

Ciro Martins Gomes

Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, *swab* nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

Brasília -DF

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1015882.

G633a Gomes, **Ciro Martins**.
Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana : estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise / **Ciro Martins Gomes**. -- 2014.
xiv, 122 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Saliva. I. Sampaio, Raimunda Nonata Ribeiro. II. Título.

CDU 616.993.161

Ciro Martins Gomes

Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, *swab* nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora:

Presidente:

Professora Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Universidade de Brasília - UnB

Membros:

Professor Dr. Marco Tulio Antonio García-Zapata
Universidade Federal de Goiás - UFG

Professora Dra. Izelda Maria Carvalho Costa
Universidade de Brasília - UnB

Professora Dra. Beatriz Dolabela de Lima
Universidade de Brasília - UnB

Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha
Universidade de Brasília - UnB

Suplente:

Dra. Carmen Dea Ribeiro de Paula
Hospital Universitário de Brasília - HUB

DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho à minha amada esposa
Leticia, aos meus pais Maria Luiza, Antônio
e a meu querido irmão Ricardo que estão
presentes nos momentos mais
importantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS:

À **Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio**, minha orientadora, fonte de inspiração e amiga pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelas horas de convivência agradável.

À **Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino**, pela ajuda, orientações e confiança incondicional depositada em mim. Sem seus ensinamentos e ajuda não teria sequer iniciado a pesquisa.

A **Natália Aparecida de Paula**, que me ensinou com empenho as técnicas de biologia molecular. Pela imensa paciência e pelos bons momentos que passamos durante a pesquisa.

À **Profa. Dra. Izelda Maria Carvalho Costa**, pelos ensinamentos como professora de graduação, até os dias atuais pela disposição e auxílio no atendimento dermatológico.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Afonso Teixeira**, que me introduziu e despertou meu primeiro interesse pela pesquisa médica.

Ao **Prof. Rubens Marcelo Souza Leite**, por ser grande fonte de inspiração, amigo e pelos ensinamentos em relação aos trabalhos científicos.

À **Dra. Gladys Aires Martins**, pelos ensinamentos e auxílio nas palestras em francês e pelas viagens a congressos ao redor do mundo.

À **Profa. Dra. Carmen Déa Ribeiro de Paula**, pela presença sempre marcante em meus primeiros passos como dermatologista e pelo auxílio nos serviços prestados no Hospital Universitário de Brasília.

Aos colegas de laboratório **Viviane Medeiros e Tércio Rodrigues** pelos auxílios nos experimentos parasitológicos e de biologia molecular.

Aos colegas de pós-graduação **Claudinei Pimenta, Jefferson Bruno e Ada Urdapilleta** pelos bons momentos e pelo aprendizado em conjunto.

A **Aline Rafaela, Aline Lobo, Aline Turatti** e toda equipe do Laboratório de Dermatologia da USP-Ribeirão Preto pela disponibilidade e auxílio com os experimentos de biologia molecular.

A **Mariana Vicente Cesetti**, pelo auxílio na submissão ao comitê de ética em pesquisa e coleta das amostras.

A **Orlando Oliveira de Moraes**, pelo auxílio na redação de artigos científicos.

A **Paulo Eduardo Nunes Barroso e Regina Maria Fernandes Barroso** pelo auxílio e disponibilidade nos momentos mais conturbados.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ** pelo financiamento do projeto que propiciou introdução de técnicas de biologia molecular para o laboratório de dermatomicrologia da Faculdade de Medicina da UnB.

A **Fabiana Damasco, Elisa Santos, Sebastián Vernal, Fabrício Theodoro, Adriana Santos** pelo auxílio com a revisão sistemática da literatura.

Ao Hospital Universitário de Brasília, pelos 5 anos em que passei nesta instituição aprendendo dermatologia, com a possibilidade de curar e dar conforto ao próximo.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

RESUMO:

Introdução: A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) aumenta a sensibilidade do diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA), especialmente na forma mucosa (LM). Teve-se por objetivo avaliar a acurácia dos resultados de PCR em amostras da mucosa nasal, oral e de saliva no diagnóstico da LM e da leishmaniose cutânea (LC). **Métodos:** Pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília foram incluídos de forma consecutiva em amostra de conveniência. Intradermoreação de Montenegro (IDRM), imunofluorescência indireta (IFI), *imprint* em lâmina, cultura, exame histopatológico e PCR em papel filtro da lesão foram utilizados em paralelo para alocação dos casos nos grupos de LM, LC e controles. As amostras mucosas avaliadas por PCR foram coletadas por *swab* nasal (SN), microtubo de 1,5mls (saliva) e esfregaço oral na forma de *imprint* em papel de filtro (PFO). Para a PCR, utilizou-se par de iniciadores que amplificam sequência de 120pb do DNA mitocondrial de *Leishmania spp.* Para a identificação do subgênero, empregou-se digestão pelas enzimas de restrição HaeIII e BsrI. Realizou-se ainda revisão sistemática da literatura com o objetivo de agregação com os dados encontrados na pesquisa clínica. **Resultados:** Foram incluídos 69 pacientes, sendo 17 (25%) com LM, 19 (28%) com LC e 33 (48%) controles. Para o diagnóstico da LM, em comparação aos controles, a melhor acurácia foi alcançada pela PCR do SN 86% (IC-95%=73,81-93,05), seguido da saliva 74% (IC-95%=60,45-84,13) e PFO 68% (IC-95%=54,19-79,24). As especificidades do SN e PFO foram completas, negativas em todos os controles sem LTA. Dois casos de LC tiveram SN e PFO simultaneamente positivos. A revisão sistemática da literatura resultou na inclusão de 14 referências. Análise dos dados por meta-análise, possível apenas para amostras de PCR de fragmento da lesão em 2 dos artigos selecionados, demonstrou uma sensibilidade de 70% (IC-95%=0,57-0,81), especificidade de 97% (IC-95%=0,89-1), e razão de chances de 40,34 (IC-95%=11,06-147,08) no diagnóstico da LM. Identificou-se *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 12 casos de LM e 11 casos da LC. Em apenas um caso de LC foi identificado o subgênero *Leishmania*. **Conclusões:** O SN demonstrou a melhor acurácia entre os exames de PCR na mucosa. Os resultados da PCR nas três formas de coleta nasal, oral e de saliva apresentaram maior especificidade que a IDRM e IFI. Estes mostraram ainda sensibilidade comparável aos exames de cultura e *imprint* em lâmina, com a vantagem da coleta menos invasiva.

Palavras chave: Leishmaniose Cutânea; Leishmaniose Mucocutânea; Reação em Cadeia da Polimerase; Saliva; Diagnóstico.

ABSTRACT:

Introduction: The technique of polymerase chain reaction (PCR) increases the sensitivity of the etiological diagnosis of american cutaneous leishmaniasis (ACL), especially in the mucocutaneous form (MCL). The aim of the study was to evaluate the accuracy of PCR in the nasal cavity, oral mucosa and saliva in the diagnosis of MCL and cutaneous leishmaniasis (CL). **Methods:** Patients attending the University Hospital of Brasilia were consecutively included in a convenience sample. Montenegro skin test (MST), indirect immunofluorescence (IIF), smear, culture, histopathology and PCR from filter paper imprints of lesion biopsy (FPIL) were used in parallel for allocation in groups of MCL, CL and controls. Mucosal samples evaluated by PCR were collected by nasal *swab* (NS), 1.5mls microtubes (saliva) and oral filter paper imprints (OFPI). The *primers* used resulted on a 120-bp sequence present in the mitochondrial DNA of *Leishmania spp.* Digestion with the restriction enzymes HaeIII and BSR1 were used for subgenus identification. A systematic review of the literature was conducted with the goal of aggregation with data found in the present clinical research. **Results:** 69 patients were included, 17 (25%) with MCL, 19 (28%) with CL and 33 (48%) controls. For the diagnosis of MCL, compared to controls, the best accuracy was achieved by NS 86% (95%CI=73.81-93.05), followed by saliva 74% (95%CI=60.45-84.13) and OFPI 68% (95%CI=54.19-79.24). The specificity of the NS and OFPI were complete, negative in all controls without ACL. Two cases of isolated CL showed positivity for both NS and OFPI. The systematic review of the literature resulted in the inclusion of 14 previous references. Analysis of aggregated data by meta-analysis, possible only for tissue samples in 2 of the previously selected articles showed a sensitivity of 70% (IC-95%=0.57-0.81), a specificity of 97% (IC-95%=0.89-1) and an odds-ratio of 40.34 (IC-95%=11.06-147.08) in the diagnosis of MCL. We identified the *Leishmania* subgenus *Viannia* in 12 cases of MCL and in 11 cases of CL. In only one case of CL the subgenus *Leishmania* was identified. **Conclusions:** NS showed the best accuracy among the PCR tests in the mucosa. PCR results in all three forms of nasal, oral and saliva samples showed higher specificity than the MST and IIF. The methods also show a sensitivity comparable to culture and smears, with the advantage of a less invasive collection.

Key Words: Leishmaniasis, Cutaneous; Leishmaniasis, Mucocutaneous; Polymerase Chain Reaction; Saliva; Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Título:	página
Figura 1. Máximo postal.....	16
Figura 2. Distribuição geográfica dos casos de LTA no Brasil.....	17
Figura 3. Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> no território nacional.....	20
Figura 4. Leishmaniose cutânea.....	21
Figura 5. Leishmaniose cutânea disseminada.....	22
Figura 6. Leishmaniose mucosa.....	23
Figura 7. Intradermorreação de Montenegro.....	26
Figura 8. Imunofluorescência indireta.....	27
Figura 9. Exame direto	28
Figura 10. Cultura.....	30
Figura 11. Circuito de eletroforese.....	32
Figura 12. Registro da revisão sistemática da literatura.....	38
Figura 13. PCR em tempo real.....	50
Figura 14. Visualização em gel de agarose.....	52
Figura 15. Visualização em gel de acrilamida.....	53
Figura 16. Resultado do cálculo amostral realizado no ambiente OpenEpi® Version 3...54	
Figura 17. Cálculo amostral - casos.....	55
Figura 18. Cálculo amostral - controles.....	56
Figura 19. Fluxograma de inclusão.....	60
Figura 20. Correlação entre tempo de evolução da leishmaniose cutânea e intradermorreação de Montenegro	62
Figura 21. Imagem de videonasofibroscopia em casos de leishmaniose mucosa e cutânea.....	68
Figura 22. Fluxograma de seleção e inclusão dos artigos.....	70
Figura 23. QUADAS.....	76
Figura 24. Fluxograma da meta-análise e estudo clínico.....	78
Figura 25. Gráficos floresta para avaliação da heterogeneidade	80
Figura 26. Gráfico floresta com agregação dos dados de sensibilidade.....	81
Figura 27. Gráfico floresta com agregação dos dados de especificidade.....	81
Figura 28. Gráfico floresta com agregação dos dados de razão de chances.....	81

Figura 29. Curva SROC.....	82
Figura 30. Relação entre o tamanho amostral e a diferença mínima entre a precisão dos exames.....	86

LISTA DE TABELAS:

Título:	página
Tabela 1. Endereço virtual das fontes de busca para revisão sistemática da literatura....	39
Tabela 2. Ferramenta de análise crítica.....	41
Tabela 3. Ferramenta de análise crítica QUADAS.....	42
Tabela 4. Matriz para cálculo dos indicadores para os testes laboratoriais.....	42
Tabela 5. Número de casos (ou controles)	55
Tabela 6. Número exato de perdas.....	56
Tabela 7. Positividade de todos os exames realizados.....	61
Tabela 8. Características básicas dos casos de leishmaniose mucosa.....	63
Tabela 9. Leishmaniose mucosa X controles.....	64
Tabela 10. Leishmaniose mucosa X controles - Exames de alocação.....	65
Tabela 11. Leishmaniose mucosa X leishmaniose cutânea.....	66
Tabela 12. Leishmaniose cutânea X controles - Exames de alocação.....	67
Tabela 13. Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea e PCR positivo na mucosa.....	68
Tabela 14. Referências bibliográficas dos artigos selecionados após revisão sistemática.	71
Tabela 15. Características dos estudos selecionados.....	73
Tabela 16. Dados utilizados na criação da tabela 2x2.....	74
Tabela 17. Dados calculados após criação de tabela 2x2.....	75

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS:

- AMM - Amostras moleculares mucosas;
EH - Exame histopatológico;
HUB - Hospital Universitário de Brasília;
IDRM - Intradermorreaco de Montenegro;
IFI - Imunofluorescência indireta;
kDNA - DNA mitocondrial de cinetoplastos da *Leishmania*;
LC - Leishmaniose cutânea;
LM - Leishmaniose mucosa;
LTA - Leishmaniose tegumentar americana;
PCR - Reaco em cadeia da polimerase;
PFL - Imprint em papel filtro de biópsia da lesão;
PFO - Imprint em papel filtro da mucosa oral;
RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*;
RT-PCR - *Reverse transcriptase chain reaction*;
SN - *Swab* nasal;
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido;
UnB - Universidade de Brasília;
USP - Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil.

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO: REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA	15
1.1 HISTÓRICO.....	16
1.2. SITUAÇÃO ATUAL.....	17
1.3. DEFINIÇÃO DE CASOS.....	18
1.4. CRITÉRIOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	19
1.5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	20
1.5.1. Leishmaniose Cutânea	20
1.5.2. Leishmaniose Cutânea Disseminada	21
1.5.3. Leishmaniose Cutânea Difusa	22
1.5.4. Leishmaniose Mucosa	22
1.5.5. Comprometimento Cutâneo na Leishmaniose Visceral	23
1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	23
1.6.1. Propriedades de um Teste Diagnóstico	23
1.6.2. Associação de Exames	24
1.7. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO.....	25
1.8. TESTES SOROLÓGICOS.....	26
1.9. EXAME DIRETO.....	28
1.10. EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	29
1.11. CULTURA.....	29
1.12. BIOLOGIA MOLECULAR.....	30
1.13. IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	33
1.14. PCR EM AMOSTRAS NÃO INVASIVAS.....	33
1.15. PREMISSAS.....	34
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MÉTODOS	37
3.1. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA.....	37
3.1.1. Revisão Sistemática da Literatura	38
3.1.2. Seleção dos Artigos	38
3.1.3. Análise dos Artigos Seleccionados	40

3.2. ESTUDO SOBRE A ACURÁCIA DA PCR NO SWAB NASAL, SALIVA E PAPEL FILTRO ORAL NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMETNAR AMERICANA.....	43
3.2.1. Local do Estudo.....	44
3.2.2. População Estudada.....	44
3.2.3. Exames Diagnósticos para Alocação.....	44
3.2.4. Critérios de Alocação no Grupo Leishmaniose Mucosa.....	44
3.2.5. Critérios de Alocação no Grupo Leishmaniose Cutânea.....	45
3.2.6. Critérios de Alocação no Grupo Controle.....	45
3.2.7 Critérios de Exclusão.....	45
3.2.8. Intradermoreação de Montenegro.....	46
3.2.9. Exame Histopatológico.....	46
3.2.10. <i>Imprint</i> em Lâmina para Microscopia.....	46
3.2.11. Cultura do Aspirado da Lesão.....	46
3.2.12. Imunofluorescência Indireta.....	47
3.2.13. <i>Imprint</i> de Biópsia de Lesão em Papel Filtro.....	47
3.2.14. Amostras Mucosas.....	47
3.2.15. Testes Iniciais.....	48
3.2.16. Escolha da Sequência Amplificadora.....	51
3.2.17. Identificação do Subgênero.....	53
3.2.18. Tamanho Amostral.....	54
3.2.19. Dados Incompletos.....	56
3.2.20. Análise Estatística.....	57
3.2.21. Ética.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1. ESTUDO SOBRE A ACURÁCIA DA PCR NO SWAB NASAL, SALIVA E PAPEL FILTRO ORAL NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMETNAR AMERICANA.....	58
4.1.1. Características Clínicas e Populacionais.....	59
4.1.2. Características dos Exames.....	60
4.1.3. Comparações: Desfecho Principal.....	64
4.1.4. Comparações: Desfechos Secundários.....	66
4.2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA.....	69

4.2.1. Resultado da Revisão Sistemática da Literatura	70
4.2.2. Resultado da Revisão Qualitativa e Sistemática dos Artigos Selecionados	72
4.3. META-ANÁLISE	77
4.3.1. Análise da Heterogeneidade dos Artigos	78
4.3.2. Criação de Gráfico Floresta com Agregação	80
5. DISCUSSÃO	83
5.1. SELEÇÃO E INCLUSÃO DOS PACIENTES.....	84
5.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O TAMANHO AMOSTRAL.....	85
5.3. DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	86
5.4. EXAMES DE ALOCAÇÃO (IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS).....	87
5.5. TEMPO DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA E POSITIVIDADE DOS EXAMES.....	88
5.6. AMOSTRAS MOLECULARES MUCOSAS NA LEISHMANIOSE MUCOSA.....	88
5.7. AMOSTRAS MOLECULARES MUCOSAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	90
5.8. OUTRAS COMPARAÇÕES.....	92
5.9. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA E META-ANÁLISE.....	92
6. CONCLUSÃO	94
6.1. CONCLUSÃO PRINCIPAL.....	95
6.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9. ANEXOS	113
9.1. ANEXO I.....	114
9.2. ANEXO II.....	115
9.3. ANEXO III.....	116

1. INTRODUÇÃO:

REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA

1.1. HISTÓRICO:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença descrita em tempos remotos. Esculturas em cerâmica da era pré-colombiana já retratavam casos de LTA (DO VALE; FURTADO, 2005). Apesar das evidências que apontam a leishmaniose como doença antiga, sua descrição só foi pormenorizada no início do século 20 com Wright que, em 1903, descreveu o botão do oriente. Nas Américas, trabalhadores responsáveis pela construção da estrada de ferro Noroeste em Bauru, São Paulo - Brasil, foram acometidos por uma epidemia de úlceras cutâneas. Nesta ocasião, Lindemberg e Carini & Paranhos, em 1909, descreveram, pela primeira vez, o agente etiológico da LTA (DO VALE; FURTADO, 2005).

Em 1912, foi comemorado o centenário da descoberta, por Gaspar Vianna, da ação do tártaro emético nas leishmanioses (Figura 1). Apesar da referida descoberta ter sido realizada há mais de um século, algumas questões perduram até os dias de hoje. Casos de resistência ao tratamento e toxicidade das drogas são preocupações atuais e pertinentes que mostram a necessidade do diagnóstico preciso da LTA.



Figura 1. Máximo postal: Selo e envelope comemorativos do cinquentenário das descobertas de Gaspar Vianna. Imagem gentilmente cedida e do acervo pessoal do Dr. Aluísio Queiroga.

1.2. SITUAÇÃO ATUAL:

O crescimento populacional desenfreado, nos países latino-americanos como o Brasil, gera inúmeras preocupações sanitárias e de saúde pública. A expansão das fronteiras urbanas é acompanhada pelo aparecimento de inúmeras patologias, anteriormente restritas às atividades rurais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A LTA é considerada uma doença negligenciada, em expansão. Tem transmissão vetorial e é causada por protozoário do gênero *Leishmania*. As espécies relacionadas com a forma tegumentar têm especial tropismo pela pele e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O diagnóstico da LTA consiste em uma tarefa difícil. O perfil geográfico da doença torna ainda mais complexo este processo. Os principais focos endêmicos da LTA localizam-se longe dos grandes centros urbanos, dificultando a realização dos exames subsidiários que necessitam de capacitação técnica (Figura 2). Tal fato é preocupante, já que o perfil de toxicidade das drogas existentes exige a identificação precisa do agente causal (WISE et al., 2012; LIMA et al., 2010; SAMPAIO, 2012).

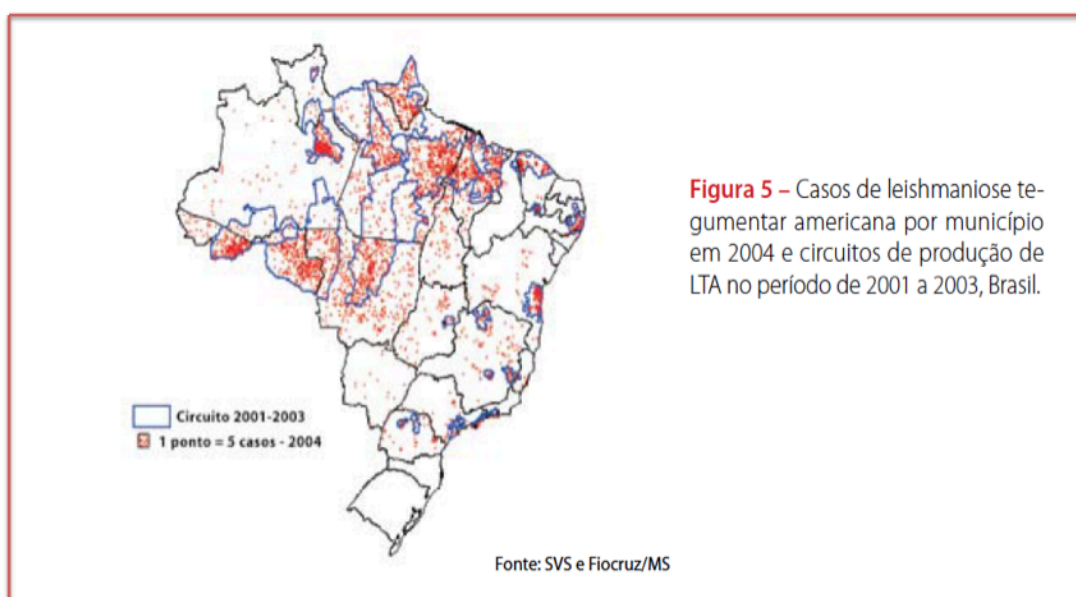


Figura 2. Distribuição geográfica dos casos de LTA: ano de 2004. (Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde - 2007)

Os critérios diagnósticos para LTA ainda não foram definidos de forma homogênea. Exames complementares que auxiliem esta ação são desejáveis (GOTO; LINDOSO, 2010). As principais estratégias diagnósticas utilizam a detecção da resposta imune celular ou humoral à infecção por *Leishmania*, somada ao encontro do parasita ou de seu material genético (ZAGHI et al., 2011). Os exames que detectam a resposta imune, geralmente, apresentam boa sensibilidade, mas especificidade insatisfatória. O inverso ocorre com os exames que objetivam visualizar o parasita, que apresentam alta especificidade e baixa sensibilidade (BOGGILD et al., 2007; FABER et al., 2003; RAHMAN; BARI, 2003; MOMENI et al., 2013; ROMERO et al., 2001). Estudos recentes apontam a biologia molecular como ferramenta promissora por agregar adequada sensibilidade e especificidade, mas com uso limitado pela necessidade de centros especializados para a realização da técnica (SILVA ET AL., 2012).

1.3. DEFINIÇÃO DE CASOS:

As seguintes definições de casos foram retiradas do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007):

Caso Suspeito:

Leishmaniose cutânea: indivíduo com presença de úlcera cutânea, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura.

Leishmaniose mucosa: indivíduo com presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração, ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios, palato e nasofaringe.

Caso Confirmado:

Critério clínico-laboratorial de leishmaniose cutânea e/ou mucosa - a confirmação dos casos clinicamente suspeitos deverá preencher no mínimo um dos seguintes critérios:

- residência, procedência ou deslocamento em/para área com confirmação de transmissão e encontro do parasita nos exames parasitológicos diretos e/ou indireto;
- residência, procedência ou deslocamento em/para área com confirmação de transmissão e intradermoreação de Montenegro (IRM) positiva;

- residência, procedência ou deslocamento em/para área com confirmação de transmissão com outros métodos de diagnóstico positivo.

Critério clínico-epidemiológico de leishmaniose cutânea e/ou mucosa – todo caso com suspeita clínica, sem acesso a métodos de diagnóstico laboratorial e com residência, procedência ou deslocamento em/para área com confirmação de transmissão. Nas formas mucosas, considerar a presença de cicatrizes cutâneas como critério complementar para confirmação do diagnóstico.

Caso Descartado:

Caso suspeito com diagnóstico laboratorial negativo ou caso suspeito com diagnóstico confirmado de outra doença.

1.4. CRITÉRIOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Coleta de dados sobre a procedência de casos suspeitos é a primeira etapa para o correto diagnóstico da LTA. O paciente deve ser indagado sobre as atividades de lazer, trabalho e *habitat*. A história de viagens a regiões endêmicas eleva a suspeita diagnóstica (FIELD et al., 2010). No entanto, são crescentes os relatos da transmissão urbana da LTA na América Latina (GIL et al., 2010).

A julgar pela epidemiologia das espécies encontradas, também pode-se tentar inferir uma relação entre a forma clínica da leishmaniose e o provável local de contágio. As espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* estão presentes em todo o território brasileiro em uma proporção de 80% e 20% dos casos, respectivamente, enquanto espécies como *L. (V.) guyanensis* estão restritas à região Norte do país (WEIRATHER et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) (Figura 3).

