas a velocidade máxima por 1 minuto à temperatura ambiente.

Para a PCR foi utilizado DNA extraído das amostras de swab nasal e Rhino-probe<sup>TM</sup> e preservadas a -20°C. Tanto Primers de β-actina quanto de leishmania foram testados. A reação de amplificação com os Primers β-actina F (5' GAC CCT GAA GTA CCC CAT TGA G 3') e R (5' TTG TAG AAG GTG TGG TGC CAG AT 3') foi padronizada em um volume final de 25µl contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega, 6µL de água livre de nucleases; 10pmol de cada primer e 20ng de DNA da amostra. A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 44 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58,8 °C por 30 segundos, e 72 °C por 45 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. Por outro lado, a PCR para detecção de DNA de leishmania foi feito com os primers 150 (5' SSS WCT ATW TTA CAC CAA CCC C 3') e 152 (5' GGG KAG GGG CGT TTT SCG AA 3'), conforme descrito anteriormente (Rodgers et al., 1990). A reação de amplificação com os Primers 150/152 foi padronizada em um volume final de 25µl contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega, 6,8µL de água livre de nucleases; 10pmol de cada primer e 20ng de DNA da amostra. A amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, e 72 °C por 45 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Além dos Primers 150/152,

também foram testados os primers LVB1 (LV (5'ATT TTT GAA CGG GGT TTC TG 3' e B1 5'GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3') (Figuroa et al., 2009). A reação de amplificação com os Primers LVB1 foi padronizada em um volume final de 25µl contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega, 8µL de água livre de nucleases; 10pmol de cada primer e 20ng de DNA da amostra. A amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de 92 °C por 60 segundos, 59.2 °C por 60 segundos, e 72 °C por 60 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. A análise dos produtos amplificados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato e 1 mM EDTA pH 8) com gel submetido a voltagem constante de 6-7 V/cm. Após corrida foi utilizada a imersão do gel numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 20 minutos, para posterior a visualização das bandas em transluminador ultravioleta. A detecção das bandas esperadas foi realizada por comparação das bandas observadas ao padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de tamanhos conhecidos. A fotodocumentação dos géis com os fragmentos amplificados foi realizado com auxílio da câmera em Fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad.

#### IV.4. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Para IDRМ foi utilizado antígeno de Montenegro da cepa de leishmania *L. amazonensis* (40µgN), clone I-IIID Mayrink & cols, 1993, produzido no Laboratório de Leishmaniose do Mem. Inst. Osvaldo Cruz 88p.226 UFMG/BH/MG. Foram inoculados 100µl do antígeno por via intradérmica no antebraço dos pacientes e após 48 a 72 horas foi realizada a leitura. A área de induração foi mensurada utilizando-se uma régua. Alguns pacientes realizaram a IDRМ no Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA), onde foi utilizado o antígeno da cepa de *L. amazonensis* (cepa de referência da OMS MHOM/BR/73/PH8).

#### IV.5. EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO PARA LEISHMANIA

A avaliação histopatológica foi realizada por dois patologistas experientes e em algumas amostras foi feito estudo imunohistoquímico para leishmania. Para detectar a presença de antígenos de leishmania nas amostras de biópsia preservadas em parafina, secções de 5µm de espessura foram desparafinizadas e em seguida bloqueadas usando peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos, na temperatura ambiente (TA). Posteriormente as lâminas foram lavadas com tampão-fosfato (PBS 1X) e incubadas com leite desnatado a 3% por 60 minutos, seguida de incubação com anticorpo primário hamster anti-leishmania “overnight” a 4°C. Após 20 minutos em temperatura ambiente e lavagem com tampão-fosfato, foram adicionados o anticorpo secundário com a enzima Advance HRP

(DAKO), conforme protocolo do fabricante. Por fim, foi feita a revelação com DAB e contra-coloração com hematoxilina de Harris.

#### IV.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prisma (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Os resultados de PCR para leishmania nas amostras de swab nasal de pacientes com LM, controles saudáveis e portadores de outras doenças nasais foram comparados utilizando teste de teste do qui-quadrado. Para comparação de resultados de IDRMs de pacientes com leishmaniose e controles foi utilizado teste de Mann-Whitney.

Após determinação da sensibilidade e especificidade da reação de Montenegro foi construída curva ROC e foi determinada a área sob a curva, para detectar o ponto de corte do teste que determinasse maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LM.

#### IV.7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto do presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA (Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia. CEP 40.296-710. Correio-E: cep@bahia.fiocruz.br. Tel.: (71)3176-2327). O parecer final foi emitido em 09 de dezembro de 2013, com situação de aprovado e sem pendências, sem necessidade de apreciação da CONEP. Número do parecer: 484.908 e CAAE: 18355513.6.0000.0040 (obs.: devido a um erro do sistema Plataforma Brasil, o número CAAE do projeto está previsto para ser modificado, entretanto ainda estamos no aguardo de tal mudança).

