

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JAQUELINE OSIRO BERGMANN

**ACURÁCIA DA qPCR ASSOCIADA AO CULTIVO NO MEIO
NOVY-MACNEAL-NICOLLE NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

BRASÍLIA
2019

**ACURÁCIA DA qPCR ASSOCIADA AO CULTIVO NO MEIO
NOVY-MACNEAL-NICOLLE NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

JAQUELINE OSIRO BERGMANN

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, na área de concentração: Ciências Aplicadas em Saúde.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.
Co-orientador: Prof. Dr. Ciro Martins Gomes.

Brasília
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OOS82a Osiro Bergmann, Jaqueline
Acurácia da qPCR associada ao cultivo no meio Novy
MacNeal-Nicolle no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar
Americana. / Jaqueline Osiro Bergmann; orientador Raimunda
Nonata Ribeiro Sampaio; co-orientador Ciro Martins Gomes. -
Brasília, 2019.
89 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Cultura de
Leishmania. 3. Diagnóstico Molecular. 4. qPCR. I. Nonata
Ribeiro Sampaio, Raimunda , orient. II. Martins Gomes,
Ciro, co-orient. III. Título.

**ACURÁCIA DA qPCR ASSOCIADA AO CULTIVO NO MEIO
NOVY-MACNEAL-NICOLLE NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Universidade de Brasília – UnB

Membros

Prof. Dr. Killarney Ataíde Soares
Hospital de Força Aérea de Brasília – HFAB

Prof^a. Dr^a. Ada Amália Ayala Urdapilleta
Hospital da Criança de Brasília – HCB

Suplente

Prof. Dr. Jefferson Bruno Pereira Ribeiro
Universidade Católica de Brasília – UCB

26 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

A toda comunidade de pesquisa e desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre me acompanhar nesta jornada árdua que é a pesquisa científica.

À minha orientadora, professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, que me deu a oportunidade de realizar o projeto no Laboratório de Dermatologicologia – UnB e me ensinou que é preciso dedicação à pesquisa. Muito obrigada pela confiança.

Ao meu co-orientador, professor Ciro Martins Gomes, por todo o amparo e auxílio na escolha do projeto. Seus ensinamentos foram de grande valia. Aprendi que o trabalho em equipe é fundamental para que a evolução do projeto aconteça. Seu modo de lidar com a pesquisa é humanitário e indescritível.

À Laís Sevilha dos Santos, amiga desde a graduação, me ensinou que é necessário aproveitar todas as oportunidades que surgem na vida acadêmica. Desde o início me auxiliou nos experimentos e seu companheirismo foi essencial para o projeto.

À Viviane Medeiros Silva, que sempre esteve presente no dia a dia com seus ensinamentos. Tudo que aprendi ao longo desse período foi de grande valia e espero poder retribuir da mesma forma.

À Bruna Caroline Vêras de Carvalho, por nunca poupar esforços para me ajudar com a execução da pesquisa. À professora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo, por permitir que parte do projeto fosse realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências – UnB.

À professora Beatriz Dolabela de Lima e ao Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior, por todo o conhecimento e colaboração durante a fase final dos experimentos realizados no Laboratório de Biologia do Gene – UnB.

A todos os servidores do setor de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB que acompanharam a minha jornada neste período. Em especial às residentes Dr^a. Camille Bresolin Pompeu, Dr^a. Larissa Freire Segato e Dr^a. Renata Trindade Gonçalves, que foram essenciais na coleta das amostras dos pacientes.

Às enfermeiras Joselita Santos, Michele Pereira, Naiara Daris dos Santos, Rita de Cássia Esmeraldo e Rosa Helena Generosa por me auxiliarem nas coletas. Pessoas essenciais no cuidado ao paciente, sempre gentis e dispostas a ajudar com a pesquisa.

Aos alunos de PIBIC, Arthur Youssif Mota Arabi e Daniel da Silva Marques por todo o cuidado e auxílio com as fichas clínicas, trabalho fundamental para a análise de dados.

Ao técnico Tércio Rodrigues Pereira, pelos ensinamentos com a parte parasitológica e rotina laboratorial.

A todos os pacientes que aceitaram ser incluídos na pesquisa. Sem eles nada seria possível.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para que minha dedicação fosse exclusivamente à pesquisa científica.

A todos os funcionários da Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina – UnB, por estarem sempre à disposição dos alunos.

À minha mãe, Nilze Yoshie Osiro, que sempre me incentivou a continuar estudando e me ensinou que esta é a maior riqueza que podemos levar.

Ao meu amigo, companheiro e marido, Sergio Osiro Bergmann, por ser a minha base e o meu conforto nos momentos de maior dificuldade. Agradeço por todo o companheirismo nesses 2 anos e por sempre acreditar em mim.

À minha família que sempre me apoiou em todas as minhas jornadas.

Por fim, agradeço imensamente a oportunidade que me foi concedida. Ser pesquisador no Brasil é um grande desafio, que vem acompanhado de grandes responsabilidades. O que nos incentiva a continuar nesta luta diária é a satisfação de contribuir para sociedade e para o desenvolvimento da pesquisa científica; é fazer a diferença na vida do paciente; é encontrar métodos de diagnósticos e tratamentos mais eficazes. É nunca desistir. Obrigada!

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da <i>Leishmania</i> nas formas promastigota e amastigota.....	19
Figura 2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp..	20
Figura 3. Critérios para alocação nos grupos.	29
Figura 4. Esquema representativo dos exames realizados no estudo.	30
Figura 5. Fluxo do processamento das amostras coletadas para o estudo.....	31
Figura 6. Local de coleta da lesão suspeita de LTA para a realização da biópsia.	32
Figura 7. Meio de cultura NNN modificado em fase sólida.....	33
Figura 8. Tubo de vidro para coleta de sangue siliconizados.	33
Figura 9. Visualização em meio de cultura NNN modificado negativo com presença de células em microscópio invertido com aumento de 1000x.	34
Figura 10. Visualização de formas promastigotas inoculadas com aspirado da lesão de LTA em meio de cultura NNN modificado em microscópio invertido com aumento de 1000x.	34
Figura 11. <i>Imprints</i> em lâmina para microscopia corado com Giemsa.	35
Figura 12. Etapas da rotina em pacientes com suspeita de LTA no Ambulatório de Dermatologia – HUB.	35
Figura 13. <i>Esco Microplate Shaker/Incubator</i>	38
Figura 14. Espectrofotômetro <i>NanoVue Plus®</i>	38
Figura 15. Etapas do processo de amplificação da região ITS1.....	40
Figura 16. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA.	41
Figura 17. Cuba horizontal <i>Owl EasyCast B1</i>	43
Figura 18. <i>High Performance Transilluminator (UVP)</i>	43
Figura 19. Representação esquemática da PCR em tempo real com o uso de sonda TaqMan.	44
Figura 20. Curvas de amostras de cultura de paciente positivo (azul: Cq: 12.10) e de água ultrapura (vermelho: Cq: 36.99).....	46
Figura 21. Curva padrão realizada com controle de <i>L. braziliensis</i> ($R^2 = 0.949$, eficiência = 99.722, declive = -3.329).	46
Figura 22. Cálculo do número de parasitos por tubo de cultura.	47
Figura 23. Curva padrão demonstrando a média dos ciclos de quantificação (Cq) da diluição seriada do controle de <i>L. braziliensis</i>	47
Figura 24. Diagrama de estudo do fluxo de participantes.	49
Figura 25. Distribuição geográfica dos prováveis contágios de LTA no estudo.....	52
Figura 26. Locais de desenvolvimento das lesões de LTA.....	53
Figura 27. Curva das fases da qPCR com controle de <i>L. braziliensis</i> (rosa) e água ultrapura (azul).	55
Figura 28. Gráfico de limite de detecção dos valores de Cq em amostras de cultura. ..	56
Figura 29. Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela enzima <i>HaeIII</i> em amostras de cultura.....	59
Figura 30. Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela enzima <i>HaeIII</i> em amostras de cultura.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados na PCR convencional para amplificação da região ITS1.	39
Tabela 2. Etapas do processo de amplificação da região ITS1.	40
Tabela 3. Reagentes utilizados na PCR para amplificação da região conservada do kDNA.	41
Tabela 4. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA.	41
Tabela 5. Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene constitutivo β -actina.	42
Tabela 6. Etapas do processo de amplificação do gene constitutivo β -actina.	42
Tabela 7. Reagentes utilizados na qPCR para amplificação da região conservada do kDNA 3.	45
Tabela 8. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA 3.	45
Tabela 9. Características demográficas dos grupos controle e LTA.	50
Tabela 10. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos exames classificatórios dentro dos grupos.	54
Tabela 11. Sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de PCR convencional dentro dos grupos.	54
Tabela 12. Acurácia diagnóstica da avaliação microscópica da cultura e qPCR.	57
Tabela 13. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes classificatórios e teste índice.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	Ampere
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área sob a curva)
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> (Ágar Infusão Cérebro e Coração)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)
Cq	<i>Quantification cycle</i> (Ciclo de quantificação)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EH	Exame Histopatológico
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
fg	Fentograma
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Faculdade de Medicina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC	Intervalo de Confiança
IFI	Imunofluorescência indireta
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius restriction enzyme</i> (Enzima de restrição <i>Haemophilus aegyptius</i>)
ITS1	<i>Internal Transcribed Spacer 1</i> (Região Espaçadora Interna Transcrita 1)
kDNA	DNA do cinetoplasto
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
MIQE	<i>Guideline: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
mM	Milimolar

MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores
MP	Marcador de peso molecular
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
NNN	<i>Novy-MacNeal-Nicolle</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
QR	Intervalo Quartil
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)
rpm	rotações por minuto
STARD	<i>Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Agente Etiológico	19
1.2 Diagnóstico	21
1.2.1 Exame direto	21
1.2.2 Exame Histopatológico (EH)	21
1.2.3 Testes Sorológicos	21
1.2.4 Cultura	22
1.2.5 Biologia Molecular	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. HIPÓTESE DO ESTUDO	26
5. MÉTODOS	27
5.1 Local do estudo	27
5.2 População estudada	27
5.3 Critérios de inclusão no grupo LTA	28
5.4 Critérios de inclusão no grupo controle	28
5.5 Critérios de exclusão	28
5.6 Cálculo amostral	29
5.7 Exames realizados após a suspeita clínica de LTA	30
5.8 Ética	30
5.9 Método de coleta e processamento das amostras	31
5.10 Exames realizados para a classificação dos pacientes	32
5.10.1 Biópsia incisional da lesão	32
5.10.2 Cultura do aspirado da lesão	32
5.10.3 Pesquisa de formas promastigotas	34
5.10.4 <i>Imprints</i> em lâmina para microscopia	34
5.10.5 Exame Histopatológico (EH)	36
5.10.6 Imunofluorescência Indireta (IFI)	36
5.10.7 Extração de DNA	36
5.10.7.1 Extração das amostras de biópsias	36
5.10.7.2 Extração das amostras de aspirado em meio de cultura	37
5.10.8 Quantificação do DNA	38
5.10.9 PCR Convencional	39
5.10.9.1 Amplificação da região conservada do gene ITS1	39
5.10.9.2 Amplificação de região conservada do kDNA de <i>Leishmania</i> spp.	40
5.10.9.3 Integridade do DNA nas amostras de biópsias	42
5.10.9.4 Eletroforese em gel de agarose	43

5.11 Teste índice.....	44
5.11.1 PCR em tempo real (qPCR)	44
5.11.2 Critérios de positividade	45
5.12 Análise do Polimorfismo em Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP).....	47
5.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida	48
5.14 Análise Estatística.....	48
5.15 Análise de prontuários dos pacientes com suspeita de LTA.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1 Características clínicas e populacionais.....	50
6.1.1 Grupo controle.....	51
6.1.2 Grupo LTA.....	51
6.2 Exames classificatórios.....	53
6.3 PCR convencional	54
6.4 Exame testado	55
6.4.1 qPCR + cultura do aspirado da lesão (teste índice)	55
6.4.2 Quantificação de parasitos por tubo de cultura	57
6.4.3 Comparação dos resultados (testes classificatórios x teste índice)	57
6.5 PCR-RFLP	58
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO 1.....	71
ANEXO 2.....	72
ANEXO 3.....	76
ANEXO 4.....	77
ANEXO 5.....	78
ANEXO 6.....	81
APÊNDICE 1.....	83
APÊNDICE 2.....	84
APÊNDICE 3.....	85
APÊNDICE 4.....	86
APÊNDICE 5.....	88

RESUMO

FUNDAMENTOS: A sensibilidade dos métodos de cultura em meio sólido para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é limitada pela capacidade visual do avaliador. **OBJETIVO:** Neste trabalho, foi testada a acurácia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) baseada em ensaios com sonda de hidrólise TaqMan acoplada à cultura em meio *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) modificado para o diagnóstico de LTA. **MÉTODOS:** Pacientes com apresentação clínica compatível com LTA foram alocados nos grupos controle e grupo LTA. Foram comparadas a acurácia da avaliação microscópica da cultura e da qPCR de aspirados de lesões cultivados. Os ensaios quantitativos e qualitativos foram realizados utilizando uma sonda de hidrólise específica e *primers* que amplificam o kDNA de *Leishmania braziliensis*. **RESULTADOS:** Cinquenta e oito pacientes foram incluídos no estudo, sendo 38 no grupo LTA e 20 no grupo controle. A análise combinada da qPCR + cultura melhorou significativamente a acurácia do diagnóstico em comparação com a análise visual microscópica ($p = 0,006$). Ao comparar a avaliação microscópica e a qPCR + cultura, foi observado um ganho de sensibilidade de 44.7% (17 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 28,6 - 61.7) para 68.4% (26 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 51.3 - 82.5), com uma pequena redução de especificidade de 100% (20 de 20 controles; 95% IC = 83.2 - 100) para 95% (19 de 20 controles; 95% IC = 75.1 - 99.9), respectivamente. A quantidade mínima de parasitos por tubo de cultura detectada por microscopia foi de 15. Entretanto, a sensibilidade foi de apenas 30% quando menos de 1.000 parasitos foram quantificados. **CONCLUSÃO:** A avaliação microscópica das amostras de cultura na LTA pode ter sua sensibilidade limitada pela não visualização de parasitos escassos ou pela não diferenciação de parasitos amastigotas em formas promastigotas.

Palavras-chave: Leishmaniose; LTA; Cultura de *Leishmania*; Diagnóstico molecular; qPCR.

ABSTRACT

BACKGROUND: The sensitivity of culture methods in solid medium for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL) is limited by the visual capacity of the evaluator. **OBJECTIVE:** It was tested the accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction (qPCR) coupled to culture in *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) medium modified for the diagnosis of ATL. **METHOD:** Patients with a clinical presentation compatible with ATL were allocated into ATL and control groups. The accuracy of microscopic and qPCR processing of cultured lesion aspirates were compared. Quantitative and qualitative assays were performed using a specific hydrolysis probe and primers amplifying the kDNA minicircle of *Leishmania braziliensis*. **RESULTS:** Fifty-eight patients were included in the study, with 38 in the ATL group and 20 in the control group. The combined qPCR + culture analysis significantly improved the accuracy of diagnosis compared to the microscopic analysis ($p=0.006$). When comparing microscopic and qPCR + culture processing, we observed a sensitivity gain from 44.7% (17 of 38 ATL patients; 95% CI = 28.6 - 61.7) to 68.4% (26 of 38 ATL patients; 95% CI = 51.3 - 82.5), with a small specificity reduction from 100% (20 of 20 controls; 95% CI = 83.2 - 100) to 95% (19 of 20 controls; 95% CI = 75.1 - 99.9), respectively. The minimum quantity of parasites per culture tubes detected by microscopic evaluation was 15, but the sensitivity was only 30% when fewer than 1,000 parasites were quantified. **CONCLUSION:** The microscopic evaluation of culture samples in ATL may have its sensitivity limited by the non-visualization of scarce parasites or by the non-differentiation of amastigote parasites into promastigote forms.

Keywords: Leishmaniasis, ATL; *Leishmania* culture; Molecular diagnostic; qPCR.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa parasitária, com ampla distribuição mundial e com grande impacto potencialmente extenso na sociedade (ALVAR et al., 2012; ERBER et al., 2018). As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro. São consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública devido à sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afetam predominantemente pessoas com baixo poder econômico, sobretudo em países em desenvolvimento. Dessa forma, requer um esforço coletivo e um compromisso entre os governos, organizações, instituições e a sociedade para o seu controle (OPAS, 2017). O termo LTA abrange amplo espectro de manifestações, influenciado por diversas características do hospedeiro e do agente causal. Considerando-se a área do tegumento afetada, a LTA pode ser classificada principalmente como cutânea, mucosa ou cutâneo-mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A importância da LTA reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo e prejuízo financeiro ao Estado (GONTIJO; CARVALHO, 2013).

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão. O conhecimento científico completo ainda é limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle. Propõe-se a vigilância e o monitoramento em unidades territoriais, definidas como áreas de maior incidência da doença, bem como suas características ambientais, sociais e econômicas, buscando um conhecimento amplo e intersetorial. As ações

devem ser voltadas para o diagnóstico oportuno e o tratamento adequado dos casos detectados, além de estratégias de controle flexíveis, distintas e adequadas a cada padrão de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Um diagnóstico rápido e preciso é essencial para o tratamento e o controle das possíveis complicações e da cronificação da doença (REITHINGER et al., 2007; REVEIZ et al., 2013). Entretanto, ainda não foi identificado um método “padrão-ouro” para o diagnóstico da LTA (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2010). O diagnóstico é estabelecido com base em informações epidemiológicas, apresentação clínica das lesões e exames laboratoriais, que podem ser feitos através de métodos parasitológicos e imunológicos (GOTO e LINDOSO, 2010).

Os testes utilizados para o diagnóstico da LTA apresentam acurácia variável e em métodos parasitológicos clássicos, como o exame direto e a cultura, a sensibilidade tende a variar de acordo com fatores dependentes do examinador (GOMES et al., 2014). Neste contexto, os critérios diagnósticos para LTA ainda não foram definidos de forma homogênea. A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, qualidade do equipamento, dos insumos utilizados, tempo de evolução das lesões, formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (MOMENI et al., 2013).