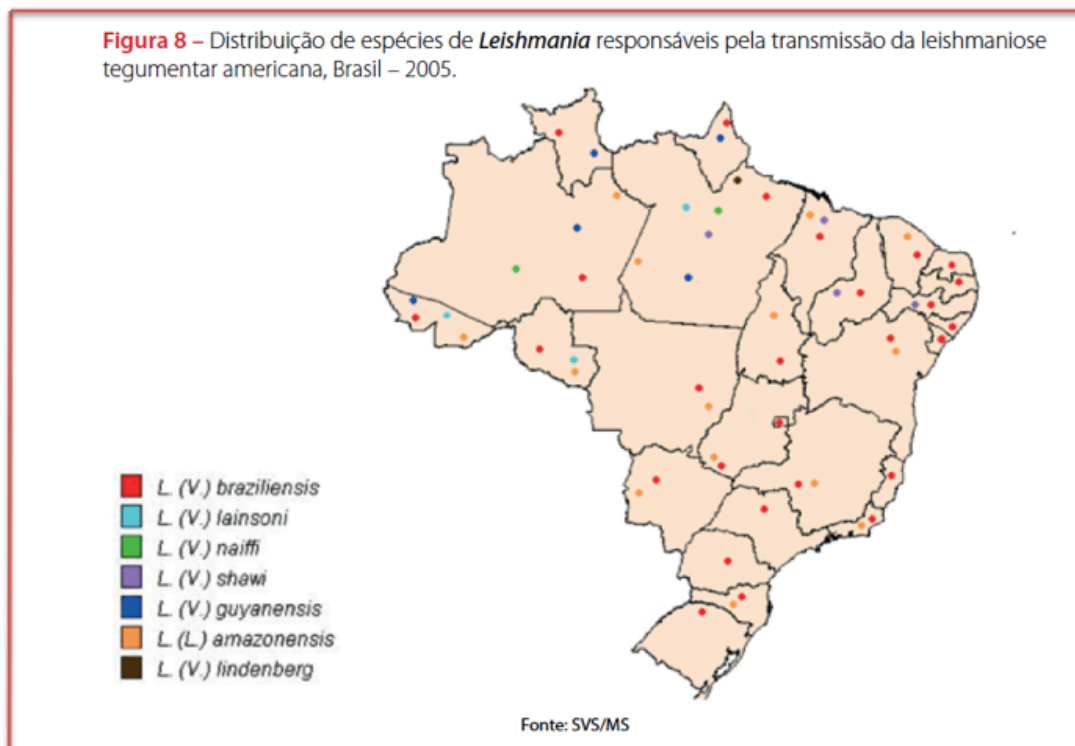


Figura 3. Distribuição das espécies de *Leishmania* no território nacional. (Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde - 2007)

1.5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

O termo LTA abrange amplo espectro de manifestações, influenciado por diversas características do hospedeiro e do agente causal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Considerando-se a área do tegumento afetada, a LTA pode ser classificada como cutânea, mucosa ou cutâneo-mucosa. Critérios adicionais como história clínica, tempo de evolução, distribuição, extensão das lesões e imunidade do hospedeiro definem as diversas variantes clínicas pormenorizadas a seguir (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

1.5.1. Leishmaniose Cutânea (LC):

A forma clínica mais comum de LTA consiste em úlcera indolor, de bordos elevados e fundo granuloso (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOMES et al., 2012) (Figura 4). A lesão localizada pode ainda apresentar-se como placa verrucosa e fazer diagnóstico diferencial com micoses profundas e micobacterioses, classicamente referidas pelo acrônimo PLECT

(paracoccidioidomicose, leishmaniose, esporotricose, cromomicose e tuberculose). O quadro localizado pode estar ainda associado a intensa linfangite, o que dificulta o diagnóstico diferencial com a esporotricose cutânea.



Figura 4. Leishmaniose cutânea: Dois casos de leishmaniose tegumentar americana atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília.

1.5.2. Leishmaniose cutânea disseminada:

A forma disseminada ocorre após proliferação da *Leishmania* por via hematogênica ou linfática, em indivíduos com relativa imunodeficiência celular (BARRAL et al., 1995). As lesões podem ser acneiformes, papulares, ulceradas em um número mínimo de 10 (Figura 5). O acometimento mucoso é comum (MACHADO et al., 2011). O quadro pode vir acompanhado de manifestações sistêmicas como febre, mal estar, mialgia e perda de peso (MACHADO et al., 2011).



Figura 5. Leishmaniose cutânea disseminada: Paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida atendido no Hospital Universitário de Brasília. Nota-se, inúmeras pápulas que caracterizam esta forma da doença.

1.5.3. Leishmaniose cutânea difusa:

A forma difusa da LTA é caracterizada por lesões extensas, em placas ou nodulares, que raramente ulceram (GUIMARÃES et al., 2009). Ocorre em pacientes com intradermoreação de Montenegro (IDRM) negativa e deficiência da resposta imune celular tardia (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2005). No Brasil, é causada pela *L. (L.) amazonensis* (FRANÇA-COSTA et al., 2012).

1.5.4. Leishmaniose mucosa (LM):

A forma mucosa pode surgir em indivíduos com a forma cutânea manejada inadequadamente, após disseminação hematogênica ou linfática do parasito (DE OLIVEIRA CAMERA et al., 2006). Fatores de risco considerados são a reduzida imunidade do hospedeiro, sexo masculino, lesões cutâneas primárias extensas, lesões acima da cintura pélvica, lesão primária com persistência maior que um ano e desnutrição (CASTELLUCCI et al., 2006).

A LM acomete principalmente o septo nasal anterior e pode cursar com alta morbidade, resultando em destruição das estruturas faciais e prejuízo funcional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) (Figura 6). Representa um desafio diagnóstico, sobretudo pela dificuldade de

obtenção de amostras biológicas para a realização de exames. A LM é preferencialmente causada pela *L. (V.) braziliensis* (MEDEIROS; SILVA; ROSELINO, 2008).



Figura 6. Leishmaniose mucosa: Paciente atendido no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília. Nota-se lesão infiltrada no palato.

1.5.5. Comprometimento cutâneo na leishmaniose visceral:

Os agentes causadores da leishmaniose visceral raramente provocam lesões cutâneas. No entanto, relatos sobre esta ocorrência vêm se tornando cada vez mais corriqueiros (ROSELINO et al., 2008). A associação mais frequente consiste na denominada leishmaniose cutânea pós-Kala-azar, onde há o acometimento cutâneo após o tratamento da leishmaniose visceral. (BARI, 2012) Pacientes imunossuprimidos podem apresentar lesões cutâneas causadas por espécies viscerotrópicas tanto de forma isolada, quanto em associação com o acometimento visceral.

1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL:

1.6.1. Propriedades de um teste diagnóstico:

Os exames subsidiários para diagnóstico da LTA sofrem influência de propriedades inerentes a qualquer teste diagnóstico. É de suma importância o conhecimento destas características (PEREIRA, 2000):

- Sensibilidade: Proporção de exames positivos entre todos os portadores da doença. Pode ser ainda vista como a probabilidade de um teste ser positivo na existência da doença. No caso de um teste de sensibilidade alta, os exames negativos são altamente confiáveis, no entanto, pode haver alta proporção de falso positivos (PEREIRA, 2000).

- Especificidade: Proporção de exames negativos entre todos os pacientes sem a doença. Pode ser ainda vista como a probabilidade de um teste resultar negativo na ausência da doença. Um teste de especificidade alta pode apresentar alta proporção de falso negativos, mas resultados positivos costumam ser confiáveis (PEREIRA, 2000).

Testes sensíveis são utilizados para *screening* populacional, em doenças raras, doenças com pouco tempo de evolução. São ainda preferíveis em casos de doenças graves, onde resultados falso negativos serão muito lesivos (PEREIRA, 2000).

Testes específicos são úteis em doenças com alto impacto social, onde resultados falsamente positivos podem ser muito lesivos, ou quando o tratamento envolver riscos importantes. Pode ser ainda usado como exame complementar para confirmação diagnóstica (PEREIRA, 2000).

- Valor preditivo positivo: Refere-se à proporção de paciente com resultados verdadeiramente positivos, entre todos os resultados positivos. Pode ser considerado como a probabilidade da doença estar presente em um teste que resultou positivo (PEREIRA, 2000).

- Valor preditivo negativo: Refere-se à proporção de pacientes com resultados verdadeiramente negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Pode ser ainda considerado a probabilidade da doença estar ausente em um exame que resultou negativo (PEREIRA, 2000).

- Acurácia: Mede a exatidão de um teste diagnóstico, leva em consideração e pondera as medidas de sensibilidade e especificidade. Mede o quanto determinado exame se aproxima de um padrão ouro para o diagnóstico da doença (PEREIRA, 2000).

1.6.2. Associação de exames:

Em função da ausência de um teste padrão ouro no diagnóstico da LTA, é importante citar algumas estratégias de associação de exames diagnósticos:

- Exames em série: A realização de testes em série é geralmente utilizada quando estes apresentam pequena especificidade, quando realizados isoladamente. Neste caso, após

a observação de um exame positivo, realiza-se um novo teste confirmatório. Este procedimento visa aumentar a especificidade e o valor preditivo positivo do teste.

- Exames em paralelo: São utilizados em situações onde necessita-se de um diagnóstico rápido, em detrimento ao custo mais elevado para realização de dois exames ao mesmo tempo. Esta estratégia resulta no aumento da sensibilidade e do valor preditivo negativo do processo diagnóstico. Com base nestes conceitos discutiremos as propriedades dos principais exames utilizados no diagnóstico da LTA.

1.7. INTRADERMORREACÇÃO DE MONTENEGRO (IDRM):

A IDRM, também conhecida como teste cutâneo da leishmanina, é um exame que avalia a resposta de hipersensibilidade celular tardia. O teste consiste na injeção intradérmica de solução contendo formas promastigotas mortas de *Leishmania* (Figura 7). Tende a apresentar resultados positivos a partir de 3 meses da infecção, não tendo positividade frequente nas infecções agudas e formas anérgicas como a leishmaniose cutânea difusa. Resultado positivo é considerado quando do surgimento de pápula endurecida maior que 5mm após 48 horas da aplicação na face anterior do antebraço. É um exame de alta sensibilidade, de baixo custo e pouco invasivo. Estudos mostram sensibilidade altamente heterogênea que pode variar de 30% a valores próximos de 100%, diretamente proporcional ao tempo de evolução da doença (GARCIA, A. *et al.* 2005; REIS *et al.*, 2008). Apresenta especificidade também variável em torno de 75% (BOGGILD; RAMOS *et al.*, 2010). A relativa baixa especificidade pode ser explicada pela grande quantidade de resultados falso positivos em casos de infecção inaparente e pela reação cruzada com algumas patologias a exemplo da doença de Chagas, micoses subcutâneas, tuberculose e hanseníase virchowiana, bem como por falha técnica (PINEDA *et al.*, 2011). A medição costuma ser realizada com caneta esferográfica que parte da pele são até a região endurecida. Alguns autores propuseram a documentação do resultado desenhado com caneta esferográfica e subsequente aplicação de papel embebido em álcool (FAGUNDES *et al.*, 2012). Desta forma, espera-se documentar o resultado do exame de forma mais fidedigna e facilitar o registro do mesmo em prontuário médico.



Figura 7. Intradermorreação de Montenegro: Leitura da intradermorreação de Montenegro 48 horas após aplicação do teste. Nota-se pápula endurecida no centro da marcação.

1.8. TESTES SOROLÓGICOS:

Existem inúmeros testes sorológicos para o diagnóstico da LTA. Entre eles podemos citar a imunofluorescência indireta (IFI), o teste imunoenzimático (ELISA) e imunoblotting (Western Blot) (Figura 8). A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos apresentam grande variabilidade a depender da técnica utilizada e da forma clínica abordada. Tendem a apresentar resultados positivos a partir de 3 meses do início da forma cutânea. A IFI e o ELISA apresentam uma sensibilidade amplamente variável, que compreende desde resultados baixos em torno de 30%, até próximos a 100%, a depender de inúmeros fatores, incluindo a espécie envolvida. (REIS et al., 2008; SZARGIKI et al., 2009; POMARES et al., 2012). Estes testes são mais sensíveis em infecções causadas pela *L. (V.) braziliensis* em comparação à doença causada pela *L. (L.) amazonensis* (SZARGIKI et al., 2009).

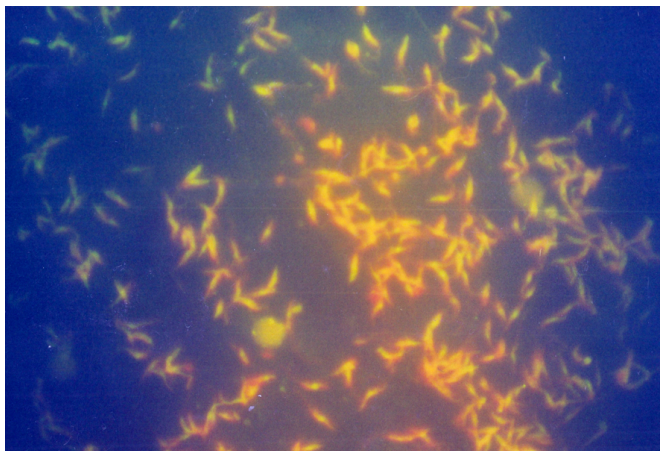


Figura 8. Imunofluorescência indireta: Visualização da fluorescência de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensibilizadas por anticorpos humanos.

O uso do Western Blot para o diagnóstico sorológico da leishmaniose agrega maior sensibilidade, por vezes próxima a 100%. No entanto, trata-se de técnica mais dispendiosa e que requer maior estrutura laboratorial, dificultando sua implementação como rotina (POMARES et al., 2012).

Pelo exposto anteriormente, alguns autores consideram os exames sorológicos como de utilidade limitada no diagnóstico da LTA (POMARES et al., 2012; ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007). No entanto, podem atuar como um complemento ao exame clínico e outras provas disponíveis. São exames de coleta pouco invasiva, mas que apresentam reações cruzadas com outras condições, a exemplo da doença de Chagas, paracoccidioidomicose, pêfigo foliáceo, micoses profundas, justificando sua baixa especificidade. Trata-se de uma ferramenta amplamente utilizada para estudos epidemiológicos.

Alguns autores advogam seu uso para o controle de cura, como ferramenta complementar ao exame clínico, uma vez que após o tratamento espera-se que seus valores permaneçam estáveis e até diminuam (ROMERO et al., 2005). Já o aumento de seus títulos deveriam despertar para a possibilidade de recidiva, dado a ser ponderado com a avaliação clínica, ainda considerada a principal forma de monitoramento da recidiva desta doença.

1.9. EXAME DIRETO:

A realização do exame direto apresenta diversas variações técnicas. Para coleta do material, algumas estratégias podem ser utilizadas como raspagem por bisturi ou por escovas, aspiração por agulha, *imprint* em lâmina de fragmentos excisados e lavagem da mucosa oral ou nasal (DANESHOD et al., 2011; HOSSEINZADEH; OMIDIFAR, 2012). Colorações como Wright, Giemsa e Papanicolau podem ser utilizadas (Figura 9).

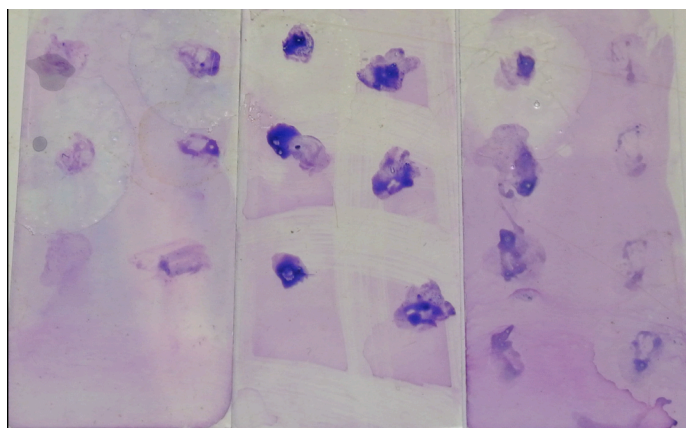


Figura 9. Exame direto: *Imprint* em lâmina para microscopia de fragmentos excisados em caso suspeito de leishmaniose tegumentar americana. Observa-se o corante pela técnica de Giemsa demarcando o material coletado.

O exame direto apresenta a vantagem do baixo custo e quando positivo confirma o diagnóstico, representando ferramenta útil na instalação de tratamento precoce. Apresenta sensibilidade extremamente variável, entre 15 a 90%, a depender do tempo de lesão, considerada relativamente baixa após 3 meses de evolução, nas formas crônicas e hiperérgicas de LTA (SZARGIKI et al., 2009; BOGGILD; RAMOS et al., 2010; REIS et al., 2008). Apesar de ser um método que depende da experiência do examinador, tem uma especificidade quase completa, já que o achado de formas amastigotas praticamente confirma o diagnóstico (BOGGILD; RAMOS et al., 2010). Poucos dados referentes à influência dos variados tipos de coleta estão disponíveis. Estudo recente mostra maior sensibilidade da citologia por aspirado de agulha (89%), quando comparado à raspagem por lâmina de bisturi (80%) com resultados estatisticamente significativos. A especificidade dos dois métodos permaneceu semelhante (HOSSEINZADEH; OMIDIFAR, 2012).

1.10. EXAME HISTOPATOLÓGICO:

O exame histopatológico (EH) é um dos exames subsidiários mais utilizados na dermatologia. O material a ser examinado deve ser, preferencialmente, extraído da borda ativa da lesão (AMEEN, 2010). O centro da lesão pode apresentar alterações reparativas cutâneas intensas, o que dificulta a identificação de parasitos. A visualização das formas amastigotas é difícil, principalmente nas lesões mucosas crônicas. As colorações especiais como o Giemsa ou Wright são utilizadas para este fim. Maior sensibilidade ao diagnóstico pode ser alcançada com o uso de técnicas de imuno-histoquímica ou imunocitoquímica (LUNEDO et al., 2011; GOTO; LINDOSO, 2010).

A visualização, em detalhes, das formas amastigotas, é uma tarefa difícil e requer intenso treinamento. Elementos fúngicos da histoplasmose ou parasitários da toxoplasmose, bem como artefatos, podem ser confundidos com as formas de *Leishmania*, explicando a reduzida especificidade do teste (DANESHBOD et al., 2011). Os achados histopatológicos clássicos consistem em reação granulomatosa não específica, com infiltrado inflamatório predominante de plasmócitos e linfócitos. Pode ocorrer exuberante hiperplasia pseudoepiteliomatosa, o que gera diagnóstico diferencial com carcinoma espinocelular, patologia que frequentemente acomete pele e mucosas (VIANA et al., 2011) (Figura 9).

1.11. CULTURA:

Variações técnicas são descritas para o diagnóstico da LTA por cultura. Este procedimento pode ser realizado tanto *in vitro* por microcultivo ou cultura tradicional, quanto por inoculação em animais (*in vivo*). Algumas das técnicas para cultura *in vitro* consistem em semear o material em fase sólida Neal, Novy, Nicolle (NNN) ou em meio líquido como o Schneider's (Figura 10). A sensibilidade da cultura tradicional pode variar de 40 a 75% e apresenta uma especificidade quase completa, uma vez que a visualização da forma promastigota semeada é característica (AMEEN, 2010; BOGGILD; RAMOS et al., 2010). Aspiração da borda da lesão por agulha pode fornecer material para ser semeado nos meios referidos acima (ROMERO et al., 1999; PAVLI; MALTEZOU, 2010).

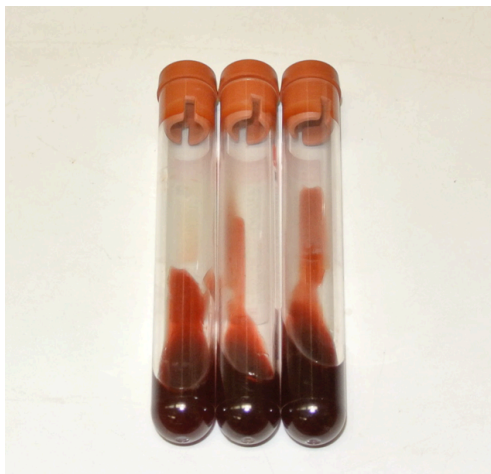


Figura 10. Cultura: Aspirado de lesão semeado em meio de fase sólida Neal, Novy, Nicolle (NNN).

Novas técnicas de microcultivo vêm sendo desenvolvidas e demonstram maior acurácia diagnóstica que a cultura tradicional, além de necessitar menor período de incubação para conclusão do teste (em média 2 dias) (BOGGILD et al., 2007; BOGGILD et al., 2008). Parece ser um método menos dispendioso que a cultura tradicional, já que utiliza pequena quantidade do meio de cultura (ALLAHVERDIYEV et al., 2004). Apresenta a desvantagem de produzir pequena quantidade de formas promastigotas, dificultando a realização de novos experimentos (BOGGILD; RAMOS et al., 2010).

A cultura *in vivo* representa uma metodologia complexa, com risco de acidentes por inoculação e necessita de técnico experiente para sua realização. Trata-se de uma metodologia sujeita a impedimentos éticos e não é comumente realizada na rotina diagnóstica. Cabe ainda ressaltar que consiste em uma metodologia complementar importante, principalmente em casos duvidosos e para realização de pesquisas.

1.12. BIOLOGIA MOLECULAR:

O uso da biologia molecular no diagnóstico das leishmanioses é considerado método promissor, pois alia sensibilidade e especificidade concomitantemente altas em comparação aos outros testes descritos (SILVA et al., 2012). Deve-se considerar, porém que se trata de uma técnica não disponível na maioria dos centros de referência.

Inúmeras variações estão presentes quando citamos as técnicas de biologia molecular. Dentre elas são variáveis as formas de extração do DNA, amplificação do material genético e

sua visualização. Estas características transformam a biologia molecular em um espectro de técnicas combinadas, com um principal alicerce na amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Diversos tipos de amostra podem ser utilizados na extração de material genético. Podemos citar fragmentos de biópsia incisional fresca, congelada ou em bloco de parafina; além de amostras não invasivas obtidas por escarificação da lesão. Outras técnicas descritas como o *imprint* da lesão em papel filtro têm a vantagem do fácil armazenamento até o momento da extração do DNA e realização do exame (ROSELINO, 2008; MIRANDA et al., 2012; DA GRAÇA et al., 2012). Após a coleta, o DNA da amostra pode ser extraído das células por diferentes técnicas laboratoriais, inclusive com o uso de kits disponíveis comercialmente.

Após o processo de extração, todo o DNA existente na amostra está purificado, idealmente livre de proteínas e de reagentes contaminantes. A quantidade obtida de DNA ainda é indetectável, sendo que para identificar vestígios do parasita é necessário que este DNA seja multiplicado (ROSELINO, 2008).

A multiplicação do DNA *in vitro* é obtida pela técnica da PCR, que consiste na replicação de pequenas quantidades de DNA por enzimas, em uma reação com mudanças cíclicas de temperatura. Este processo consiste em três fases descritas a seguir (ROSELINO, 2008; KIM; DE PAULA; ROSELINO, 2012):

1. A dupla fita de DNA extraída é separada em fitas simples a uma temperatura entre 92 a 96 graus Celsius, processo conhecido como desnaturação térmica. As fitas separadas serão o molde para a amplificação em cadeia de novas fitas.
2. Para ocorrer o início da amplificação na fita molde, são necessários oligonucleotídeos conhecidos como *primers* ou iniciadores, que se ligam a uma região alvo específica do DNA molde a uma temperatura entre 58 e 65 graus Celsius. Esta ligação será a sequência iniciadora para a amplificação em cadeia.
3. Por meio da enzima Taq DNA polimerase, ocorre a adição de novos nucleotídeos para a extensão da sequência iniciadora, até complementar as fitas simples, duplicando a amostra de DNA inicial.

Essas três etapas são repetidas várias vezes e, a cada ciclo, as novas moléculas replicadas também se tornam molde para novas amplificações, multiplicando de forma exponencial a quantidade de DNA. Estes atributos são responsáveis pela alta sensibilidade do método, mesmo com pequena quantidade inicial de DNA extraído.

A última etapa consiste na visualização do produto amplificado e sua comparação com controles previamente estabelecidos. Ao final da PCR, o DNA alvo está multiplicado. Para visualização desse resultado pode-se utilizar a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida por exemplo (Figura 11).

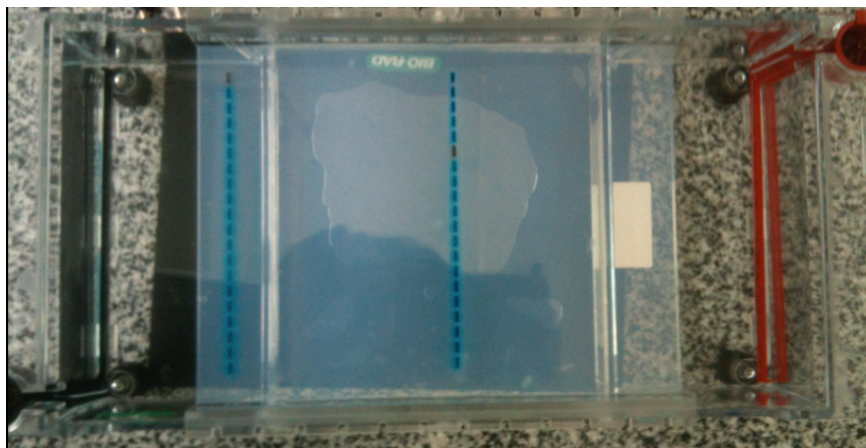


Figura 11. Circuito de eletroforese: Exemplo de circuito de eletroforese para revelação em gel de agarose a 2%. A corrente elétrica gerada do polo negativo (preto) ao polo positivo (vermelho) separa fragmentos amplificados de acordo com seu peso molecular. Técnica realizada no Laboratório de Dermatologia do Hospital das Clínicas - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto – São Paulo.

O exame apresenta taxa de detecção variável a depender das técnicas de coleta, extração, purificação e amplificação do DNA celular. A sensibilidade pode girar em torno de 60%, mas tende a alcançar valores maiores, por vezes próximos a 100% (MIRANDA et al., 2012 (DA GRAÇA et al., 2012). A especificidade também é considerada alta, reportada por diversos autores como em torno de 100% (YEHIA et al., 2012; AL-JAWABREH et al., 2006).

A adição de novas etapas ou variações técnicas à reação mencionada agregam outras propriedades à PCR. Estes avanços possibilitam novas ferramentas como a análise quantitativa do produto amplificado. A PCR em tempo real (Real-time qPCR) agrega propriedades adicionais à técnica mencionada. A progressão e quantidade do material amplificado são monitorados durante o processo de reação em cadeia, ou seja, em tempo real. Utilizam-se fluorocromos ou *probes* que se ligam ao DNA replicado e emitem fluorescência.