## V. RESULTADOS

### V.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES

Foram incluídos 30 pacientes com LM, 68 com LC, 19 com outras doenças nasais, e 75 voluntários sadios (Tabela 1). O grupo com outras doenças nasais foi composto por indivíduos com rinite alérgica (n=3), rinosinusite aguda (n=9), sarcoidose (n=1), tuberculose (n=2), penfigóide cicatricial (n=2), rinite atrófica (n=1) e hanseníase (n=1). Todos os pacientes apresentavam lesão em atividade no momento da coleta do material nasal. No caso dos pacientes com doenças infecciosas, a coleta do material nasal e a reação intradérmica de Montenegro foi realizada antes do tratamento. Todos os pacientes com sarcoidose, tuberculose, penfigoide cicatricial e hanseníase apresentavam lesão em atividade comprometendo cavidade nasal no momento da coleta do material.

Para o estudo da IDRM foram utilizados dados de 23 pacientes com LM, 45 pacientes com LC, 7 pacientes com outras doenças nasais e 65 voluntários sadios.

Para estudo do PCR do swab nasal foram utilizados dados de 9 pacientes com LM, 23 pacientes com LC, 15 pacientes com outras doenças nasais e 10 voluntários sadios.

Não foram encontrados nos prontuários dados de idade de 30 pacientes (7 pacientes com LM, 18 pacientes com LC, 5 pacientes com outras doenças nasais, 1 voluntário sadio).

**Tabela 1 - Características epidemiológicas dos pacientes**

	LM n=30	LC n=68	Outras doenças nasais n=19	Voluntários sadios n=75
<b>Sexo (M/F)</b>				
<b>PCR</b>	4/5	14/9	7/8	2/8
<b>IDRM</b>	18/5	28/17	3/4	20/45
<b>Total</b>	22/10	42/26	10/12	22/53
<b>Idade Média* (±DP)</b>				
<b>PCR</b>	50 (±4,2)	48,6(±21,2)	41,2(±16,1)	34,7(±9,0)
<b>IDRM</b>	50,6(±19,3)	47,2(±19,8)	55,1(±14,0)	43,5(±18,6)
<b>Total</b>	49,0(±20,4)	48,3(±19,8)	44,5 (±15,47)	42,37(±17,87)

LM: leishmaniose mucosa; LC: leishmaniose cutânea; M: sexo masculino; F: sexo feminino; PCR: grupo que realizou reação de polimerase em cadeia; IDRM: grupo que realizou intradermo reação de Montenegro; DP: desvio padrão

\*Não há dados de idade 30 pacientes ( 7 pacientes com LM, 18 pacientes com LC, 5 pacientes com outras doenças nasais, 1 voluntário sadio).

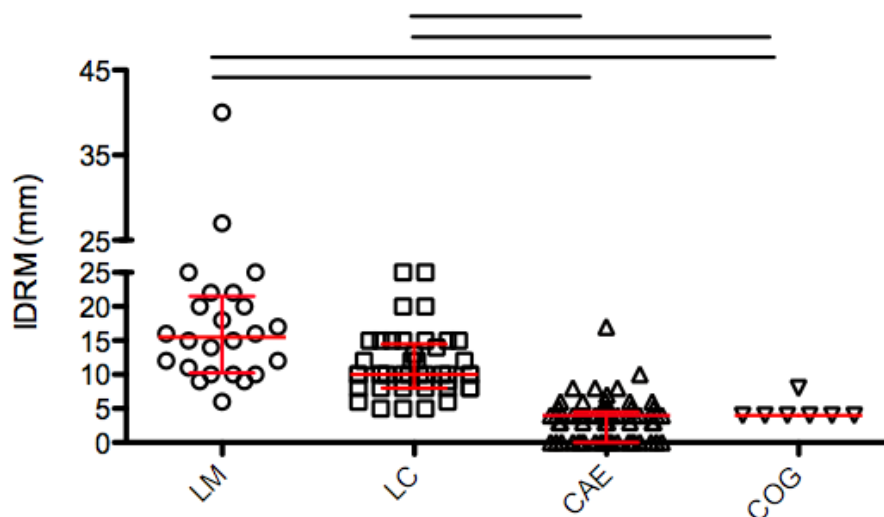
### V.2. ANÁLISE COMPARATIVA DA INTRADERMORREACÇÃO DE MONTENEGRO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE MUCOSA, LEISHMANIOSE CUTÂNEA, CONTROLES DE ÁREA ENDÊMICA OU PORTADORES DE OUTRAS GRANULOMATOSES NASAIS.