A cultura *in vitro* representa uma variação dos métodos parasitológicos altamente específicos que visam aumentar artificialmente o número de parasitos coletados em uma amostra, facilitando a identificação do patógeno (MARTINEZ et al., 1992; ROMERO et al., 1999; BOGGILD; MIRANDA et al., 2008). Este método também permite a replicação e armazenamento de parasitos, o que é fundamental para estudos experimentais que avaliam a biologia da infecção, diagnóstico e tratamento.

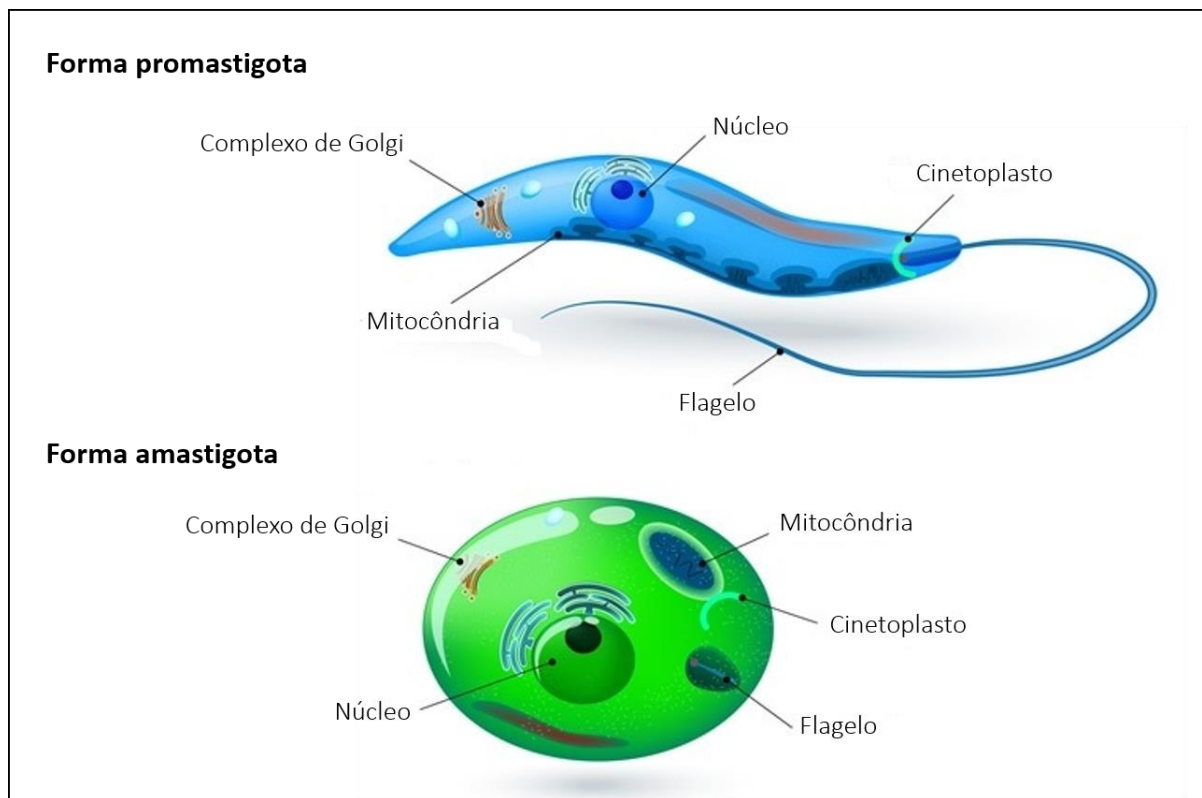
Existem várias técnicas diferentes para cultivar *Leishmania* e uma variedade de meios podem ser usados para este propósito. Estudos prévios descreveram o uso de meios semissólidos, bifásicos e líquidos, entretanto, o meio de cultura *Novy-MacNeal-Nicolle* modificado é uma das opções mais estudadas. A sensibilidade da maioria dos métodos de cultura é limitada e varia de 50 a 70% (BOGGILD; MIRANDA et al., 2008; GOMES et al., 2014). Possivelmente, essa limitação pode ser explicada pela não

visualização de parasitos escassos ou pela não diferenciação das formas amastigotas coletadas presentes no tecido infectado em formas promastigotas no meio de cultura.

1.1 Agente Etiológico

O agente etiológico é um parasito que pode ser encontrado na forma promastigota no tubo digestivo do inseto vetor e a forma amastigota que pode ser encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (CAVALIER-SMITH, 2016). O protozoário pertence a filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. A ordem Kinetoplastida caracteriza-se por apresentar o minicírculo de kDNA, uma mitocôndria única (cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial (DIAS; COURA, 1997).

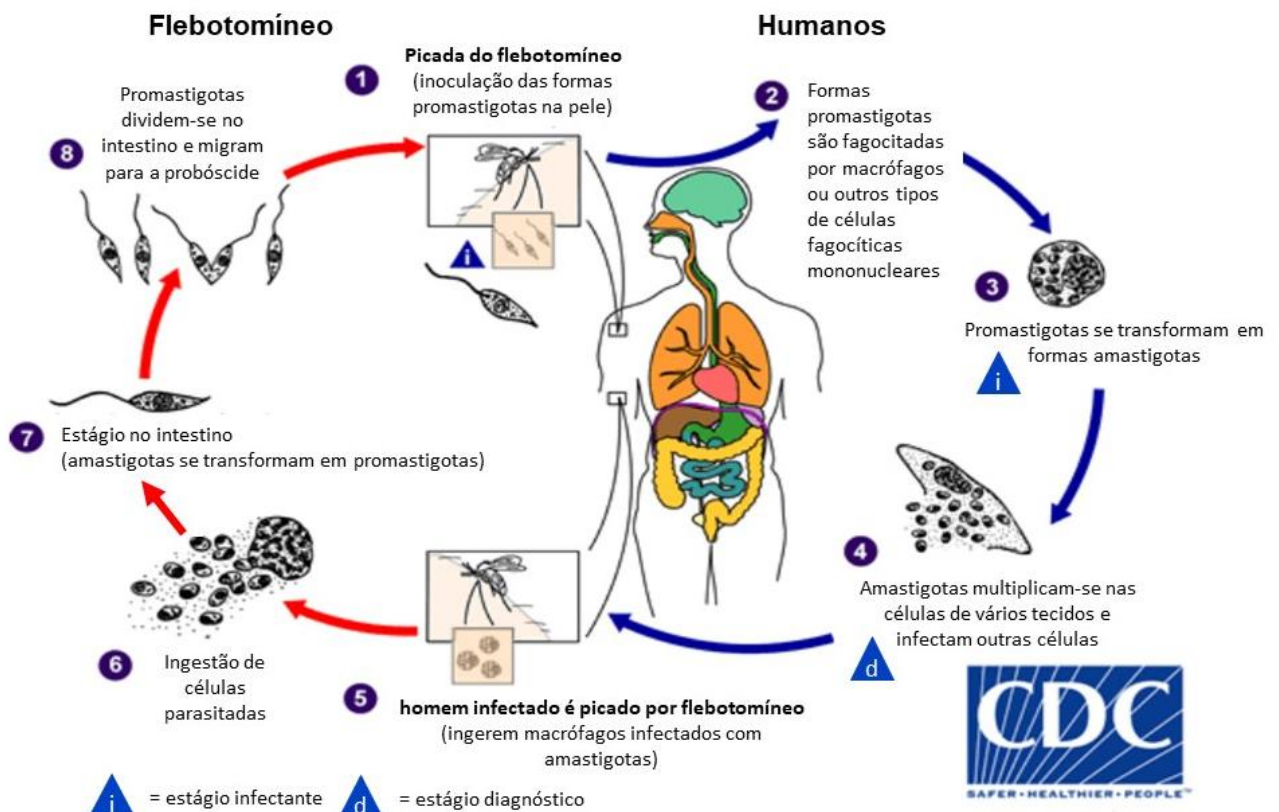
Figura 1. Morfologia da *Leishmania* nas formas promastigota e amastigota.



Fonte: Adaptado de *News Medical Life Sciences*, 2018.

O ciclo de vida do parasito é digenético (heteroxênico), ou seja, o parasito vive alternadamente nos hospedeiros vertebrados e nos insetos vetores (Figura 2). Nos hospedeiros vertebrados, os parasitos assumem a forma amastigota. Esta forma se multiplica, exclusivamente, dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, rompendo os macrófagos e liberando formas amastigotas, que serão fagocitadas novamente por outros macrófagos. Nos invertebrados, os parasitos vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo, onde diferenciam-se em formas flageladas e são posteriormente inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Os vetores responsáveis pela transmissão da doença pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003).

Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* spp..



Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2013.

1.2 Diagnóstico

1.2.1 Exame direto

O exame direto oferece a vantagem do baixo custo e quando positivo confirma o diagnóstico, representando uma ferramenta útil na instalação de tratamento precoce. Apresenta sensibilidade bastante variável dependendo do tempo de lesão, entre 15 a 90% e é considerada relativamente baixa após 3 meses de evolução, nas formas crônicas da LTA (REIS et al., 2008; SZARGIKI et al., 2009). Apesar de ser um método que depende da experiência do examinador, tem uma especificidade alta, já que o achado de formas amastigotas confirma o diagnóstico da doença (BOGGILD; RAMOS et al., 2010).

1.2.2 Exame Histopatológico (EH)

No exame histopatológico (EH) o material a ser examinado deve ser, preferencialmente, extraído da borda ativa da lesão (AMEEN, 2010). O centro da lesão pode apresentar alterações cutâneas, o que dificulta a identificação de parasitos. A visualização das formas amastigotas é difícil, principalmente nas lesões mucosas crônicas. Uma melhor sensibilidade ao diagnóstico pode ser alcançada com o uso de técnicas de imuno-histoquímica ou imunocitoquímica (GOTO; LINDOSO, 2010). A visualização em detalhes das formas amastigotas é uma tarefa difícil e requer intenso treinamento. Além disso, elementos fúngicos ou parasitários, bem como artefatos, podem ser confundidos com as formas de *Leishmania*, explicando a reduzida especificidade do teste (DANESHBOD et al., 2011).

1.2.3 Testes Sorológicos

Existem vários testes sorológicos para o diagnóstico da LTA, entre eles a imunofluorescência indireta (IFI), o teste imunoenzimático (ELISA) e o *immunoblotting* (Western Blot). A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos apresentam grande variabilidade dependendo da técnica utilizada e da forma clínica abordada. Tendem a apresentar resultados positivos a partir de 3 meses do início da forma

cutânea. Os exames de IFI e ELISA apresentam uma sensibilidade amplamente variável, que abrange resultados baixos em torno de 30 a 100%, a depender de inúmeros fatores, incluindo a espécie envolvida (REIS et al., 2008; SZARGIKI et al., 2009; POMARES et al., 2012). O uso do Western Blot para o diagnóstico sorológico da LTA agrega maior sensibilidade. No entanto, trata-se de uma técnica mais dispendiosa e que requer maior infraestrutura laboratorial, dificultando sua implementação como rotina (POMARES et al., 2012). Neste sentido, alguns autores consideram os exames sorológicos como de utilidade limitada no diagnóstico da LTA, entretanto, podem atuar como um complemento ao exame clínico (ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007; POMARES et al., 2012).

1.2.4 Cultura

A cultura pode ser realizada tanto *in vitro* por microcultivo (cultura de fungos) ou cultura tradicional em meio sólido, quanto *in vivo* por inoculação em animais. Algumas das técnicas para cultura *in vitro* consistem em semear o material em fase sólida em meio NNN modificado ou em meio líquido como o Schneider. A sensibilidade da cultura tradicional em meio sólido NNN modificado 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). Consiste em uma metodologia complementar essencial, principalmente em casos duvidosos e na realização de pesquisas científicas.

1.2.5 Biologia Molecular

O uso da biologia molecular no diagnóstico da LTA é considerado um método promissor, pois tem alta sensibilidade e especificidade em comparação aos demais testes descritos (SILVA et al., 2012). Porém, é uma técnica que não está disponível na maioria dos centros de referência tendo em vista seu alto custo. As formas de extração do DNA, amplificação do material genético e sua visualização podem ser variáveis. Estas características transformam a biologia molecular em um espectro de técnicas combinadas, com um principal alicerce na amplificação do DNA pela técnica de PCR.

Após a coleta, o DNA da amostra pode ser extraído das células por diferentes técnicas laboratoriais, inclusive com o uso de kits disponíveis comercialmente. A acurácia desta metodologia 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 (SILVA et al., 2012). A baixa sensibilidade dos exames parasitológicos no diagnóstico da LTA é uma grande limitação no manejo clínico da doença. No entanto, estas são técnicas altamente específicas, por identificar diretamente o parasito, evitando assim a prescrição de tratamentos tóxicos de forma equivocada (GOMES et al., 2016).

A qPCR é considerada uma técnica muito eficiente para a detecção de DNA e acrescenta resultados quantitativos às análises clínicas (JARA et al., 2013; GOMES et al., 2016; SEVILHA-SANTOS et al., 2018). Também é considerada muito sensível para o diagnóstico de LTA, especialmente quando detecta um alvo multicópia específico para o minicírculo de kDNA de *Leishmania* (SATOW et al., 2013).

Acredita-se que a realização de testes moleculares, especialmente a qPCR sensível em meio de cultura negativo, pode detectar parasitos nas condições citadas, situação em que não são visualizados durante a avaliação microscópica clássica. Até o presente momento, não foi descrito um exame que seja 100% eficaz para LTA. Desta forma, é essencial uma significativa melhora das técnicas para o diagnóstico da doença.

2. JUSTIFICATIVA

Os exames utilizados para o diagnóstico da LTA possuem sensibilidade e especificidade variáveis e podem ser influenciados por diversos fatores. A biologia molecular tem sido considerada uma ferramenta promissora por agregar adequada sensibilidade e especificidade. Agrega boa acurácia em comparação aos exames imunológicos e parasitológicos e consiste em uma técnica promissora no diagnóstico da LTA. É uma técnica que permite amplificar em escala exponencial as sequências de DNA do parasito em diferentes tipos de amostras, tais como pele, cultura e mucosa. É um método considerado de alta sensibilidade e especificidade e uma das principais vantagens do uso da qPCR é a possibilidade de detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária. Possivelmente, exames parasitológicos como exame direto ou cultura tem sua sensibilidade limitada pela não visualização de parasitos escassos. Estes parasitos são escassos tendo em vista que o tempo da doença é inversamente proporcional à carga parasitária; neste sentido, lesões mais antigas, tendem a ter menor carga parasitária. É possível que a realização de exames moleculares em meios de cultivo negativos possa detectar parasitos não visíveis à avaliação visual. Neste estudo, foi testada a qPCR em sobrenadante da cultura de *Leishmania* semeada em meio de cultura NNN modificado, com a finalidade de aumentar a acurácia do teste para o diagnóstico da LTA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo da pesquisa foi testar a acurácia diagnóstica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) realizada em sobrenadante de cultivo de *Leishmania* semeada em meio de cultura *Novy-MacNeal-Nicolle* modificado no diagnóstico da LTA.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar o número mínimo de parasitos necessários no meio de cultura para permitir uma detecção microscópica visual;
- b. Comparar a avaliação visual da cultura com os resultados obtidos pelo teste índice (qPCR + cultura) a fim de verificar qual metodologia é mais sensível para o diagnóstico da LTA.

4. HIPÓTESE DO ESTUDO

O crescimento em cultivo de quantidades mínimas de *Leishmania* pode não ser visível ao olho humano, reduzindo assim a sensibilidade deste exame. Espera-se que a associação do resultado da qPCR + cultura possa aumentar de forma impactante a sensibilidade e acurácia da cultura, uma vez que a qPCR realizada em material de cultivo pode detectar o DNA do parasito presente no material semeado em quantidades não perceptíveis a olho nu.

5. MÉTODOS

O presente estudo está em conformidade com as normas do *Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies* (STARD, 2015), que contém uma lista atualizada de itens essenciais para estudos de precisão diagnóstica (BOSSUYT et al., 2015) (Anexo 5) e de acordo com as recomendações do *Guideline: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE), que contém informações mínimas para publicação das diretrizes quantitativas de experimentos da qPCR (BUSTIN et al., 2009).

5.1 Local do estudo

Foram recrutados pacientes do Serviço de Dermatologia do HUB, em uma unidade ambulatorial especializada no diagnóstico de LTA no período de 15 de fevereiro de 2017 a 07 de fevereiro de 2018. 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 parasitológicos e de biologia molecular foram processados no Laboratório de Dermatomicologia, em conjunto com o Laboratório Interdisciplinar de Biociências – UnB. Os experimentos da qPCR foram realizados no Laboratório de Biologia do Gene – UnB.

5.2 População estudada

Foram incluídos, consecutivamente, pacientes com lesões cutâneas suspeitas de LTA e que realizaram previamente os exames diagnósticos para inclusão. Todos os exames, incluindo os que formaram o padrão de referência composto e o teste índice, foram coletados no mesmo horário e interpretados por avaliadores cegos (BOGGILD; VALENCIA et al., 2010; BOGGILD; RAMOS et al., 2011; GOMES et al., 2014).

5.3 Critérios de inclusão no grupo LTA

Os pacientes foram considerados portadores de LTA se apresentassem exame direto para *Leishmania* ou PCR convencional positivo, com amostras de biópsia, utilizando iniciadores que amplificam a região ITS1 (MEDEIROS-SILVA et al., 2015; SANCHES et al., 2016); ou que amplificam fragmentos de kDNA de *Leishmania* spp.. (PITA-PEREIRA et al., 2012); ou uma qPCR positiva baseada em TaqMan específica para *L. braziliensis* realizada com amostras de biópsia (GOMES et al., 2016). Alternativamente, pacientes que não preencheram esses critérios foram considerados portadores de LTA se apresentassem quadro clínico e histopatológico compatível, sem qualquer diagnóstico diferencial feito por colorações especiais ou PCR convencional para micobactérias.