Com a progressão da reação ocorre aumento da fluorescência, o que possibilita a análise quantitativa do DNA.

1.13. IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE:

A biologia molecular também possibilita a identificação das espécies relacionadas à infecção. É um procedimento mais restrito aos centros de pesquisa, mas que pode ser extremamente útil. Inúmeras são as formas de identificação. *Iniciadores* com sequências espécie específicas podem ser utilizados na reação em cadeia descrita acima.

Ferramentas complementares à PCR também são úteis. A técnica denominada PCR-*restriction fragment length* (PCR-RFLP) é utilizada na confirmação de fragmentos de ácido nucleico amplificados pela técnica da PCR (YEHIA et al., 2012). Utilizam-se enzimas digestivas que irão cortar o DNA em sítios específicos, particulares a determinadas espécies. Desta forma, revela-se em gel o produto desta digestão, comparando-se com outros perfis moleculares já conhecidos.

Outros métodos moleculares como tipificação por enzimas *multilocus* e o sequenciamento do DNA podem auxiliar na identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (SCHÖNIAN; KUHL; MAURICIO, 2011). O sequenciamento genético, mais utilizado como ferramenta confirmatória, consiste em um método altamente dispendioso, restrito aos maiores centros de pesquisa, porém extremamente efetivo na identificação da espécie implicada (MEDEIROS; SILVA; ROSELINO, 2008).

1.14. PCR EM AMOSTRAS NÃO INVASIVAS:

A relativa alta acurácia da PCR, permite a realização do exame em amostras com pequena quantidade celular, possibilitando a utilização de coletas não invasivas e redução da dependência de amostras teciduais. Algumas referências utilizam estas técnicas para o diagnóstico das infecções, no entanto os dados existentes ainda são pouco conclusivos e pouco comparáveis. Materiais como raspados, citologias e fluidos corporais permitem aliar o fácil acesso às amostras e pequeno dano ao paciente (VELAND et al., 2011).

1.15. PREMISSAS:

Acredita-se que a coleta de amostras não invasivas aliada às técnicas de PCR com extração e amplificação otimizadas podem, satisfatoriamente, atuar como ferramenta complementar no diagnóstico da LTA. Espera-se ainda que, em casos particulares, onde a biópsia é contra-indicada, a análise de fluidos corporais e coletas citológicas possam adequadamente substituir a primeira.

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL:

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades diagnósticas (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia) da PCR em amostras coletadas por técnicas não invasivas no diagnóstico da LM e LC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1. Agregar conhecimentos sobre o diagnóstico molecular da LM por meio de pesquisa sistemática da literatura e evitar possíveis limitações relacionadas à raridade da doença;
- 2.2.2. Detectar a positividade da PCR em amostras mucosas de pacientes com LC e relacionar estes dados com implicações clínicas e terapêuticas.

3. MÉTODOS:

3.1. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

3.1.1 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA:

Os dados apresentados na introdução deste documento foram provenientes de revisão narrativa da literatura e, como indicado, demonstram grande variabilidade de resultados a depender da publicação em questão. Com o objetivo de maior conhecimento das evidências relacionadas ao diagnóstico molecular da LM, foi realizada uma revisão sistemática da literatura. O método também teve como objetivo gerar dados consistentes para comparação final por meio de meta-análise após agregação com dados da presente pesquisa clínica.

A presente revisão sistemática da literatura está registrada na plataforma PROSPERO - *International prospective register of systematic review* - University of York - York - Reino Unido (Figura 12).

Registration No. ↕	Title ↕	Status ↕	Submitted ↕	Updated ↕
CRD42014007038	Diagnostic accuracy of molecular techniques in mucocutaneous Leishmaniasis	Published	06/01/2014	06/01/2014

Figura 12. Registro da revisão sistemática da literatura: Referência do registro na plataforma PROSPERO da revisão sistemática literatura apresentada.

3.1.2. SELEÇÃO DOS ARTIGOS:

Em janeiro de 2013, foram gerados os seguintes termos "((((((mucosal) OR mucocutaneous) OR mucous)) AND leishmaniasis) AND diagnosis) AND Polymerase Chain Reaction", por meio do sistema de busca avançada do site Pubmed (PUBMED ADVANCED SEARCH BUILDER), seguindo normas internacionais para pesquisa de artigos sobre acurácia diagnóstica (DEVILLÉ et al., 2002). Foram recrutados dois pesquisadores, um especialista em dermatologia e outro em especialização em dermatologia para pesquisa de todas as referências relacionadas nas seguintes bases de dados ou bibliotecas virtuais Pubmed, EMBASE, Web of Knowledge, Scielo e LILACS (Tabela 1). A busca foi iniciada em janeiro de 2013 e finalizada em dezembro de 2013.

Tabela 1. Endereço virtual das fontes de busca para revisão sistemática da literatura: acessados para realização da pesquisa dos artigos relacionados.

Base de dados ou biblioteca virtual:	Link acessado:
Pubmed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
EMBASE:	http://aplicacao.periodicos.saude.gov.br/autenticar/profissional
Web of Knowledge:	http://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?highlighted_tab=UA&product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=4Dlh@39Jdd364KmNbFe&last_prod=WOS&highlighted_tab=UA&cacheurl=no
Scielo:	http://www.scielo.org/php/index.php
LILACS:	http://lilacs.bvsalud.org/

Os critérios de inclusão e exclusão dos artigos são pormenorizados a seguir:

Critérios de inclusão:

Foram selecionados e incluídos os artigos que completassem todas as seguintes características:

- Abordagem do tópico: diagnóstico, por técnicas de biologia molecular da leishmaniose mucosa;
- Trabalhos em humanos;
- Casos de leishmaniose mucosa associados ou não a lesões cutâneas;
- Mais de 7 casos de leishmaniose mucosa;
- Qualquer número de controles sem o diagnóstico de leishmaniose mucosa;
- Sem restrição para definição dos controles (sadios, com lesões mucosas ou cutâneas);
- Escritos em inglês, francês, português ou espanhol.

Crítérios de exclusão:

- Menos de 8 casos de leishmaniose mucosa;
- Estudos não controlados;
- Estudos que utilizam casos sabidamente curados de LTA como controles;
- Estudos em que a inclusão de pacientes com a forma cutânea e mucosa não fosse explicitamente separada;
- Exames de PCR extraídos de culturas de pacientes;
- Presença, apenas, de formas cutâneas exclusivas de LTA;
- Artigos escritos em línguas que não o inglês, francês, português ou espanhol.

Pelo relativo pouco tempo de existência de técnicas como PCR, não foi incluída restrição de ano de publicação no processo de seleção dos artigos. Não foram ainda incluídas restrições quanto aos critérios diagnósticos da LTA, motivo adicional de análise nesta revisão.

Acesso aos artigos foi viabilizado por meio do portal de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), em internet conectada à rede da Universidade de Brasília - UnB, a qual os colaboradores e pesquisador são vinculados e por contato direto com os autores por meio de e-mail pessoal.

Após pesquisa e revisão pelos referidos pares, discordâncias existentes foram sanadas pelo aval de um terceiro examinador, pós-graduando na área de LTA, cego para a identidade dos pesquisadores que realizaram a seleção prévia. Comunicação eletrônica foi enviada para todos os autores correspondentes dos artigos selecionados, indagando sobre o conhecimento de qualquer pesquisa publicada ou não que abordasse os critérios de interesse. As referências bibliográficas dos artigos pré-selecionados também foram verificadas em busca de novas pesquisas.

3.1.3. ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS:

A análise dos artigos foi realizada pelo pesquisador principal. A avaliação crítica foi realizada com base em duas estratégias. Em primeiro lugar o avaliador deveria preencher tabela previamente construída nesta pesquisa, com informações relevantes contidas nos artigos (Tabela 2). Em segundo lugar, deveria ainda completar e registrar as adequações à ferramenta QUADAS: *a tool for the quality assessment of studies of diagnostica accuracy included in systematic reviews* (WHITING et al., 2003) que consiste em 14 itens classificados

por três denominações: Sim, não e não está claro (Tabela 3). O pesquisador deveria ser capaz de construir uma tabela 2 x 2 completa com números absolutos, com base nas informações presentes nos artigos (Tabela 4). A impossibilidade de completar esta tabela implicou na exclusão do estudo.

Tabela 2: Ferramenta de análise crítica: criada pelo autor com base na revisão narrativa da literatura e aplicada na presente revisão sistemática.

QUESTÕES:

1. Houve cálculo amostral?
2. Local do estudo:
3. Data do Estudo:
4. Número de casos / Positividade do teste realizado:
5. Critérios de inclusão dos casos:
6. Número de controles / Positividade do teste realizado:
7. Critérios de inclusão dos controles:
8. Amostra estudada:
9. Método de extração do DNA:
10. Iniciadores utilizados para amplificação do material genético, localização da sequência genética alvo e peso molecular do material amplificado:
11. Método de revelação do material amplificado:
12. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e <i>odds ratio</i> do exame avaliado:
13. Espécies identificadas:

Tabela 3. Ferramenta de análise crítica QUADAS: *a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews.*

QUESTÕES:
1. O espectro dos pacientes que receberão o teste na prática foi representativo?;
2. Os critérios de seleção foram claramente descritos?;
3. O padrão-ouro definido tem qualidade suficiente para definir a condição/doença desejada?
4. O período entre a aplicação do padrão-ouro e o teste em avaliação foi curto o suficiente para que se tenha segurança de que não houve mudanças no estado de saúde do indivíduo testado?;
5. A totalidade da amostra ou subamostra randomizada realizou o diagnóstico pelo mesmo padrão-ouro?;
6. Os pacientes receberam o mesmo teste como padrão-ouro, independente do resultado obtido pelo teste em avaliação?;
7. O padrão-ouro foi independente do teste em avaliação (ex: o teste em avaliação não fazia parte do padrão-ouro)?
8. A execução do teste em avaliação foi descrita com suficientes detalhes, permitindo a sua replicação?;
9. A execução do teste padrão-ouro foi descrita com suficientes detalhes, permitindo a sua replicação?;
10. Os resultados do teste em avaliação foram interpretados sem o conhecimento dos resultados do teste padrão-ouro?;
11. Os resultados do teste padrão-ouro foram interpretados sem o conhecimento dos resultados do teste em avaliação?;
12. Os dados clínicos disponíveis para o laboratório foram os mesmos que são usados na prática?;
13. Os resultados indefinidos ou intermediários dos testes foram relatados?;
14. As perdas do estudo foram explicadas?

Adaptado de (WHITING et al., 2003) e (OLIVEIRA; GOMES; TOSCANO, 2011).

Tabela 4. Matriz para cálculo dos indicadores para os testes laboratoriais:

TESTE	PACIENTES COM LM	PACIENTES SADIOS	TOTAL
Positivo	a	c	a + c
Negativo	b	d	b + d
TOTAL	a + b	c + d	a + b + c + d

Legenda: a = Verdadeiros positivos, b = Falsos negativos, c = Falsos positivos, d = Verdadeiros Negativos; Sensibilidade: $S = a/a + b$, Especificidade: $E = d/c+d$, Valor preditivo positivo: $VPP = a/a + c$, Valor preditivo negativo: $VPN = d/b + d$, Acurácia: $A = a + d/a + b + c + d$.

3. MÉTODOS:

3.2. ESTUDO SOBRE ACURÁCIA DA PCR NO *SWAB* NASAL, SALIVA E PAPEL FILTRO ORAL NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:

3.2.1. LOCAL DO ESTUDO:

O recrutamento dos pacientes foi realizado no serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil no período de 01 de janeiro de 2012 a 30 de junho de 2013. Trata-se de um serviço de referência, onde os pacientes são encaminhados de unidades básicas de saúde para confirmação diagnóstica, após suspeita clínica de LTA. Os exames de *imprint* e cultura foram processados no Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da UnB. Os exames de IFI foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN-DF. Os exames de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

3.2.2. POPULAÇÃO ESTUDADA:

Foram incluídos, consecutivamente, em amostra de conveniência, por examinador cego ao verdadeiro diagnóstico, pacientes com quadro clínico compatível com LTA, posteriormente alocados em três grupos: 1 - Pacientes com diagnóstico de LM; 2 - Com diagnóstico de LC e 3 - Sem diagnóstico de LTA (controles).

3.2.3. EXAMES DIAGNÓSTICOS PARA ALOCAÇÃO:

Realizou-se inspeção das cavidades oral e nasal com auxílio da rinoscopia anterior. Nos pacientes com qualquer suspeita de lesão mucosa, obstrução nasal ou gotejamento pós-nasal, foi realizada videonasofibrosopia.

Em todos os pacientes, foi realizada coleta dos seguintes exames de inclusão em paralelo: IDRМ; IFI; EH com as colorações hematoxilina e eosina; Giemsa; Ziehl-Neelsen; coloração pela prata; cultura de aspirado da lesão em meio Neal, Novy, Nicolle (NNN); *imprint* em lâmina de microscopia corada pelo Giemsa e PCR em papel filtro de *imprint* de biópsia da lesão (PFL) (BOGGILD; VALENCIA et al., 2010; BOGGILD; RAMOS et al., 2011).

3.2.4. CRITÉRIOS DE ALOCAÇÃO NO GRUPO LM:

O diagnóstico da LM foi realizado em pacientes com evidencia de lesão mucosa. A confirmação foi dada pela positividade de dois exames de inclusão, (IDRM e IFI) ou de apenas um, se constatada positividade parasitológica em cultura, EH, *imprint* em lâmina ou PFL e pela ausência de qualquer outro diagnóstico diferencial investigado por cultura para

fungos e micobactérias, além das colorações especiais ao EH (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Os exames parasitológicos e EH foram coletados diretamente das lesões mucosas. Pacientes com lesões cutâneas e mucosas concomitantes foram incluídos no grupo LM.

3.2.5. CRITÉRIOS DE ALOCAÇÃO NO GRUPO LC:

O diagnóstico da LC foi realizado em pacientes com lesão de pele ativa, compatível com LTA (úlceras, pápulas, infiltração e outras), sem qualquer evidência de lesão mucosa. A confirmação foi dada pelos referidos exames de inclusão, seguindo os critérios mencionados anteriormente para alocação dos casos de LM, no entanto, os exames parasitológicos e EH foram coletados diretamente das lesões cutâneas.

3.2.6. CRITÉRIOS DE ALOCAÇÃO NO GRUPO CONTROLE:

A identificação dos controles sem LTA foi realizada em pacientes com doenças cutâneas e mucosas que simulam a LTA atendidos no mesmo ambulatório, alocados pela clara identificação do agente etiológico ou pela negatividade dos referidos exames de inclusão ou se apenas um exame fosse compatível, (IDRM e IFI) sem a presença de parasitos.

Neste grupo, não foram separados pacientes com lesões mucosas ou cutâneas, já que a LTA é uma doença mucocutânea e a simples suspeita do diagnóstico de LTA também suscita a suspeita de LM. Ademais, o intuito do uso de métodos de coleta pouco invasivos como SN, saliva e PFO, visa a substituição de técnicas que necessitem a visualização direta da lesão mucosa. Na prática, o médico que utilizar estes métodos não disporá de alternativas como videonasofibroscopia para visualizar a mucosa nasal, oral e orofaríngea com detalhes.

3.2.7. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos menores de 18 anos, pacientes com qualquer indício de imunossupressão no momento da coleta dos exames (ex: síndrome da imunodeficiência adquirida, medicações), pertencentes a comunidades indígenas ou que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Pacientes procedentes de regiões onde *L. V. braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* não eram as espécies predominantes foram também excluídos (ex: Região Norte do Brasil).

3.2.8. INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO (SOARES, 2011):

A IDR, foi realizada por antígeno fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Piraquara, Paraná, Brasil. Inoculou-se, por via intradérmica, 0,1ml da solução na face anterior do antebraço esquerdo. A solução é composta por fragmentos de *L. (L.) amazonensis* (Cepa referência OMS MHOM/BR/73/PH8) em concentração de 40µg/ml de nitrogênio proteico, 0.005g/ml de fenol, 0,0098g/ml de cloreto de sódio e água destilada q.s.p. 1ml. O teste foi considerado positivo em caso de formação de pápula com diâmetro igual ou superior a 5mm em leitura após 48 horas.

3.2.9. EXAME HISTOPATOLÓGICO:

O EH foi processado no setor de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília - HUB. Biópsia incisional circular com diâmetro de 4mm foi realizada após assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra foi a periferia da lesão suspeita de LTA. O fragmento foi conservado em 20mls de formol a 10%. Para visualização dos cortes por microscopia óptica após inclusão em parafina, utilizou-se as colorações hematoxilina e eosina, Giemsa, Ziehl-Neelsen e Grocott. O teste foi considerado positivo na presença de dois critérios: 1. quando constatada a presença de formas amastigotas; 2. quando constatadas alterações cutâneas compatíveis com LTA (erosão, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, infiltração linfocitária e infiltração plasmocitária) (NAME et al., 2005).

3.2.10. IMPRINT EM LÂMINA PARA MICROSCOPIA (SOARES, 2011):

Biópsia incisional circular com raio de 4mm foi realizada após assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O fragmento foi pressionado contra 2 lâminas para microscopia em 6 pontos diferentes para cada lâmina. O *imprint* foi fixado por metanol e corado pelo Giemsa conforme anteriormente descrito (SOARES, 2011). A positividade do exame deu-se pela visualização de formas amastigotas em microscópio óptico.

3.2.11. CULTURA DO ASPIRADO DA LESÃO (SOARES, 2011):

A cultura foi realizada pelo aspirado na borda da lesão clínica com seringa estéril de 1ml contendo 200µL de solução fisiológica estéril e gentamicina a 0,2%. O conteúdo foi dividido em 2 tubos com 150µL do meio sólido NNN. Os meios foram incubados em estufa

24-26°C. Pesquisa de formas promastigotas foi realizada em microscópio invertido (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) diariamente, até 30 dias após inoculação.

3.2.12. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (SOARES, 2011):

A técnica utilizada baseia-se na pesquisa de anticorpos do tipo IgG presentes no plasma de pacientes com suspeita clínica de LTA. Foi coletada amostra de sangue venoso após punção cubital e separação do plasma. O material foi adicionado a cepas de *Leishmania* fixadas em lâmina (MHOM/BR/PH8 de *L. (L.) amazonensis*). A reação foi evidenciada após adição de conjugado fluorescente que consiste em anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína, produzido pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), pré-diluído 1:150 em solução de Azul de Evans a 0,1%. A leitura da imunofluorescência foi realizada em fotomicroscópio com lâmpada tipo HB200 e filtro BG12 (Axiolab RE, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A IFI foi considerada positiva em titulações iguais ou superiores a 1:40.

3.2.13. IMPRINT DE BIÓPSIA DE LESÃO EM PAPEL FILTRO (PFL):

Fragmento de pele adquirido durante coleta de amostra para EH, conforme previamente detalhado, foi utilizado para *imprint* em papel filtro. Fragmento e biópsia incisional circular com raio de 4mm foi pressionado contra 1 unidade de papel filtro Whatman® (General Electric®, Freiburg, Alemanha) em 2 pontos diferentes (BOGGILD; VALENCIA et al., 2010; BOGGILD; RAMOS et al., 2011). A extração e amplificação do DNA seguiu-se conforme detalhamento adiante.

3.2.14. AMOSTRAS MUCOSAS:

Em paralelo aos exames de inclusão, evitando-se qualquer lesão de continuidade à mucosa antes das coletas para PCR, foram coletadas, as seguintes amostras, aqui denominadas "amostras moleculares mucosas"(AMM), na seguinte sequência:

Saliva. Saliva total em seringa estéril de 20ml, após transferida para microtubo estéril de 1,5ml (CORVALAN et al., 2011). O paciente foi instruído a não ingerir alimentos, líquidos ou escovar os dentes 30 minutos antes.

Papel filtro oral (PFO). Raspado da mucosa oral (lingual, jugal e palatina) utilizando papel filtro Whatman® (General Electric®, Freiburg, Alemanha), com fricção por três vezes de cada mucosa supracitada, armazenado em envelope de papel.

Swab de algodão nasal bilateral (SN). Foi utilizado *swab* de algodão estéril Absorve® (São Paulo, Brasil), introduzido a 2cm do vestíbulo nasal, (FIGUEROA et al., 2009; BOGGILD; VALENCIA et al., 2011) girado em 360 graus por 5 vezes, com leve pressão contra o septo nasal. O procedimento foi repetido nas duas narinas, com o mesmo *swab*. A haste do *swab* foi cortada com lâmina de bisturi estéril para armazenamento em microtubo estéril de 1,5ml.

O manuseio das amostras foi realizado com luvas estéreis, descartadas após cada etapa. A via aérea dos pacientes não foi manipulada, em nenhum momento, antes da obtenção das amostras. A biópsia incisional, no caso da LM, foi realizada imediatamente após a coleta das AMM. As amostras foram armazenadas a -80°C e após, transportadas a -20°C até extração do DNA.

3.2.15. TESTES INICIAIS

Para assegurar adequado custo-efetividade dos testes de biologia molecular realizados neste estudo, a comparação de diferentes técnicas de extração foi realizada em um paciente índice (15/2012) que conhecidamente apresentava quadro extenso de LM com envolvimento nasal, oral e de cordas vocais e que apresentava parasitos abundantes no *imprint* em lâmina de microscopia.

Para extração do DNA, comparou-se método de eluição corriqueiramente utilizado no Laboratório de Dermatologia da USP de Ribeirão Preto com o uso de Kits comerciais de grande sensibilidade conforme descrição a seguir:

Método: Eluição e aquecimento:

- Papel filtro: 30mm² de papel filtro totalmente embebidos por amostra coletada visível foram cortados e inseridos com lâmina de bisturi estéril em microtubo de 1,5mls. Foram adicionados 100µl de água Mili-Q autoclavada (ultrapura) ao microtubo. O conteúdo foi aquecido em incubadora de banho seco Thermomixer® (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) por 10 minutos a 95°C com uma agitação de 300RPM (SOARES, 2011).

- Saliva: Duzentos microlitros de conteúdo salivar puro foram pipetados de seu recipiente de coleta e inserido em microtubo de 1,5mls. O conteúdo foi aquecido em incubadora de banho seco Thermomixer® (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) por 10 minutos a 95°C com uma agitação de 300RPM.

- *Swab* Nasal: O *swab* nasal coletado foi completamente inserido em microtubo de 1,5mls. Duzentos microlitros de água ultrapura foram adicionados ao microtubo. O conteúdo foi aquecido em incubadora de banho seco Thermomixer® (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) por 10 minutos a 95°C com uma agitação de 300RPM.

Método: Kits comerciais de qualidade forense:

A extração de DNA dos mesmos materiais coletados foi realizada conforme orientações dos fabricantes dos produtos a seguir:

- Papéis de filtro e *swab* nasal: NucleoSpin® Tissue XS (MACHEREY-NAGEL, GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha) para *imprint* no papel filtro, *swab* nasal e papel filtro oral. Amostras no PFO e PFL foram processadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante para pingos de sangue.
- Saliva: PSP® SalivaGene DNA Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Alemanha) para saliva, seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas, após extração no aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare®) com 2µL do material extraído (<50ng/µl). Ainda para quantificação e confirmação da presença do DNA genômico extraído, qPCR em tempo real foi realizada, utilizando-se o par de iniciadores para C18X - 5'-GAAAGTGCCAGACCCGCCCCC-3' e 5'-GCTGAAGCCACCGCCATAG-3', que resultam em amplificação de 343pb, específica para queratina humana, adicionados ao SYBR® Green Master Mix (Life Technologies™, Carlsbad, EUA) (LUGASSY et al., 2006). A reação foi realizada em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen®, Hilden, Germany). Os ciclos de amplificação incluíram um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos a 95°C (5 segundos) e 60°C (10 segundos), com medidas de curva melt. (60°C - 95°C) (Figura 13).

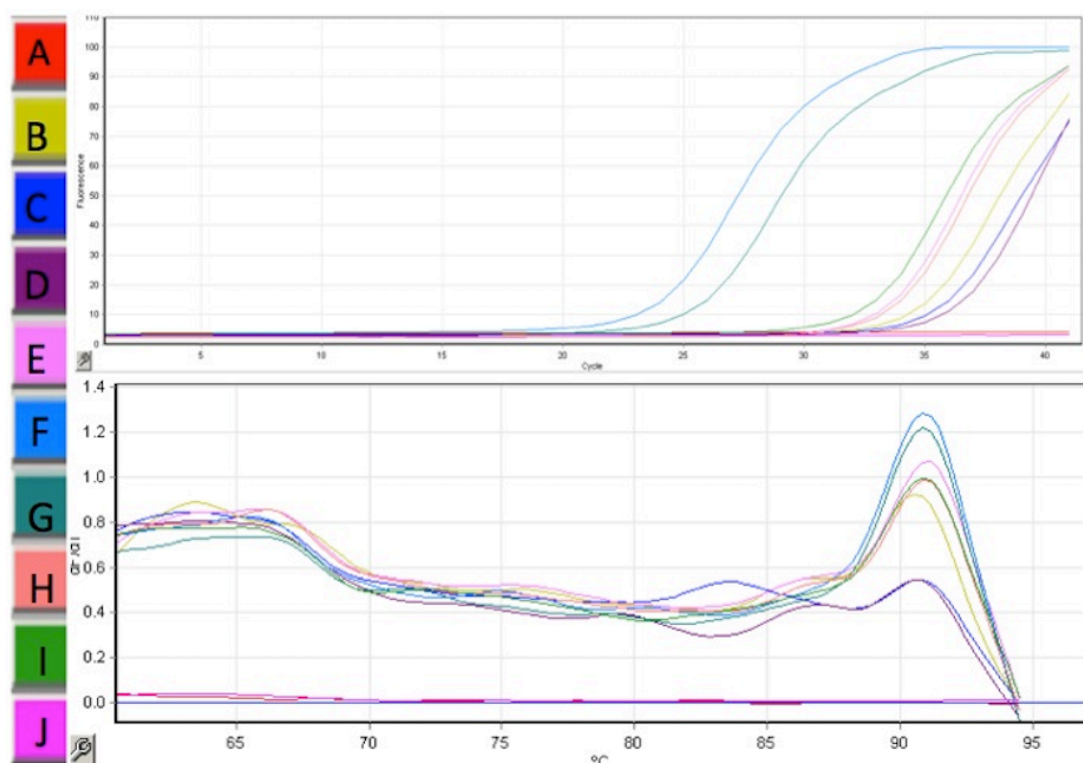


Figura 13: PCR em tempo real: Amplificação do DNA de queratina humana (acima) e curva melt (abaixo). A maior quantidade de DNA amplificado foi obtida pelo papel filtro da lesão, seguido pelo *swab* nasal, papel filtro oral e saliva. A: Papel Filtro Oral extraído por eluição, B: Papel Filtro da Lesão extraído por eluição, C: *Swab* Nasal extraído por eluição, D: Saliva extraída por eluição, E: Papel Filtro Oral extraído por eluição, E: Papel Filtro Oral extraído por kit, F: Papel Filtro da Lesão extraído por Kit, G: *Swab* Nasal extraído por Kit, H: Saliva extraída por Kit, I: Controle Positivo, J: Controle Negativo. O gráfico mostra início mais precoce de curva de amplificação nas amostras com maior quantidade de DNA extraído, conforme progressão dos ciclos realizados (acima).