A IDRМ em pacientes com LM apresentaram valores maiores que a IDRМ dos demais grupos analisados (Tabela 2). Os pacientes com LM apresentaram uma mediana (valor máximo-valor mínimo) de 15,5mm (6-40mm), enquanto o grupo de pacientes com LC apresentou valores de 10mm (5-25mm). Para os controles sadios de área endêmica, os valores foram de 4mm (0-17mm) e o grupo de indivíduos com outras granulomatoses manteve-se negativo em todos os indivíduos (Tabela 2). Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de IDRМ dos pacientes com LM em relação aos dois grupos de controles (de área endêmica e de outras doenças nasais). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de LM e de LC (Figura 1).

**Tabela 2 – Valores (mm) de intra dermo reação de Montenegro (IDRM) nos diferentes grupos de pacientes**

Grupos	LM n=24	LC n=45	CAE n=65	COG* n=7
Valor mínimo	6,0	5,0	0,0	4,0
Percentil 25%	10,25	8,0	0,0	4,0
Mediana	15,5	10,0	4,0	4,0
Percentil 75%	21,5	14,5	4,5	4,0
Valor máximo	40,0	25,0	17,0	8,0

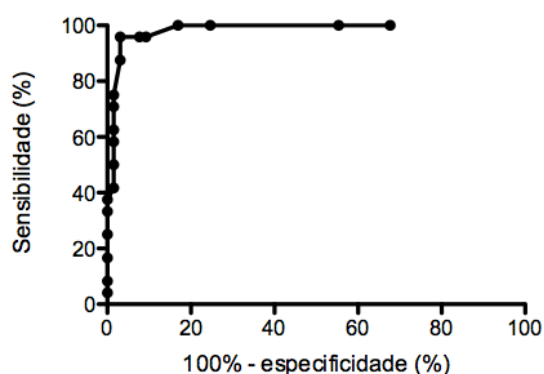
LM: leishmaniose mucosa; LC: leishmaniose cutânea; CAE: controles de área endêmica; COG: controles com outras granulomatoses nasais  
\*Seis paciente desse grupo apresentavam laudo do exame como “negativo” sendo considerado para fins de cálculo o valor de 4mm.



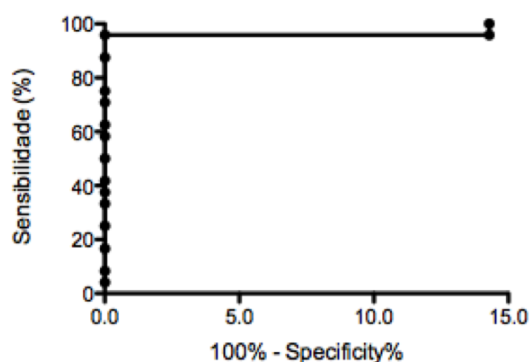
**Figura 1 – Valores de intra dermo reação de Montenegro em pacientes com LM e controles. As linhas horizontais em vermelho correspondem a mediana, percentil 25 e percentil 75. LM – Leishmaniose mucosa; LC- Leishmaniose cutânea; CAE – Controle de área endêmica; COG- Controle com outras granulomatoses nasais. Linhas horizontais em preto - p<0,05.**

Baseado nesses resultados, foram construídas curvas ROC para avaliar a capacidade da IDRМ em discriminar indivíduos com LM de indivíduos sadios de área endêmica (Figura 2A) e de indivíduos com outras granulomatoses nasais (Figura 2B). Comparando-se os resultados dos pacientes com LM com os controle os indivíduos sadios da área endêmica, foi identificado o valor da IDRМ de 8,5 mm como o ponto de maior sensibilidade (95,8 % com IC=78,8% a 99,9%) e especificidade (96,92% com IC=89,3% a 99,63%) no diagnóstico de LM (Tabela 3). Quando os resultados de IDRМ de pacientes com LM foram comparados com o grupo OGN, o ponto de 8,5 mm também mostrou melhor resultado, com sensibilidade de 95,8 (IC = 78,88% to 99,89%), e especificidade de 100% (IC : 59,04% to 100,0%).