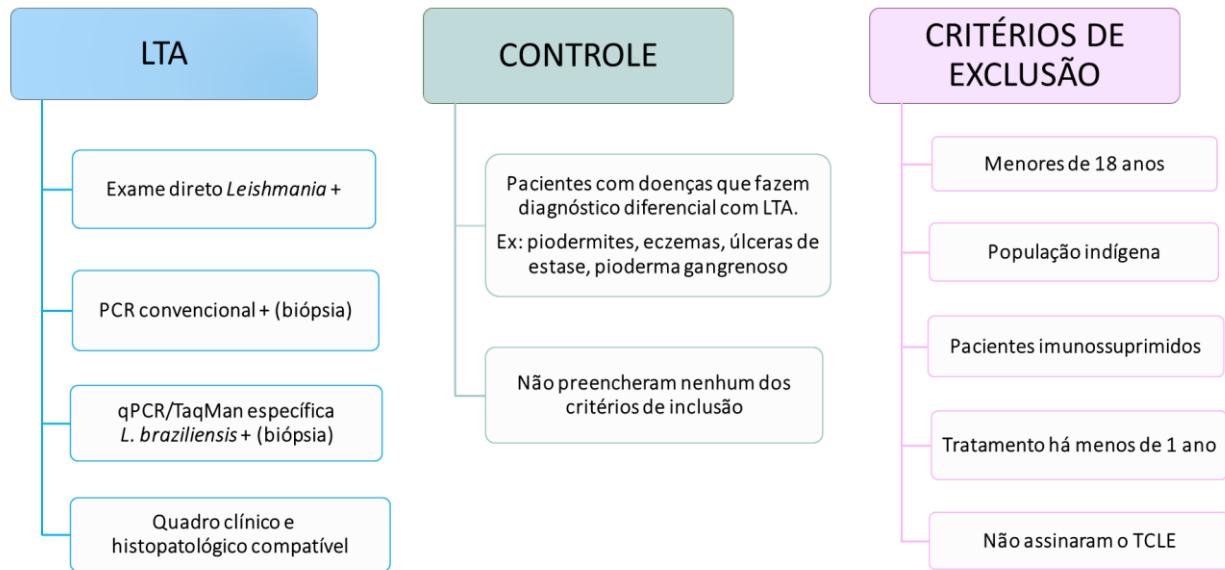
5.4 Critérios de inclusão no grupo controle

O grupo controle foi formado por pacientes com doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA e que não preencheram nenhum dos critérios acima mencionados.

5.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com imunossupressão (infecção por HIV ou medicamentosa), pacientes que receberam tratamento para leishmaniose menos de 1 ano antes do recrutamento, pacientes pertencentes a populações especiais (menores de 18 anos e populações indígenas) ou que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

Figura 3. Critérios para alocação nos grupos.

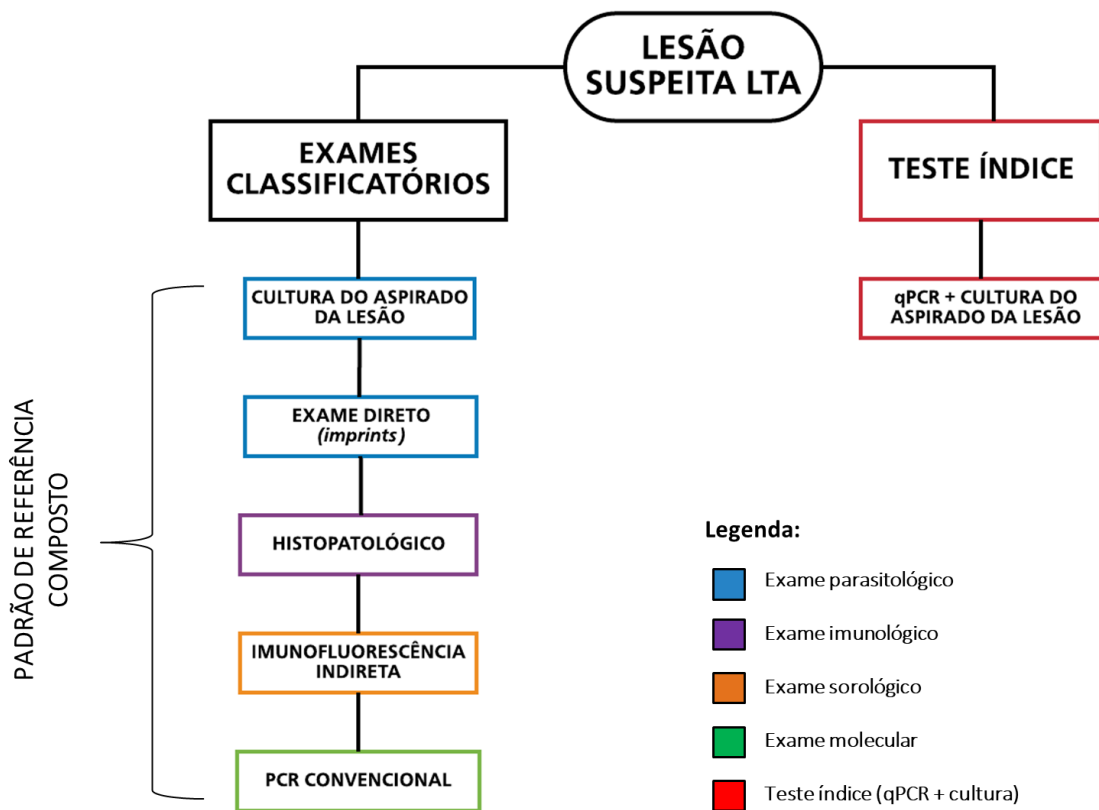


5.6 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi definido com base nos pacientes com suspeita clínica de LTA do ambulatório de Dermatologia do HUB. A prevalência estimada de LTA nessa população é de 70% (NAME et al., 2005; SEVILHA-SANTOS et al., 2018). De acordo com Bujang et al., 2016, com uma hipótese nula para sensibilidade definida em 70%, uma hipótese alternativa para sensibilidade definida em 90%, potência ajustada em $\geq 80\%$ e o valor de p definido como <0.05 , o tamanho mínimo da amostra para doença positiva e amostra total deveriam ser 31 e 44, respectivamente. A especificidade foi considerada estável para a qPCR baseada em TaqMan e não foi incluída no cálculo do tamanho da amostra. O cálculo amostral foi realizado pelo ambiente virtual *OpenEpi® version 3.01* (Emory University, Rollins School of Public Health, Atlanta, Georgia, EUA).

5.7 Exames realizados após a suspeita clínica de LTA

Figura 4. Esquema representativo dos exames realizados no estudo.



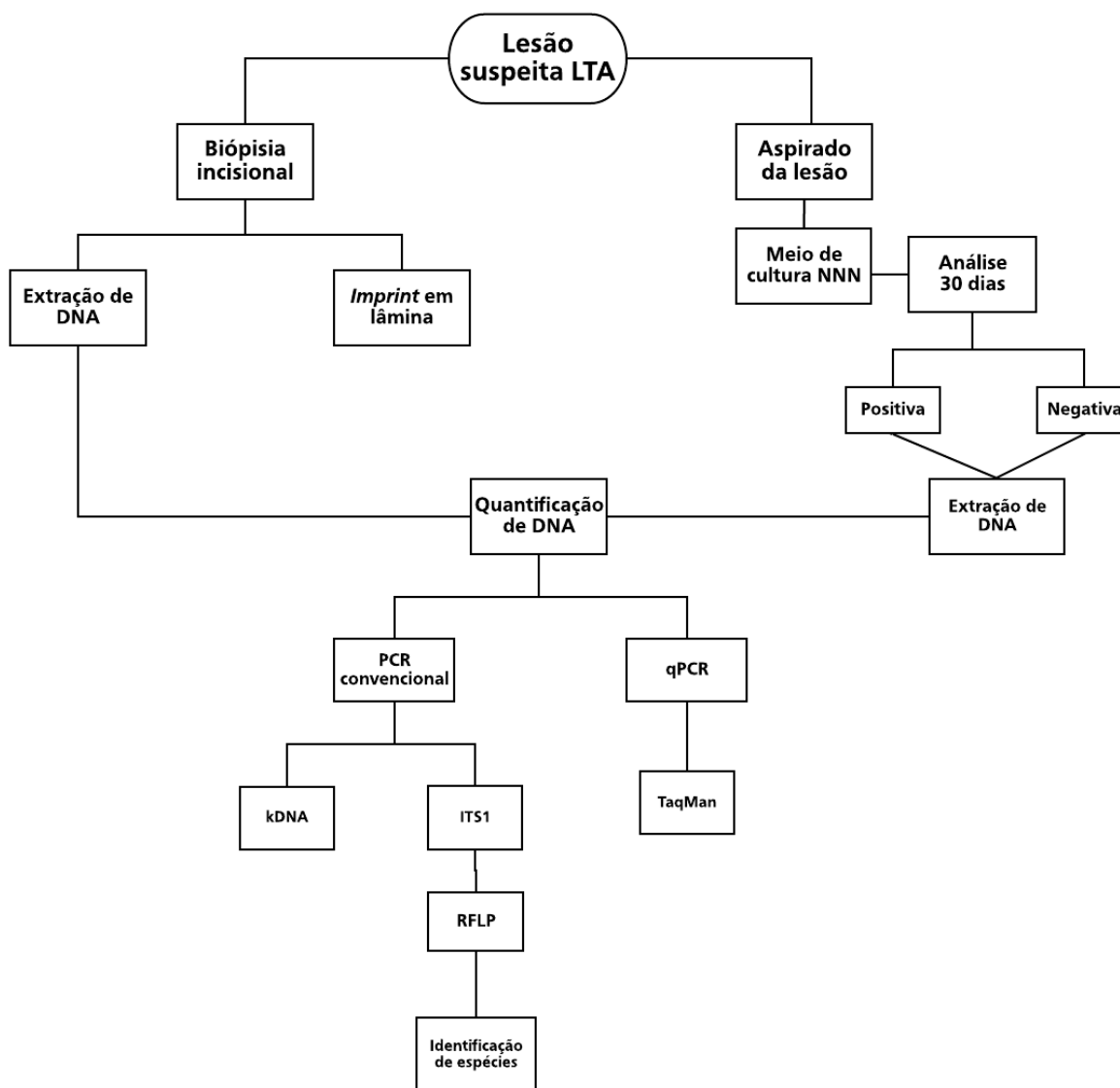
5.8 Ética

Todos os pacientes foram incluídos após concordância e assinatura do TCLE. Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*, 2013). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – UnB (56709316.3.0000.5558) e pelo Comitê de Ética em Uso Animal – UnB (148305/2015).

5.9 Método de coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas e processadas de acordo com o fluxograma abaixo:

Figura 5. Fluxo do processamento das amostras coletadas para o estudo.



5.10 Exames realizados para a classificação dos pacientes

5.10.1 Biópsia incisional da lesão

A biópsia incisional com diâmetro de 5 mm feita com *punch* ou bisturi foi realizada após a assepsia e antissepsia da lesão com clorexidina alcoólica a 0.5%, álcool etílico a 70% e solução fisiológica a 0.9%. A anestesia local foi feita com cloridrato de lidocaína a 2% e o local escolhido para obtenção da amostra foi a borda da lesão suspeita de LTA (Figura 6). Este fragmento foi armazenado no freezer a -80°C até o processamento da amostra através da PCR convencional no Laboratório de Dermatologicologia – UnB (SOARES et al., 2011; GOMES et al., 2014).

Figura 6. Local de coleta da lesão suspeita de LTA para a realização da biópsia.



Fonte: Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2017.

5.10.2 Cultura do aspirado da lesão

O aspirado na borda da lesão cutânea foi realizado com seringa estéril de 1 mL, contendo 0.5 mL de solução fisiológica estéril e gentamicina (250 µg/mL). O conteúdo foi dividido em 2 tubos em meio sólido NNN modificado (Figura 7), após a assepsia dos tubos com álcool a 70%. Os meios de cultura foram incubados em estufa a 24-26°C por 30 dias.

Figura 7. Meio de cultura NNN modificado em fase sólida



Fonte: Laboratório de Dermatocologia – UnB, 2018.

A preparação dos meios de cultura utilizados neste estudo foi adaptada de acordo com a metodologia descrita por Romero e colaboradores em 1999. Foram utilizados 8 g de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) - Himedia® (REF M211-500G) e sangue de coelho desfibrinado a 44% para 200 mL de ágar, o qual foi adicionado após a fusão do ágar a 50°C. Também foram adicionados ao meio 250 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, Brasil) e a mistura foi distribuída em tubos de vidro para coleta de sangue à vácuo siliconizados livres de ativador de coágulo de 10 mL (*Labor Import*) (Figura 8). Os tubos contendo o meio permaneceram por 24 horas na câmara de fluxo laminar desligada para verificar se houve contaminação. Após este período os tubos foram fechados com as tampas de borracha e armazenados a 8°C.

Figura 8. Tubo de vidro para coleta de sangue siliconizados.



Fonte: Labor Import.

5.10.3 Pesquisa de formas promastigotas

A pesquisa de formas promastigotas foi realizada em microscópio invertido (*Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha*) diariamente até o trigésimo dia após a inoculação (Figura 10). Em seguida, o aspirado do sobrenadante da cultura foi transferido para um micro tubo cônico de 1.5 mL com auxílio de uma seringa estéril de 1 mL, após a prévia desinfecção das tampas dos tubos com álcool a 70%. Após este processo, o micro tubo cônico de 1.5 mL foi centrifugado por 5 minutos (min) a 11.000 rotações por minuto (rpm) para a formação do *pellet*. Foi realizada, inicialmente, duas lavagens com 0.5 mL de solução-tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e em seguida uma lavagem com 0.5 mL de água ultrapura, descartando o sobrenadante. Após este procedimento, os micro tubos cônicos de 1.5 mL foram armazenados no freezer a -80°C até a extração de DNA no Laboratório de Dermatômico da Faculdade de Medicina – UnB (SOARES et al., 2011; GOMES et al., 2014).

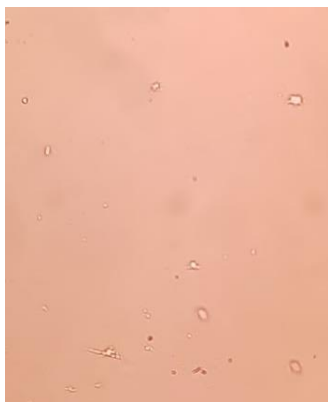


Figura 10. Visualização em meio de cultura NNN modificado negativo com presença de células em microscópio invertido com aumento de 1000x.

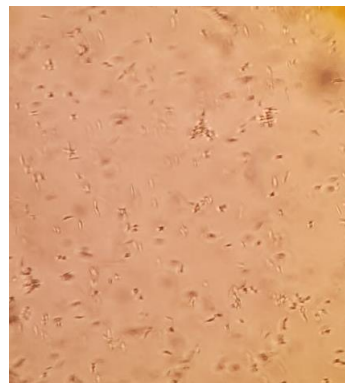


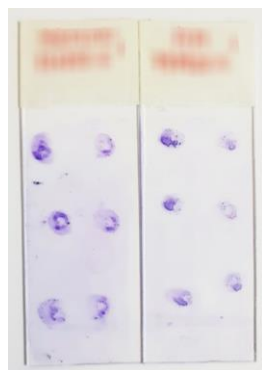
Figura 9. Visualização de formas promastigotas inoculadas com aspirado da lesão de LTA em meio de cultura NNN modificado em microscópio invertido com aumento de 1000x.

5.10.4 *Imprints* em lâmina para microscopia

Após a realização da biópsia incisional circular conforme o subitem 5.10.1, o fragmento foi pressionado em 6 pontos diferentes em 2 lâminas para microscopia (Figura 11). Os *imprints* foram fixados com álcool metílico e, após secagem, corados com *Giemsa*, para posterior exame ao microscópio óptico em objetiva de imersão com

aumento de 1000x. A positividade do exame é constatada através da visualização de formas amastigotas em microscópio óptico (SOARES et al., 2011; GOMES et al., 2014).

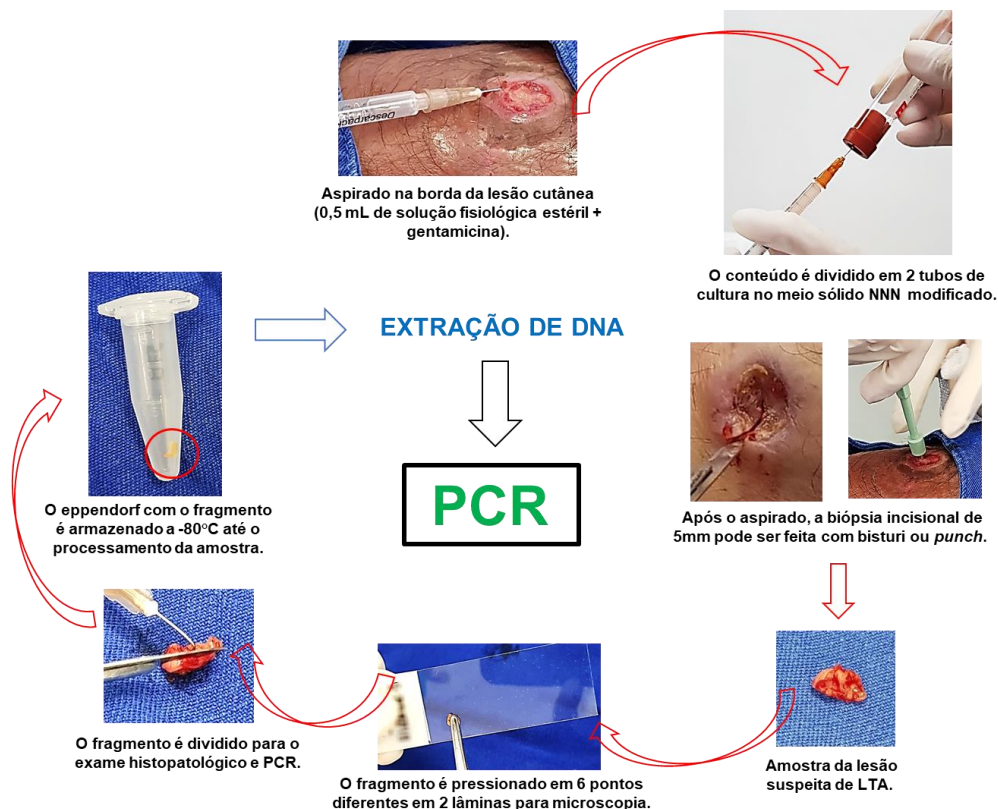
Figura 11. *Imprints* em lâmina para microscopia corado com Giemsa.



Fonte: Laboratório de Dermatocologia – UnB, 2018.

Esquema representativo das etapas realizadas na rotina em pacientes com suspeita de LTA no Ambulatório de Dermatologia – HUB (Figura 12).

Figura 12. Etapas da rotina em pacientes com suspeita de LTA no Ambulatório de Dermatologia – HUB.