3.2.16. ESCOLHA DA SEQUÊNCIA AMPLIFICADORA (iniciadores):

A decisão sobre o par de *iniciadores* ideal a ser utilizado nesta pesquisa levou em consideração algumas características listadas a seguir:

- Sensibilidade;
- Espécies de *Leishmania* presentes na região estudada;
- Possibilidade de diferenciação de subgêneros ou espécies por enzimas de restrição;
- Evitar a necessidade de repetição do teste;
- Adequabilidade para padronização do teste no Laboratório de Dermatocologia - FM - UnB.

Na PCR convencional foram utilizados iniciadores específicos para as sequências do DNA mitocondrial de cinetoplastos da *Leishmania spp.* (kDNA) 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCCAACCCC-3' e 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (Ultrachem, Londres, Reino Unido) As reações ocorreram em termociclador Eppendorf® Mastercycler® pro (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha).

Cada reação foi realizada em um volume final de 23µl, contendo 12,9µl de H₂O; 2µl de tampão Amélia-USP-RP a 10x [1M tris-HCl - Peso Molecular 1:121,14 - pH 8,8; 1M (NH₄)₂SO₄, 1M MgCl₂; 1M Dithiothreitol; Triton X100 10%; 100mg/ml Bovine Serum Albumin]; 2,5µl de mix de dNTPs (2µM); 0,2µl de cada iniciador (40µM); 0,2µl de *Taq* DNA polimerase (5u/µl)(Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 5µl do extraído (DNA). Os ciclos para amplificação seguiram desnaturação inicial por 3 minutos e 30 segundos a 94°C, seguida por trinta e cinco ciclos: 93°C (30segundos), 60°C (1minuto), 72°C (1 minuto), e extensão final a 72°C (10 minutos). Toda reação incluiu controle sem DNA e positivo formado por cultura lisada de *L (V.) braziliensis*.

Para visualização do resultado, 4 µL do volume amplificado foram misturados a 2 µL de xileno-cianol (ficoll 15g, 250mg de xileno-cianol, 100mls de H₂O) e 1µL (1:100) de GelRed® (Biotium®, Hayward, EUA), e aplicados em gel de agarose 2%, imerso em tampão TAE 1x. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb na concentração 1µg/µL (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (BIO-RAD® Sub-Cell® GT Cell 170-4403, CA, EUA) com os seguintes parâmetros:

1h30minutos, 90V e 400mAmp. Após o tempo de corrida o gel foi visualizado em fotodocumentador com luz UV (EC3 Imaging System, UVP, CA, EUA).

Para as amostras que não apresentaram banda específica, como controle negativo, foi realizada PCR em tempo real, conforme previamente especificado, com par de iniciadores C18X específicos para fragmentos de queratina humana e que mostrou-se satisfatória em todas as amostras.

Os resultados provenientes dos testes realizados no caso índice influenciaram na decisão de usar os *Kits* comerciais como protocolo do estudo (Figuras 13 e 14).

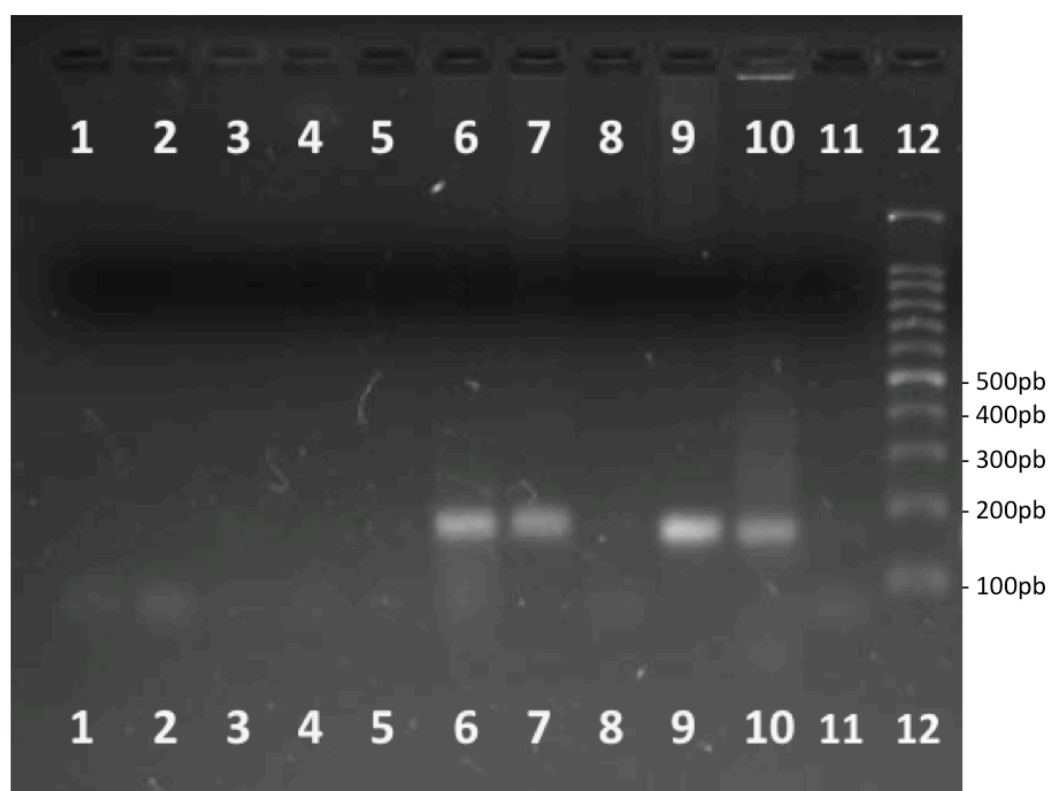


Figura 14. Visualização em gel de agarose: Visualização em gel de agarose a 2% de reação em cadeia da polimerase convencional do paciente índice: 1- PFO eluição, 2- PFL eluição, 3- SN eluição, 4- saliva eluição, 5- PFO Kit, 6- PFL Kit, 7- SN Kit, 8- saliva Kit , 10- *L. braziliensis*, 11- controle negativo, 12- marcador com 100pb. PFO = papel filtro oral, PFL = papel filtro da lesão, SN = *swab* nasal.

3.2.17. IDENTIFICAÇÃO DO SUBGÊNERO (SOARES, 2011):

A identificação do subgênero foi realizada por meio da técnica de Restriction fragment length polymorphism (RFLP). As amostras foram digeridas, utilizando as enzimas *Hae* III e *bsr*I (Biolabs, NE, USA), adicionadas a 4 μ L do material amplificado, incubadas durante a noite, a 37°C e 65°C respectivamente. A visualização das bandas foi realizada em gel de poliacrilamida a 10%, corada pela prata (Figura 15). A digestão pela *Hae* III foi considerada positiva para *Leishmania Viannia* quando geradas bandas de 80 e 40pb após clivagem em 5'..GG^CG..3' e 3'..CC^GG..5' (GARCIA, F. *et al.* 2005). A positividade para *Leishmania Leishmania* foi dada com a digestão pela *bsr*I e geração de bandas em 100 e 20pb após clivagem em 5'..ACTGGN^..3' e 3'..TGAC^CN..5'. Neste último, apenas banda com 100pb costuma ser visível.

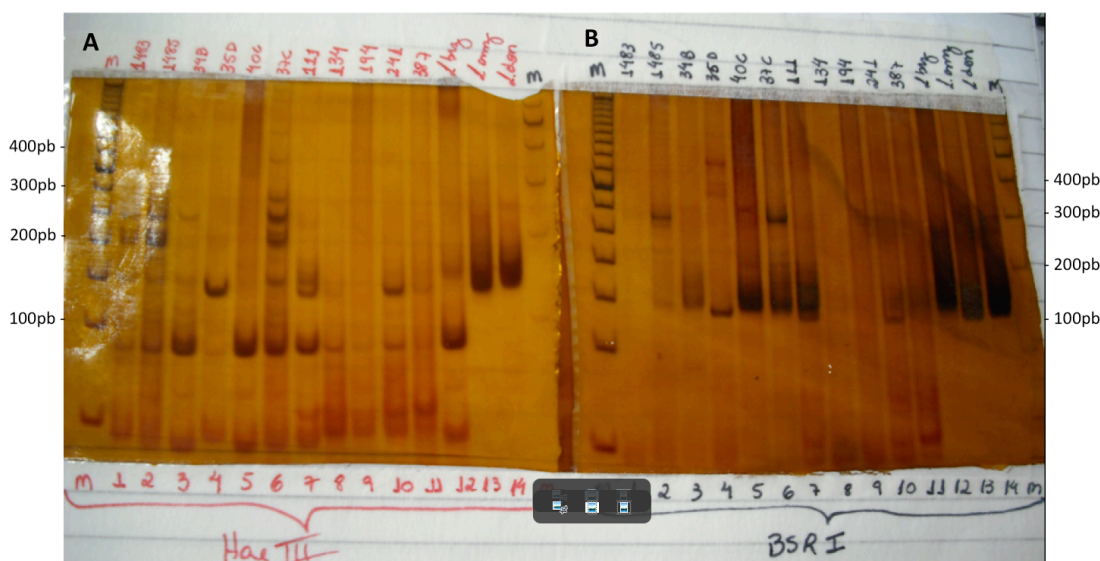


Figura 15. Visualização em gel de acrilamida: Visualização em gel de acrilamida (10%) de *Restriction fragment length polymorphism*. A – coluna 12: Exemplo de *Leishmania Viannia* após digestão pela HAEIII. B – colunas 13 e 14: Exemplo de *Leishmania Leishmania* após digestão pela *bsr*I.

3.2.18. TAMANHO AMOSTRAL (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005):

O cálculo amostral baseou-se no desfecho principal desejado, a comparação entre LM e controles. De acordo com Flahault e colaboradores, testes que aproximem a distribuição normal são geralmente adequados para cálculo amostral relativo a testes com desfecho binário (positivo ou negativo) (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005). O mesmo autor relata ainda que o número necessário de casos segue padrões para o cálculo amostral para simples proporções, uma vez que a sensibilidade consiste na proporção de casos positivos entre todos os pacientes com a doença analisada.

A sensibilidade esperada para o desfecho principal definido (PCR de SN) foi de 95% conforme referência previamente publicada (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011). Com a utilização do ambiente OpenEpi® Version 3 (Emory University, Atlanta, EUA), considerando-se uma média anual de 13,2 casos de LM enviados para comprovação diagnóstica ao Laboratório de Dermatocologia da Faculdade de Medicina da UnB, o número mínimo de casos foi fixado em 16 pacientes para um período de 18 meses de estudo. Esta amostra garante um nível de confiança de 95% e limite de confiança de 5% (Figura 16).

Sample Size for Frequency in a Population	
Population size(for finite population correction factor or fpc)(N):	20
Hypothesized % frequency of outcome factor in the population (p):	95%+/-5
Confidence limits as % of 100(absolute +/- %)(d):	5%
Design effect (for cluster surveys-DEFF):	1
Sample Size(n) for Various Confidence Levels	
ConfidenceLevel(%)	Sample Size
95%	16
80%	13
90%	15
97%	17
99%	18
99.9%	19
99.99%	19
Equation	
Sample size $n = [DEFF * N * p(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$	
Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--SSPropor Print from the browser with ctrl-P or select text to copy and paste to other programs.	

Figura 16: Resultado do cálculo amostral realizado no ambiente OpenEpi® Version 3.

De acordo com a aproximação proposta por Flahault e colaboradores, supondo-se que π = Sensibilidade esperada do teste diagnóstico (SN), e $1 - \alpha$ = limite inferior do intervalo de confiança, baseado-se na distribuição normal, o número de 16 pacientes alcança um limite inferior mínimo aceitável do intervalo de confiança - 95% de 0.65 e uma probabilidade deste limite estar acima do mínimo aceitável de 0,95 (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005) (Tabela 5) (Figura 17).

$$n = \frac{[z_{1-\beta}\sqrt{\pi(1-\pi)} + z_{1-\alpha}\sqrt{(\pi-\delta)(1-\pi+\delta)}]}{\delta^2}$$

Figura 17. Cálculo amostral - casos: Fórmula aplicada para construção de tabela de cálculo amostral dos casos (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005).

Tabela 5. Número de casos (ou controles): de acordo com a sensibilidade esperada (ou especificidade), variando de 0,60 a 0,95.

Sensibilidade (ou especificidade) esperada.	Limite inferior do intervalo de confiança mínimo aceitável									
	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	
0,60	268	1.058								
0,65	119	262	1.018							
0,70	67	114	248	960						
0,75	42	62	107	230	869					
0,80	28	40	60	98	204	756				
0,85	18	26	33	52	85	176	624			
0,90	13	18	24	31	41	70	235	474		
0,95	11	12	14	16	24	34	50	93	298	

A probabilidade do limite inferior do intervalo de confiança de 95% estimado estar acima do mínimo aceitável é de 0,95.

Adaptado de (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005).

Para o cálculo do número de controles, considerou-se uma prevalência de 40,8% de casos de LM em pacientes com diagnóstico clínico de LTA nesta específica população hospitalar (NAME et al., 2005). A estimativa do número mínimo de controles foi de 24, de acordo com a seguinte fórmula (Figura 18).

$$N_{\text{controles}} = N_{\text{casos}}[(1-\text{Prev})/\text{Prev}]$$

Figura 18. Cálculo amostral - controles: Fórmula para cálculo amostral de controles em caso de prevalência menor que 50%. Fonte: (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005).

3.2.19. DADOS INCOMPLETOS:

Problemas operacionais, laboratoriais ou dificuldade de acesso às lesões, impossibilitaram a realização de exames pontuais em alguns dos pacientes inclusos. As referidas perdas não prejudicaram a inclusão destes pacientes, já que outros exames, possibilitaram a alocação nos grupos. Estas perdas foram ignoradas para o cálculo da acurácia dos exames de inclusão (Tabela 6).

Uma paciente foi excluída do estudo por incompatibilidade do registro clínico, o que impossibilitou aferição de diversas variáveis no presente caso. Os dois últimos pacientes avaliados foram excluídos do estudo por falta de material e verba para processamento dos exames de PCR.

Tabela 6. Número exato e perdas:

EXAMES	PERDAS		
	LM:	LC:	Controles:
IDRM:	1	1	4
IFI:	1	1	9
Histopatológico:	2	0	1
Imprint:	6	1	2
Cultura in vitro:	7	1	3
PCR em papel filtro da lesão:	4	1	3

3.2.20. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para as variáveis expressas em média \pm desvio padrão e que apresentavam distribuição gaussiana, a comparação entre os níveis de forma se deu pela utilização do teste ANOVA, ou pelo teste de Kruskal-Wallis para aquelas que não apresentavam distribuição gaussiana. Empregou-se o teste de comparações múltiplas com ajustamento de Tukey ou de Dwass, Steel, Critchlow-Fligner (CRITCHLOW; FLIGNER, 1991) nas situações em que o teste ANOVA ou de Kruskal-Wallis apresentou p-valor $< 0,05$, respectivamente. Para as variáveis expressas em frequência, a comparação entre as formas se deu pelo uso do teste de qui-quadrado, ou pela sua versão exata quando mais de 20% das caselas apresentaram frequência esperada inferior a 5. Quando o teste de qui-quadrado mostrou-se significativo ($p < 0,05$) calculou-se os resíduos padronizados (AGRESTI, 2007) para cada casela da tabela, de modo identificar o sentido das associações.

Para se comparar as médias do tempo de evolução para diversas característica medidas entre os grupos foi empregado o teste t-student para aquelas variáveis que apresentavam distribuição gaussiana em ambos os grupos e nos casos em que não se observou a normalidade nos dois grupos foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. No caso do teste t-student, um intervalo de 95% de confiança para a diferença entre as médias foi calculado. Para efeito de análise empregou-se nível de significância de 5%. As correlações entre as variáveis foram feitas empregando-se o coeficiente de correlação linear de Pearson. Nesta fase da análise, utilizou-se o programa SAS 9.3® (SAS Institute Inc, Cary, EUA).

Para fins de comparação entre os grupos, definiu-se arbitrariamente, como desfecho primário a diferenciação ente LM e controle e como desfechos secundários as demais comparações. O cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia e índice Kappa foram realizados no ambiente OpenEpi® versão 3 (Emory University, Atlanta, EUA). As variáveis quantitativas foram categorizadas para análise do resultado da IFI em resultados positivos e negativos e os resultados do teste IDRm foram classificados de forma numérica (diâmetro) e categórica (positivo ou negativo). Significância estatística foi definida em $p < 0.05$ e IC 95%.

3.2.21. ÉTICA:

Os pacientes foram incluídos após assinatura do TCLE. O estudo está de acordo com a declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB Brasília, Brasil.(036/2011)

4. RESULTADOS:

4.1. ESTUDO SOBRE ACURÁCIA DA PCR NO *SWAB* NASAL,
SALIVA E PAPEL FILTRO ORAL NO DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:

4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E POPULACIONAIS:

Foram incluídos 69 pacientes, sendo 17 (25%) com LM, 19 (28%) com LC e 33 (48%) controles sem LTA (Figura 19). Dentre os 33 controles foram diagnosticados casos de carcinoma (3), esporotricose (4), úlcera de estase (5), piodermite (9), micetoma actinomicótico (1), siusite (2), hanseníase (2), pioderma gangrenoso (1), osteomielite (1) e lesões sem diagnóstico firmado (5).

A proporção de homens com LM 12 (71%) foi superior em comparação aos pacientes com LC 10 (53%) e controles 17 (52%), mas nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p=0,4020$). A idade média nos referidos grupos foi de 58,3 ($\pm 10,0$), 45,7 ($\pm 15,1$) e 45,7 ($\pm 14,6$) nos casos de LM, LC e controles respectivamente. Pacientes com LM apresentaram idade média significativamente maior do que os grupos LC ($p=0,0223$) e controles ($p = 0,0090$). Pacientes com LM apresentaram tempo de evolução médio de 83,7 ($\pm 87,9$) meses, significativamente maior em comparação ao tempo de evolução dos pacientes com LC 11,5 ($\pm 19,2$; $p=0,0001$) e controles 15,2 ($\pm 33,6$; $p<0,0001$). Nenhum dos pacientes com LM apresentou tempo de evolução da doença menor do que 3 meses, fato observado em apenas 4 pacientes com LC. A proporção de pacientes que representavam casos de recidiva de LTA ($p=0,2085$) e o número médio de lesões não foi diferente entre os três grupos ($p=0,4011$).

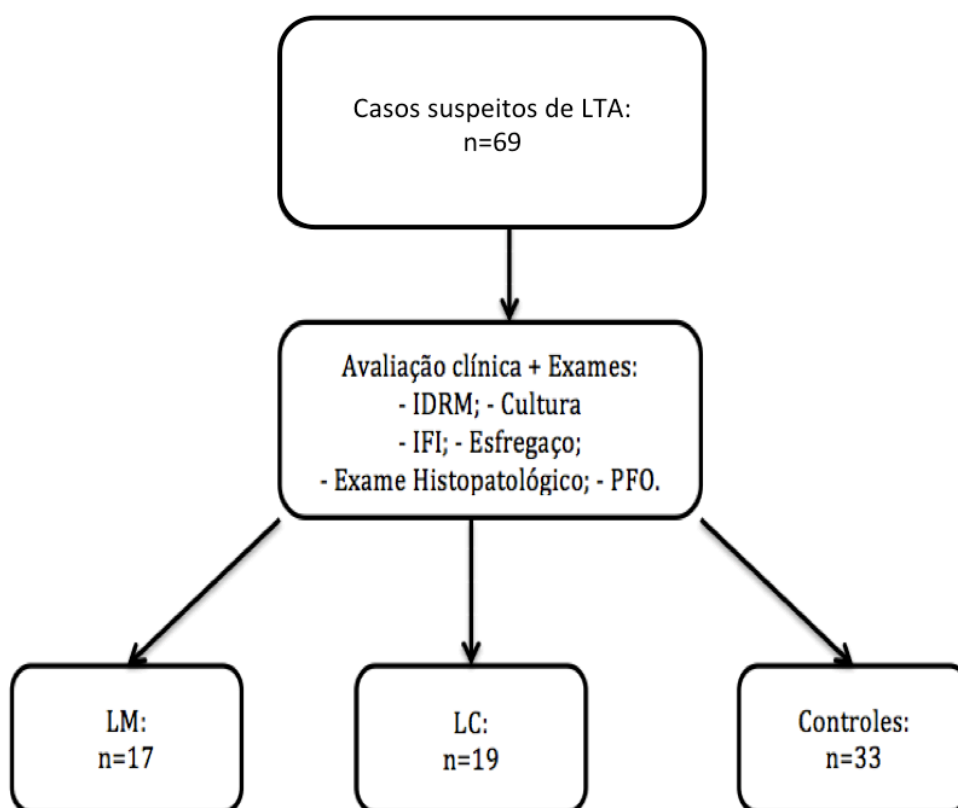


Figura 19. Fluxograma de inclusão: Fluxograma de inclusão dos casos e controles. n=número de pacientes; LTA=Leishmaniose tegumentar americana, IDRM=Intradermorreação de Montenegro; IFI=Imunofluorescência indireta; PFL=PCR em papel filtro da lesão.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS DOS EXAMES:

A proporção de positividade de cada exame realizado no presente estudo está indicada na tabela 11 (Tabela 11). Pela análise dos resultados é possível observar que exames que testam a imunidade do indivíduo como a IDRM e IFI apresentam positividade em uma pequena parcela dos controles analisados. O mesmo não é observado em relação aos exames que visam a detecção do parasito.

Análise das frequências de resultados positivos e negativos demonstrou que todos os exames, exceto pelo PFO ($p=0,2400$), foram eficazes em diferenciar as diferentes formas de LTA e controles. Tal fato reforça a adequabilidade dos critérios de inclusão em relação ao presente cálculo amostral aqui apresentado (Tabela 7).

Tabela 7: Positividade de todos os exames realizados: Exames de inclusão coletados.

EXAMES	Positividade (n)/%			Significância p:
	LM:	LC:	Controles:	
IDRM:	15 (94%)	17 (94%)	11 (38%)	<0,0001
IFI:	11 (69%)	9 (50%)	6 (25%)	0,0212
Histopatológico Amastigotas +:	2 (13%)	5 (26%)	0	<0,0001
Histopatológico Compatibilidade:	15 (100%)	18 (95%)	13 (41%)	<0,0001
Imprint em lâmina:	3 (27%)	6 (33%)	0	0,0027
Cultura in vitro:	1 (10%)	7 (39%)	0	<0,0001
PCR em papel filtro da lesão:	8 (62%)	12 (67%)	0	<0,0001
PCR do <i>swab</i> Nasal:	10 (59%)	2 (11%)	0	<0,0001
PCR da saliva:	4 (24%)	0	0	0,0027
PCR do papel filtro oral:	1 (6%)	2 (11%)	0	0,2400

LM = leishmaniose mucosa, LC = leishmaniose cutânea, PCR = Reação em cadeia da polimerase. Obs.: Foram excluídos do cálculo, as amostras não coletadas ou processadas.

Quanto à influência do tempo de evolução da doença na positividade dos testes, observou-se correlação significativamente diferente de zero entre o tempo de evolução da LC e IDRMs quantitativa ($r=0,49$; $p=0,0339$), no sentido de quanto maior é o tempo de evolução, maior a IDRMs (Figura 20). Os demais exames não demonstraram relação ou correlação estatisticamente significativa em ambas as formas de LTA, cutânea e mucosa.