A



B



**Figura 2- Curva ROC para análise dos valores de intradermo reação de Montenegro de pacientes com leishmaniose mucosa (LM) em relação a diferentes controles. A - LM e controles sadios de área endêmica; B - LM e controles com outras granulomatoses nasais**



**Tabela 3- Relação de sensibilidade e especificidade para cada valor de intradermo reação de Montenegro de pacientes com leishmaniose mucosa versus controle de área endêmica.**

<b>VALOR IDRM (mm)</b>	<b>SENSIBILIDADE (%)</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>ESPECIFICIDADE (%)</b>	<b>IC (95%)</b>
>1,5	100	85,75-100	32,31	21,23-45,05
>3,5	100	85,75-100	44,62	32,27-57,47
>4,5	100	85,75-100	75,38	63,13-85,23
>5,5	100	85,75-100	83,08	71,73-91,24
>6,5	95,83	78,88-99,89	90,77	80,98-96,54
>7,5	95,83	78,88-99,89	92,31	82,95-97,46
>8,5	95,83	78,88-99,89	96,92	89,32-99,63
>9,5	87,50	67,64-97,34	96,92	89,32-99,63
>10,5	75	53,29-90,23	98,46	91,72-99,96
>11,5	70,83	48,91-87,38	98,46	91,72-99,96
>13,0	62,50	40,59-81,20	98,46	91,72-99,96
>14,5	58,33	36,64-77,89	98,46	91,72-99,96
>15,5	50	29,12-70,88	98,46	91,72-99,96
>16,5	41,67	22,11-63,36	98,46	91,72-99,96
>17,5	37,50	18,80-59,41	100	94,48-100
>19,0	33,33	15,63-55,32	100	94,48-100
>21,0	25	9,77-46,71	100	94,48-100
>23,5	16,67	4,73-37,38	100	94,48-100
>26,0	8,33	1,02-27	100	94,48-100
>33,5	4,16	0,10-21,12	100	94,48-100

Como para efeito prático a mensuração de um o valor fracionado de 8,5mm na IDRM poderia representar maior dificuldade durante a examinação do paciente, foi analisado o valor aproximado de IDRM  $\geq$  9 mm como ponto de corte para positividade do teste. Nesse caso, os valores de sensibilidade e especificidade, quando considerado o grupo controle de área endêmica, foram de aproximadamente 94% e 97%, respectivamente (Tabela 4). Quando considerado o grupo de outras

granulomatoses como controle, os valores de sensibilidade e especificidade foram ambos 100% (Tabela 4).

**Tabela 4 – Relação de sensibilidade e especificidade utilizando o valor de intradermo reação de Montenegro de 9mm como ponto de corte em pacientes com leishmaniose mucosa versus controles sadios de área endêmica e controles com outras granulomatoses**

IDRM (mm)	Sensibilidade % (IC)	Especificidade % (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Likelihood ratio	Valor de P
LMx CE	94,12 (71,31-99,85)	96,92 (89,32- 99,63)	88,89(65,29- 98,62)	98,44(91,60- 99,96)	30,29	<0,0001
LMxOG	100 (80,49-100)	100 (63,06- 100)	100(80,49- 100)	100(63,06- 100)	+++	<0,0001

IDRM: intra dermo reação de Montenegro; LM: leishmaniose mucosa; CE: controles de área endêmica; OG: controles com outras granulomatoses  
VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

### V.3. ANÁLISE DA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) EM AMOSTRAS DE SWAB NASAL PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE MUCOSA.

Analisou-se ainda o valor do teste de PCR para diagnóstico de LM em amostras de swab nasal (Tabela 5). Para o PCR foram utilizados dois tipos de primers, 150/152 e LVB1, contendo sequências de DNA do parasita. Foram utilizados como controles negativos pacientes com outras patologias nasais, conforme descrito na tabela 1. Com o uso do primer 150/152 obteve-se sensibilidade de 67% (IC 95%: 29,9-92,5) e especificidade de 100% (IC 95%: 78,2-100), (p= 0,0006). A utilização do primer LVB1 mostrou menor sensibilidade (55% com IC 95%: 21-86) mantendo-se a especificidade de 100% (IC 95%: 78-100) (p = 0,003)(Tabela 5).

**Tabela 5- Análise comparativa do teste de PCR em amostras de swab nasal de pacientes com leishmaniose mucosa e controles com outras patologias nasais, utilizando-se dois primers**

Primer	LM		OPN		Sensibilidade % (IC)	Especificidade % (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Valor de P
	+	-	+	-					
<b>150/152</b>	6	3	0	15	67 (29,9-92,5)	100 (78,2-100)	100 (54- 100)	83 (58- 96)	0,0006
<b>LVB1</b>	5	4	0	15	55 (21-86)	100 (78-100)	100 (47- 100)	78 (54- 93)	0,003

LM: leishmaniose mucosa; OPN: outras patologias nasais; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