5.10.5 Exame Histopatológico (EH)

Após coleta, o fragmento foi conservado em 20 mL de formol 20% e destinado ao setor de Anatomia Patológica – HUB. O histopatológico foi considerado positivo com base em dois critérios: na visualização das formas amastigotas do parasito e na presença de alterações cutâneas e infiltrado celular compatíveis com LTA (erosão, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e infiltrado linfo-plasmo-histiocitário) (NAME et al., 2005; GOMES et al., 2014).

5.10.6 Imunofluorescência Indireta (IFI)

As amostras de sangue venoso coletadas dos pacientes foram enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN, onde o exame é realizado após a separação do soro. O exame de IFI consiste na detecção de anticorpos contra *Leishmania* no soro humano. É um teste que se baseia na reação de soros com a presença do parasito (*Leishmania*), quando em contato com o soro humano. A reação é evidenciada após a adição de um conjugado fluorescente, com 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%. Após a preparação do material, a leitura é feita por fotomicroscopia e o exame é considerado positivo quando apresenta titulações iguais ou superiores a 1:40 (GOMES et al., 2014).

5.10.7 Extração de DNA

5.10.7.1 Extração das amostras de biópsias

As amostras de biópsias foram mantidas congeladas a -80°C até o processamento. O protocolo utilizado para a extração estava de acordo com o *Biopur Kit Extração Mini Spin Plus* (Mobius Life Science, Pinhais, PR, Brasil), realizada conforme orientações do fabricante e processadas no Laboratório Interdisciplinar de Biociências – UnB.

As amostras estavam inicialmente em um micro tubo cônico de 1.5 mL e foram adicionados a este tubo 25 µL de Proteinase K e 200 µL de Tampão de Lise S, que foram homogeneizados vigorosamente em vórtex por 10 a 20 segundos (s). Esta etapa de homogeneização foi importante para obter um alto rendimento e pureza do DNA. As amostras foram incubadas a 56°C por 30 min e misturadas em vórtex duas vezes vigorosamente durante a incubação. Após esta primeira etapa, foram adicionados 210 µL de etanol (96-100%) e homogeneizados em vórtex. Toda a amostra foi transferida para o Tubo Spin S (tubo-filtro) e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 µL de Tampão de Lavagem SI e centrifugados por 1 min a 11.000 rpm. Após novo descarte do sobrenadante, foram adicionados 600 µL de Tampão de Lavagem SII e centrifugados por 1 min a 11.000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. O tubo-filtro foi colocado em um micro tubo cônico identificado e foram adicionados 100 µL de Tampão de Eluição S previamente aquecido a 56°C. O micro tubo cônico foi deixado por 1 min à temperatura ambiente e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. Após este processo, a alíquota de DNA foi quantificada conforme o subitem 5.10.8 e estocada a 4°C.

5.10.7.2 Extração das amostras de aspirado em meio de cultura

As amostras de aspirado em meio de cultura foram mantidas congeladas a -80°C até o processamento. O protocolo utilizado para a extração estava de acordo com o kit comercial *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha), e foi realizada conforme as orientações do fabricante no Laboratório de Dermatômico-logia – UnB.

As amostras de cultura estavam em micro tubos cônicos de 1.5 mL e foram adicionados a estes micro tubos 200 µL de *Lysis Buffer T1*, 25 µL de Proteinase K e 200 µL de *Buffer Lysis B3*, que foram homogeneizados vigorosamente em vórtex por 10 a 20 s até soltar o *pellet* de células. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 min em incubadora/agitadora (*ESCO ProvoCell™ Microplate Shaker/Incubator*) (Figura 13). Após esta primeira etapa, foram adicionados 210 µL de etanol (96-100%) e homogeneizados em vórtex. A amostra foi transferida para o *NucleoSpin Tissue*

Columns (tubo-coluna) e centrifugada por 1 min a 11.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de *Wash Buffer BW* e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. Após novo descarte do sobrenadante, foram adicionados 600 μ L de *Wash Buffer B5* e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. O tubo-coluna foi colocado em um micro tubo cônico identificado e foram adicionados em cada um 100 μ L de *Elution Buffer BE* previamente aquecido a 70°C. O micro tubo cônico foi deixado por 1 min à temperatura ambiente e centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. Após este processo, a alíquota de DNA foi quantificada conforme o subitem 5.10.8 e estocada a 4°C.

Figura 13. *Esco Microplate Shaker/Incubator*.¹



5.10.8 Quantificação do DNA

Após o processo de extração de DNA, as amostras de aspirado de cultura e biópsia foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoVue Plus®* (*GE Healthcare Life Science*, UK) (Figura 14) com 3 μ L do material extraído no Laboratório Interdisciplinar de Biociências – UnB e armazenadas a 4°C até o momento da amplificação do DNA.

Figura 14. Espectrofotômetro *NanoVue Plus®*.²



¹ Fonte: <http://www.escoglobal.com>

² Fonte: <https://www.gelifesciences.com>

5.10.9 PCR Convencional

O controle positivo utilizado nas reações da PCR convencional nas amostras de aspirado de cultura e biópsia foi obtido a partir do isolamento do DNA de culturas em crescimento exponencial de *L. braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300). Todas as amplificações das amostras de biópsias e culturas foram realizadas em um termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA) no Laboratório de Dermatocologia – UnB.

5.10.9.1 Amplificação da região conservada do gene ITS1

Para amplificação da região do alvo ITS1 do DNA ribossomal foram utilizadas as sequências específicas dos *primers* PR280 (5'-AGCTGGATCATTTTCCGATG-3') e PR281 (5'-TATGTGAGCCGTTATCCACGC-3') (SANCHES et al., 2016) gerando um produto esperado de 250-300 pb (pares de base). O procedimento de amplificação foi realizado com volume final de 30 µL (SEVILHA-SANTOS et al., 2018) conforme as reações descritas nas Tabelas 1, 2 e Figura 15.

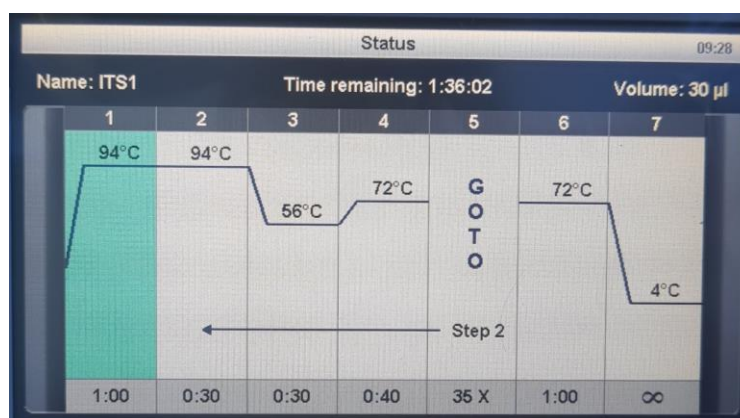
Tabela 1. Reagentes utilizados na PCR convencional para amplificação da região ITS1.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultrapura	-----	11.7 µL
Buffer	10 X	6 µL
dNTP's	2 mM	3 µL
MgCl ₂	50 mM	1.8 µL
PR280	10 mM	1.0 µL
PR281	10 mM	1.0 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0.5 µL
DNA	100 ng	5.0 µL
Volume final	-----	30 µL

Tabela 2. Etapas do processo de amplificação da região ITS1.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	
Anelamento	56°C	30 s	35x
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

Figura 15. Etapas do processo de amplificação da região ITS1.



5.10.9.2 Amplificação de região conservada do kDNA de *Leishmania* spp.

Para amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. foram utilizadas as seguintes seqüências específicas dos *primers* PPf (5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3') e PPr (5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3') (PITA-PEREIRA et al., 2012), gerando um produto esperado de 120 pb. O procedimento de amplificação foi realizado com um volume final de 25 µL, conforme as reações descritas nas Tabelas 3, 4 e Figura 16.

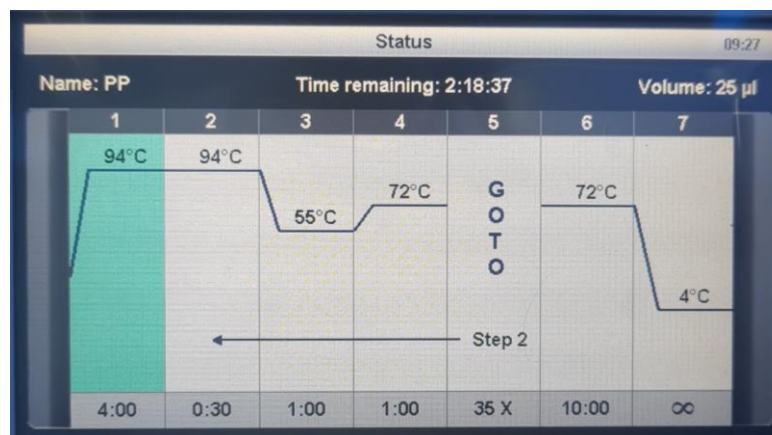
Tabela 3. Reagentes utilizados na PCR para amplificação da região conservada do kDNA.

<i>REAGENTES</i>	<i>CONCENTRAÇÃO INICIAL</i>	<i>CONCENTRAÇÃO FINAL</i>
Água ultrapura	-----	18.20 µL
Buffer	10 X	2.5 µL
dNTP's	2 mM	0.2 µL
MgCl ₂	50 mM	1.0 µL
PPf	10 mM	0.4 µL
PPr	10 mM	0.4 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0.3 µL
DNA	100 ng	2.0 µL
Volume final	-----	25 µL

Tabela 4. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA.

<i>ETAPA</i>	<i>TEMPERATURA</i>	<i>TEMPO</i>	<i>CICLO</i>
Desnaturação inicial	94°C	4 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	
Anelamento	55°C	1 min	35x
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1x

Figura 16. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA.



5.10.9.3 Integridade do DNA nas amostras de biópsias

Para confirmar a integridade do DNA das amostras de biópsias foram utilizadas sequências específicas que amplificam o gene constitutivo β -actina dos *primers* BAA (5'-ATC TGG CAC ACC TTC CTA CAA TGA GCT GCG-3') e BAS (5'- CGT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCTGC-3') (ROSSI et al., 1994). Os amplificados foram separados através da corrida eletroforética em gel de agarose a 0.8% (*Invitrogen*®, USA) corado com brometo de etídio 0.5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1X (Tris acetato 90 mM pH 8.0; EDTA 25 mM). Este processo foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências – UnB.

Tabela 5. Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene constitutivo β -actina.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Buffer	1X
dNTP's	0.2 mM
MgCl₂	3.0 mM
BAA	0.1 μ M
BAS	0,1 μ M
Taq DNA polimerase	2.5 U/ μ L
DNA	20 ng
Volume final	25 μL

As amplificações do gene constitutivo β -actina foram realizadas em um termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler System* (*Bio-Rad Laboratories*, Inc. California, USA), conforme as etapas descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Etapas do processo de amplificação do gene constitutivo β -actina.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1x
Desnaturação	95°C	30 s	
Anelamento	60°C	1 min	30x
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	5 min	1x

5.10.9.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a preparação do gel de agarose, foram utilizados 0.750 g (gel a 1.5%) ou 1 g de agarose (gel a 2%) dissolvidos em 50 mL de tampão TAE. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal *Owl EasyCast B1* (Figura 17) a 100 volts por 50 min. Todas as amostras amplificadas foram coradas com diluição 1:500 de *GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain*, Jaguará, São Paulo) e visualizadas no transiluminador (*High Performance Transilluminator* (UVP) (Figura 18). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Dermatômico-logia – UnB.

Figura 17. Cuba horizontal *Owl EasyCast B1*.³

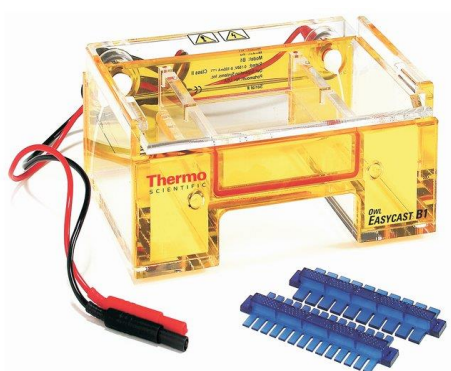


Figura 18. *High Performance Transilluminator* (UVP).⁴



³ <https://www.thermofisher.com>

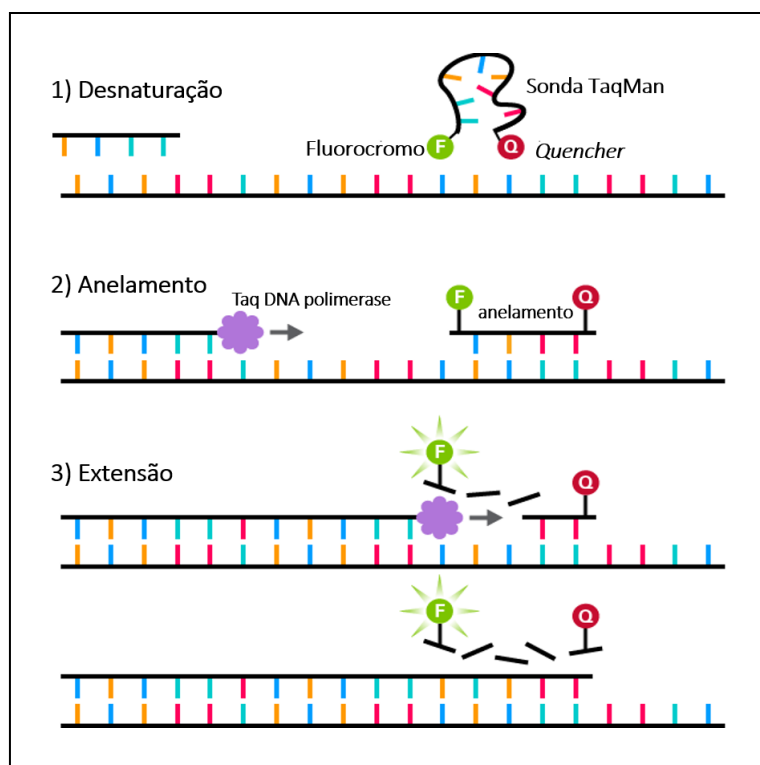
⁴ <https://uvp.com/highperformance.html>

5.11 Teste índice

5.11.1 PCR em tempo real (qPCR)

Os ensaios quantitativos da técnica de qPCR foram realizados utilizando a metodologia *TaqMan MasterMix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), com iniciadores específicos para amplificar as sequências do kDNA 3 da *Leishmania Viannia braziliensis* (5'-TGC TAT AAA ATC GTA CCA CCC GACA-3') e (5'-GAA CGG GGT TTC TGT ATG CCA TTT-3') e uma sonda de hidrólise específica para *Leishmania Viannia braziliensis* (FAM-TTG CAG AAC GCC CCT ACC CAG AGGC-TAMRA) (FAM, 6-carboxifluoresceína, TAMRA, 6-carboxietrametil-triamina) (Figura 19) resultando em um produto amplificado de 83 pb (WEIRATHER et al., 2011; GOMES et al., 2017).

Figura 19. Representação esquemática da PCR em tempo real com o uso de sonda TaqMan.



Legenda: **1) Desnaturação:** sonda TaqMan complementar a uma região do DNA é ligada a dois compostos fluorescentes. **2) Anelamento:** quando a amplificação inicia, a Taq DNA polimerase cliva/remove a sonda e o sinal de fluorescência é liberado. **3) Extensão:** a fluorescência é liberada a cada ciclo, gerando um sinal fluorescente específico da sequência.

As reações foram realizadas com volume final de 10 µL no Laboratório de Biologia do Gene – UnB, conforme descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Reagentes utilizados na qPCR para amplificação da região conservada do kDNA 3.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultrapura	----	0.5 µL
TaqMan Master Mix	2X	5.0 µL
kDNA 3	10 mM	0.2 µL
kDNA 3	10 mM	0.2 µL
Probe	5 mM	0.1 µL
DNA	10 ng	4.0 µL
Volume final	----	10 µL

As amplificações das amostras de biópsias e culturas foram processadas utilizando o termociclador *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), conforme as etapas descritas na Tabela 8. Todas as reações utilizaram controle positivo de cultura de *L. braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300), água ultrapura, controle negativo extraído de pele sadia e de sangue.

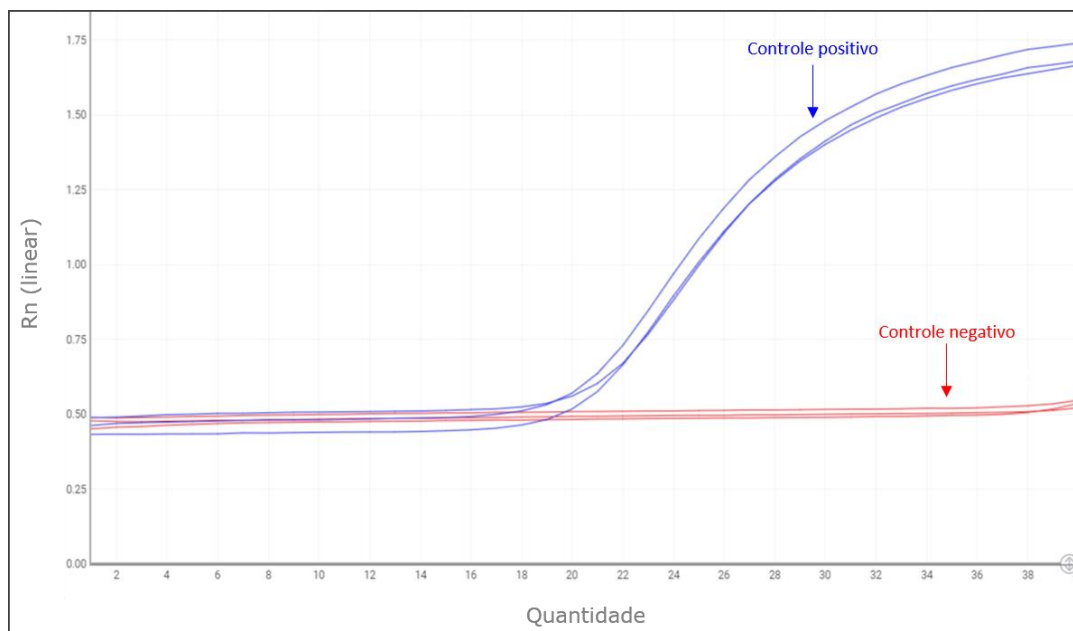
Tabela 8. Etapas do processo de amplificação da região conservada do kDNA 3.

TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
50°C	2 min	----
95°C	10 min	
95°C	15 s	40x
60°C	1 min	

5.11.2 Critérios de positividade

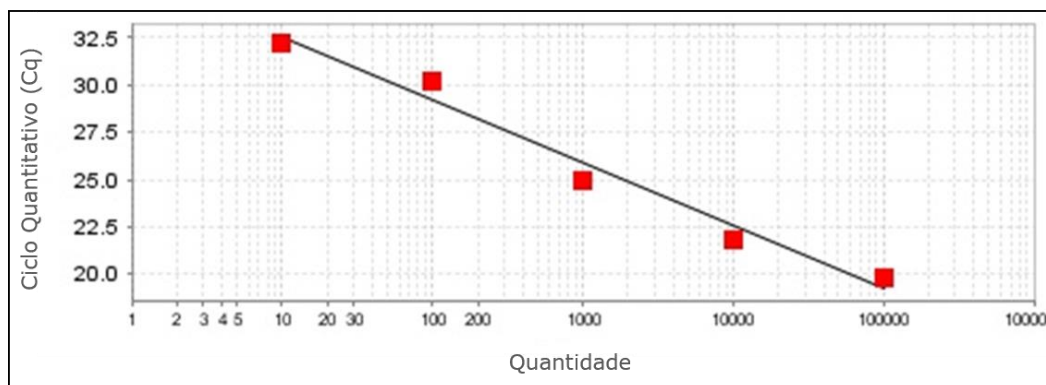
O DNA extraído de amostras de pele saudável, sangue e de água ultrapura não tiveram valores médios de Cq (ciclo de quantificação) menores ou iguais a 36 ciclos (Figura 20). Dessa forma, antes do processamento das amostras e com base na curva padrão, um resultado positivo (limite máximo de detecção) foi definido com amostras que apresentaram um valor de Cq menor ou igual a 32 ciclos (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

Figura 20. Curvas de amostras de cultura de paciente positivo (azul: Cq: 12.10) e de água ultrapura (vermelho: Cq: 36.99).



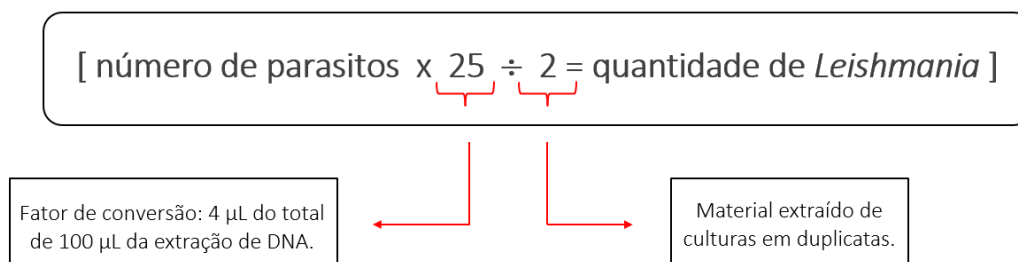
Todas as reações foram realizadas por um pesquisador responsável e cego com relação aos outros exames e às condições clínicas dos pacientes. As amostras para o teste do padrão de referência composto e para o teste índice foram coletadas ao mesmo tempo. A curva padrão foi gerada com amostras de cultura em triplicata de *L. braziliensis* (Figura 21) (SHRIVASTAVA et al., 2011).

Figura 21. Curva padrão realizada com controle de *L. braziliensis* ($R^2 = 0.949$, eficiência = 99.722, declive = -3.329).



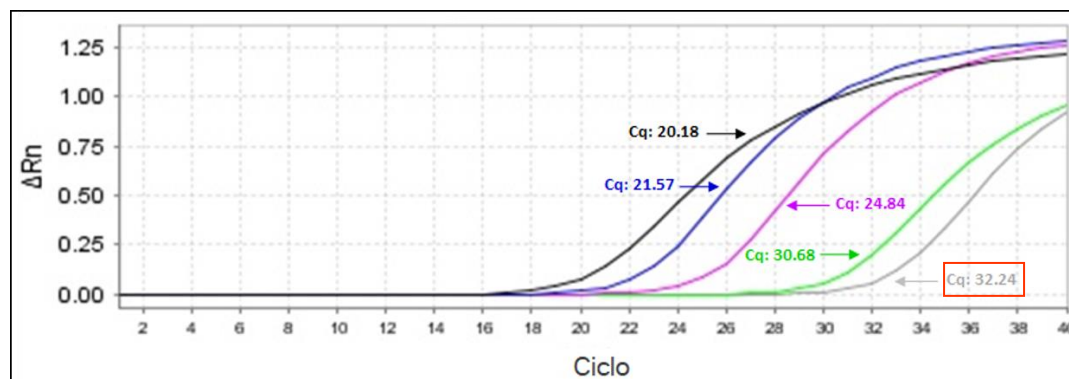
O número de parasitos por tubo de cultura foi calculado conforme a Figura 22.

Figura 22. Cálculo do número de parasitos por tubo de cultura.



Levando em consideração o tamanho do genoma haploide da *L. braziliensis*, foi considerado 83,15 fg do DNA de *Leishmania* como sendo equivalente a um parasito (32 Mb, 70 fg por seu genoma diploide) (JARA et al., 2013).

Figura 23. Curva padrão demonstrando a média dos ciclos de quantificação (Cq) da diluição seriada do controle de *L. braziliensis*.



A reação mostrou um limiar de quantificação igual a 5×10^{-3} ng de *Leishmania* DNA por reação, equivalentes a 6,01 parasitos com um valor de Cq = 32.24 (Figura 23).

5.12 Análise do Polimorfismo em Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

A PCR-RFLP foi realizada para a identificação do subgênero de *Leishmania* com produtos da PCR de amostras de culturas positivas. A PCR-RFLP foi realizada com enzima *HaeIII* (Promega, Madison, WI, USA), os micro tubos cônicos de 1.5 mL foram

previamente identificados e foram adicionados 5 μ L de amostra em seus respectivos tubos. Em seguida, 5 μ L de mix (10 unidades da enzima *HaeIII*, 10 μ L de *Buffer* 10X e 39 μ L de água ultrapura). As amostras permaneceram incubadas por 1 hora e em seguida foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SILVA, 2012). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Dermatologia – UnB.

5.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram visualizados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida a 7.5%, 150 volts, 75 Amp, por 90 min. Em seguida, o gel foi fixado sob agitação com 100 mL de solução fixadora (5 mL de ácido acético glacial e 1000 mL de água bidestilada) a 10% por 5 min. Logo em seguida, corado com 100 mL de solução de prata (AgNO_3) a 0.2% por 5 min e lavado com 100 mL de água bidestilada. Por último, foram acrescentados 100 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 3% com 800 μ L de formaldeído P.A por 10 a 15 min no agitador até a revelação das bandas. O marcador de peso molecular utilizado em todos os géis foi o *DNA Molecular Weight Marker V* (Roche Applied Science – Alemanha), capaz de identificar fragmentos entre 8 e 587 pb. Este processo foi realizado de acordo com protocolos usualmente utilizados no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) – UnB.

5.14 Análise Estatística

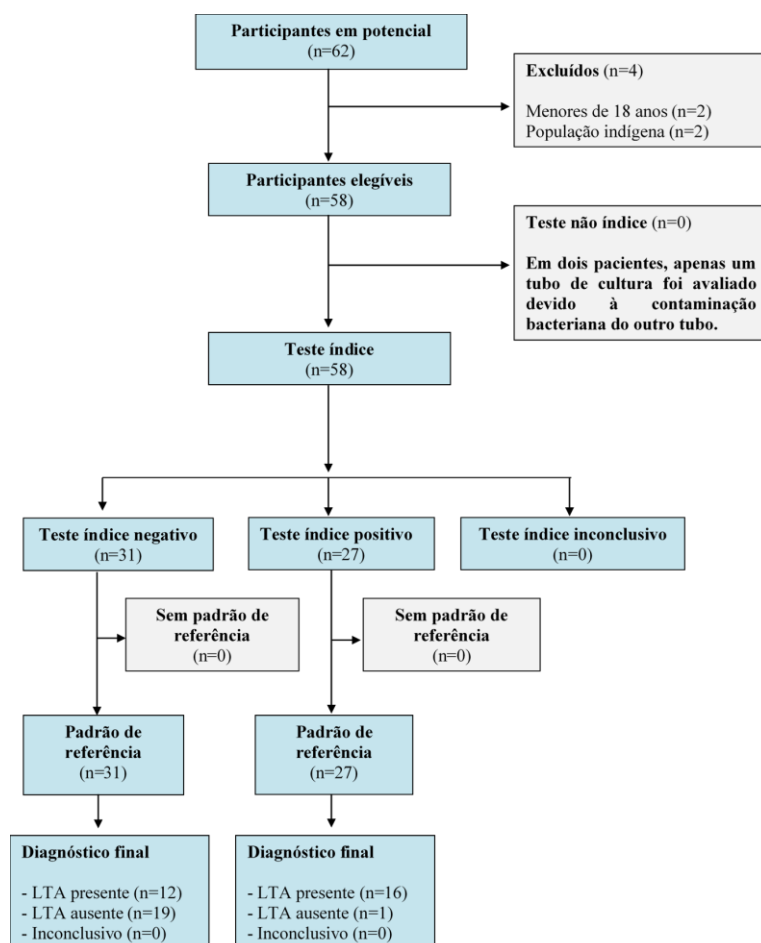
Os valores de sensibilidade foram definidos com base na porcentagem de resultados positivos em todos os pacientes do grupo LTA. A especificidade foi definida como a porcentagem de resultados negativos em todos os pacientes do grupo controle. A acurácia foi definida como a soma de resultados verdadeiro positivo e verdadeiro negativo em todos os pacientes avaliados. Para as variáveis categóricas, as comparações foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados qualitativos da qPCR foram comparados com os da avaliação de cultura microscópica e qPCR com amostras de biópsia usando o teste de McNemar. O

programa RStudio versão 1.1.456 (Equipe RStudio (2016). RStudio: Desenvolvimento Integrado para R. RStudio, Inc., Boston, MA) foi usado para as análises. A significância estatística foi definida como valor de p menor que 0.05 e intervalo de confiança (IC) estabelecido em 95%.

5.15 Análise de prontuários dos pacientes com suspeita de LTA

Para compor inicialmente o desenho do estudo, 62 pacientes com potencial para satisfação dos critérios de indicação foram recrutados (Figura 24). Destes, somente 58 pacientes eram elegíveis, sendo que 4 não participaram de acordo com os critérios de exclusão. A qPCR + cultura (teste índice) foi negativo para 31 participantes e positivo em 27. No estudo não houve teste índice inconclusivo.

Figura 24. Diagrama de estudo do fluxo de participantes.



Uma análise de prontuários de todos os pacientes incluídos foi realizada posteriormente à coleta do material biológico, com a finalidade de preencher uma ficha clínica, adaptada de uma ficha preexistente do HUB, para a coleta de dados epidemiológicos e resultados dos exames utilizados para a alocação dos grupos controle e LTA (Anexo 6).

6. RESULTADOS

6.1 Características clínicas e populacionais

Durante o período de recrutamento, 58 pacientes foram incluídos no estudo, dos quais, 23 (38,9%) eram do gênero feminino e 36 (61,0%) do gênero masculino. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: 38 alocados para o grupo LTA e 20 para o grupo controle (Tabela 9).

Tabela 9. Características clínicas e populacionais dos grupos controle e LTA.

	GRUPO LTA	GRUPO CONTROLE	P-VALOR
GÊNERO			0.130
MASCULINO, N° (%)	28 (73.7)	10 (50.0)	
FEMININO, N° (%)	10 (26.3)	10 (50.0)	
MÉDIA DE IDADE (QR)	52 (21.5)	56.5 (25.8)	0.409
HISTÓRIA PRÉVIA DE LTA, N° (%)	3 (8.0)	5 (25.0)	0.113
LESÃO ULCERADA, N° (%)	26 (68.4)	11 (57.9)	0.623
MÉDIA DO N° DE LESÕES (QR)	1.0 (0.0)	1.0 (1.0)	0.229
MÉDIA DO DIÂMETRO DAS LESÕES (CM) (QR)	3.0 (3.6)	3.0 (2.5)	0.728
MÉDIA DO TEMPO DE DOENÇA (MESES) (QR)	3.0 (16.0)	7.0 (23.0)	0.712

Legenda: LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana; QR: intervalo quartil.

Ambos os grupos foram equilibrados em relação às características demográficas. No grupo LTA, 10 (26.3%) pacientes eram do gênero feminino e 28 (73.7%) do gênero masculino. No grupo controle, 10 (50%) eram do gênero feminino e 10 (50%) do gênero

masculino ($p = 0.130$). Três pacientes no grupo LTA e 5 no grupo controle tiveram histórico prévio de LTA tratada há mais de um ano antes do recrutamento, embora não tenham sido detectadas diferenças significativas ($p = 0.113$). A média do tempo de doença foi de 3 meses no grupo LTA e 7 meses no grupo controle ($p = 0.712$). As médias de idade, número e diâmetro das lesões foram similares entre o grupo controle e o grupo LTA.

6.1.1 Grupo controle

Os diagnósticos finais dos 20 pacientes alocados no grupo controle consistiram em doenças que simulam a LTA, como piodermites (7), eczema (5), úlcera de estase (3), líquen simples crônico (2), sarcoidose (1), carcinoma de células fusiformes (1) e pioderma gangrenoso (1). Nenhuma reação adversa significativa foi relatada durante o processo de amostragem.

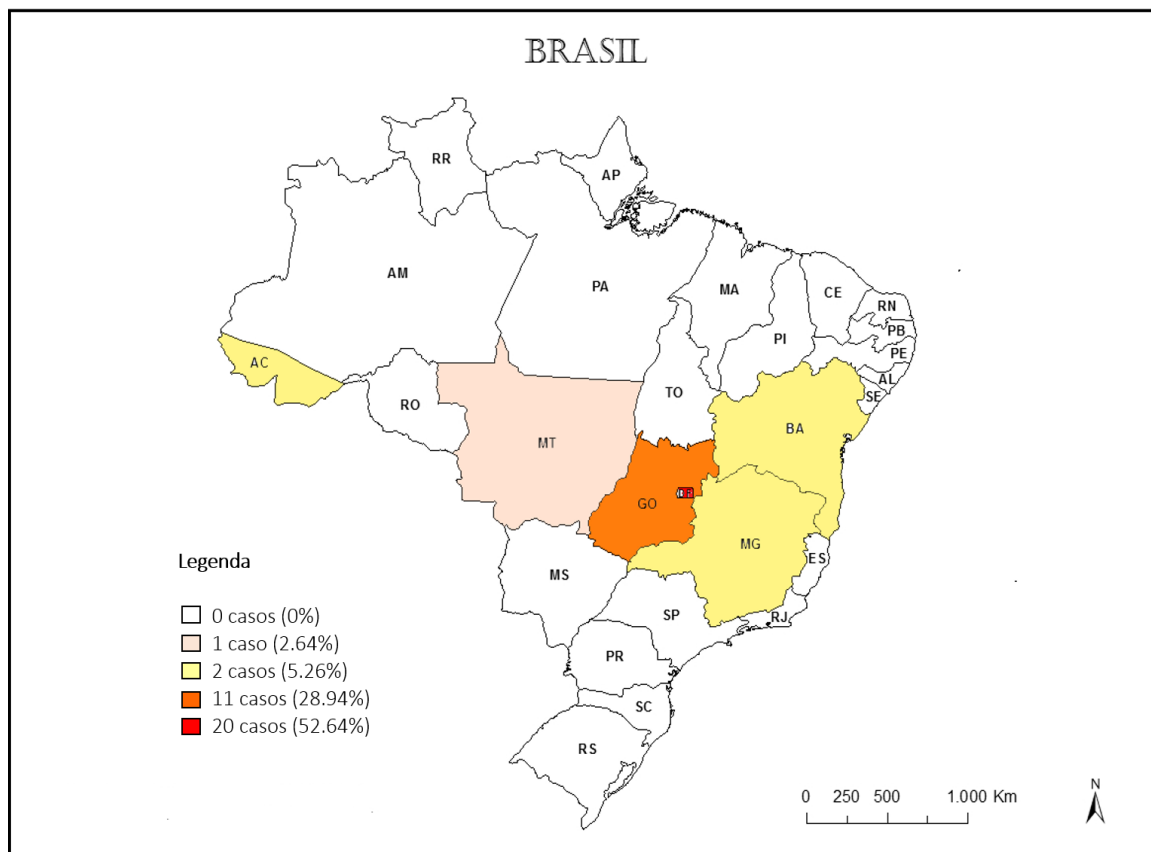
6.1.2 Grupo LTA

Foram relatados 20 casos (52.64%) no DF, abrangendo Brasília e os seguintes locais: Asa Norte, Ceilândia, Itapoã, Paranoá, Park Way, Planaltina, Riacho Fundo, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Sobradinho, Taguatinga e Vila Planalto.

Trinta casos foram citados como prováveis áreas de contágio nos seguintes estados brasileiros (Figura 25):

- Acre/AC (2 casos - 5.26%);
- Bahia/BA (2 casos - 5.26%);
- Distrito Federal/DF (20 casos - 52.64%);
- Goiás/GO (11 casos - 28.94%);
- Minas Gerais/MG (2 casos - 5.26%);
- Mato Grosso/MT (1 caso - 2.64%).