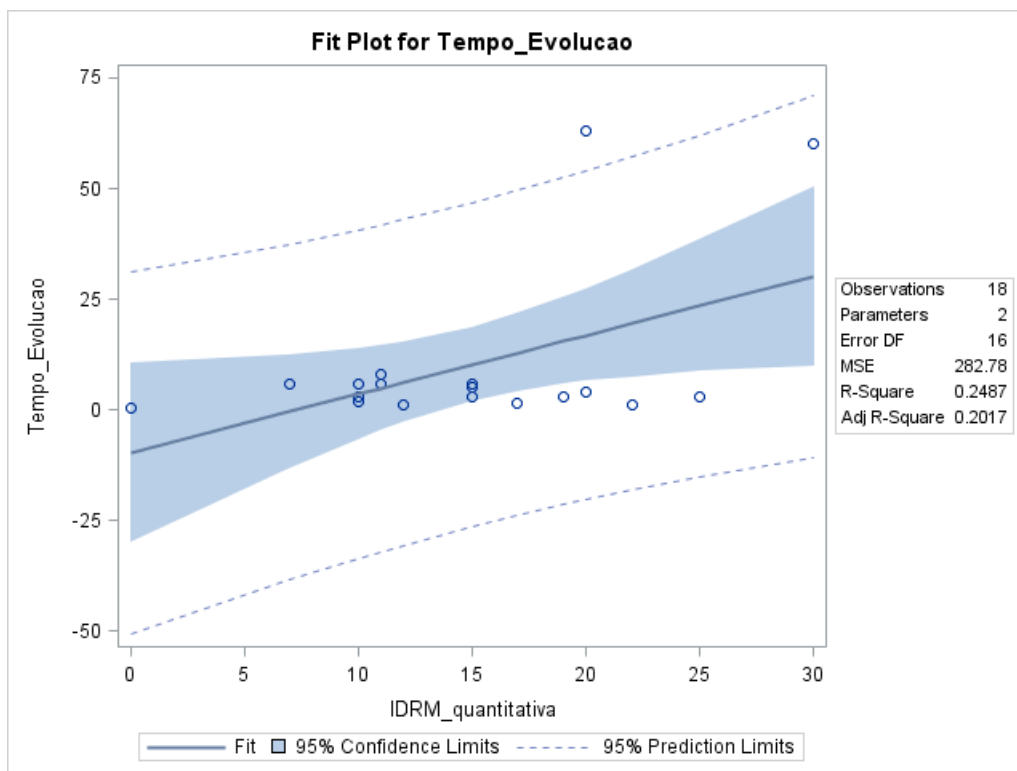


Figura 20. Correlação entre tempo de evolução da leishmaniose cutânea e intradermorreação de Montenegro: Gráfico demonstrando a correlação diretamente proporcional entre o tempo de evolução da doença e a medida da intradermorreação de Montenegro quantitativa para os casos de leishmaniose cutânea.

Nos pacientes com LM, 5 apresentaram positividade apenas no SN, 4 para SN e saliva e 1 para SN e PFO. A videonasofibroscopia demonstrou que dos 17 pacientes com LM, 11 apresentavam lesão isolada na cavidade nasal, 4 lesão contígua nasal e orofaríngea e 2 lesões isoladas na orofaringe (Tabela 8). Todos os pacientes com positividade para SN, saliva ou PFO apresentavam lesões nasais, isoladas ou contíguas.

Tabela 8. Características básicas dos casos de leishmaniose mucosa: características clínicas, demográficas e positividade dos exames coletados nos pacientes com leishmaniose mucosa.

Identificação no estudo:	Sexo:	Idade: (anos)	Localização:	Evolução (meses):	Swab nasal:	Saliva:	Papel filtro oral:
4/2012	M	64	Orofaringea	12	-	-	-
6/2012	M	80	Nasal	180	-	-	-
7/2012	M	56	Orofaringea	96	-	-	-
8/2012	M	54	Nasal	12	-	-	-
12/2012	M	66	Nasal e Orofaringea	180	-	-	-
15/2012	M	56	Nasal e Orofaringea	60	+	+	-
31/2012	F	55	Nasal	24	-	-	-
32/2012	M	58	Nasal e Orofaringea	24	+	-	-
34/2012	F	65	Nasal	180	-	-	-
40/2012	F	45	Nasal	312	+	-	-
42/2012	M	60	Nasal	24	+	-	-
43/2012	M	51	Nasal e Orofaringea	120	+	-	+
45/2012	M	49	Nasal	6	+	+	-
48/2012	M	59	Nasal	-	+	+	-
54/2013	F	69	Nasal	24	+	-	-
66/2013	M	67	Nasal	48	+	+	-
69/2013	F	37	Nasal	37	+	-	-
Total:	-	-	-	-	10	4	1

4.1.3. COMPARAÇÕES: DESFECHO PRINCIPAL:

Para o diagnóstico da LM, em comparação aos controles sem LTA, a melhor acurácia foi alcançada pelo PCR do SN 86% (IC-95%=73,81-93,05), seguido da saliva 74% (IC-95%=60,45-84,13) e PFO 68% (IC-95%=54,19-79,24). As especificidades do SN e PFO foram de 100% (completas), negativas em todos os controles (Tabela 9).

Tabela 9. Leishmaniose mucosa X controles: Comparação do poder diagnóstico para a diferenciação entre as formas de leishmaniose mucosa e controles.

Exame:	Sens: (%) (IC95%)	Esp: (%) (IC95%)	VPP: (%) (IC95%)	VPN (%) (IC95%)	Acurácia: (%) (IC95%)
Swab	58,82	100	100	82,5%	86
Nasal:	(36,01-78,39)	(89,57-100)	(72,25-100)	(68,05-91,25)	(73,81-93,05)
Saliva:	23,53	100	100	71,74	74
	(9,56-47,26)	(89,57-100)	(51,01-100)	(57,45-82,68)	(60,45-84,13)
Filtro	5,88	100	100	67,35	68
Oral:	(1,05-26,98)	(89,57-100)	(20,65-100)	(53,38-78,79)	(54,19-79,24)

Sens=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo. (Wilson Score)

Em relação aos testes de inclusão, na comparação entre LM e controles, a melhor acurácia diagnóstica foi alcançada com a PCR de papel filtro da lesão 88,37% (IC-95%=75,52-94,93), seguido do *imprint* em lâmina 80,95% (IC-95%=66,70-90,02) e da cultura *in vitro* 77,50% (IC-95%=62,5-87,68). Apesar da segunda e terceira maior acurácia encontrada com a aplicação do *imprint* em lâmina e cultura *in vitro* estes testes apresentaram baixa sensibilidade, calculada em 27,27% (IC-95%=9,75-56,57) e 10% (IC-95%=1,79-40,42)

respectivamente. A maior sensibilidade foi alcançada com a aplicação do exame histopatológico pelo critério da compatibilidade 100% (IC-95%=79,61-100) e IDRM 93,75% (IC-95%=71,67-98,89). Em relação à avaliação quantitativa dos resultados da IDRM, pacientes com LM apresentam IDRM médio 23,1 (\pm 11,9) significativamente maior que os controles 4,9 (\pm 7,2) ($p < 0,0001$; Tabela 10).

Tabela 10. Leishmaniose mucosa X controles: Exames de alocação. Comparação do poder diagnóstico para a diferenciação entre as formas de leishmaniose mucosa e controles sem leishmaniose tegumentar americana.

Exame:	Sens (IC95%)	Esp (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	Acurácia (IC95%)
PCR filtro lesão:	61,54 (35,52-82,29)	100 (88,65-100)	100 (67,56-100)	85,71 (70,62-93,74)	88,37 (75,52-94,93)
<i>Imprint</i> em lâmina :	27,27 (9,75-56,57)	100 (88,97-100)	100 (43,85-100)	79,49 (64,47-89,22)	80,95 (66,70-90,02)
Cultura in vitro:	10 (1,79-40,42)	100 (88,65-100)	100 (20,65-100)	76,92 (61,66-87,35)	77,50 (62,50-87,68)
IDRM:	93,75 (71,67-98,89)	62,07 (44-77,31)	57,69 (38,95-74,46)	94,74 (75,36-99,06)	73,33 (58,96-84,04)
Histopatológico Amastigotas:	13,33 (3,74-37,88)	100 (89,28-100)	100 (34,24-100)	71,11 (56,63-82,27)	72,34 (58,24-83,06)
Histopatológico Compatível:	100 (79,61-100)	59,38 (42,26-74,48)	53,57 (35,81-70,47)	100 (83,18-100)	72,34 (58,24-83,06)
IFI:	68,75 (44,4-85,84)	75 (55,1-88)	64,71 (41,3-82,69)	78,26 (58,10-90,34)	72,5 (57,16-83,89)

Sens=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo. (Wilson Score)

4.1.4. COMPARAÇÕES: DESFECHOS SECUNDÁRIOS:

Para diferenciação entre LM e LC, resultados semelhantes foram encontrados. A melhor acurácia foi alcançada pelo PCR do SN 75% (IC-95%=58,93-86,25), seguido da saliva 63,89% (IC-95%=47,57-77,52) e PFO 50% (IC-95%=34,47-65,53). As especificidades do SN e PFO não foram completas, positivas simultaneamente em dois casos de LC. Não houve positividade do PCR da saliva em casos de LC (Tabela 11). Em relação à avaliação quantitativa dos resultados da IDRM, pacientes com LM apresentam IDRM médio 23,1 ($\pm 11,9$) significativamente maior que os pacientes com LC 14,9 ($\pm 7,1$) ($p < 0,0001$).

Tabela 11. Leishmaniose mucosa X leishmaniose cutânea: Comparação do poder diagnóstico para a diferenciação entre as formas de leishmaniose mucosa e leishmaniose cutânea.

Exame:	Sens: (%) (IC95%)	Esp: (%) (IC95%)	VPP: (%) (IC95%)	VPN (%) (IC95%)	Acurácia: (%) (IC95%)
<i>Swab</i>	58,82	89,47	83,33	70,83	75
Nasal:	(36,01-78,39)	(68,61-97,06)	(55,20-95,30)	(50,83-85,09)	(58,93-86,25)
Saliva:	23,53 (9,56-47,26)	100 (83,18-100)	100 (51,01-100)	59,38 (42,26-74,48)	63,89 (47,57-77,52)
Filtro	5,88	89,47	33,33	51,52	50
Oral:	(1,05-26,98)	(68,61-97,06)	(6,15-79,23)	(35,22-67,50)	(34,47-65,53)

Sens=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo. (Wilson Score)

Em relação aos testes de inclusão, neste momento analisados para diferenciação entre LC e controles sem LTA, a melhor acurácia diagnóstica foi alcançada com a PFL 87,50% (IC-95%=75,30-94,14), seguido da cultura in vitro 77,08% (IC-95%=63,46-86,69) e *imprint* em lâmina 75,51% (IC-95%=61,91-85,40). A maior sensibilidade foi alcançada com a aplicação da IDRM 99,44% (IC-95%=74,24-99,01) e do exame histopatológico com presença de infiltrado celular com compatibilidade para LTA 94,74% (IC-95%=75,36-99,06). As especificidades do PFL, cultura e *imprint* em lâmina foram de 100% (Tabela 12).

Tabela 12. Leishmaniose cutânea X controles: Exames de alocação. Comparação do poder diagnóstico para a diferenciação entre as formas de leishmaniose cutânea e controles.

Exame:	Sens (IC95%)	Esp (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	Acurácia (IC95%)
PCR filtro lesão:	66,67 (43,75-83,72)	100 (88,65-100)	100 (75,75-100)	83,33 (68,11-92,13)	87,50 (75,30-94,14)
Cultura in vitro:	38,89 (20,30-61,38)	100 (88,65-100)	100 (64,57-100)	73,17 (58,07-84,31)	77,08 (63,46-86,69)
<i>Imprint</i> em lâmina:	33,33 (16,28-56,25)	100 (88,97-100)	100 (60,97-100)	72,09 (57,31-83,25)	75,51 (61,91-85,40)
IDRM:	99,44 (74,24-99,01)	62,07 (44-77,31)	60,71 (42,41-76,43)	94,74 (75,36-99,06)	74,47 (60,49-84,75)
Histopatológico Amastigotas:	26,32 (11,81-48,79)	100 (89,28-100)	100 (56,55-100)	69,57 (55,19-80,92)	72,55 (59,05-82,89)
Histopatológico Compatível:	94,74 (75,36-99,06)	59,38 (42,26-74,48)	58,06 (40,77-73,58)	95 (76,39-99,11)	72,55 (59,05-82,89)
IFI:	50 (29,03-70,97)	75 (55,10-88)	60 (35,75-80,18)	66,67 (47,48-81,36)	64,29 (49,17-77,01)

Sens=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo. (Wilson Score)

Identificou-se *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 12 casos de LM e em 11 casos da LC. Em apenas um caso de LC a espécie identificada foi do subgênero *Leishmania*.

Em relação aos dois casos de LC que apresentaram positividade em exames de mucosa, (ambos para SN e PFO), a avaliação videonasofibroscópica não identificou acometimento mucoso clinicamente evidente (Figura 21). Nenhum destes casos representava recidiva de lesão cutânea. Em um destes pacientes, identificou-se o uso prévio dos imunossuppressores etanercepte e metotrexato para o tratamento de quadro de artrite psoriásica. A medicação havia sido suspensa 3 meses antes da coleta dos exames. Os critérios de exclusão projetados apenas abordavam a imunossupressão no momento da coleta dos exames, o que permitiu a inclusão desta paciente no estudo. Nesta mesma paciente, não foram identificados sinais de disseminação da leishmaniose em exames complementares como o mielograma (*imprint* em lâmina e cultura) (Tabela 13).

Tabela 13. Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea e PCR positivo na mucosa: Características dos dois pacientes com leishmaniose cutânea que apresentaram PCR positiva em amostras mucosas.

Registro:	Sexo:	Idade:	Evolução (Meses):	Lesão (n):	Local:	Espécie:	Imunossupressor:
37/2012	F	59	3	Úlcera (1)	Cabeça	<i>L. Viannia</i>	+
67/2013	M	65	6	Úlcera (2)	MMSS e MMII	Negativo	-

MMSS = membros superiores, MMII = membros inferiores.

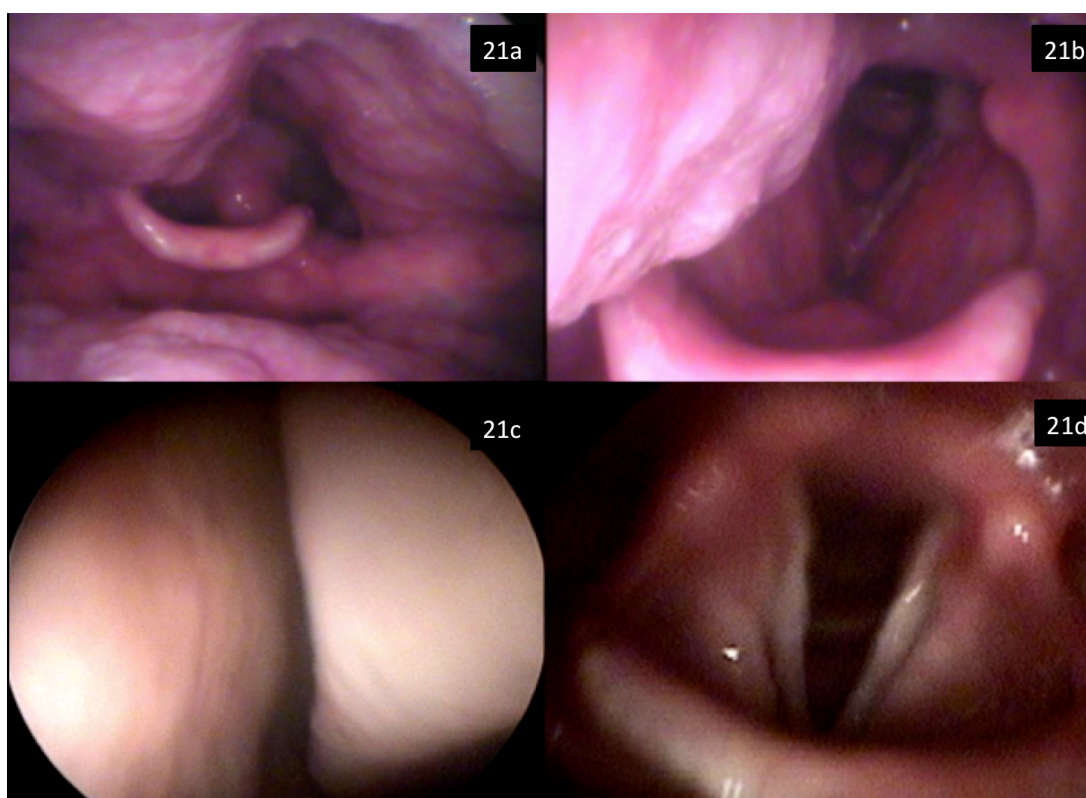


Figura 21. Imagem de videonasofibroscopia em casos de leishmaniose mucosa e cutânea: Comparação da videonasofibroscopia de paciente com leishmaniose mucosa (21a, 21b), acometimento das cordas vocais (15/2012-swab nasal e saliva positivos), com caso de leishmaniose cutânea (21c, 21d) sem qualquer acometimento da mucosa nasal e cordas vocais, (37/2012-swab nasal e papel filtro oral positivos).

4. RESULTADOS:

4.2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA:

4.2.1. RESULTADO DA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA:

Após o final do processo de seleção foram incluídos 14 artigos conforme os critérios mencionados. O fluxograma contido na figura 22, especifica todas as etapas deste processo. (Figura 22; Tabela 14)

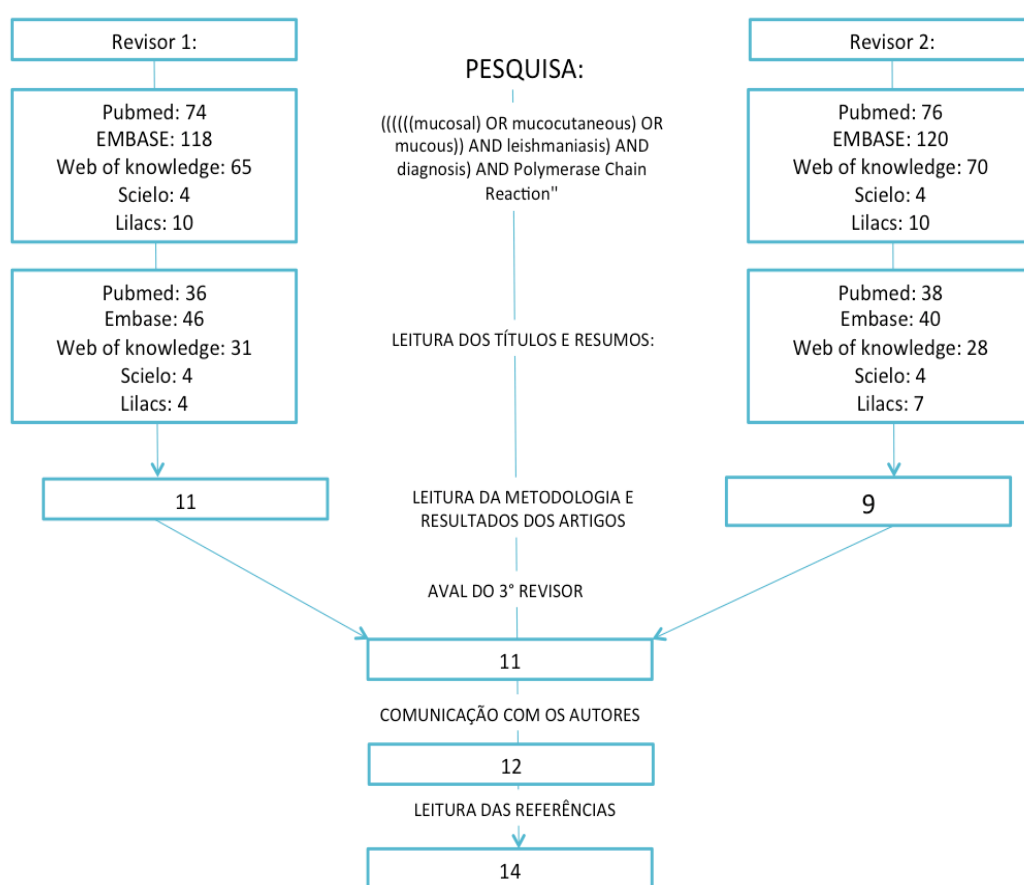


Figura 22. Fluxograma de seleção e inclusão dos artigos.

Tabela 14. Referências bibliográficas dos artigos selecionados após revisão sistemática:

CITAÇÃO:	REFERÊNCIA:
Piñero/1999	Piñero J, Martínez E, Pacheco R, Aragón Z, De Armas F, Del Castillo A, Valladares B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. <i>Acta Trop</i> . 1999 May 25;73(1):21-9.
Pirmez/1999	Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. <i>J Clin Microbiol</i> . 1999 Jun;37(6):1819-23.
Victoir/2003	Victoir K, De Doncker S, Cabrera L, Alvarez E, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Le Ray D, Dujardin JC. Direct identification of <i>Leishmania</i> species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> . 2003 Jan-Feb;97(1):80-7.
Disch/2005	Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, Rabello A. <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> . 2005 Mar;51(3):185-90.
Camera/2006	de Oliveira Camera P, Junger J, do Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C. Haematogenous dissemination of <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> in human American tegumentary leishmaniasis. <i>Trans R Soc Trop Med Hyg</i> . 2006 Dec;100(12):1112-7.
Bracho/2007	Ovalle Bracho C, Porrás de Quintana L, Muvdi Arenas S, Rios Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> . 2007 Aug;102(5):549-54.
Deborggraeve/ 2008	Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, El-Safi S, Al-Basheer AA, Arévalo J, Miranda-Verástegui C, Leclipteux T, Mertens P, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. <i>J Infect Dis</i> . 2008 Nov 15;198(10):1565-72.
Pereira/2008	Pereira Ede F, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, de Castro EA, Mulinari-Brenner F, Queiroz-Telles F, Luz E. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil. <i>Exp Dermatol</i> . 2008 Dec;17(12):1024-30.
Fagundes/2010	Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, Monteiro Vde S, Madeira Mde F, Quintella LP, Valette-Rosalino CM, Vasconcellos Ede C, Azeredo-Coutinho RB, Pacheco RS, Marzochi MC, Marzochi KB. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> . 2010 Feb;105(1):109-12.
Boggild/2011a	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. <i>PLoS One</i> . 2011;6(10):e26395.
Thomaz- Soccol/2011	Thomaz-Soccol A, Mocellin M, Mulinari F, Castro EA; Queiroz-Telles F, Alcântara FS, Bavaresco MT, Hennig L, Andraus A, Luz E, Thomaz-Soccol V. Clinical aspects and

relevance of molecular diagnosis in late mucocutaneous leishmaniasis patients in Paraná, Brazil. *Braz. arch. biol. technol*;54(3):487-494, May-June 2011.

Veland/2011	Veland N, Espinosa D, Valencia BM, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A, Boggild AK. Polymerase chain reaction detection of Leishmania kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. <i>Am J Trop Med Hyg.</i> 2011 Apr;84(4):556-61.
Marco/2012	Marco JD, Barroso PA, Mimori T, Locatelli FM, Tomatani A, Mora MC, Cajal SP, Nasser JR, Parada LA, Taniguchi T, Korenaga M, Basombrio MA, Hashiguchi Y. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of Leishmania species from Argentina. <i>BMC Infect Dis.</i> 2012 Aug 15;12:191.
Neitzke-Abreu/2013	Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MV, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, Silva NR, Aristides SM, Silveira TG, Lonardon MV. Detection of DNA from Leishmania (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. <i>PLoS One.</i> 2013 Jul 5;8(7):e62473.

4.2.2. RESULTADO DA REVISÃO QUALITATIVA E SISTEMÁTICA DOS ARTIGOS SELECIONADOS:

Como relatado em algumas publicações, revisões sistemáticas sobre teste de acurácia diagnóstica tendem a resultar em referências de menor qualidade quando comparada às revisões que buscam ensaios clínicos (DEVILLÉ et al., 2002). Outro fato interessante recai sobre a relativa baixa frequência da LM. Ambos os fatos podem afetar resultados das pesquisas publicadas e de uma revisão sistemática da literatura.

Quanto à localização, 7 estudos foram realizados no Brasil, todos na região Sul e Sudeste do país, endêmicas para a espécie *L. V. braziliensis*, 5 no Peru, 1 na Colômbia e 1 na Argentina. De fato, apenas 5 dos 14 artigos incluídos realizaram o estudo apenas em pacientes com LM. Os demais estudos mesclaram casos de LM e LC, geralmente em uma forma consecutiva de seleção. Esta característica dificultou a identificação de estratificação por idade ou sexo dos pacientes que apresentavam apenas LM.

Um dos principais pontos de heterogeneidade nos artigos selecionados foram os critérios diagnósticos e a definição dos controles. Em apenas 3 estudos, os pacientes foram selecionados com base na união de critérios clínicos, epidemiológicos e parasitológicos. Erro frequente, avaliado em 6 artigos, foi a inclusão do exame de PCR investigado nos critérios de inclusão e alocação. Nos demais estudos, 3 utilizaram o critério parasitológico isolado, 1 somente o critério clínico e em 1 estudo os critérios diagnósticos não foram identificados.

Quanto à natureza da amostra analisada, 3 estudos utilizaram amostras de sangue, 1 urina, 1 raspado da lesão, 1 aspirado da lesão, 1 *swab* nasal e biópsia e 7 somente amostras de tecido coletadas por biópsia. Dados sobre positividade e características dos testes são pormenorizados a seguir (Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 15. Características dos estudos selecionados:

Autor/ano:	Local:	Inclusão Casos:	Amostra:	Iniciadores em pares de bases:
Piñero/1999	Cuzco/Peru	Parasitológico	Sangue	72
Pirmez/1999	Rio de Janeiro/Brasil	Clinico	Biopsia	120
Victoir/2003	Lima/Peru	PCR	Biopsia	870
Disch/2005	Belo Horizonte/Brasil	Clinico, Imunológico e Parasitológico	Biopsia	51,120
Camera/2006	Rio de Janeiro/Brasil	Parasitológico e PCR	Sangue	120
Bracho/2007	Bogotá/Colômbia	Clinico, Imunológico e Parasitológico	Biopsia	120, 1000
Deborggraeve/2008	Lima/Peru	Parasitológico	Aspirado	115
Pereira/2008	Paraná/Brasil	Parasitológico e PCR	Biopsia	70, 750, 103, 62
Fagundes/2010	Rio de Janeiro/Brasil	Parasitológico	Biopsia	120
Boggild/2011a	Lima/Peru	Clinico, Imunológico, Parasitológico e PCR	<i>Swab</i> , escova Nasal e biópsia.	70
Tomaz-Socoll/2011	Paraná/Brasil	Clinico, Parasitológico e PCR	Biopsia	70, 750
Veland/2011	Lima/Peru	Parasitológico e PCR	Urina	70
Marco/2012	Salta/Argentina	Clinico, Imunológico e Parasitológico	Raspado da lesão	168, 700, 103, 79, 79, 862
Neitzke-Abreu/2013	Maringá/Brasil		Sangue	70

Legenda: PB = Peso molecular em pares de bases.