## VI. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigadas novas estratégias para aprimorar o diagnóstico da LM envolvendo o uso de IDRMs e do PCR de swab nasal. Comparando resultados de IDRMs de pacientes com LM e de controles sadios da área endêmica ou portadores de outras granulomatoses nasais identificamos maior reação de hipersensibilidade tardia na LM. A utilização do valor de endurecimento maior que 9mm como ponto de corte para teste positivo em pacientes com LM aumentou a especificidade da IDRMs para o diagnóstico de LM. Pacientes com LM parecem desenvolver uma resposta imunológica exacerbada frente ao parasita, o que parece contribuir para o desenvolvimento das lesões mucosas (Passos et al., 2001; Maurer-Cecchini et al., 2009). Esse fato pode justificar as diferenças observadas na resposta de hipersensibilidade tardia observada nesse trabalho. Apesar de não ter sido identificada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com LM e LC, há uma tendência a maiores valores de IDRMs no primeiro grupo em relação ao segundo. A ampliação do número de casos de LM poderá mostrar diferenças estatisticamente significativas entre esses grupos.

Os pacientes com LT residem em sua maioria em áreas rurais, com difícil acesso à assistência médica especializada como avaliação otorrinolaringológica. Muitas vezes o diagnóstico de LM é estabelecido baseado nas queixas clínicas e no resultado positivo do teste de IDRMs. Isso tem resultado em frequentes erros diagnósticos e como consequência tratamento inadequado dos pacientes (Boaventura et al., 2006). Com base nos resultados apresentados o estabelecimento de um valor de corte acima de 9mm para IDRMs positiva em pacientes com suspeita de LM poderia ajudar na triagem, reduzindo o número de pacientes que necessitariam de avaliação por especialista, e evitando tratamentos incorretos.

Para que esse novo valor de IDRMs seja validado no diagnóstico de LM é necessário aumentar a amostra, incluindo casos de outras regiões e países, pois existem diferenças epidemiológicas que podem refletir-se.

A utilização de um novo ponto de corte, mais elevado, na IDRMs para o diagnóstico de LM mostrou-se vantajosa em aumentar a especificidade, sem representar elevação do custo aos serviços de saúde, já que a IDRMs é um ferramenta diagnóstica rotineiramente utilizada em casos de suspeita de leishmaniose.

Existe uma limitação quanto ao uso da IDRMs como ferramenta diagnóstica de leishmaniose, pois os extratos de antígeno de leishmania não são padronizados nos diferentes serviços, devido à inexistência de um protocolo padrão para sua preparação (Costa et al., 1996). Essa limitação está presente, inclusive nesse estudo, pois o antígeno utilizado nos pacientes que realizaram a reação na Fiocruz foi diferente do antígeno utilizado nos pacientes que realizaram a reação no Lacaen. O

antígeno utilizado na Fiocruz-BA foi testado por Costa et al. (1996), que não obteve diferença significativa nas médias de endureção utilizando 5 diferentes antígenos. Esses resultados estão de acordo com os dados de Mayrink et al. (1993), que empregou um clone de *L. amazonensis*. Já o antígeno utilizado no LACEN-Ba foi testado por Melo et al. (1977). Outra limitação do presente estudo é a falta de um grupo controle com doenças nasais que seja proveniente de área endêmica.

Quanto aos resultados das PCRs, o primer 150/152 mostrou-se mais sensível que o primer LVB1, devendo portanto ser o primer de escolha para a realização de PCR nos indivíduos com suspeita de LM. Ambos os primers apresentaram especificidade de 100%. O método de coleta das amostras para a realização do PCR através de swab nasal traz uma grande vantagem sobre a biópsia, por ser não invasivo, de fácil obtenção, não apresentar risco de sangramento ou infecção e ser menos doloroso, o que traz um conforto maior ao paciente. Boggild et al. (2011) compararam a PCR do swab nasal com a PCR realizada em biópsias nasais em 28 pacientes com suspeita de LM em Lima – Peru, e encontraram resultados discretamente inferiores de sensibilidade e especificidade: 91,3% e 90%, respectivamente para o swab e 95,7% e 100% para a biópsia. Compararam esses dados também com o padrão ouro: biópsia com histopatologia (21,7% de sensibilidade e 100% de especificidade), obtendo resultados de sensibilidade muito superiores com as PCRs. O swab que utilizaram foi semelhante ao utilizado nesse estudo, entretanto, utilizaram os primers MP1-L e MP3-H específicos para *Leishmania* subgênero *Viannia*. Oliveira et al. (2005) realizaram PCR em 35 biópsias de pacientes do Acre – Brasil, nas quais 34 (97%) foram positivas, encontrando 100% de especificidade. Os resultados de PCR em biópsia citados apresentaram sensibilidade e especificidade superiores aos encontrados na PCR do swab no presente estudo. Portanto, é necessária uma comparação entre esses dois métodos, utilizando amostras de swab e biópsia dos mesmos pacientes e realizando as reações nas mesmas condições para definir se há vantagem em utilizar um método sobre o outro.