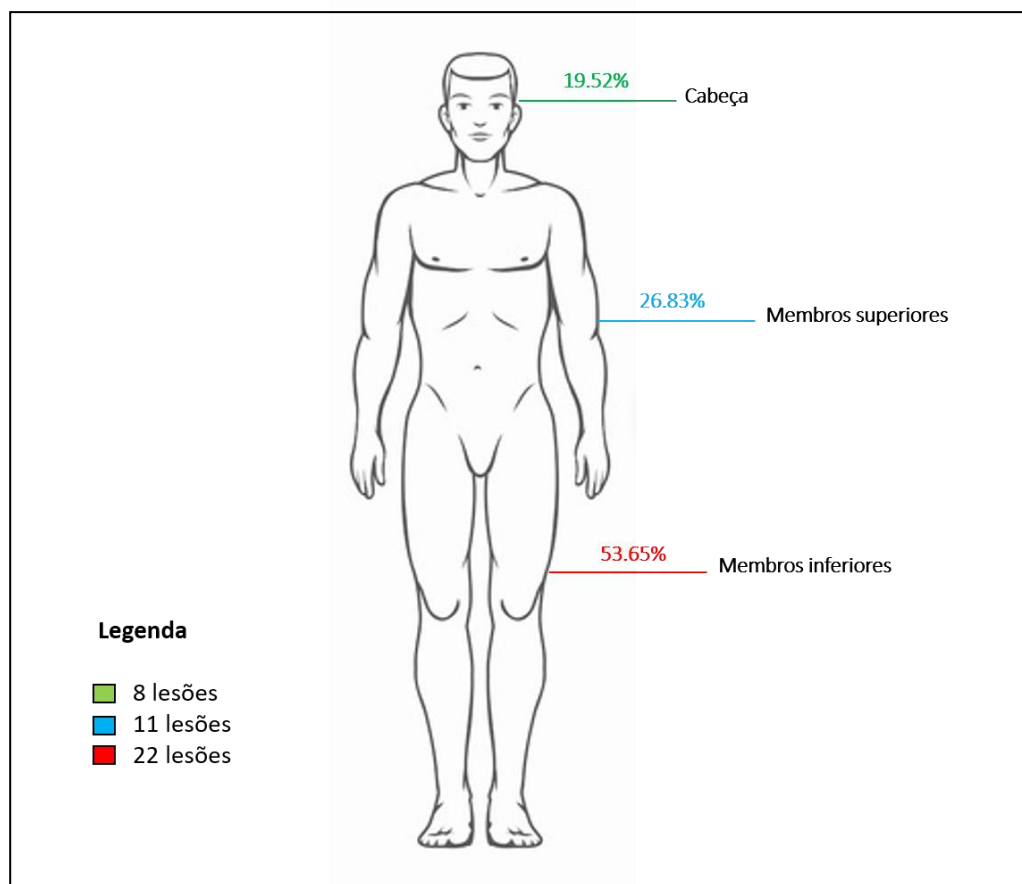
Figura 25. Distribuição geográfica dos prováveis contágios de LTA no estudo.



Fonte: Adaptado do IBGE.

O local mais comum para o desenvolvimento das lesões foram os membros inferiores (53.65%), seguido dos membros superiores (26.83%) e da cabeça (19.52%) (Figura 26).

Figura 26. Locais de desenvolvimento das lesões de LTA.



6.2 Exames classificatórios

A avaliação dos exames classificatórios no grupo LTA demonstrou que o exame histopatológico com laudo compatível com LTA apresentou sensibilidade de 86.8% (33 de 38 pacientes com LTA) e especificidade de 65.0% (13 de 20 controles) em relação aos demais exames. Seguida da avaliação microscópica da cultura com sensibilidade de 44.7% (17 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 28.6 - 61.7) e especificidade de 100% (20 de 20 controles) (Tabela 10).

Tabela 10. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos exames classificatórios dentro dos grupos.

	Sensibilidade – Positivo Grupo LTA (IC 95%)	Especificidade – Negativo Grupo Controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Avaliação microscópica da cultura	44.7% - 17/38 (28.6 – 61.7)	100.0% - 20/20 (83.2 - 100)	63.8% (50.1 – 76.0)
Exame direto	18.7% - 6/38	100.0% - 20/20	50.0%
Histopatológico compatível	86.8% - 33/38	65.0% - 13/20	79.3%
Histopatológico amastigote	15.7% - 6/38	90.0% - 18/20	41.3%

6.3 PCR convencional

Todos os 58 pacientes foram avaliados quanto ao exame da PCR convencional, realizados em amostras de cultura e biópsia dos pacientes com a utilização dos *primers*: ITS1 (ribossomal) e kDNA (minicírculo). Ao comparar a PCR nas amostras de cultura, foi observado 36.8% de sensibilidade com ITS 1 (14 de 38 pacientes com LTA) para um ganho de 50.0% (19 de 38 pacientes com LTA) com kDNA. Em relação às amostras de biópsia também houve uma maior sensibilidade de 21.0% (8 de 38 pacientes com LTA) para 23.6% (9 de 38 pacientes com LTA) com a utilização do kDNA. A especificidade no grupo controle variou de 95 a 100% em todos os exames (Tabela 11).

Tabela 11. Sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de PCR convencional dentro dos grupos.

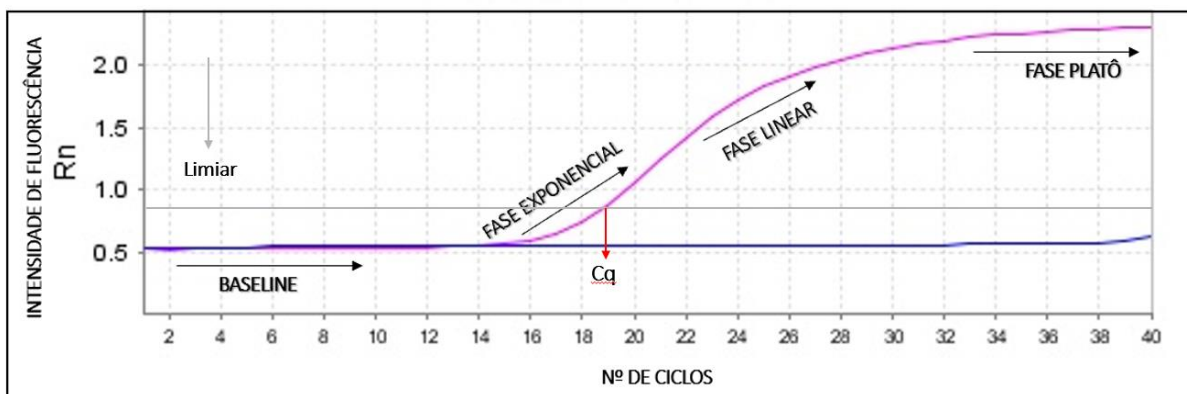
	Sensibilidade – Positivo Grupo LTA (IC 95%)	Especificidade – Negativo Grupo Controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
PCR Cultura – ITS1	36.8% - 14/38	100.0% - 20/20	58.62%
PCR Cultura – kDNA	50.0% - 19/38	95.0% - 19/20	65.5%
PCR Biópsia – ITS1	21.0% - 8/38	100.0% - 20/20	48.2%
PCR Biópsia – kDNA	23.6% - 9/38	100.0% - 20/20	50.0%

6.4 Exame testado

6.4.1 qPCR + cultura do aspirado da lesão (teste índice)

Foram considerados positivos na qPCR + cultura todos os pacientes que apresentaram Cq menor que 32. Dessa forma, antes do processamento das amostras e com base na curva de diluição seriada, um resultado positivo (limite de detecção) foi definido em amostras que apresentavam um valor de Cq menor ou igual a 32 ciclos (Figura 27) (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

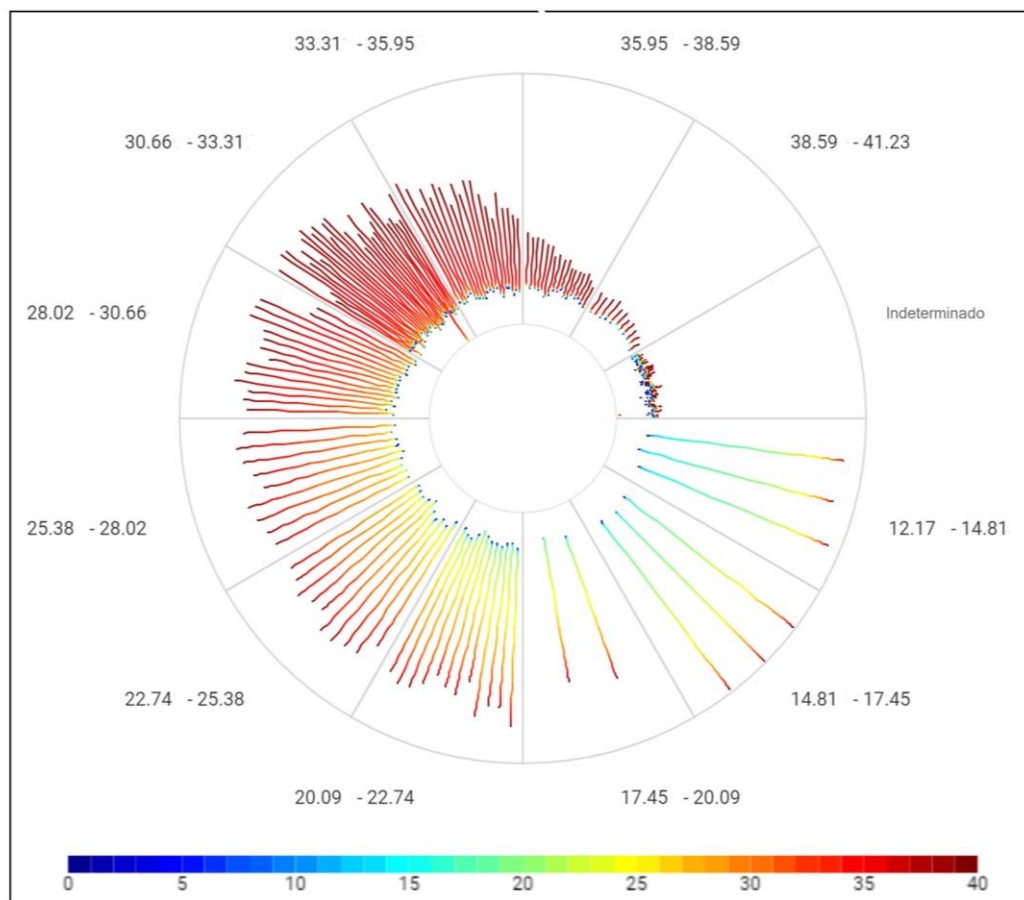
Figura 27. Curva das fases da qPCR com controle de *L. braziliensis* (rosa) e água ultrapura (azul).



Legenda: **Baseline:** não houve produtos suficientes para detectar a fluorescência. **Fase exponencial:** quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo. **Fase linear:** quantidade de produtos começa a diminuir. **Fase platô:** não há mais aumento no número de produtos. **Cq:** instante em que a reação atinge o limiar da fase exponencial.

Gráfico *outlier* com representação esquemática do limite de detecção dos valores de Cq em amostras de cultura. A escala do valor de Cq varia de 0 a 40. As amostras indeterminadas não foram possíveis de serem analisadas (valor discrepante). Observa-se que o menor valor positivo de Cq foi de 12.17, enquanto o maior valor negativo foi de 41.23 (Figura 28).

Figura 28. Gráfico de limite de detecção dos valores de Cq em amostras de cultura.



Fonte: Thermo Fisher Cloud, Applied Biosystems™ PCR em tempo real.

A análise da qPCR das amostras de cultura melhorou significativamente a acurácia quando comparada com a análise microscópica ($p = 0.006$). Ao comparar a análise microscópica da cultura e a análise da qPCR + cultura, foi observado um ganho de sensibilidade de 44.7% (17 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 28.6 - 61.7) para 68.4% (26 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 51.3 - 82.5), com pequena redução de especificidade de 100.0% (20 de 20 controles; IC 95% = 83.2 - 100.0) para 95% (19 de 20 controles; IC 95% = 75.1 - 99.9), respectivamente (Tabela 12). Somente um falso positivo foi observado na análise da qPCR + cultura. A acurácia do método da qPCR + cultura foi relativamente melhor que a acurácia da qPCR das amostras de biópsias utilizadas no padrão de referência composto, embora não tenha sido detectada diferença significativa ($p = 0.327$), conforme a tabela a seguir.

Tabela 12. Acurácia diagnóstica da avaliação microscópica da cultura e qPCR.

	Sensibilidade – Positivo Grupo LTA (IC 95%)	Especificidade – Negativo Grupo Controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Avaliação microscópica da cultura	44.7% - 17/38 (28.6 – 61.7)	100.0% - 20/20 (83.2 - 100)	63.8% (50.1 – 76.0)
qPCR + biópsia	55.26% - 21/38 (38.3 – 71.4)	100.0% - 20/20 (83.2 – 100)	70.7% (57.3 – 81.9)
qPCR + cultura (teste índice)	68.4% - 26/38 (51.3 – 82.5)	95% - 19/20 (75.1 – 99.9)	77.6% (64.7 – 87.5)

Legenda: Teste McNemar: Biópsia x qPCR + cultura = 0.327. Avaliação microscópica da cultura x qPCR + cultura = 0.006.

6.4.2 Quantificação de parasitos por tubo de cultura

Os ensaios de quantificação mostraram que a cultura em meio NNN modificado detectou de 15 a 37.8×10^6 parasitos por tubo de cultura. A análise microscópica também detectou essa mesma faixa de concentração de parasitos. No entanto, a proporção de resultados positivos na avaliação microscópica em tubos de cultura com menos de 1.000 parasitos foi consideravelmente menor e só alcançou 31.3% (5/16) de positividade. A positividade da análise microscópica em tubos de cultura com 1.000 ou mais parasitos foi de 100.0% (11/11).

6.4.3 Comparação dos resultados (testes classificatórios x teste índice)

A maior sensibilidade encontrada foi no histopatológico compatível com LTA 86.8% (33 de 30 pacientes com LTA), seguida do teste índice qPCR + cultura 68.4% (26 de 38 pacientes com LTA; IC 95% = 51.3 - 82.5). A especificidade da maioria dos exames variou de 90 a 100%, entretanto, o histopatológico compatível apresentou 65.0% (13 de 20 controles) em comparação aos demais testes (Tabela 13).

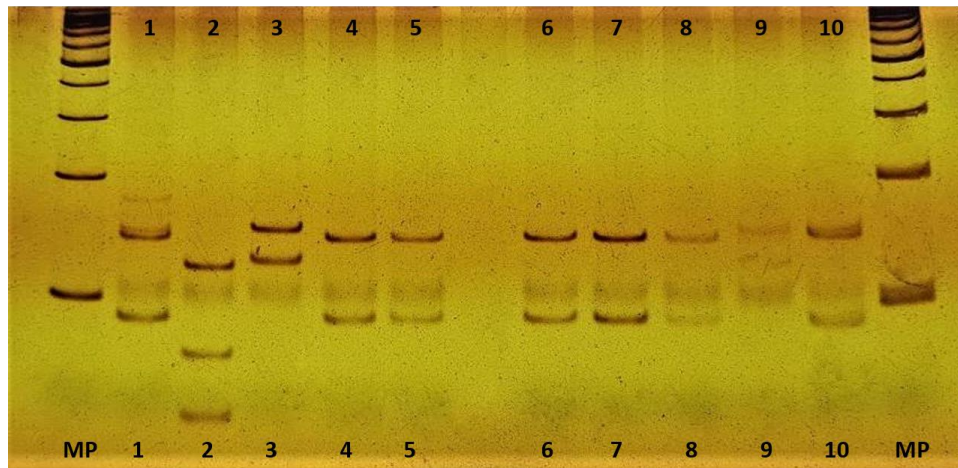
Tabela 13. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes classificatórios e teste índice.

	Sensibilidade – Positivo Grupo LTA (IC 95%)	Especificidade – Negativo Grupo Controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Exame direto	18.7% - 6/38	100.0% - 20/20	50.0%
Histopatológico compatível	86.8% - 33/38	65.0% - 13/20	79.3%
Histopatológico amastigote	15.7% - 6/38	90.0% - 18/20	41.3%
PCR Cultura – kDNA	50.0% - 19/38	95.0% - 19/20	65.5%
PCR Biópsia – ITS1	21.0% - 8/38	100.0% - 20/20	48.2%
PCR Biópsia – kDNA	23.6% - 9/38	100.0% - 20/20	50.0%
Avaliação microscópica da cultura	44.7% - 17/38 (28.6 – 61.7)	100.0% - 20/20 (83.2 - 100)	63.8% (50.1 – 76.0)
qPCR + biópsia	55.2% - 21/38 (38.3 – 71.4)	100.0% - 20/20 (83.2 – 100)	70.7% (57.3 – 81.9)
qPCR + cultura (teste índice)	68.4% - 26/38 (51.3 – 82.5)	95% - 19/20 (75.1 – 99.9)	77.6% (64.7 – 87.5)

6.5 PCR-RFLP

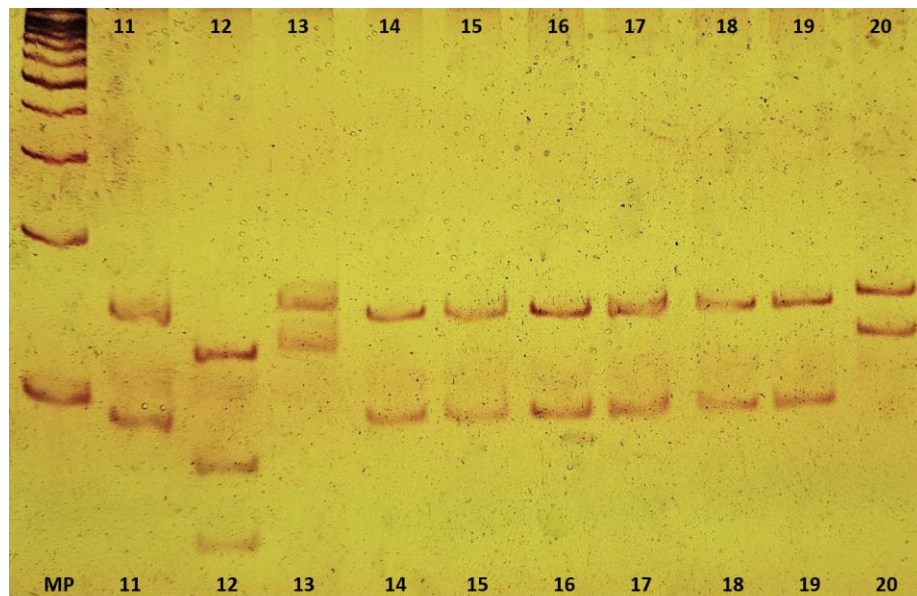
A digestão com a enzima *HaeIII* apresentou padrões de bandas compatíveis com os controles positivos de *Leishmania Viannia* nas 12 amostras positivas. Apenas um dos 12 pacientes citados apresentou resultado negativo para o método qPCR específico de *L. braziliensis*. Para apenas o paciente 51 (9), os métodos descritos não foram capazes de identificar as espécies envolvidas por nenhuma metodologia (Figura 24). O subgênero *amazonensis* foi encontrado apenas no paciente 28 (20) (Figura 29).