Tabela 16. Dados utilizados para criação de tabela 2x2: Publicações com mais de um método de coleta ou amplificação foram subdivididas.

ESTUDO	Casos (VP)	Controles (FP)
Piñero/1999	36 (30)	19 (0)
Pirmez/1999	30 (23)	14 (0)
Victoir/2003	15 (11)	5 (0)
Disch/2005 51	13 (11)	10 (0)
Disch/2005 120	13 (11)	10 (0)
Camera/2006	20 (7)	37 (9)
Bracho/2007 KDNA	35 (24)	25 (2)
Bracho/2007 ITS	35 (14)	25 (1)
Deborgraeve/2008	12 (11)	8 (0)
Pereira/2008	14 (12)	3 (0)
Fagundes/2010	15 (14)	15 (1)
Boggild/2011a <i>Cervisoft</i>	23(22)	10 (1)
Boggild/2011a <i>Hystobrush</i>	23(21)	10 (1)
Boggild/2011a Biopsia	23(22)	5 (0)
Tomaz-Socoll/2011	15 (15)	6 (0)
Tomaz-Socoll/2011	15 (15)	6 (0)
Veland/2011	8 (6)	32 (0)
Marco/2012	9 (8)	19 (3)
Neitzke-Abreu/2013 Sangue	10 (6)	55 (2)

Legenda: VP = Verdadeiros positivos, FP = Falsos positivos.

Tabela 17. Dados calculados após criação de tabela 2x2: Publicações com mais de um método de coleta ou amplificação foram subdivididas.

Autor/ano:	Sens:	Esp:	VPP:	VPN:	Acurácia:
Pinero/ 1999	83,33 (68,11-92,13)	100 (83,18-100)	100 (88,65-100)	76,00 (56,57-88,5)	89,09 (78,17-94,9)
Pirmez/ 1999	76,67 (59,07-88,21)	100 (78,47-100)	100 (85,69-100)	66,67 (45,37-82,81)	84,09 (70,63-92,07)
Victoir/ 2003	73,33 (48,05-89,1)	100 (56,55-100)	100 (74,12-100)	55,56 (26,66-81,12)	80 (58,4-91,03)
Disch/2005 51	84,62 (57,76-95,67)	100 (75,25-100)	100 (74,12-100)	83,33 (55,2-95,3)	91,3 (73,2-97,58)
Disch/ 2005 120	84,62 (57,76-95,67)	100 (75,25-100)	100 (74,12-100)	83,33 (55,2-95,3)	91,3 (73,2-97,58)
Camera/ 2006	35 (18,12-56,71)	75,68 (59,88-86,64)	43,75 (23,1-66,82)	68,29 (53,02-80,44)	61,4 (48,43-72,94)
Bracho/ 2007 KDNA	68,57 (52,02-81,45)	92 (75,03-97,78)	92,31 (75,86-97,86)	67,65 (50,84-80,87)	78,33 (66,38-86,88)
Bracho/ 2007 ITS	40 (25,55-56,43)	96 (80,46-99,29)	93,33 (70,18-98,81)	53,33 (39,08- 67,07)	63,33 (50,68-74,38)
Deborgraeve/ 2008	91,67 (64,61-98,51)	100 (67,56-100)	100 (74,12-100)	88,89 (56,5-98,01)	95 (76,39- 99,11)
Pereira/ 2008	85,71 (60,06-95,99)	100 (43,85-100)	100 (75,15-100)	60 (23,07-88,24)	88,24 (65,66-96,71)
Fagundes/ 2010	93,33 (70,18-98,81)	93,33 (70,18-98,81)	93,33 (70,18-98,81)	93,33 (70,18- 98,81)	93,33 (78,68-98,15)
Boggild/ 2011a Cervisoft	95,65 (79,01-99,23)	90 (59,58-98,21)	95,65 (79,01-99,23)	90 (59,58-98,21)	93,94 (80,39-98,32)
Boggild/ 2011a Hystobrush	91,3 (73,20-97,58)	90 (59,58-98,21)	95,45 (78,20-99,19)	81,82 (52,30-94,86)	90,91 (76,43-96,86)
Boggild/ 2011a Biopsia	95,65 (70,01-99,23)	100 (56,55-100)	100 (85,13-100)	83,33 (43,65-96,99)	96,43 (82,29-99,37)
Tomaz-Socoll/ 2011	100 (79,61-100)	100 (60,97-100)	100 (79,61-100)	100 (60,97-100)	100 (84,54-100)
Tomaz-Socoll/ 2011	100 (79,61-100)	100 (60,97-100)	100 (79,61-100)	100 (60,97-100)	100 (84,54-100)
Veland/2011	75 (43,93-92,85)	100 (89,28-100)	100 (60,97-100)	94,12 (80,91-98,37)	95 (83,5-98,62)
Marco/ 2012	88,89 (56,5-98,01)	84,21 (62,43-94,48)	72,73 (43,43-90,25)	94,12 (73,02-98,95)	85,71 (68,51-94,3)
Neitzke-Abreu/ 2013 Sangue	60 (31,27-83,18)	96,36 (87,68-99)	75 (40,93-92,85)	92,98 (83,3-97,24)	90,77 (81,29-95,7)

Legenda: Sens = Sensibilidade, Esp = Especificidade, VPP = Valor preditivo positivo, VPN =

Valor preditivo negativo.

4. RESULTADOS:

4.3. META-ANÁLISE:

O presente tópico tem por objetivo realizar meta-análise da união dos artigos selecionados pela revisão sistemática da literatura e estudo clínico aqui realizado. Os passos desta análise são relatados a seguir (Figura 24).

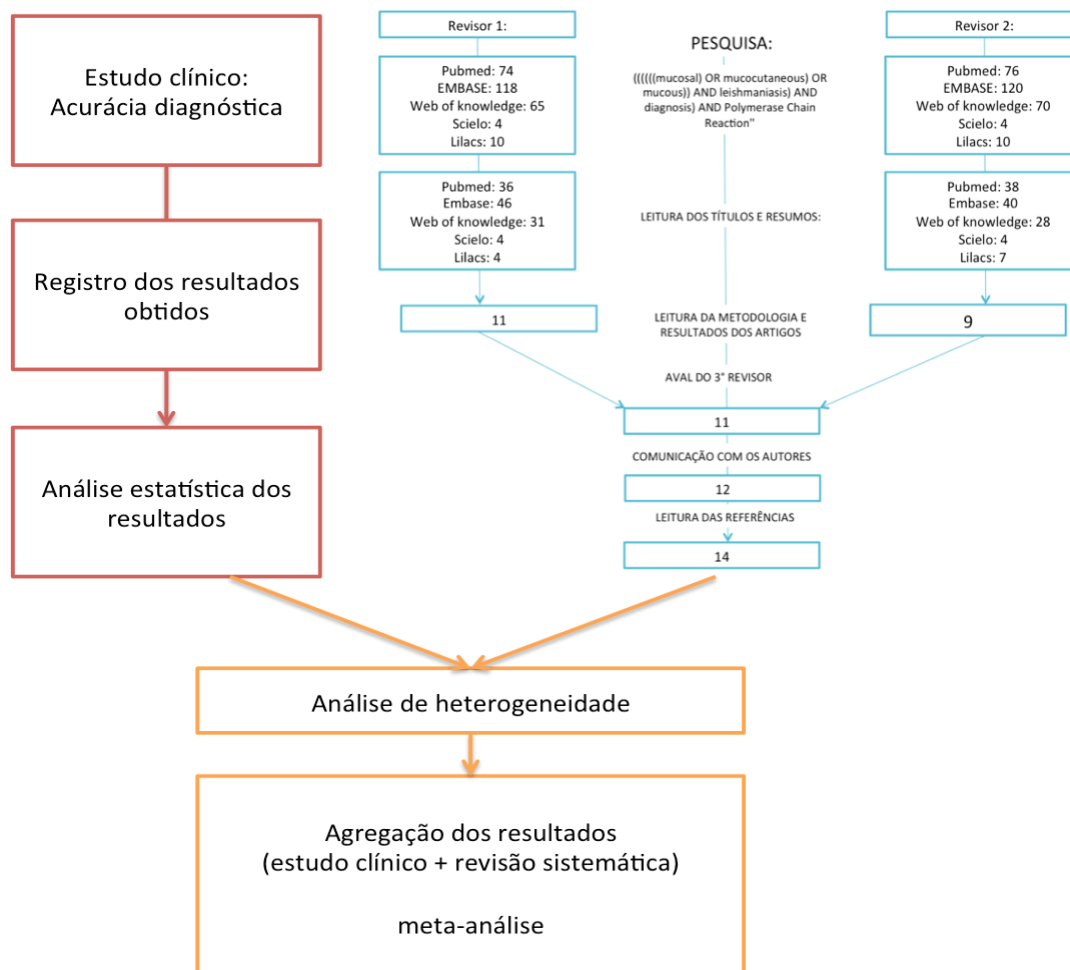


Figura 24. Fluxograma da meta-análise e estudo clínico. O fluxograma demonstra os passos da agregação do estudo clínico com artigos semelhantes encontrados pela revisão sistemática da literatura.

4.3.1. ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DOS ARTIGOS:

É sabido que estudos de acurácia diagnóstica apresentam elevada heterogeneidade em comparação aos ensaios clínicos, o que frequentemente impede a realização de uma meta-análise do primeiro gênero (DEVILLÉ et al., 2002). Os dados utilizados para comparação

agregada tanto na pesquisa clínica quanto nos artigos selecionados referiram-se à comparação entre LM e controles sem LTA.

O primeiro passo para agrupamento dos artigos com base em suas semelhanças metodológicas foi a análise dos procedimentos e etapas para inclusão dos pacientes. Os artigos foram classificados quanto ao uso de métodos clínicos, imunológicos e parasitológicos durante a seleção dos casos e controles (Tabela 15). Acredita-se que este quesito seja de suma importância, já que a inclusão de pacientes apenas pelo critério parasitológico ou utilização da própria PCR na inclusão elevaria a sensibilidade do exame.

Em uma segunda etapa, avaliou-se a metodologia da PCR desde a coleta até a revelação do exame. Variações muito discrepantes destas características podem exercer grande influência na variabilidade dos resultados. Iniciadores com peso molecular menor que 150pb e que identifiquem a região conservada do do kDNA de *Leishmania* apresentam sensibilidade superior e podem ser identificados em sítios distantes da lesão clínica (VELAND et al., 2011).

As seguintes características foram consideradas nesta fase do agrupamento: amostra analisada, peso molecular e alvo dos iniciadores utilizados para amplificação. As amostras de tecido humano foram consideradas semelhantes mesmo que armazenadas em papel filtro, bloco de parafina ou congeladas (MARQUES et al., 2001). Foram ainda consideradas semelhantes as formas de extração do DNA que utilizassem *Kits* comerciais ou uso de técnicas com fenol (MARQUES et al., 2001). Foram considerados semelhantes os estudos que utilizassem iniciadores com alvo no minicírculo kDNA e apresentassem peso molecular menor que 150pb.

Após avaliação metodológica, foram selecionados 3 artigos (DISCH et al., 2005; BRACHO et al., 2007; TOMAZ-SOCOLL et al., 2011), onde foi possível comparação com a presente pesquisa clínica, apenas para amostras de tecido. Criou-se gráfico floresta que evidenciou aparente discrepância na referência de Tomaz-Socoll/2011 (TOMAZ-SOCOLL et al., 2011; FOREST PLOT PROGRAM). Esta referência demonstrou sensibilidade aparentemente elevada em relação às demais incluídas e foi desconsiderada para análise agregada dos dados (Figura 25).

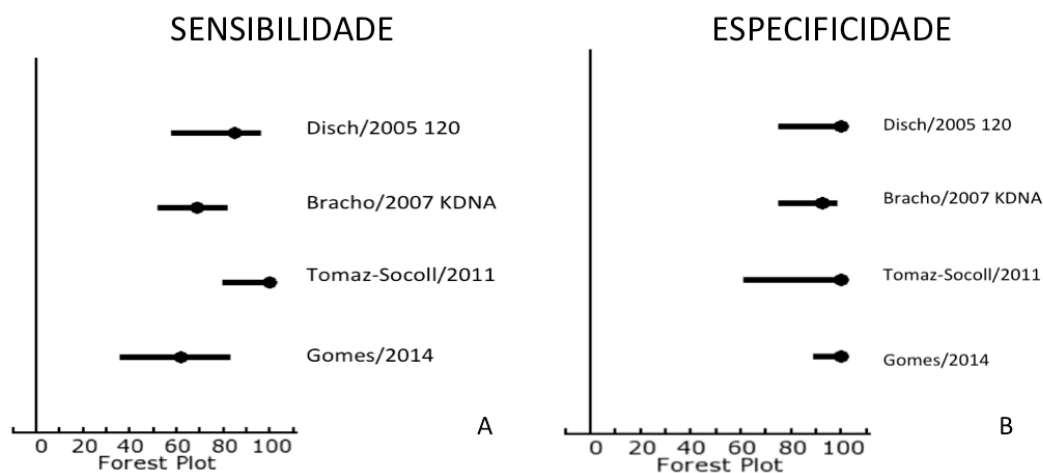


Figura 25. Gráficos floresta para avaliação da heterogeneidade: sobre a sensibilidade (A) e especificidade (B) dos artigos selecionados e da presente pesquisa clínica.

4.3.2. CRIAÇÃO DE GRÁFICO FLORESTA COM AGREGAÇÃO:

A agregação e análise dos dados foram feitas por meio do programa Meta-DiSc® (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Espanha). A escassez de detalhamento sobre a característica das populações estudadas impediu o agrupamento dos dados encontrados com base em características demográficas como sexo e idade. Pela hipótese da existência de possíveis vieses de seleção devido a este último problema relatado e para garantir a homogeneidade dos dados optou-se pela aplicação do modelo de diagnóstico com efeito randomizado. Foram considerados homogêneos valores de $p > 0,1$ (DIVERSITY AND HETEROGENEITY).

Análise dos dados agregados demonstrou sensibilidade de 70% (IC-95%=0,57-0,81), especificidade de 97% (IC-95%=0,89-1), e razão de chances de 40,34 (IC-95%=11,06-147,08) para PCR de amostras de tecido no diagnóstico da LM. Análise por meio do teste do qui-quadrado após agregação dos dados confirmou homogeneidade satisfatória para ambos sensibilidade ($p=0,3771$) e especificidade ($p=0,1406$) (Figuras 26, 27, 28, 29).

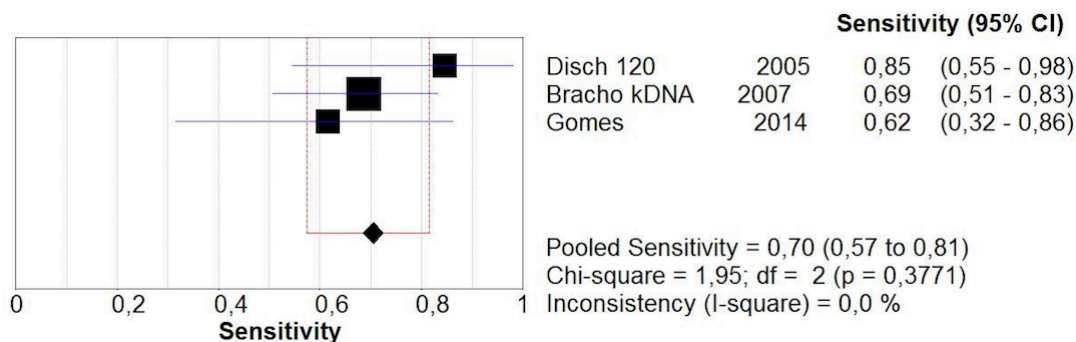


Figura 26. Gráfico floresta com agregação dos dados de sensibilidade.

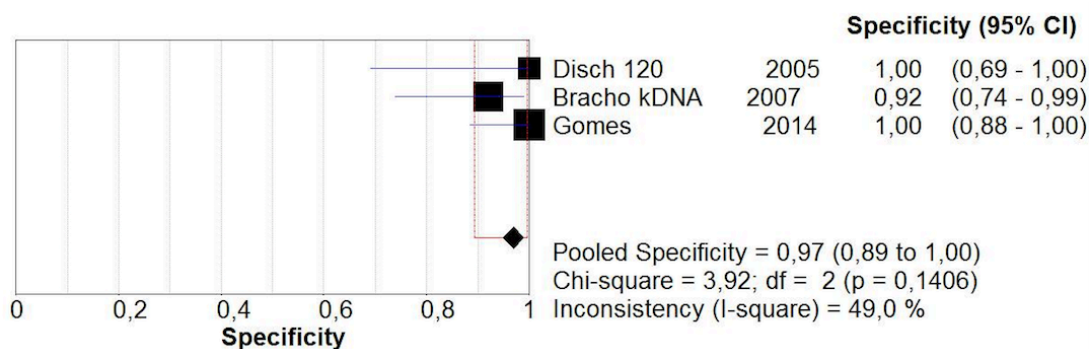


Figura 27. Gráfico floresta com agregação dos dados de especificidade.

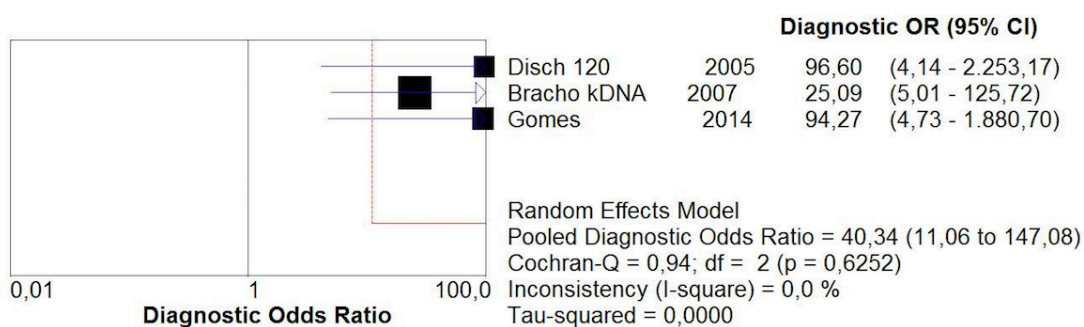


Figura 28. Gráfico floresta com agregação dos dados de razão de chances.

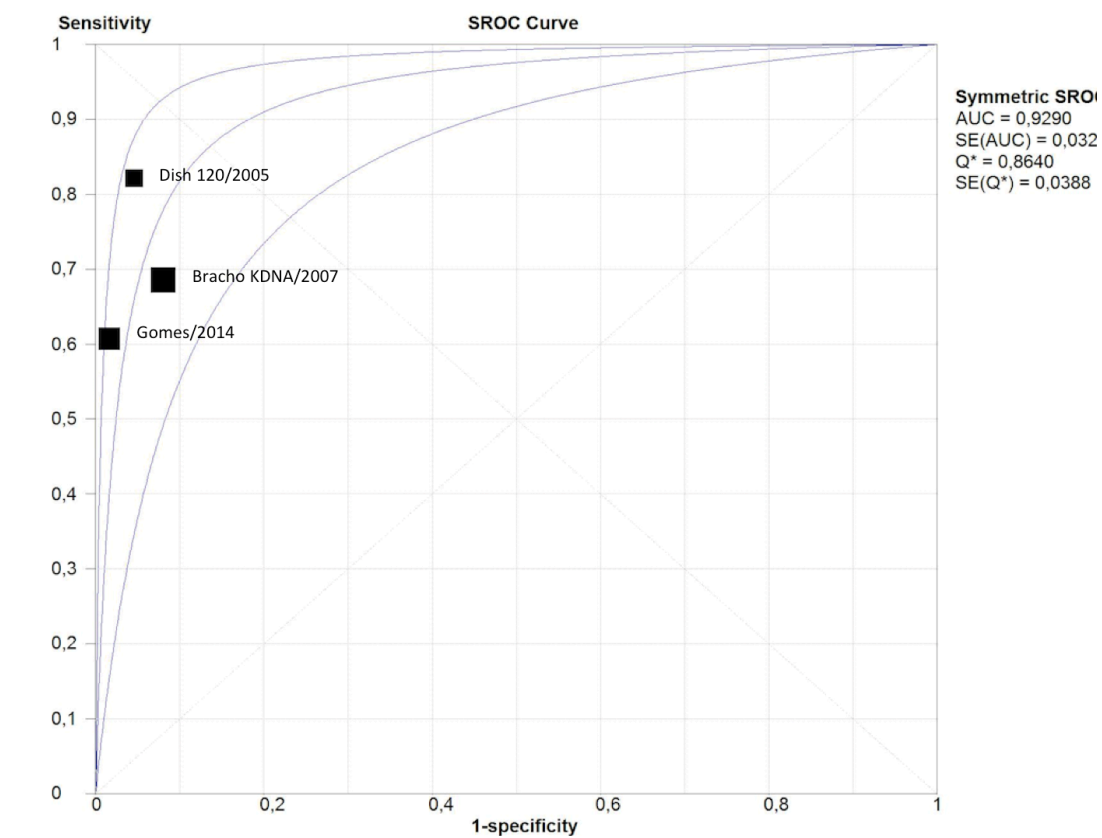


Figura 29. Curva SROC: demonstração da rela o entre sensibilidade e especificidade.

Pela escassez e heterogeneidade das referências encontradas, não foi possível aplicar meta-análise para SN, saliva e PFO.

5. DISCUSSÃO:

5.1. SELEÇÃO E INCLUSÃO DOS PACIENTES:

As características dos pacientes atendidos no presente estudo devem ser analisadas com cautela e estão intimamente relacionadas aos critérios de inclusão e exclusão previamente definidos. No período de 18 meses de coleta, foram incluídos 36 casos de LM e LC, representando 52% de um total de 69 pacientes analisados nesta pesquisa.

A média anual de pacientes com diagnóstico clínico de LTA encaminhados ao Laboratório de Dermatologia da FM-UnB nos últimos 17 anos, foi de aproximadamente 100 casos (GOMES; CESETTI et al., 2014). Esta redução de casos evidenciada no presente estudo, em comparação à média histórica, pode ser explicada por perdas amostrais no momento da inclusão consecutiva e pela aplicação dos critérios de exclusão.

A proporção de casos de LM (47%), em comparação a todos os casos de LTA, mostrou-se condizente com inquéritos anteriores na mesma população (NAME et al., 2005), mas discrepante aos dados da população geral, já que os casos de LC são consideravelmente mais frequentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A LM é uma doença com recidivas mais comuns do que a LC e este não consistiu em critério de exclusão no presente estudo, o que poderia explicar a proporção semelhante entre casos de LC e LM (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011). No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de casos de recidiva entre os grupos ($p=0,2085$).

O HUB é considerado centro terciário, de referência regional para o tratamento da LTA e o papel do hospital no sistema de saúde pode explicar a elevada proporção de casos de LM encontrada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Os casos de LM envolvem maior complexidade, e são frequentemente encaminhados ao serviço. Já os casos de LC podem ser tratados em centros secundários e até primários nesta região.

Não se pode ainda excluir a presença de um possível viés de seleção. Nesta hipótese, o recrutador, ciente da raridade e da importância dos casos de LM, pode ter exercido uma tendência de incluir estes casos em maior proporção. Um exemplo prático seria: na chegada simultânea de 2 pacientes, um com LM e um com LC, e na impossibilidade de realizar-se a coleta de dois casos ao mesmo tempo, opta-se pela coleta do caso de LM.

5.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O TAMANHO AMOSTRAL:

A determinação do tamanho amostral em um estudo de acurácia diagnóstica é um grande desafio. Existem algumas variações técnicas amplamente utilizadas.

Antes do início do estudo, apenas uma referência sobre SN, realizada em população distinta foi identificada, (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011) o que impediu utilização da comparação entre SN, saliva e PFO para cálculo da amostra. Utilizou-se então técnica que avalia a sensibilidade de um definido desfecho principal e a prevalência da doença conforme descrito nos métodos.

Os resultados da sensibilidade aqui apresentados pelo SN 58,82% (IC95% = 36,01-78,39) na comparação entre LM e controles, demonstram considerável discrepância com os 95% de sensibilidade definidos pela referência prévia utilizada (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011). O resultado foi ainda abaixo do limite mínimo aceitável para o intervalo de confiança definido em 65% com a inclusão de 16 casos. Estas diferenças podem ser justificadas por variações metodológicas e populacionais já detectadas pela revisão sistemática da literatura. Provavelmente, a definição de uma sensibilidade esperada de 95% não foi adequada.

A realização de estudos piloto com a mesma metodologia, na mesma população a ser estudada pode evitar erros de inferência. Ao final do primeiro ano de estudo, com exatos 14 casos de LM, 14 casos de LC e 17 controles, realizou-se novo cálculo amostral deste piloto. Este novo procedimento daria melhores informações sobre os testes e sobre a população em questão e possibilitaria o reinício da coleta de dados para maior precisão da análise.

Para o cálculo utilizou-se o programa R versão 3.1.0® (Institute for Statistics and Mathematics, Wirtschaftsuniversität, Viena, Áustria). O poder do teste foi fixado em 95% e o nível de significância em 5%, porém como há múltiplas comparações esse nível de significância foi ajustado. A correção de Bonferroni foi aplicada e o novo nível de significância foi definido como 1,67%. Assim, a figura 30 mostra a relação entre o tamanho amostral e a diferença mínima entre a precisão dos exames (Figura 30). O resultado analítico então mostrou que seriam necessários pelo menos 150 pacientes para avaliar uma diferença de 30% entre os exames.