Considerar a IDRМ positiva apenas se o valor for  $\geq 9$  mm em pacientes com suspeita de leishmaniose mucosa poderá evitar erros diagnósticos e assim reduzir o risco de realizar tratamentos desnecessários, cuja droga utilizada (antimoniato de N-metilglucamina – Glucantime®) apresenta efeitos colaterais que podem ser fatais nos pacientes se não acompanhados, além de ser uma droga cara, evitando-se custos também desnecessários. Seria também uma forma simples de melhorar a especificidade de um teste já utilizado na prática, sem representar aumento do custo financeiro. A PCR é uma ferramenta altamente sensível para o diagnóstico de LM (Oliveira et al. 2005), podendo ser realizada em amostras obtidas preferencialmente de forma não invasiva através do swab nasal, com redução de risco de sangramentos e infecção no local da biópsia, método com benefícios para o paciente por ser indolor. Além disso, também representaria redução de custos com material de biópsia, preocupação com descarte desse material e anestesia.

## VII. CONCLUSÕES

1. O valor maior que 9mm aumenta a especificidade da IDRM para o diagnóstico de LM, o que sugere que este seja um novo valor a ser considerado como ponto de corte para positividade.
2. O primer 150/152 tem maior sensibilidade que o primer LVB1 para o diagnóstico de LM, sendo mais indicado para a realização de PCR.
3. A PCR realizada em amostras de swab nasal é um método que apresenta alta sensibilidade e especificidade, e tem a vantagem sobre a biópsia por ser não invasivo.

## VIII. SUMMARY

Early diagnosis of mucosal leishmaniasis (ML) allows the correct treatment and prevents development of destructive lesions. However the diagnosis is usually established lazily. The clinical course is usually slow, with initial clinical presentation similar to various nasal granulomatous diseases. Moreover, the lack of a single diagnostic method with high sensitivity and specificity hampers diagnostic confirmation. In this scenario, we evaluate two new diagnostic alternative to ML. Nasal swab samples from patients with ML, cutaneous leishmaniasis (CL), and controls (normal volunteers and patients with other nasal diseases) were subjected to study PCR (Polymerase Chain Reaction) for detection of *Leishmania* DNA. In this test, two DNA primers (150/152 and LVB1) were compared, as sensitivity and specificity in detecting ML. Primers 150/152 and LVB1 showed respectively 67% and 55 % sensitivity and both showed 100 % specificity when analyzed patients with ML and other nasal pathologies. The other alternative diagnostic study was the establishment of a new cut-off point in the examination of Montenegro skin test (MST), modifying the criteria for positivity, aiming to increase the specificity of the test. Measurements in millimeters of MST of patients and controls were analyzed by ROC curve for detection of the point with greater sensitivity and specificity in the diagnosis of ML. MST value of 8.5 mm was identified as the best result for the diagnosis of ML compared to controls of endemic area (sensitivity of 95.8 % - CI = 78.8 to 99.9 and specificity of 96.92% - CI = 89.3 to 99.63) and the group with other nasal granulomatosis (sensitivity of 95.8 % - CI = 78.88 to 99.89 and specificity of 100% - CI: 59.04 to 100.0). For practical purposes the fractional value of 8.5 mm represent difficulty in measuring the exam, so we analyzed the approximate value of  $MST \geq 9$  mm as the cut-off for test positivity. In this case, the values of sensitivity and specificity when considered the control group endemic area, were approximately 94 % and 97 %, respectively. When considering the other nasal granulomatosis group as control, sensitivity and specificity were both 100 %. With these results we conclude that the value larger than 9mm increases the specificity of the MST for the diagnosis of ML, suggesting that this is the new value to be considered the cutoff for positivity; primer 150/152 has higher sensitivity for diagnosis of ML than primer LVB1, and must be chosen for the PCR; PCR performed on nasal swab samples is a method that has good sensitivity and specificity, and has the advantage over biopsies by being noninvasive.

Key words: 1. Mucosal leishmaniasis. 2. Diagnosis. 3. Montenegro skin test. 4. Polymerase chain reaction.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amato VS, Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*, 2003. 85(1): 39-49.
2. Arevalo J. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Leishmania sp.* 2011
3. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol*. 1999; 85(2): 181-7.
4. Barroso-Freitas AP, Passos SR, Moura-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, Nascimento LD, Marzochi MC, Marzochi KB. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009. 103(4): 383-9.
5. Barton RP. Importance of nasal lesions in early lepromatous leprosy. *Ann R Coll Surg Engl*. 1975; 57(6): 309-12.
6. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58(1): 102-9.
7. Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, Freitas LAR, Brodskyn C, Barral-Netto M and Barral A. Short report: concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(2): 267-69
8. Boaventura VS, de Oliveira JG, Costa JM, Novais FO, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Barral A. The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*, 2009; 81(3): 384-6.
9. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010; 40(10): 2830-6.
10. Boggild AK, Valencia BM, Veland N, Pilar Ramos A, Calderon F, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26395.
11. Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn CI, Bacellar O. Immunoregulation in leishmaniasis. *J Braz Ass Adv Sci*, 1994; 46: 441-5.
12. Celeste BJ, Sanchez MCA, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Costa FAL, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous,