Figura 29. Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela enzima *HaeIII* em amostras de cultura.



Legenda: MP: Marcador 100 pb; Cultura de *L. braziliensis* (1); Cultura de *L. infantum*; (2); Cultura de *L. amazonensis* (3); Paciente 29 (4); Paciente 30; (5) Paciente 34 (6); Paciente 46 (7); Paciente 48 (8); Paciente 51 (9); Paciente 52 (10).

Figura 30. Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela enzima *HaeIII* em amostras de cultura.



Legenda: MP: Marcador 100 pb; Cultura de *L. braziliensis* (11); Cultura de *L. infantum*; (12); Cultura de *L. amazonensis* (13); Paciente 1 (14); Paciente 2; (15) Paciente 3 (16); Paciente 12 (17); Paciente 22 (18); Paciente 26 (19); Paciente 28 (20).

7. DISCUSSÃO

A LTA constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos nas Américas, Europa, África e Ásia, com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. No Brasil, essa doença encontra-se amplamente difundida ocorrendo em todos os estados. A partir da década de 1980, verifica-se um aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). No período de 1995 a 2014, observa-se uma média anual de 25.763 casos novos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes, um número mais elevado de casos no ano de 1995, quando atingiu 22,94 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em 2005, foi realizado um estudo clínico e epidemiológico com 402 pacientes com LTA atendidos no Hospital Universitário de Brasília – DF. De acordo com o estudo, houve um aumento significativo no número de casos de LTA provenientes no Distrito Federal (12,9%) (NAME et al., 2005), considerando-se que até há poucos anos não se registravam casos de LTA nessa unidade da Federação (NOGUEIRA; SAMPAIO, 2001).

Em relação aos pacientes envolvidos neste projeto (2018 – 2019), houve um aumento expressivo do número de casos (52.64%). Este aumento pode estar relacionado ao fato de que o HUB é considerado um centro de referência, que atende casos de maior complexidade no DF. O aumento da ocorrência da LTA aumenta a cada ano, tendo em vista a diversidade de agentes, de reservatórios, de vetores, a situação epidemiológica, aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos, evidencia a complexidade do controle desta endemia.

O cenário atual do tratamento das leishmanioses no Brasil apresenta características peculiares pela variedade dos contextos onde acontece a transmissão para o ser humano. Esta diversidade estaria relacionada com as espécies do parasito, dos vetores, dos reservatórios e dos ecossistemas. A apresentação clínica exhibe polimorfismo e o espectro de gravidade dos sinais e sintomas também é variável, embora exista certa correspondência entre as distintas apresentações clínicas e as diferentes espécies do parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A baixa sensibilidade dos exames parasitológicos no diagnóstico da LTA é uma grande preocupação no manejo clínico da doença (LIMA et al., 2010; GOMES et al., 2014; SOUSA et al., 2014). Por outro lado, são técnicas altamente específicas, pois identificam diretamente o parasito, agilizando assim o tratamento (LIMA et al., 2010). Portanto, técnicas que visam melhorar a sensibilidade e reduzir o impacto de fatores dependentes do examinador nos exames parasitológicos são importantes objetivos para o diagnóstico, tratamento e controle da LTA.

Atualmente, existe uma falta de consenso sobre a melhor forma de realizar e interpretar os experimentos de qPCR. O problema é devido à falta de detalhes experimentais suficientes em muitas publicações, o que impede a capacidade de um leitor avaliar criticamente a qualidade dos resultados apresentados ou repetir os experimentos. Neste sentido, todos os experimentos deste projeto que incluíram a qPCR obedeceram ao *Guideline* MIQE, que contém informações mínimas para publicação das diretrizes que visam a confiabilidade dos resultados para ajudar a garantir a integridade da literatura científica, promover consistência entre os laboratórios e aumentar a transparência experimental. Este material fornecer todas as condições experimentais relevantes e características que o ensaio deve conter. A divulgação de todos os reagentes, sequências e métodos de análise é necessária para permitir que outros pesquisadores reproduzam os resultados. O objetivo de seguir essas diretrizes é uma melhor prática experimental, permitindo uma interpretação mais confiável e inequívoca dos resultados da qPCR (BUSTIN et al., 2009).

No presente estudo, foi testada uma técnica de biologia molecular após a cultura no meio sólido NNN modificado, considerando que algumas culturas seriam negativas simplesmente por causa da limitação da visualização do parasito. De fato, a análise da qPCR + cultura demonstrou uma maior sensibilidade em relação a avaliação microscópica da cultura ($p = 0.006$) (Tabela 12). O experimento obteve um resultado de 9 pacientes positivos no teste índice quando comparado com a avaliação microscópica da cultura. Isso é, provavelmente, explicado pelo fato de que amostras extraídas de lesões de LTA ativas possivelmente apresentarão uma quantidade maior de *Leishmanias*, até mesmo na fase de amastigotas mesmo na ausência de diferenciação para promastigotas na cultura (SILVA et al., 2011). Também deve-se considerar que

pode haver uma quantidade limitada de crescimento de cultura de *Leishmanias* que não poderá ser detectado por avaliação microscópica, porém, pode ser detectado pela qPCR, especialmente as técnicas altamente sensíveis que visam o kDNA.

Os presentes dados suportam as hipóteses acima mencionadas, uma vez que a mesma faixa de detecção foi descrita para avaliação microscópica e qPCR + cultura, enquanto a sensibilidade da avaliação microscópica foi significativamente menor que a da qPCR + cultura quando menos de 1.000 parasitos por tubo de cultura foram quantificados. A quantidade mínima de parasitos por tubo de cultura que pode ser detectada pelo olho humano foi de 15 no método descrito. Este resultado reforça o fato dos métodos de cultura serem considerados de baixa sensibilidade para o diagnóstico de LTA, especialmente quando comparados com a PCR direcionada com kDNA que pode idealmente detectar menos de um parasito por amostra testada (GOMES et al., 2014). Além disso, a acurácia da qPCR + cultura foi ligeiramente melhor que a acurácia da qPCR realizada nas amostras de biópsia utilizadas no padrão de referência composto (Tabela 12). Isso reforça a importância dessa associação, uma vez que a maioria dos estudos considera amostras de tecido fresco como a melhor fonte de material para investigações de PCR.

Os resultados exatos da quantificação devem ser interpretados com cautela, uma vez que uma quantidade significativa de DNA pode ser perdida durante a extração e purificação do DNA baseado em coluna de sílica. No entanto, a direção da associação da qPCR + cultura é clara, tendo em vista que um grande número de parasitos (> 1.000) deve estar presente para garantir uma detecção microscópica sensível. Outra limitação que foi observada, consiste na especificidade da reação de qPCR para *L. braziliensis*, uma vez que *Leishmania amazonensis* também está presente em 3% dos casos de LTA no Centro-Oeste (SEVILHA-SANTOS et al., 2018). De fato, o paciente no qual o subgênero *Leishmania* foi identificado por PCR-RFLP não foi detectado pela qPCR.

Constatou-se também que, embora houvesse um aumento da sensibilidade observada no método da qPCR + cultura, houve também uma pequena diminuição na especificidade (Tabela 12). A presença de um resultado falso positivo para o método da qPCR + cultura levanta a preocupação devido o aumento da sensibilidade do método

realizado com sonda de hidrólise TaqMan. Esta parece ser a principal limitação para a replicação futura da combinação de métodos da qPCR em cultura. No entanto, os valores de especificidade são consistentes e não indicam uma ocorrência sistemática de contaminação da amostra, em razão de que este paciente não tinha história prévia de LTA.

O ensaios com a utilização da metodologia SYBR Green foram testados, entretanto, houve um aumento na quantidade de amplificações não específicas. Neste sentido, a escolha da metodologia TaqMan mais adequada para o estudo, uma vez que não é comum amplificações não específicas com a utilização das sondas TaqMan pela devido à sua especificidade (TAJADINI et al., 2014). No entanto, este efeito deve ser sempre considerado tendo em vista que a especificidade da sonda pode variar entre as regiões geográficas.

Um ponto de corte de 32 Cq (limite máximo de detecção) foi definido antes de qualquer processamento de amostra com base no último Cq que representasse a amplificação de um parasito inteiro e com base no último ponto de diluição (Cq = 32.24) da curva de amplificação com controle de *L. braziliensis*. A reação mostrou um limiar de quantificação igual a 5×10^{-3} ng de *Leishmania* DNA por reação, equivalentes a 6,01 parasitos (Figura 23). Isso demonstrou ser eficaz em suprimir os efeitos de possíveis amplificações inespecíficas e em evitar o possível efeito de contaminação consistente com o DNA de *Leishmania* resultante do processamento simultâneo de ensaios parasitológicos e de biologia molecular. Uma possível amplificação de produtos de PCR de transmissão resultantes de amplificações subsequentes foi suprimida por incubação em N-glicosilase de uracilo presente na solução de qPCR.

Por fim, é importante levar em consideração o custo x benefício das técnicas estudadas. O meio de cultura tradicional NNN modificado necessita de cultivo de cepas e armazenamento em nitrogênio líquido. Neste projeto, foi possível identificar pacientes com resultados positivos em meio de cultura NNN modificado, porém, com uma limitação menor de sensibilidade em relação a qPCR + cultura. A junção desta técnica possui maior sensibilidade com o uso de sondas, entretanto, tem considerável custo elevado. A questão principal está em identificar métodos mais eficazes para o diagnóstico do paciente com suspeita de LTA, seja com a utilização de técnicas

tradicionais ou por meio de técnicas moleculares com custo relativamente mais alto. Dessa forma, estudos futuros são necessários afim de agilizar o tratamento de pacientes com LTA, tendo em vista que o tempo entre o início das lesões e o início de terapêutica parece interferir no prognóstico da doença (NAME et al., 2005).

8. CONCLUSÃO

A técnica de biologia molecular foi testada após o cultivo no tradicional meio sólido NNN modificado, considerando que algumas culturas seriam negativas simplesmente pela não identificação visual do parasito. De fato, a análise da qPCR + cultura demonstrou uma sensibilidade maior do que a avaliação visual da cultura. Esta diferença foi relativamente considerável, uma vez que 9 pacientes apresentaram positividade pela qPCR e negatividade à avaliação visual da cultura. Ambos os métodos de avaliação da cultura mostraram especificidade completa (100.0%), mostrando que a qPCR com uso de sondas específicas não detectou testes falso positivos. Esta é uma característica importante para o diagnóstico da LTA, já que o tratamento errôneo pode trazer complicações graves aos pacientes.

Pode-se concluir que a junção da qPCR à cultura é uma boa estratégia para melhorar a sensibilidade dos métodos parasitológicos de detecção, apesar de ser uma técnica de alto custo. Esta significativa melhora está relacionada à eliminação de fatores dependentes do examinador durante a interpretação da avaliação microscópica dos resultados da cultura. Acredita-se que esta associação tenha um papel promissor no diagnóstico correto da LTA e que estudos futuros devam ser realizados, inclusive com outros meios de cultura, para validação deste método em diferentes populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 2012; 7:e35671.

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

Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79:847–52.

Boggild, AK, Ramos, AP, Espinosa, D, et al. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 83, n. 2, p. 345-50, 2010.

Boggild, AK, Valencia, BM, Espinosa, D, et al. 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.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015; 351:h5527.

Bujang MA, Adnan TH. Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *J Clin Diagn Res* 2016; 10:YE01–6.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55:611–22.

Cavalier-Smith, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *Eur. J. Protistol.* 56: 147–170, 2016.

Daneshbod, Y, Oryan, A, Davarmanesh, et al. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med*, v. 135, n. 4, p. 478-82, 2011.

Dias, JCP, Coura, JR, org. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.

Erber AC, Arana B, Bennis I, et al. An international qualitative study exploring patients' experiences of cutaneous leishmaniasis: study set-up and protocol. *BMJ Open* 2018; 8:e021372.

Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz 2003; 23-51.

Gomes CM. 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. Brasília. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] – Universidade de Brasília; 2014.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, et al. Field validation of SYBR® Green- and TaqMan®-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in a *Leishmania* (V.) *braziliensis*-endemic area. J Clin Microbiol 2016; 55:JCM.01954–16–534.

Gomes CM, de Paula NA, Cesetti MV, et al. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 79:413–8.

Gomes CM, Paula NA de, Morais OO de, et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. An Bras Dermatol 2014; 89:701–9.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36:71-80.

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

Jara M, Aduai V, Valencia BM, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J Clin Microbiol 2013; 51:1826–33.

Lima MIS, Arruda VO, Alves EVC, et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. Arch Toxicol 2010; 84:227–32.

Martinez JE, Alba, Arias L, et al. Haemoculture of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86:392–4.

Medeiros-Silva V, Gurgel-Gonçalves R, Nitz N, et al. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. BMC Vet Res 2015; 11:258.

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [recurso eletrônico]. 2 ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Momeni BA, Aminjavaheri M, Moshtaghian B, et al. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2013; 52:827-30.

Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, et al. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with american cutaneous leishmaniasis attended at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. *An Bras Dermatol* 2005; 80:249–54.

Nogueira LSC, Sampaio RNR. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An Bras Dermatol*. 2001;76:51-62.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS): Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2012; 5:15.

Pomares, C, Despierres, L, del Giudice, P, et al. 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.

Reis, LC, Brito, ME, Almeida, EL, et al. 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, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581–96.

Revez L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS ONE* 2013; 8:e61843.

Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Francino O, et al. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a ‘Gold Standard’. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82:251–6.

Romero GAS, Sampaio RNR, Macêdo VO, et al. 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* 1999; 94:505–508.

Rossi G, Albertin G, Belloni A, et al. Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 94:1226–34.

Sanches LDC, Martini CC de, Nakamura AA, et al. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25:465–9.

Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2013; 55:393–9.

Sevilha-Santos L, Santos ACM, Medeiros-Silva V, et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2018.

Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young SCI* 2011;2:21-25.

Silva AM, Cordeiro-da-Silva A, Coombs GH. Metabolic variation during development in culture of *Leishmania donovani* promastigotes. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1451.

Silva JG, Silva TM, Peloso EF, et al. 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* 2012; 45(2): 257-259.

Silva VM. Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae) como potencial vetor de leishmaniose visceral canina no distrito federal, brasil. Brasília. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Universidade de Brasília; 2012.

Soares KA. Validação do teste de elisa com exo-antígenos e da Imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose Tegumentar americana. [Tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB); 2011.

Sousa AQ, Pompeu MML, Frutuoso MS, et al. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91:905–7.

Szargiki R, Castro EA, Luz E, et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009; 13:47-52.

Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 2014; 3:85.

Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3892–904.

World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013; 310:2191–4.

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

ANEXO 1

The screenshot shows the PubMed interface. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI Resources' and 'How To' links. Below this is the PubMed logo and a search bar containing 'PubMed'. The main content area displays the abstract for a paper titled 'Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction combined to a Novy-MacNeal-Nicolle medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis.' The authors listed are Osiro Bergmann J¹, de Castro Moreira Dos Santos Júnior A², Sevilha-Santos L¹, Medeiros-Silva V³, Bresolin Pompeu C⁴, Youssif Mota Arabi A⁵, da Silva Marques D⁵, Caroline Vêras de Carvalho B¹, Nitz Silva Lociks de Araújo N⁶, Gomes CM^{1,4,7,8}, Dolabela de Lima B⁹, and Nonata Ribeiro Sampaio R⁸. The abstract text begins with 'Dear editor, tests used for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis (TL) have variable accuracy and in classic parasitological methods, sensitivity tends to vary according to examiner-dependent factors¹. In vitro culture is a highly specific method but its sensitivity is limited^{1,2}. Real-time PCR (qPCR) is considered a very efficient technique and it adds quantitative results to clinical analyses³⁻⁵. We aimed to test the accuracy of the combination of a Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium culture and TaqMan-based qPCR analysis for the diagnosis of TL. This article is protected by copyright. All rights reserved.' The PMID is 30659669 and the DOI is 10.1111/jdv.15440.

Publication in JEADV-2018-2158.R1

Dear Dr. Ciro Gomes,

Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction combined to a Novy-MacNeal-Nicolle medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. (ms no. JEADV-2018-2158.R1)
I am pleased to confirm that your paper has been accepted for publication in Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology.

Your paper will be passed to the production department and proofs will follow in due course. Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

Please inform the editorial office of any change in your email address or address. Proofs will be posted if no e-mail address is available, but this will inevitably lead to a delay in publication.

As part of the Journal's continued commitment to its authors, the Editorial Office and Publisher wish to keep you informed about what will happen next and, as the attached paper contains important information regarding journal publication and services for authors, you may wish to save it for future reference.

Thank you for supporting the journal!

Yours sincerely,

Prof. Johannes RING
Editor-in-Chief

ANEXO 2

Decision on Your Manuscript JEADV-2018-2158

Dear Dr. Ciro Gomes,

Thank you for submitting your manuscript Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction coupled to a Novy-MacNeal-Nicolle medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. to the Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. We are pleased that you considered our Journal for the publication of your work.

Your manuscript has been through the review process. I feel that the paper contains information of interest to our readers. Therefore, I would be grateful if you could rearrange the information contained in your paper as a “Letter to the Editor” (Letters to the Editor should be formatted in one continuous section and should not exceed 600 words, 2 double-spaced pages, 10 references and 2 photos or diagrams).

However, please note that we cannot at this stage guarantee publication.

Please upload your revised paper onto the system within a period of 4 weeks; Please quote this paper's reference number JEADV-2018-2158 in all future correspondence.

Yours sincerely,

Prof. Johannes RING
Editor in Chief

Dear Editor and Reviewers,

I would like to thank you for this detailed and fast review of our manuscript. We are glad to see that no methodological issue was detected and that most of the suggestions are related to a better detailment of the discussion section. Please, find bellow the answers for the referred questions.

We agree that the main objective of our study, related to the accuracy performance of culture + qPCR analysis can be well fitted into the “Letter to the Editor section”. We chose to maintain the most important information about accuracy. We also maintain the most important material added to the article including our flow diagram and a diagram constructed using our accuracy table.