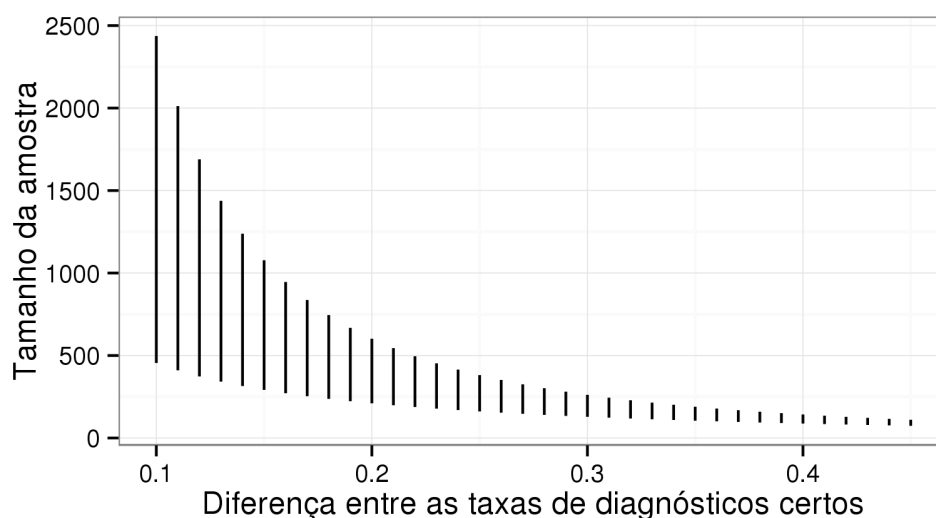


Figura 30. Relação entre o tamanho amostral e a diferença mínima entre a precisão dos exames.

Considerando-se o ritmo da inclusão de casos, seriam necessários mais de 3 anos para a conclusão de uma nova etapa e nova movimentação de recursos acima de 3 vezes o utilizado até então. Pela restrição da disponibilidade dos casos, principalmente de LM, e pelos custos adicionais, decidiu-se pela continuidade do estudo na maior parcela de população possível, até exaustão dos recursos materiais adquiridos.

5.3. DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS:

Os dados clínicos aferidos seguiram padrões já descritos na literatura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A idade dos pacientes ($p=0,0223$) e o tempo médio de início dos sintomas ($p=0,0001$) foram significativamente maiores nos pacientes com LM, em comparação aos casos de LC. Este resultado pode ser explicado pelo maior tempo de evolução e cronicidade da LM, que pode ainda, ser resultante do manejo inadequado de uma LC cutânea prévia (DE OLIVEIRA CAMERA et al., 2006).

A proporção de pacientes do sexo masculino, conhecido fator de risco para a LM (DE OLIVEIRA CAMERA et al., 2006), foi maior neste grupo, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,4020$). Este fato pode ser explicado pelo tamanho amostral, limitado pela relativa raridade da doença.

5.4. EXAMES DE ALOCAÇÃO (IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS):

O diagnóstico precoce da LM é essencial, pelo alto impacto social envolvido (AL-QAHTANI et al., 2012). A maioria dos exames parasitológicos são invasivos e de baixa sensibilidade. Existem ainda opções como a IDRM com boa sensibilidade, mas baixa especificidade (REITHINGER et al., 2007). Os testes sorológicos como a IFI têm valor limitado, mas podem ser úteis se o parasito não for encontrado (SZARGIKI et al., 2009; ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007). O presente estudo confirmou estas propriedades, já descritas na literatura (BOGGILD et al., 2007; FABER et al., 2003; RAHMAN; BARI, 2003; MOMENI et al., 2013; SADEGHIAN et al., 2013; ROMERO et al., 2001).

Os resultados também demonstraram a melhor acurácia do PFL no diagnóstico da LTA. No entanto, estes exames não estão presentes na maioria dos centros assistenciais. Em relação aos exames de inclusão, estratégias de associação das provas diagnósticas podem ser instituídas, com vistas a melhorar a acurácia no diagnóstico da LTA. A melhor escolha depende da disponibilidade em cada centro. Outras características como custo e rapidez dos resultados também devem ser levadas em conta.

Em relação aos exames parasitológicos (exame histopatológico, exame direto, cultura), recomenda-se a associação em paralelo, o que aumentaria a sensibilidade do processo. Ademais, um mesmo fragmento de lesão cutânea ou mucosa pode ser usado para realização das três provas mencionadas, agregando boa relação custo-efetividade.

Nos casos em que os exames imunológicos (IDRM e sorologias) estão disponíveis, estes podem ser utilizados como ferramenta para *screening* nos casos clinicamente suspeitos. Em um segundo momento, exames parasitológicos podem ser instituídos, se necessário, para confirmação diagnóstica e início do tratamento. Esta sequência pode resolver, em parte, a baixa especificidade dos exames imunológicos e reduzir custos.

Apesar das alternativas existentes, casos de LM ainda representam grande desafio diagnóstico. A elevada resposta imunitária dificulta o encontro da *Leishmania* por técnicas convencionais (BOGGILD; RAMOS et al., 2010; SZARGIKI et al., 2009; REIS et al., 2008). A presença de diversos diagnósticos diferenciais torna ainda os resultados dos exames imunológicos pouco confiáveis. Frente ao dilema, inúmeros pesquisadores buscam padronização de técnicas moleculares no diagnóstico da LM, aparentemente, a melhor solução aos problemas relatados.

5.5. TEMPO DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA E POSITIVIDADE DOS EXAMES:

Estudos anteriores atestam que o tempo de evolução da LTA pode afetar, de sobremaneira a sensibilidade dos testes diagnósticos (BOGGILD; RAMOS et al., 2010; SZARGIKI et al., 2009; REIS et al., 2008). Os exames parasitológicos apresentam maior positividade nos primeiros meses da infecção, quando a imunidade celular do hospedeiro não está completamente instalada e a quantidade de parasitos é mais abundante. O inverso pode ser observado em relação aos exames imunológicos (IDRM e IFI), com maior positividade em fases tardias da infecção. No presente estudo, correlação diretamente proporcional só pôde ser observada quando comparados o tempo de evolução e a medição da IDRM quantitativa em casos de LC ($p=0,0339$) (Figura 20).

Nos demais exames, não observou-se influência significativa do tempo de doença em ambas as formas de LTA. O fato pode ser explicado pela baixa variabilidade de pacientes com tempo de evolução da doença menor do que 3 meses, marco frequentemente citado na literatura científica (GOMES; DE PAULA et al., 2014). Nenhum dos pacientes com LM e apenas 4 pacientes com LC apresentaram tempo de evolução da doença menor do que 3 meses. Acredita-se que dificuldades operacionais relacionadas à assistência médica possam atrasar o diagnóstico dos casos de LTA. Por se tratar de doença negligenciada, torna-se mais difícil o acesso aos centros especializados em fases precoces da infecção.

5.6. AMOSTRAS MOLECULARES MUCOSAS NA LM:

Quesito importante na reprodutibilidade de exames moleculares na LM recai sobre a falta de padronização dos critérios de inclusão, o que prejudica a comparação entre estudos prévios (SHIRIAN et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2010). Obviamente, a inclusão apenas de pacientes com parasitologia positiva, resultaria em maior sensibilidade da PCR. Para estudos clínicos, consideramos que o critério parasitológico isolado é insuficiente em nossa região (KLINE et al., 2013). A *L. (V.) braziliensis*, espécie predominante no Centro-Oeste do Brasil, é conhecida por causar lesões mucosas com escassez parasitária e intensa formação de granulomas (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). O uso de exames em paralelo teve por objetivo solucionar o problema da baixa sensibilidade dos exames parasitológicos.

A definição de grupos controle também não segue padronização na literatura. Como controles, incluímos pacientes com doenças que simulam a LTA. Doenças como hanseníase e paracoccidioidomicose são endêmicas nesta região e podem ser confundidas. A inclusão de pacientes com a forma cutânea isolada também possibilitou a comparação da primeira com os

casos de LM, que se justifica pela possibilidade de pacientes com LC apresentarem lesões mucosas iniciais, não reconhecíveis ao exame clínico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A inclusão de controles hígidos, simularia situação fictícia, dificilmente aplicável na prática, e que geraria especificidade diagnóstica equivocadamente alta (WHITING et al., 2003). Este resultado seria nocivo, uma vez que a doença cursa com baixa mortalidade, mas tem tratamento tóxico, a exemplo do antimônio pentavalente e anfotericina-B (REVEIZ et al., 2013). O tempo de tratamento com antimônio poderia ainda ser prolongado, caso um paciente com LC fosse erroneamente diagnosticado como caso de LM (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Para o diagnóstico da LM em comparação aos controles, a melhor acurácia foi alcançada pelo SN 86% (IC95% = 73,81-93,05). Todos os pacientes com positividade para SN, saliva ou PFO apresentavam lesões nasais, contíguas ou não. O septo nasal anterior é composto por mucosa delicada, rica em macrófagos e consiste na região das vias aéreas superiores mais acometida pela LM (FARIAS et al., 2013). A característica celular, imunológica e temperatura desta região parecem ideais para abrigo e proliferação da *Leishmania* após disseminação linfática ou hematogênica (LESSA et al., 2012). Lesões nesta localização são ainda mais friáveis, o que possivelmente resultou em melhor amostra citológica. O uso de SN possibilita fácil acesso à mucosa do septo nasal anterior sem a necessidade de procedimentos invasivos ou uso de anestésicos. O procedimento gerou leve desconforto e sangramento facilmente estancável no momento da coleta.

Boggild *et al.* 2011, avaliou o *swab* mucoso na LM (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011). Os autores demonstraram positividade do kDNA da *Leishmania* em 95% dos casos estudados (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011). Foram identificadas as espécies do subgênero *Viannia* como *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis*. Em nossa região, detectam-se como predominantes as espécies *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*, sendo a primeira, provavelmente responsável por todos os casos de LM aqui relatados. Casos autóctones de LM por outras espécies não foram devidamente comprovados na região Centro-oeste do Brasil. A *L.(V.) braziliensis* é reconhecida por induzir intensa reação inflamatória e baixa quantidade de parasitos aos exames diagnósticos (ROMERO et al., 2001; BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). Este fator pode explicar a menor sensibilidade da coleta por SN no presente estudo, em comparação à única referência anterior encontrada (BOGGILD; VALENCIA et al., 2011).

A acurácia da saliva na diferenciação entre LM e controles foi de 74% (IC-95%=60,45-84,13), positiva em 4 casos de LM. Destes, 3 apresentavam lesão nasal isolada e

1 lesão nasal e oral contíguas. A saliva total é formada por diversos componentes celulares, a exemplo de células mucosas descamadas. Presença de gotejamento pós-nasal, pode explicar esta associação. A coleta deste exame também é pouco invasiva e não gera dor ou sangramento. Aquisição da amostra necessária (aproximadamente 1,5mls) pode ser difícil, principalmente em pacientes com hipossalivação severa e em estações do ano com baixa umidade relativa do ar.

A acurácia para a PCR do PFO na diferenciação entre LM e controles foi de 68% (IC-95%=54,19-79,24). Este resultado deu-se às custas da alta especificidade do exame 100% (IC-95%=89,57-100), uma vez que este apresentou baixíssima sensibilidade 5,88% (IC-95%=1,05-26,98). Este resultado indica que a *L. (V.) braziliensis* não está presente nas amostras citológicas da mucosa oral sadia e que o contato direto com a lesão clínica parece ser essencial para a positividade de coleta em papel filtro.

A análise dos dados, mostra que a positividade dos exames não invasivos para o diagnóstico da leishmaniose mucosa foi proporcionalmente maior nas fases finais do estudo, principalmente nos casos do *swab nasal* e saliva. O dado mostra que a curva de aprendizado e adequação das novas técnicas de coleta aqui utilizadas podem ter contribuído para a relativa alta observação de resultados negativos no início do estudo, para LM (Tabela 8).

Mesmo com a revisão sistemática da literatura, não foram encontrados dados prévios controlados sobre a saliva e PFO no diagnóstico da LM, o que impediu comparação da pesquisa atual com outras evidências.

5.7. AMOSTRAS MOLECULARES MUCOSAS NA LC:

Para o diagnóstico da LC por PCR de SN, dados apontam que diversas espécies de *Leishmania* podem estar presentes na mucosa sem causar lesão clínica evidente. De fato, no presente estudo, dois pacientes com lesão cutânea exclusiva apresentaram positividade no SN e PFO, mas não na saliva. Nasofibroscopia comprovou ausência de lesão mucosa (Figura 21). Em um dos casos foi identificado o uso de imunossupressores previamente ao diagnóstico. A paciente foi incluída, pois estima-se que, pelo tempo de meia-vida do etanercept e metotrexato, 80 e 3 a 10 horas respectivamente, não havia imunossupressão significativa no momento da coleta dos exames (BIOMETROX SOLUÇÃO INJETÁVEL; TEXTO DE BULA DE ENBREL). No entanto, a imunossupressão prévia pode ter sido responsável pela disseminação durante atividade da LC, o que pode explicar a positividade do SN e PFO neste

caso. Exames adicionais como mielograma não indicaram visceralização da LC clinicamente detectável.

Figueroa *et al.* 2009, relatou positividade na PCR por *swab* mucoso de 81% dos pacientes portadores de LC (FIGUEROA *et al.*, 2009). Os autores descrevem ainda o achado da espécie *L. (V.) panamensis* na grande maioria dos pacientes e menor incidência de outras espécies como *L.(V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis* (FIGUEROA *et al.*, 2009). Pelo presente estudo, realizado na região Centro-Oeste do Brasil, onde espécies diversas à *L.(V.) braziliensis* não são reconhecidas como importantes causadoras de LM, a proporção de pacientes com LC e positividade molecular nas mucosas foi de apenas 11%.

O fato da *L.(V.) braziliensis* estar menos presente na mucosa de pacientes com LC quando comparado às outras espécies parece discrepante, já que a primeira é a principal causadora de LM (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012). No entanto, a observação clínica de que a *L.(V.) braziliensis* é o parasito mucoso mais frequente em pacientes com de LTA deve ser revisada com cautela. Os achados deste e de estudos prévios mostram o contrário (FIGUEROA *et al.*, 2009; BOGGILD; VALENCIA *et al.*, 2011). Não se pode excluir o fato das outras espécies serem mais frequentes e atuarem como hospedeiros silenciosos. Estudos *in vitro* mostram que a *L. (V.) braziliensis* estimula a produção de citocinas como a metaloproteinase-9 e receptor do tipo Toll-9, essenciais para a formação de granulomas e lesão clínica evidente (WEINKOPFF *et al.*, 2013; MARETTI-MIRA *et al.*, 2011). Pelo exposto, pode-se inferir que, possivelmente, a *L.(V.) braziliensis* atue como a principal espécie causadora de lesões clínicas mucosas, mas talvez, não a principal espécie encontrada na mucosa de pacientes com LC sem qualquer lesão mucosa.

Contaminação de amostras tanto na coleta quanto no processamento pode explicar a positividade da PCR do *swab* mucoso em pacientes com LC exclusiva. A presença de lesões na face justifica contaminação por manuseio no momento da coleta. Em nosso estudo, apenas 2 pacientes com LC apresentavam lesão facial, sendo que um deles apresentou positividade no SN e PFO. A pequena quantidade de pacientes com lesões faciais impossibilita conclusões mais detalhadas. No entanto, Figueroa *et al.* 2009, não encontrou relação entre a PCR de *swab* mucoso e o local da lesão em 26 pacientes com LC (FIGUEROA *et al.*, 2009). Estes dados mostram que a contaminação é improvável se adotados procedimentos adequados.

O uso de *iniciadores* com baixo peso molecular, menores que 150pb, como o utilizado no presente estudo (120pb) apresentam maior sensibilidade. Acredita-se que este gênero de amplificadores possa detectar, não somente parasitos no local da coleta, mas também debris

genéticos de *Leishmania* infectante em sítios distantes (VELAND et al., 2011). Pelo exposto, esta positividade não significa necessariamente que existem *Leishmanias* viáveis nas vias aéreas superiores dos pacientes com LC.

Um relato de caso parece ser a única evidência prévia de positividade da saliva em pacientes com LC exclusiva (CORVALAN et al., 2011). Os autores descrevem paciente com lesão na face. Possivelmente, em pacientes com lesão facial, a disseminação linfática ou hematogênica para a mucosa é mais proeminente (MARETTI-MIRA et al., 2011). No presente estudo, não encontramos positividade na saliva de pacientes com LC.

5.8. OUTRAS COMPARAÇÕES:

A análise por subgrupos, demonstrou características semelhantes ao desfecho principal. A coleta por SN, também mostrou maior acurácia na diferenciação entre LM e LC. Esta característica é de suma importância já que o tratamento preconizado para a LM é mais prolongado do que na LC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Pacientes com evidenciada LC poderiam ser avaliados por PCR de mucosa para previsão exata do tempo de tratamento e identificação de lesões mucosas iniciais. Em caso de positividade deste exame, uma averiguação detalhada de acometimento mucoso e disseminação da *Leishmania* deve ser realizada.

5.9. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA E META-ANÁLISE:

Os dados adquiridos pela revisão sistemática da literatura comprovam a falta de padronização na classificação da LTA. Apenas 2 dos 14 artigos selecionados puderam ser comparados com a presente pesquisa por meio de meta-análise. Diferentes passos metodológicos na realização da PCR também conferiram heterogeneidade entre os artigos selecionados. A heterogeneidade entre os artigos e escassez de referências similares impediram a agregação de dados sobre SN, saliva e PFO.

Os dados mostram que a grande maioria dos estudos utilizam amostras histológicas para o diagnóstico da LM por PCR. O uso de amostras não invasivas não é prática corriqueira na literatura científica. Os artigos existentes referem-se a dados não controlados ou pesquisas experimentais.

Em relação ao uso da PCR em amostras teciduais mucosas no diagnóstico da LM, análise dos dados agregados demonstrou uma sensibilidade de 70% (IC-95%=0,57-0,81), especificidade de 97% (IC-95%=0,89-1), e razão de chances de 40,34 (IC-95%=11,06-

147,08). A análise estatística, feita após aplicação dos critérios metodológicos, confirmou a homogeneidade dos artigos selecionados tanto para sensibilidade ($p=0,3771$) quanto para especificidade ($p=0,1406$).

Curva SROC gerada demonstrou a relação entre sensibilidade e especificidade (Figura 29). Apesar do pequeno número de artigos inclusos, a análise da curva demonstrou que mesmo com variações na sensibilidade do teste, a especificidade da PCR em amostras histológicas da lesão ativa mantém-se alta e estável.

Esta característica utilizada é de suma importância, já que estratégias para elevação da sensibilidade do teste como método de coleta, técnicas de extração, escolha da sequência amplificada e revelação da reação podem ser otimizadas com pouco prejuízo à especificidade do teste. Ainda assim, cuidados para evitar contaminação da amostra e dimerização dos iniciadores devem ser cautelosamente observados, já que podem gerar resultados falso positivos.

6. CONCLUSÃO:

6. CONCLUSÃO:

6.1. CONCLUSÃO PRINCIPAL:

O detalhamento dos exames utilizados permite concluir que a acurácia dos testes diagnósticos depende de inúmeros fatores, desde o método de coleta até a definição de casos e controles, já que não existe um teste padrão ouro definido para o diagnóstico da LTA. A dificuldade na comparação dos dados aqui apresentados com dados existentes na literatura deu-se, em grande parte, pela heterogeneidade dos critérios diagnósticos.

6.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:

6.2.1. Em relação à positividade de amostras mucosas em casos de LC, o presente estudo demonstra que este fato pode estar associado a fatores como imunossupressão, contaminação de amostras.

6.2.2. Os dados expostos permitem ainda concluir que, em comparação aos exames parasitológicos clássicos, o SN, a saliva e o PFO são menos invasivos e mantêm boa especificidade. A sensibilidade mais alta foi encontrada com o SN. Todas técnicas demonstraram ainda maior especificidade que a IFI e IDRM. Apesar disto, nenhum destes exames agrega acurácia suficiente para, isoladamente, diagnosticar a LM.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se afirmar que o uso de métodos não invasivos para realização da PCR no diagnóstico da LM não supera, em termos de acurácia, as técnicas para aquisição de amostras de tecido. No entanto, técnicas como o SN, saliva e PFO podem ser utilizados em situações nas quais não há recursos para a realização de biópsia ou em pacientes com contra indicações ao procedimento (ex: discrasias sanguíneas, infecção secundária).

Procedimentos que aumentem a sensibilidade destes materiais devem ser utilizados. O uso de substâncias estabilizadoras e conservantes para a coleta, principalmente da saliva, são desejáveis para otimização dos resultados. Técnicas de amplificação mais sensíveis também devem ser testadas como a qPCR. Tais atitudes podem aumentar a utilidade dos exames aqui testados e gerar ferramentas promissoras para o diagnóstico da LTA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agresti, A. An Introduction to Categorical Data Analysis, Second Edition, 2007, New York: John Wiley & Sons.

Al-Jawabreh, A.; Schoenian, G.; Hamarsheh, O.; Presber, W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of giemsa-stained smears. *Acta Trop*, v. 99, n. 1, p. 55-61, 2006.

Al-Qahtani, M.S.; Malik, N.W.; Jamil, S.; Mekki, T.E. Diagnostic dilemma of primary mucosal leishmaniasis. *Saudi Med J*, v. 33, n. 11, p. 1234-8, 2012.

Allahverdiyev, A.M.; Uzun, S.; Bagirova, M.; Durdu, M.; Memisoglu, H.R. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 70, n. 3, p. 294 – 7, 2004.

Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol*, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

Bari, A.U. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. *Dermatol Online J*, v. 18, n. 2, p. 4, 2012.

Barral, A.; Costa, J.M.; Bittencourt, A.L.; Barral-Netto, M.; Carvalho, E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol*, v. 34, p. 474–9, 1995.

BIOMETROX SOLUÇÃO INJETÁVEL. Disponível em: <http://www.ache.com.br/Production/Product.aspx?ProductId=34> Acesso em: 10 janeiro 2014.

Boggild, A.K.; Miranda-Verastegui, C.; Espinosa, D.; Arevalo, J.; Adai, V.; Tulliano, G.; Llanos-Cuentas, A.; Low, D.E. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol*. v. 45, n. 11, p. 3680-4, 2007.

Boggild, A.K.; Miranda-Verastegui, C.; Espinosa, D.; Arevalo, J.; Martinez-Medina, D.; Llanos-Cuentas, A.; Low, D.E. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, v. 79, n. 6, p. 847-52, 2008.

Boggild, A.K.; Ramos, A.P.; Espinosa, D.; Valencia, B.M.; Veland, N.; Miranda-Verastegui, C.; Arevalo, J.; Low, D.E.; Llanos-Cuentas, A. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 83, n. 2, p. 345-50, 2010.

Boggild, A.K.; Ramos, A.P.; Valencia, B.M.; Veland, N.; Calderon, F.; Arevalo, J.; Low, D.E.; Llanos-Cuentas, A. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 3, p. 1097-100, 2011.

Boggild, A.K.; Valencia, B.M.; Espinosa, D.; Veland, N.; Ramos, A.P.; Arevalo, J.; Llanos-Cuentas, A.; Low, D.E. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v. 50, p. e1-6, 2010.

Boggild, A.K.; Valencia, B.M.; Veland, N.; Pilar Ramos, A.; Calderon, F.; Arevalo, J.; Low, D.E.; Llanos-Cuentas, A. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS One*, v. 6, n. 10, p. e26395, 2011.

Brelaz-de-Castro, M.C.; de Almeida, A.F.; de Oliveira, A.P.; de Assis-Souza, M.; da Rocha, L.F.; Pereira, V.R. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol*, v. 279, n. 2, p. 180-6, 2012.

Castellucci, L.; Menezes, E.; Oliveira, J.; Magalhaes, A.; Guimaraes, L.H.; Lessa, M.; Ribeiro, S.; Reale, J.; Noronha, E.F.; Wilson, M.E.; Duggal, P.; Beaty, T.H.; Jeronimo, S.; Jamieson, S.E.; Bales, A.; Blackwell, J.M.; de Jesus, A.R.; Carvalho, E.M. IL6 -174 G/C

promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. - *J Infect Dis*, v.194 n. 4, p. 519-27, 2006.

Corvalan, F.; Sampaio, R.; Brustoloni, Y.; Andreotti, R.; Lima Júnior, M. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, v. 17, n. 1, p. 5, 2011.

Critchlow, D. E.; Fligner, M. A. "On Distribution-Free Multiple Comparisons in the One-Way Analysis of Variance," *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 1991, 20, 127–139.

Daneshbod, Y.; Oryan, A.; Davarmanesh, M.; Shirian, S.; Negahban, S.; Aledavood, A.; Davarpanah, M.A.; Soleimanpoor, H.; Daneshbod, K. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med*, v. 135, n. 4, p. 478-82, 2011.

de Oliveira Camera, P.; Junger, J.; do Espírito Santo Silva Pires, F.; Mattos, M.; Oliveira-Neto, M.P.; Fernandes, O.; Pirmez, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 100, n. 12, p. 1112-7, 2006.

de Oliveira, F.S.; Valete-Rosalino, C.M.; Schubach, AeO.; Pacheco, RaS. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 66, n. 4, p. 361-5, 2010.

Deborggraeve, S.; Laurent, T.; Espinosa, D.; Van der Auwera, G.; Mbuchi, M.; Wasunna, M.; El-Safi, S.; Al-Basheer, A.A.; Arévalo, J.; Miranda-Verástegui, C.; Leclipteux, T.; Mertens, P.; Dujardin, J.C.; Herdewijn, P.; Büscher, P. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 198, n. 10, p. 1565-72, 2008.