- mucosal and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet] . 2014 mar. Disponível em: <http://ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0623>.
13. Costa CA, Toledo VPCP, Genaro O, Williams P, Mayrink W. Montenegro Skin Test - Evaluation of the Composition and Stability of the Antigen Preparation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91: 193-4.
  14. Costa JML, Netto EM, Masden PD. Acute Obstruction Due to Oedema of Larynx Following Antimony Therapy in Mussel Leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1986; 19(2): 109.
  15. Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97 Suppl 1: 115-33.
  16. DeShazo RD, O'brien MM, Justice WK, Pitcock J. Diagnostic criteria for sarcoidosis of the sinuses. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103(5 Pt 1): 789-95.
  17. DeShazo and Kemp. Allergic rhinitis: clinical manifestations, epidemiology and diagnosis. Mar 2014. *Em UoToDate* [Internet]. Filadélfia (PA): WoltersKluwer Health, 1992.
  18. Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, Diaz YR, Tellez JA, Saravia NG. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis*. 2009; 200(4): 638-46.
  19. Goto H and Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8(4): 419-33.
  20. Hautarzt. Diagnosis and therapy of mucous membrane pemphigoid. Results of the 1st International Consensus Conference. 2002. **53**(5): p. 371-2.
  21. Hwang and Getz. Acute sinusitis and rhinossinusitis in adults: clinical manifestations and diagnosis. Ago 2013. *Em UoToDate* [Internet]. Filadélfia (PA): WoltersKluwer Health, 1992.
  22. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 1995; 21(2): 123-52.
  23. Kuttikat A, Saeed T, Chopra B, Chopra S, Chakravarty K. Nasal Wegener's and skin sarcoid -a rare combination of two granulomatous diseases. *Clin Rheumatol*. 2006; 25(6): 895-7.
  24. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007; 73(6): 843-7.
  25. Llanos Cuentas EA. Estudo clínico evolutivo da leishmaniose em área endêmica de *L. braziliensis braziliensis* 1984:
  26. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(3): 231-40




27. Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JLM. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1984; 17: 179-86.
28. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80(6): 859-76.
29. Maurer-Cecchini A, Decuypere S, Chappuis F, Alexandrenne De Doncker S, Boelaert M, Dujardin JC, Loutan L, Dayer JM, Tulliano G, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Chizzolini C. Immunological determinants of clinical outcome in Peruvian patients with tegumentary leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Infect Immun*. 2009; 77(5): 2022-9.
30. Melo MN, Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Williams P, Araujo FG, Coelho MV, Batista SM. Standardization of the Montenegro antigen. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1977; 19(3): 161-4.
31. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, Café V, Barral-Netto M, Barral A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(1): 70-3.
32. Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JM, Barral A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop*. 2005; 94(1): 55-9.
33. Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CM, Falcão AL, Lima-Costa MF. Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989-1995). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(1): 5-12.
34. Pinero J, Martinez E, Pacheco R, Aragon Z, De Armas F, Del Castillo A, Valladares B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1999; 73(1): 21-9.
35. Rodgers MR, Popper SJ, and Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990; 71(3): 267-75.
36. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militão de Albuquerque M de F, Jardim ML, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(10): 3572-6.
37. Rottoli P, Bargagli E, Chidichimo C, Nuti D, Cintorino M, Ginanneschi C, Caruso G. Sarcoidosis with upper respiratory tract involvement. *Respir Med*. 2006; 100(2): 253-7
38. Sanguenza OP, Sanguenza JM, Stiller MJ, Sanguenza P. Mucocutaneous leishmaniasis: a clinicopathologic classification. *J Am Acad Dermatol*, 1993. 28(6): 927-32.

39. Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguin AF, Navas C, Palma G, Weigle KA. The relationship of *Leishmania brasiliensis* subespécies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1989; 159(4): 725-35
40. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araujo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez M de A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 2001; 96(7): 987-96.
41. Scott P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol.* 1985; 7(3): 277-88.
42. Sharma U and Singh S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis.* 2008; 45(4): 255-72.
43. Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *Plos One.* 2013; 8(6): e66110.
44. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2): 601-6.

## X. ANEXOS

### X.1. ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA</b></p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>								
<p><b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b></p> <p><b>Título da Pesquisa:</b> Avaliação da sensibilidade e especificidade de novos métodos para o diagnóstico de leishmaniose mucosa</p> <p><b>Pesquisador:</b> Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira</p> <p><b>Área Temática:</b></p> <p><b>Versão:</b> 4</p> <p><b>CAAE:</b> 18355513.6.0000.0040</p> <p><b>Instituição Proponente:</b> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA</p> <p><b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio</p>								
<p><b>DADOS DO PARECER</b></p> <p><b>Número do Parecer:</b> 484.908</p> <p><b>Data da Relatoria:</b> 28/11/2013</p> <p><b>Apresentação do Projeto:</b> A proponente solicita a inclusão da Santa Casa de Misericórdia da Bahia- Hospital Santa Izabel como Instituição co-participante neste projeto.</p> <p><b>Objetivo da Pesquisa:</b> Não se aplica.</p> <p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Não se aplica.</p> <p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Não se aplica.</p> <p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Não se aplica.</p> <p><b>Recomendações:</b></p> <p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Não existem pendências.</p> <p><b>Situação do Parecer:</b> Aprovado</p>								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="font-size: small;">Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121</td> <td style="font-size: small;">CEP: 40.296-710</td> </tr> <tr> <td style="font-size: small;">Bairro: Candeal</td> <td style="font-size: small;">Município: SALVADOR</td> </tr> <tr> <td style="font-size: small;">UF: BA</td> <td style="font-size: small;">E-mail: cep@bahia.fiocruz.br</td> </tr> <tr> <td style="font-size: small;">Telefone: (71)3176-2327</td> <td style="font-size: small;">Fax: (71)3178-2285</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710	Bairro: Candeal	Município: SALVADOR	UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br	Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3178-2285
Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710							
Bairro: Candeal	Município: SALVADOR							
UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br							
Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3178-2285							
Página 01 de 02								
<div style="text-align: center; padding: 10px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA</b></p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div> <p style="font-size: x-small; margin-top: 5px;">Continuação do Parecer: 484.908</p> <p><b>Necessita Apreciação da CONEP:</b> Não</p> <p><b>Considerações Finais a critério do CEP:</b></p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">SALVADOR, 09 de Dezembro de 2013</p> <hr style="width: 20%; margin: 10px auto;"/> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">Assinador por: Adriana Lantfredi Rangel (Coordenador)</p> </div>								

## **X.2. ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos \_\_\_\_\_(nome do paciente)\_\_\_\_\_a participar deste estudo que é uma pesquisa e que tem por objetivo avaliar o valor de dois novos exames no diagnóstico de leishmaniose mucosa. A participação neste estudo é voluntária e não remunerada e não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento ou tratamento caso não queira participar. Você responderá a um questionário com perguntas sobre a sua doença e possíveis vias e contaminação; Está prevista a utilização de uma amostra do soro que é obtido do sangue retirado para exame diagnóstico habitual de leishmaniose. Além disso, será realizada a coleta de secreção nasal utilizando uma haste semelhante a um cotonete. Ao final do estudo as amostras serão descartadas ou armazenadas no laboratório, respeitando a legislação vigente. Os resultados serão considerados confidenciais, serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. A doutora Viviane Boaventura discutiu comigo esta informação e colocou-se a disposição para outras perguntas através do telefone – (71) 3176-2286 ou no endereço – FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz- Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Caixa Postal 701- CEP – 40296-710. Salvador-Bahia. Você também poderá entrar em contato com o comitê de ética que julgou esse estudo (Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz - Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Tel – 3176-2385), cujo endereço está representado acima. Todos os resultados serão considerados confidenciais e serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. Os resultados dos exames realizados para a confirmação diagnóstica serão disponibilizados ao paciente. Os laudos serão entregues impressos na consulta médica entre sete e 30 dias após a realização.

A sua participação neste estudo é voluntária e você está livre para recusar participar ou se retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que deverá receber.

Você receberá uma cópia desse formulário.

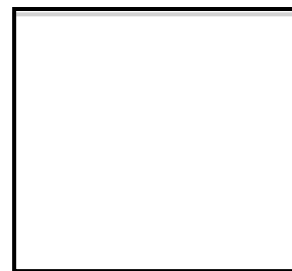
Caso autorize o armazenamento de amostras para utilização em pesquisas futuras favor assinalar abaixo:

( ) SIM, autorizo                      ( ) NAO autorizo

Caso autorize acesso aos dados do seu prontuário em pesquisas futuras favor assinalar abaixo:

( ) SIM, autorizo                      ( ) NAO autorizo

Pelo presente consinto voluntariamente em participar deste estudo.



---

Ass. e RG do Voluntário

---

Ass. e RG do Médico