Devillé, W.L.; Buntinx, F.; Bouter, L.M.; Montori, V.M.; de Vet, H.C.; van der Windt, D.A.;

Bezemer, P.D. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. *BMC Med Res Methodol*, v. 2, n. 9, p. 1-13, 2002.

Disch, J.; Pedras, M.J.; Orsini, M.; Pirmez, C.; de Oliveira, M.C.; Castro, M.; Rabello, A. *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 51, n. 3, p. 185-90, 2005.

DIVERSITY AND HETEROGENEITY. Disponível em: <<http://www.cochrane-net.org/openlearning/html/mod13-3.htm>> Acesso em: 18 de dezembro de 2013.

do Vale, E.C.S.; Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *An Bras Dermatol*, v. 80, n. 4, p. 421-8, 2005.

Faber, W.R.; Oskam, L.; van Gool, T.; Kroon, N.C.; Knecht-Junk, K.J.; Hofwegen, H.; van der Wal, A.C.; Kager, P.A. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis, *J Am Acad Dermatol*, v. 49, n. 1, p. 70-4, 2003.

Fagundes, A.; Antônio, L.; Schubach, A.; Marzochi, K.B.; Fagundes, A. Comparison between in vivo measurement of the Montenegro skin test and paper recording. *Int J Dermatol*, v. 51, n. 5, p. 618-9, 2012.

Fagundes, A.; Schubach, A.; Paula, C.C.; Bogio, A.; Antonio Lde, F.; Schiavoni, P.B.; Monteiro Vde, S.; Madeira Mde, F.; Quintella, L.P.; Valette-Rosalino, C.M.; Vasconcellos Ede, C.; Azeredo-Coutinho, R.B.; Pacheco, R.S.; Marzochi, M.C.; Marzochi, K.B. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 1, p. 109-12, 2010.

Farias, L.H.; Rodrigues, A.P.; Silveira, F.T.; Seabra, S.H.; DaMatta, R.A.; Saraiva, E.M.; Silva, E.O. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 207, n. 3, p. 537-43 2013.

Field, V.; Gautret, P.; Schlagenhaut, P.; Burchard, G.D.; Caumes, E.; Jensenius, M.; Castelli,

F.; Gkrania-Klotsas, E.; Weld, L.; Lopez-Velez, R.; de Vries, P.; von Sonnenburg, F.; Loutan L.; Parola, P.; EuroTravNet network. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. *BMC Infect Dis*, v. 17, p. 10:330, 2008.

Figuroa, R.A.; Lozano, L.E.; Romero, I.C.; Cardona, M.T.; Prager, M.; Pacheco, R.; Diaz, Y.R.; Tellez, J.A.; Saravia, N.G.; Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis*, v. 200, n. 4, p. 638-46, 2009.

Flahault, A.; Cadilhac, M.; Thomas, G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol*, v. 58 n. 8, p. 859-62, 2005.

FOREST PLOT PROGRAM. Disponível em:
<https://www.statstodo.com/ForestPlot_Pgm.php> Acesso em: 10 dezembro 2013.

França-Costa, J.; Wanderley, J.L.; Deolindo, P.; Zarattini, J.B; Costa, J.; Soong, L.; Barcinski, M.A.; Barral, A.; Borges, V.M. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e36595, 2012.

Garcia, A.L.; Kindt, A.; Quispe-Tintaya, K.W.; Bermudez, H.; Llanos, A.; Arevalo, J.; Bañuls, A.L.; De Doncker, S.; Le Ray, D.; Dujardin, J.C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol*, v. 5 n. 2, p. 109-16, 2005.

Garcia, F.C.B.G.; dos Santos S.S.R.; Chociay, M.F.; Medeiros, A.C.P.; Roselino, A.M.F. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo-mucosas. *An. Bras. Dermatol*, v. 80, supl. 3, p. S339-44, 2005.

Gil, J.F.; Nasser, J.R.; Cajal, S.P.; Juarez, M.; Acosta, N.; Cimino, R.O.; Diosque, P.; Krolewiecki, A.J. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina:

spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg*, v. 82, n. 3, p. 433-40, 2010.

Gomes, C.M.; Cesetti, M. V.; de Moraes, O.O.; Sena, M.S.T.; Roselino, A.M.; Sampaio, R.N.R. The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in midwestern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014. In press.

Gomes, C.M.; de Paula, N.A.; de Moraes, O.O.; Soares, K.A.; Roselino, A.M.F.; Sampaio, R.N.R. Exames subsidiários no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol*, 2014. No prelo.

Gomes, C.M.; Moraes, O.O.; Leite, A.S.; Soares, K.A.; Motta, Jde. O.; Sampaio, R.N. Periungual leishmaniasis. *An Bras Dermatol*, v. 87, n. 1, p. 148-9, 2012.

Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Inst Med Trop*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

Goto, H.; Lauletta Lindoso, J.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

Goto, H.; Lindoso, J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 8, n. 4, p. 419-33, 2010.

Graça, G.C.; Volpini, A.C.; Romero, G.A.; Oliveira Neto, M.P.; Hueb, M.; Porrozzi, R.; Boité, M.C.; Cupolillo, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 664-74, 2012.

Guimarães, L.H.; Machado, P.R.; Lago, E.L.; Morgan, D.J.; Schrieffer, A.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 7, p. 712-5, 2009.

Hosseinzadeh M, Omidifar N, Lohrasb MH. Use of fine needle aspiration cytology in the

diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Trop Doct*, v. 42, n. 2, p. 112-3, 2012.

Kim, O.M.; de Paula, N.; Roselino, A.M. Métodos diagnósticos em biologia molecular aplicada a dermatoses tropicais. In: Lupi O, Cunha PR, editors. *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia*. Rio de Janeiro: AC FARMACÊUTICA; 2012. p.463-471.

Kline, K.; McCarthy, J.S.; Pearson, M.; Loukas, A.; Hotez, P.J. Neglected tropical diseases of Oceania: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 1, p. e1755, 2013.

Lessa, H.A.; Lessa, M.M.; Guimarães, L.H.; Lima, C.M.; Arruda, S.; Machado, P.R.; Carvalho, E.M. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 106, n. 6, p. 376-81, 2012.

Lima, M.I.; Arruda, V.O.; Alves, E.V.; de Azevedo, A.P.; Monteiro, S.G.; Pereira, S.R. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Arch Toxicol*, v. 84, n. 3, p. 227-32, 2010.

Lugassy, J.; Itin, P.; Ishida-Yamamoto, A.; Holland, K.; Huson, S.; Geiger, D.; Hennies, H.C.; Indelman, M.; Bercovich, D.; Uitto, J.; Bergman, R.; McGrath, J.A.; Richard, G.; Sprecher, E. Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome and dermatopathia pigmentosa reticularis: two allelic ectodermal dysplasias caused by dominant mutations in KRT14. *Am J Hum Genet*, v. 79, n. 4, p. 724-30, 2006.

Lunedo, S.N.; Thomaz-Soccol, V.; de Castro, E.A.; Telles, J.E. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochem*, v. 114, n. 3, p. 252-8, 2012.

Machado, P.R.; Rosa, M.E.; Costa, D.; Mignac, M.; Silva, J.S.; Schriefer, A.; Teixeira, M.M.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 105, n.

8, p. 438-44, 2011.

Marco, J.D.; Barroso, P.A.; Mimori, T.; Locatelli, F.M.; Tomatani, A.; Mora, M.C.; Cajal, S.P.; Nasser, J.R.; Parada, L.A.; Taniguchi, T.; Korenaga, M.; Basombrío, M.A.; Hashiguchi, Y. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infect Dis*, v. 15, n. 12, p. 191, 2012.

Maretti-Mira, A.C.; de Pinho Rodrigues, K.M.; de Oliveira-Neto, M.P.; Pirmez, C.; Craft, N. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 119, n. 2-3, p. 160-4, 2011.

Marques, M.J.; Volpini, A.C.; Genaro, O.; Mayrink, W.; Romanha, A.J. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, v. 65, n. 6, p. 902-6, 2001.

Medeiros, A.R.; Silva, W.A. Jr.; Roselino, A.M. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 63, n. 4, p. 451-6, 2008.

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007, 182p.

Miranda, A.; Saldaña, A.; González, K.; Paz, H.; Santamaría, G.; Samudio, F.; Calzada, J.E. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 106, n. 9, p. 544-8, 2012.

Mitropoulos, P.; Konidas, P.; Durkin-Konidas, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, p. 63, n. 2, p. 309-22, 2010.

Momeni Boroujeni, A.; Aminjavaheri, M.; Moshtaghian, B.; Momeni, A.; Momeni, A.Z. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, v. 52, n. 7, p. 827-30, 2013.

Motta, A.C.; Lopes, M.A.; Ito, F.A.; Carlos-Bregni, R.; de Almeida, O.P.; Roselino, A.M. Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases. *Oral Dis*, v. 13, n. 3, p. 335-40, 2007.

Name, R.Q.; Borges, K.T.; Nogueira, L.S.C.; Sampaio, J.H.D.; Tauil P,L.; Sampaio, R.N.R.; Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. *An Bras Dermatol*, v. 80, n. 3, p. 249-54, 2005.

Neitzke-Abreu, H.C.; Venazzi, M.S.; Bernal, M.V.; Reinhold-Castro, K.R.; Vagetti, F.; Mota, C.A.; Silva, N.R.; Aristides, S.M.; Silveira, T.G.; Lonardoni, M.V. Detection of DNA from *Leishmania* (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.

Oliveira, M.R.F.; Gomes, A.C.; Toscano, C.M. QUADAS e STARD: avaliação da qualidade de estudos de acurácia de testes diagnósticos. *Rev. Saúde Pública* vol.45 no.2 São Paulo Apr. 2011.

Ovalle Bracho, C.; Porras de Quintana, L.; Muvdi Arenas, S.; Rios Parra, M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 549-54, 2007.

Pavli, A.; Maltezou, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis*, v. 14, n. 12, p. e1032-9, 2010.

Pereira Ede, F.; Thomaz-Soccol, V.; Lima, H.C.; Thomaz-Soccol, A.; de Castro, E.A.; Mulinari-Brenner, F.; Queiroz-Telles, F.; Luz, E. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil. *Exp Dermatol*, v. 17, n. 12, p. 1024-30, 2008.

Pereira, M.G. Epidemiologia: Teoria e Prática. Guanabara Koogan 3a. Reimpressão, Rio de Janeiro, 2000.

Pineda, J.A.; Macías, J.; Morillas, F.; Fernández-Ochoa, J.; Cara, J.; de la Rosa, R.; Martín-Sánchez, J.; González, M.; García-Briones, E.; Delgado, J.; Lissen, E. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 95, n. 2, p. 173-4, 2001.

Pirmez, C.; da Silva Trajano, V.; Paes-Oliveira Neto, M.; da-Cruz, A.M.; Gonçalves-da-Costa, S.C.; Catanho, M.; Degrave, W.; Fernandes, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 6, p. 1819-23, 1999.

Piñero, J.; Martínez, E.; Pacheco, R.; Aragón, Z.; De Armas, F.; Del Castillo, A.; Valladares, B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 73, n. 1, p. 21-9, 1999.

Pomares, C.; Despierres, L.; del Giudice, P.; Delaunay, P.; Michel, G.; Ferrua B.; Marty, P. Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 106, n. 7, p. 452-4, 2012.

PUBMED ADVANCED SEARCH BUILDER. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 03 de janeiro de 2013.

Rahman, S.; Bari, A. Laboratory profile in patients of cutaneous leishmaniasis from various regions of Pakistan, *J Coll Physicians Surg Pak*, v. 13, n. 6, p. 313-6, 2003.

Reis, Lde.C.; Brito, M.E.; Almeida, E.L.; Félix, S.M.; Medeiros, A.C.; Silva, C.J.; Pereira, V.R. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, n. 5, p. 439-43, 2008.

Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n. 9, p. 581-96, 2007.

Reveiz, L.; Maia-Elkhoury, A.N.; Nicholls, R.S.; Sierra Romero, G.A.; Yadon, Z.E. Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e61843, 2013.

Romero, G.A.; de la Glória Orge Orge, M.; de Farias Guerra, M.V.; Paes, M.G.; de Oliveira Macêdo, V.; de Carvalho, E.M. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop*, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

Romero, G.A.; Sampaio, R.N.; Macedo, Vde. O.; Marsden, P.D. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 4, p. 505-8, 1999.

Romero, G.A.; Vinitius De Farias Guerra, M.; Gomes Paes, M.; de Oliveira Macêdo, V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*, v. 32, n. 9, p. 1304-12, 2001.

Roselino, A.M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. *An Bras Dermatol*, v. 83 n. 3, p. 187-203, 2008.

Roselino, A.M.; Chociay, M.F.; Costa, R.S.; Machado, A.A.; Figueiredo, J.F. L. (L.) chagasi in AIDS and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 50, n. 4, p. 251-4, 2008.

Sadeghian, G.; Ziaei, H.; Bidabadi, L.S.; Nilforoushzadeh, M.A. Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol*, v. 58, n. 3, p. 239, 2013.

Sampaio, R.N.R. Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico e Tratamento. In: Lupi O, Cunha PR, editors. Rotinas de Diagnóstico e Tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Rio de Janeiro: AC FARMACÊUTICA; 2012. p. 379-387.

Schönian, G.; Kuhls, K.; Mauricio, I.L. Parasitology. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania, v. 138, n. 4, p. 405-25, 2011.

Shirian, S.; Oryan, A.; Hatam, G.R.; Daneshbod, K.; Daneshbod, Y. Molecular diagnosis and species identification of mucosal leishmaniasis in Iran and correlation with cytological findings. Acta Cytol, v. 56, n. 3, p. 304-9, 2012.

Silva, J.G.; Silva, T.M.; Peloso Ede, F.; Machado-Coelho, G.L.; Mayrink, W.; Ariosa, M.C.; Silva, P.M.; Marques, M.J. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from Leishmania in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop, v. 45, n. 2, p. 257-9, 2012.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 100, n. 5, p. 525-34, 2005.

Soares KA. VALIDAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM EXO- ANTÍGENOS E DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2011, 98f, Tese (Doutorado em Ciências Médicas), Pós-graduação em Ciências Médicas - Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Szargiki, R.; Castro, E.A.; Luz, E.; Kowalthuk, W.; Machado, A.M.; Thomaz-Soccol, V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. Braz J Infect Dis, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TEXTO DE BULA DE ENBREL. Disponível em:

http://www.pfizer.com.br/arquivoPdf/EnbrelPFS_PS.pdf. Acesso em: 10 janeiro 2014.

Thomaz-Soccol, A.; Mocellin, M.; Mulinari, F.; Castro, E.A.; Queiroz-Telles, F.; Alcântara, F.S.; Bavaresco, M.T.; Hennig, L.; Andraus, A.; Luz, E.; Thomaz-Soccol, V. Clinical aspects and relevance of molecular diagnosis in late mucocutaneous leishmaniasis patients in Paraná, Brazil. *Braz. arch. biol. technol.*, v. 54, n. 3, p. 487-94, 2011.

Veland, N.; Espinosa, D.; Valencia, B.M.; Ramos, A.P.; Calderon, F.; Arevalo, J.; Low, D.E.; Llanos-Cuentas, A.; Boggild, A.K. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 84, n. 4, p. 556-61, 2011.

Viana, A.G.; Domingos, P.L.; Kaminagakura, E.; Botelho, A.C.; Martelli, H. Jr.; Bonan, P.R. Immunohistochemical profile of cytokeratins in pseudoepitheliomatous hyperplasia of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.*, v. 50, n. 12, p. 1470-4, 2011.

Victoir, K.; De Doncker, S.; Cabrera, L.; Alvarez, E.; Arevalo, J.; Llanos-Cuentas, A.; Le Ray, D.; Dujardin, J.C. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 97, n. 1, p. 80-7, 2003.

Weinkopff, T.; Mariotto, A.; Simon, G.; Hauyon-La Torre, Y.; Auderset, F.; Schuster, S.; Zangger, H.; Fasel, N.; Barral, A.; Tacchini-Cottier, F. Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun.*, v. 81, n. 5, p. 1575-84, 2013.

Weirather, J.L.; Jeronimo, S.M.; Gautam, S.; Sundar, S.; Kang, M.; Kurtz, M.A.; Haque, R.; Schriefer, A.; Talhari, S.; Carvalho, E.M.; Donelson, J.E.; Wilson, M.E. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 2011; v. 49, n. 11, p. 3892-904, 2011.

Whiting, P.; Rutjes, A.W.; Reitsma, J.B.; Bossuyt, P.M.; Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in

systematic reviews. *BMC Med Res Methodol*, v. 3, n. 25, p. 1-13, 2003.

Wise, E.S.; Armstrong, M.S.; Watson, J.; Lockwood, D.N. Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travellers with New World cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 6, e1688, 2012.

Yehia, L.; Adib-Houreh, M.; Raslan, W.F.; Kibbi, A.G.; Loya, A.; Firooz, A.; Satti, M.; El-Sabban, M.; Khalifeh, I. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. *J Cutan Pathol*, v. 39, n. 3, p. 347-55, 2012.

Zaghi, D.; Panosian, C.; Gutierrez, M.A.; Gregson, A.; Taylor, E.; Ochoa, M.T. New World cutaneous leishmaniasis: current challenges in diagnosis and parenteral treatment. *J Am Acad Dermatol*. v. 64, n. 3, p. 587-92, 2011.

Zeyrek, F.Y.; Korkmaz, M.; Ozbel, Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol*, v. 14, n. 11, p. 1409–15, 2007.

9. ANEXOS:

9.1. ANEXO I:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa PCR em amostras de saliva nos pacientes com o diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília. A leishmaniose tegumentar americana é doença infecciosa que tem tratamento acessível no território brasileiro.

O objetivo do estudo é avaliar a possibilidade do diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana através de amostras da saliva do (ª) Sr. (ª). Estas amostras serão coletadas através de despejo da saliva em um tubo de coleta estéril conhecido como microtúbulo de Eppendorf (1,5ml). A amostra será imediatamente congelada e posteriormente processada para o exame.

O procedimento de coleta não acarreta riscos para a saúde do (ª) Sr. (ª) e pode facilitar o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.

Esclarecemos que a participação neste estudo é voluntária e que este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízos à continuidade do atendimento médico. Garantimos a confidencialidade das informações geradas e a privacidade do sujeito da pesquisa. Não será revelado o nome de qualquer participante. Eventuais dúvidas poderão ser sanadas, a qualquer momento no telefone 3448-5415 (serviço de Dermatologia) através de contato direto com a equipe de pesquisa.

Eu, _____, RG nº _____ fui informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito, bem como realização de fotografia.

Ou

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, RG nº _____ fui informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito bem como realização de fotografia.

Dados de identificação

Título do Projeto: PCR em amostras de saliva nos pacientes com o diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília

Pesquisador Responsável: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade de Brasília

Telefones para contato: (61) 3448-5415

Endereço: SGAN avenida L2 norte, quadra 605.

Faculdade de Medicina/Universidade de Brasília

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa

Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte

CEP: 70.910-900 - Brasília - DF - Brasil

Contato: 61 3307-2520/ 3273-4069


Atendimento: 2ª e 4ª das 8h30 às 12h e às 5ª das 14h às 17h.

Brasília, _____ de _____ de _____

Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
RG: 355154 Cel: 81216100

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.

9.2. ANEXO II:


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

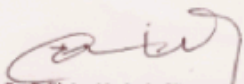
Registro de Projeto: CEP-FM 036/2011.
Título: "PCR em amostras de saliva nos pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana Atendidos no Hospital Universitário de Brasília".
Pesquisador Responsável: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.
Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).
Data de entrega: 09/05/2011.
Parecer do (a) relator (a)
 Aprovação
 Não aprovação.
Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 25/05/2011.
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 29/06/2011.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR "ad referendum"**, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 10 de janeiro de 2012.

Brasília, 30 de Junho de 2011.


Prof. Elaine Mario de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

Anexo 2. Cópia de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB.

9.3. Anexo III:



UnB
 Universidade de Brasília
 Serviço de Dermatologia
 Laboratório de Dermatologicologia

**Validação do teste de PCR em amostras de saliva em pacientes com o diagnóstico de
 Leishmaniose Tegumentar Americana**

FICHA CLÍNICA

ORDEM ____/____ (no/ano - anotar também na fotografia) Data __/__/__

1. Identificação:

Número Prontuário HuB _____ Telefone _____

Suspeita LTA - C M Grupo controle S N

Nome _____

Endereço _____

DN__/__/__ Idade__ anos Sexo M F Fototipos: I, II, III, IV, V
 VI

Escolaridade _____ Naturalidade _____/____

Profissão _____

Procedência: _____ Área: Urbana, Rural, Periurbana

Convívio com animais Sim () Não () Quais? _____

Hábitos recreativos: Caça () Pesca () Outros: _____

Residências anteriores _____

OBS _____

2. Histórico médico:

Local do provável contágio: _____

Alguma atividade no campo? Sim () Não () Há quanto tempo? _____

Local: _____

Teve Leishmaniose anteriormente: SIM NÃO

Se sim, foi tratado SIM NÃO

Se sim, há quantos meses acabou o tratamento: _____

Droga utilizada: _____

Dose: _____

Efeitos adversos () sim () não Quais? _____

Antecedentes patológicos pregressos:

Tabagismo () Quantificar _____

Etilismo () Quantificar _____

Uso de drogas () Quantificar _____

Diabetes Mellitus () Hipertensão Arterial () Alergias ()

Cardiopatia () Nefropatia () Pneumopatias () HIV/ AIDS ()

Outros _____

Outras imunodeficiências: _____

Doenças concomitantes conhecidas:

Doença de Chagas () Hanseníse () Tuberculose cutânea ()

Pênfigo foliáceo sul americano () Micose profunda (Esporotricose, Cromoblastomicose, Paracoccidioidomicose) () Doença Reumática ()

CONTATOS:

Contato próximo com diagnóstico de LTA? Sim () Não () - Parentesco:

Há quanto tempo? _____ Tratado? Sim () Não ()

3. Exame físico:

Lesões cutâneas:

Número Total de Lesões___

Local das lesões (anotar o número):

1-Face___ -Nariz 2-a) asa___ b) dorso___ 2-Lábios___ 5-Orelha___ 6-Pescoço___

8-Tórax___ 9- Membros superiores: ___ 10 - Membros inferiores: _____

Aspecto: Úlcera () Pápula () Verrucosa () Esporotricóide () outros: _____ ()

EVOLUÇÃO:

Tempo de início da lesão: Tempo: _____

Obs:_____

Lesões mucosas:

Queixas: - Obstrução Nasal: Sim () Não () - Sangramentos: Sim () Não () - Dor: Sim () Não () - Coriza: Sim () Não () - Dificuldade para deglutir: Sim () Não () - Secreção: Sim () Não () - Dificuldade para respirar: Sim () Não () - Crostas: Sim () Não () - Prurido: Sim () Não ()

Exame físico: - Úlcera nasal: Sim () Não () - Infiltração: Sim () Não () - Deformidade externa nasal: Sim () Não () - Perfuração do septo nasal: Sim () Não () - Destrução septal total: Sim () Não () - Fístula orofaríngea: Sim () Não () - Utilização de prótese: Sim () Não () - Lesão da cavidade oral: Sim () Não () , Cicatriz ou lesão cutânea prévia: Sim () Não ()

- Tipo: infiltração () úlcera () Local: _____

- Lesão cutânea concomitante: Sim () Não () Local: _____

Rinoscopia:_____

4. Exames:

Sorologias:

HIV		DD/MM/AA ___/___/___	Chagas		DD/MM/AA ___/___/___
Anti-HBs		___/___/___	HBsAg		___/___/___
Anti-HBc		___/___/___	HBcAg		___/___/___
Anti-HBe		___/___/___	HBeAg		___/___/___
Anti-HCV - IgM		___/___/___	Anti-HCV - IgG		___/___/___
Anti-HAV - IgM		___/___/___	Anti-HAV - IgG		___/___/___
VDRL		___/___/___			___/___/___

Rotina para PLECT:

Intradermorreação de Montenegro		DD/MM/AA ___/___/___	Imunofluorescência indireta para LTA		DD/MM/AA ___/___/___
Inoculação em hamster		___/___/___	Cultura para LTA		___/___/___
Cultura para fungos		___/___/___	<i>Imprint</i> em lâmina LTA		___/___/___
Cultura para micobactérias		___/___/___	PCR para fungos ou micobactérias		___/___/___
PCR bloco de parafina (LTA)		___/___/___	PCR em papel filtro (LTA)		___/___/___
	Histopatológico:				

Reação em cadeia de polimerase:

PCR da saliva		DD/MM/AA ___/___/___	PCR do <i>swab</i> oral		DD/MM/AA ___/___/___
------------------	--	-------------------------	----------------------------	--	-------------------------

K									
Cl									
CPK									
IFI LTA		----	----	----	----	----	----	----	

Aspecto lesão	Fim tratamento	D 30	D 90	D 180
Ativa:				
Em cicatrização				
Cicatrizada				

Desfecho: Cura () Falha () Abandono () Toxicidade ()

Melhora dos sintomas? Sim () Não ()

7. Necessidade de novo tratamento:

2o Data __/__/__ Motivo: _____

Droga: _____

Dose por Kg: _____

Tempo previsto: _____ Desfecho: Melhora () Falha () Abandono () Toxicidade ()

3o Data __/__/__ Motivo: _____

Droga: _____

Dose por Kg: _____

Tempo previsto: _____ Desfecho: Melhora () Falha () Abandono () Toxicidade ()

8. Acompanhamento: 5 anos (após cura clínica definitiva = após D 180):

	6 meses após	2o ano	3o ano	4o ano	5o ano
--	--------------	--------	--------	--------	--------

IFI:	____:____	____:____	____:____	____:____	____:____
Desenvolvimento de lesão mucosa (aplicável para os casos de LTA cutânea):	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()
Recidiva:	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()	Sim () Não ()

Anexo III. Ficha para avaliação dos pacientes incluídos no estudo clínico.