REVIEWER: 1

Comments to the Author

The manuscript titled: ‘Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction coupled to a Novy-MacNeal-Nicolle medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis.’ describes a novel approach for detection of ATL using a combination of culture method with Taqman PCR which has better sensitivity and accuracy compared to culture method alone.

The manuscript is supported by a sound hypothesis and well planned experiments. The manuscript is well written, but would require minor modifications.

1. The authors have described data showing the comparison between culture method and Culture based Taqman PCR. However, the manuscript would greatly benefit if the authors would also discuss their data (in the discussion section) with biopsy based PCR and compare it with the other two techniques.

Dear reviewer it is true that biopsy based PCR is one of the best comparisons for our proposed method, however, as American tegumentary leishmaniasis has no gold standard diagnosis we opted to use the sensitive and specific biopsy based qPCR and PCR (cited in the article now) for case definition. The accuracy recommendations QUADAS-2 tools advise that the comparison of an index test with reference standards tests is not valid. We agree that future studies must explore this comparison using other sensitive exams for case definition.

2. Can the authors also discuss if similar combination of culture method with Taqman PCR based diagnostic, can be applied to other strains of Leishmania (old world species)?

This is certainly true once *Leishmania braziliensis* is one of the most difficult-to-cultivate species of leishmania. A brief statement about this and reference was added at the end of the new manuscript format required by the editor.

3. Authors should not use the term quantification assays (line 25, page 12). Instead, the name of the quantification technique used for the assay should be mentioned.

The term quantification assay was replaced by the term quantitative qPCR.

REVIEWER: 2

Comments to the Author

Leishmania detection allows disease treatment, patient follow-up, epidemiology and control of the disease. So far, diagnosis is done by classical parasitological methods, such as direct microscopic examination, a technique lacking sensitivity that does not allow parasite identification. Mass culture, which have a variety range of sensitivity, permits the molecular analysis. Polymerase Chain Reactions (PCR) allow its species identification with a high level of sensitivity and specificity. the application of molecular techniques (PCR) to negative culture media, could facilitate the detection of the parasite in false negatives cultures. This study is well conceived and well executed, however, some issues should be addressed to improve the quality of the manuscript and to make it easier to understand.

1. Page 3, lines 6-7: it also depends on the initial parasite load, the culture media used, the involved species of leishmania and even the involved strain of the parasite.

Our main objective in this article was to test the clinical accuracy of the methods. Some aspects of clinical validation go against some basic biological principle assays. This work will have a more robust clinical aspect accepting that in clinical practice assay variations will interfere with accuracy results. This is well explained in the QUADAS-2 tool for accuracy studies. We agree that the exact quantification here specified is risky by biological standards. We maintained these values, citing previous references described the method only to show that the association claimed by the article is true: low parasite loads in culture tubes will have a worse performance in visual microscopical evaluation of cultures.

2. Page 3, lines 43-47: this is not the real conclusion of your study.

3. Page 4, line 17: the same explanation as in lines 6-7 from page 3.

4. Page 4, lines 23-24: “allowing the detection of the pathogen. This method also permits....” In vitro culture of the parasite does not allow the species identification of the parasite.

This phrase was suppressed from the article after new format required by the editor.

5. Page 4, lines 46-48: delete the first “considered”, as you repeat it in the second sentence. “Real-time PCR (qPCR) is a very efficient technique for DNA detection...”

This repetition was corrected.

6. Page 5, lines 8-10: “...the accuracy of the combination of culture media and PCR analysis for the diagnosis...”.

This adequacy was added to the end of the first paragraph in the new article format.

7. Page 5, lines 12-14: the sentence is too ambitious. It is only calculated for this medium. Rewrite it the sentence.

We corrected this problem.

8. Material and methods: Why a group of true positives was not included in the experimental design? In this way, the values of sensitivity, specificity and accuracy could be raised.

Previously known true positive patients was not included in the study to warrant external validation. QUADAS-2 tool for diagnostic accuracy study instructs that the inclusion of true positive patients before study recruitment can artificially improve the method accuracy. We concluded that this population was not interesting for a clinical recommendations and future field application. However, this type of population will be certainly interesting for future quantitative, basic studies that aim to describe our clinical effect.

9. Page 8, line 55-Page 9, lines 1-8: Was the amount of biological material for the parasite culture the same in both tubes? Was the initial parasitic load the same? Was the parasitic load the same in both tubes for the DNA extraction? It is not an adequate way to calculate it, too risky.

Yes, the amount of biological material was the same in both tubes and this is now specified in the text. Questions regarded the parasite load in different phases of our methods are interesting, however we didn't performed quantitative qPCR in all those stages. As our main goal was to detect the clinical effect of accuracy, we accepted to maintain these possible variations because they will certainly occur in clinical practice. We agree that the exact quantification here specified is risky by biological standards. We maintained these values, citing previous references described the method only to show that the association claimed by the article is true: low parasite loads in culture tubes will have a worse performance in visual microscopical evaluation of cultures.

10. Page 12, line 7: "...since the directly detect the parasite..."

This part was suppressed according to the new article formatting required by the editor.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis

L. Sevilha-Santos¹, A. de Castro Moreira dos Santos Júnior², V. Medeiros-Silva³,
 J. Osiro Bergmann¹, E. Freitas da Silva⁴, L. Freire Segato⁵, A. Youssif Mota Arabi⁶,
 N. Aparecida de Paula⁷, R. Nonata Ribeiro Sampaio⁸, B. Dolabela de Lima⁹,
 C. Martins Gomes^{10,*}

¹ Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil² Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil³ Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil⁴ Departamento de Estatística, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF, Brazil⁵ Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário de Brasília – HUB, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF, Brazil⁶ Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil⁷ Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Dermatology Division, Department of Medical Clinics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil⁸ Laboratório de Dermatocologia, Pós-graduação em Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil⁹ Laboratório de Biologia do Gene, Pós Graduação em Biologia Microbiana, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF, Brazil¹⁰ Laboratório de Dermatocologia, Núcleo de Medicina Tropical, Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2018

Received in revised form

19 April 2018

Accepted 24 April 2018

Available online xxx

Editor: S.J. Cutler

Keywords:

Cutaneous

Diagnosis

Leishmaniasis

Polymerase chain reaction

ABSTRACT

Objectives: Superficial swab sampling of American tegumentary leishmaniasis (ATL) lesions shows higher amounts of *Leishmania* than those from biopsy. Subcutaneous involvement is also important in ATL, but parasite quantification according to lesion depth has not been evaluated. We aim to present the best depth at which sampling should be performed for molecular exams of ATL.

Methods: Patients with a clinical presentation compatible with ATL were allocated to ATL and control groups. Qualitative and quantitative qPCR assays were performed using SYBR Green and primers amplifying the kDNA minicircle of *Leishmania* spp. in different skin layers, including the epidermis, the superior dermis, the inferior dermis, and the hypodermis.

Results: Fifty-nine patients were included in this study, including 40 who had been diagnosed with ATL and 19 controls. The number of parasites was greater in samples of the epidermis and superior dermis (159.1×10^6 , range 4.0–781.7, and 75.4×10^6 , range 8.0–244.5, mean *Leishmania* parasite equivalents per μg of tissue DNA, respectively) than those in samples of the inferior dermis and hypodermis (54.6, range 8.0–256.6, and 16.8×10^6 , range 8.0–24.1, mean *Leishmania* parasite equivalents per μg of tissue DNA, respectively). The best diagnostic accuracy was achieved in the superior dermis (77.9%) and was significantly greater than that in the hypodermis (63.3%; p 0.039).

Conclusions: We conclude that superficial sampling can retrieve a greater quantity of parasites. Future studies of the role of transepidermal elimination as a mechanism of host defence in ATL must be performed as there is a considerable quantity of *Leishmania* kDNA in the epidermis. **L. Sevilha-Santos, Clin Microbiol Infect 2018;■:1**

© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO 4

Clinical Microbiology and Infection
Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

16-Nov-2018

CLM-18-14641

Spectrum of clinical manifestations and its correlation with immunological and molecular aspects in American Tegumentary Leishmaniasis.

de Carvalho, Bruna; Vital, Tamires; Gomes, Ciro; Bergmann, Jaqueline; Borges, Tatiana; Dallago, Bruno; Noronha, Elza; Hagström, Luciana; Hecht, Mariana; Nitz, Nadjar

This is an automatic confirmation of receipt of your submission.

Your paper will be initially screened by the Editor-in-Chief and will be assigned to an Associate Editor if considered to be within the scope of the journal and of sufficient priority for review. You will receive a preliminary decision as soon as possible.

Information about the status of your submission within the editorial process is available to you at any time via your Author Centre on the CMI Submission website (<http://mc.manuscriptcentral.com/cmi>).

If you have questions concerning an editorial decision or the editorial process prior to acceptance, please contact the Editorial Manager (jlubom2@gmail.com).

Thank you for your interest in Clinical Microbiology and Infection.

Best regards

Dr. Leonard Leibovici
Editor-in-Chief
Clinical Microbiology and Infection

ANEXO 5

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	✓
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	✓
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	✓
	4	Study objectives and hypotheses	✓
METHODS			
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	✓
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	✓
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	✓
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	✓
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	✓
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication	✓
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	✓
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	✓
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	✓
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	✓
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	✓
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	✓
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	✓
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	18	Intended sample size and how it was determined	✓
RESULTS			
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	✓
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	✓
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition	✓
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	✓
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	✓

<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	✓
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	✓
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	✓
DISCUSSION			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	✓
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	✓
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	✓
	29	Where the full study protocol can be accessed	✓
	30	Sources of funding and other support; role of funders	✓

STARD 2015

AIM

STARD stands for “Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies”. This list of items was developed to contribute to the completeness and transparency of reporting of diagnostic accuracy studies. Authors can use the list to write informative study reports. Editors and peer-reviewers can use it to evaluate whether the information has been included in manuscripts submitted for publication.

EXPLANATION

A **diagnostic accuracy study** evaluates the ability of one or more medical tests to correctly classify study participants as having a **target condition**. This can be a disease, a disease stage, response or benefit from therapy, or an event or condition in the future. A medical test can be an imaging procedure, a laboratory test, elements from history and physical examination, a combination of these, or any other method for collecting information about the current health status of a patient.

The test whose accuracy is evaluated is called **index test**. A study can evaluate the accuracy of one or more index tests. Evaluating the ability of a medical test to correctly classify patients is typically done by comparing the distribution of the index test results with those of the **reference standard**. The reference standard is the best available method for establishing the presence or absence of the target condition. An accuracy study can rely on one or more reference standards.

If test results are categorized as either positive or negative, the cross tabulation of the index test results against those of the reference standard can be used to estimate the **sensitivity** of the index test (the proportion of participants *with* the target condition who have a positive index test), and its **specificity** (the proportion *without* the target condition who have a negative index test). From this cross tabulation (sometimes referred to as the contingency or “2x2” table), several other accuracy statistics can be estimated, such as the positive and negative

predictive values of the test. Confidence intervals around estimates of accuracy can then be calculated to quantify the statistical **precision** of the measurements.

If the index test results can take more than two values, categorization of test results as positive or negative requires a **test positivity cut-off**. When multiple such cut-offs can be defined, authors can report a receiver operating characteristic (ROC) curve which graphically represents the combination of sensitivity and specificity for each possible test positivity cut-off. The **area under the ROC curve** informs in a single numerical value about the overall diagnostic accuracy of the index test.

The **intended use** of a medical test can be diagnosis, screening, staging, monitoring, surveillance, prediction or prognosis. The **clinical role** of a test explains its position relative to existing tests in the clinical pathway. A replacement test, for example, replaces an existing test. A triage test is used before an existing test; an add-on test is used after an existing test.

Besides diagnostic accuracy, several other outcomes and statistics may be relevant in the evaluation of medical tests. Medical tests can also be used to classify patients for purposes other than diagnosis, such as staging or prognosis. The STARD list was not explicitly developed for these other outcomes, statistics, and study types, although most STARD items would still apply.

DEVELOPMENT

This STARD list was released in 2015. The 30 items were identified by an international expert group of methodologists, researchers, and editors. The guiding principle in the development of STARD was to select items that, when reported, would help readers to judge the potential for bias in the study, to appraise the applicability of the study findings and the validity of conclusions and recommendations. The list represents an update of the first version, which was published in 2003.

More information can be found on <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard>.

ANEXO 6

FICHA CLÍNICA – PACIENTES HUB

1. IDENTIFICAÇÃO:

Número prontuário: _____ Telefone: _____
Nome: _____
Endereço: _____
DN: ___/___/____. Idade _____ anos. Sexo: () M () F.
Escolaridade: _____ Naturalidade: _____/_____
Profissão: _____.

2. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA:

Procedência: _____
Área: urbana () ; rural () ; periurbana () .
Local do provável contágio: _____.

- a. Teve Leishmaniose anteriormente? Sim () Não ()
- b. Se sim, foi tratado? Sim () Não ()
- c. Se sim, há quantos meses acabou o tratamento? _____.
- d. Droga utilizada? _____.
- e. Dose? _____.
- f. Efeitos adversos? Sim () Não ()
- g. Quais efeitos adversos foram observados? _____.

3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PREGRESSOS:

- Diabetes Mellitus () ; - Hipertensão Arterial () ;
- Alergias () ; - Cardiopatia () ;
- Nefropatia () ; - Pneumopatias () ;
- HIV/ AIDS () ; - Outros _____.
Outras imunodeficiências: _____.
Uso de imunossuppressores: _____.

4. HISTÓRIA CLÍNICA E EXAME FÍSICO:

Número total de lesões cutâneas: _____.
Local das lesões (descreva com detalhes as lesões): _____.
Aspecto:
a. úlcera () ;
b. pápula () ;
c. verrucosa () ;
d. esporotricóide () ;
e. disseminada- 10 a mais lesões de pele () ;
f. recidiva cútis () ;
g. outros () . Especificar qual outro tipo: _____.
Tempo de início da lesão: _____.

5. HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:

- LTA cutânea localizada ();
- LTA cutânea disseminada ();
- Paracoccidiodomicose ();
- Cromoblastomicose ();
- Outra (). Especificar qual: _____.
- LTA cutânea recidiva cútis ();
- LTA cutânea difusa ();
- Esporotricose ();
- Tuberculose ();

6. EXAMES LABORATORIAIS:

a. Sorologias:

EXAME	RESULTADO	DATA	EXAME	RESULTADO	DATA
HIV		___/___/___	Chagas		___/___/___

b. Exames específicos para LTA:

EXAME	RESULTADO	DATA	EXAME	RESULTADO	DATA
Intradermorreação de Montenegro		___/___/___	Imunofluorescência indireta para LTA		___/___/___
Pesquisa de amastigota		___/___/___	Cultura		___/___/___

c. Resultados de exames para outras doenças que não LTA: _____.

d. Histopatológico: _____.

e. qPCR: _____.

f. Nanovue: _____.

7. TRATAMENTO:

Droga: _____.

Peso: _____. Dose: _____. Dose por Kg: _____.

Duração do tratamento: _____.

8. RESPOSTA AO TRATAMENTO DAS LESÕES CUTÂNEAS:

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

9. NECESSIDADE DE NOVOS TRATAMENTOS:

Data: ___/___/___.

Motivo: _____.

Droga: _____.

10. OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto: **QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS**, que será realizado num período estimado de dois anos no Hospital Universitário de Brasília - HUB. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é doença infecciosa que tem tratamento acessível no território brasileiro. O principal objetivo do presente estudo consiste em observar a quantidade de protozoários causadores da doença nas diferentes camadas da pele, com a finalidade de desenvolver uma técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA. Essas amostras serão coletadas através de uma biópsia incisional de 0,5 x 0,5cm, já coletada como rotina para análise neste centro, para detecção do DNA da *Leishmania*. Apenas realizaremos a divisão das camadas da pele antes desta análise. Os possíveis benefícios do projeto são relacionados à apresentação do melhor local para se realizar uma coleta mais adequada e tornar o diagnóstico de LTA mais preciso e eficaz. A biópsia é um procedimento simples realizado com anestesia local e com duração de alguns minutos, em que um pequeno fragmento da pele é retirado para análise patológica, não resultando em riscos gerais à saúde do Sr. (ª). No entanto, solicitamos ainda a autorização para utilização de todas as informações contidas no prontuário para avaliação em nosso estudo. Em nenhum momento será realizada biópsia apenas para participação neste estudo. Durante a biópsia incisional de pele, pode ocorrer pequeno sangramento, além de dor local. Garantimos que o participante da pesquisa receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. 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 na pesquisa. Não será revelado o nome de qualquer participante. Eventuais dúvidas poderão ser sanadas, a qualquer momento no telefone (61) 2028-5415 (serviço de Dermatologia) através de contato direto com a equipe de pesquisa. Ao fim da pesquisa, os resultados serão disponibilizados no documento da tese de mestrado da pesquisadora responsável. Os pesquisadores apresentarão o termo em consulta previamente agendada ou ao encontro do paciente, não sendo previstos gastos com transporte. Garantimos ainda o cumprimento da indenização cabível diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

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

Dados de identificação

Título do projeto: **QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS**

Pesquisador responsável: Laís Sevilha dos Santos

Instituição a que pertence o pesquisador responsável: Universidade de Brasília- UnB

Telefones para contato: (61) 2028-5415. Endereço: SGAN avenida L2 norte, quadra 605.

Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - CEP/FM-UnB

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

Faculdade de Medicina. Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília - DF - Brasil.

CEP: 70.910-900 Telefone: (61) 3107-1918

Brasília, _____ de _____ de _____.

Laís Sevilha dos Santos

RG: 3086405-DF

E-mail: cepfm@unb.br / **Telefone:** (61) 3107-1918/ **Endereço:** Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília- UnB - Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte. CEP: 70.910-900.

APÊNDICE 2

FICHA DE RASTREAMENTO – PACIENTES HUB

Nº paciente: _____

Nome: _____ Registro: _____

Data da coleta: ____/____/____ Idade: ____ Gênero: Feminino Masculino

Extração de DNA:

Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Obs: _____.

Quantificação de DNA:

Data: ____/____/____ _____.

Data: ____/____/____ _____.

Obs: _____.

Lâmina:

Obs: _____

_____.

	Cultura	Repique	Criopreservação	Desciopreservação
Data				
Laudo				
Observações				

Observações: _____

_____.

APÊNDICE 3

LAUDO DE PCR DE PACIENTES COM SUSPEITA DE LTA



LABORATÓRIO DE DERMATOMICOLOGIA - FACULDADE DE MEDICINA - UnB

Nome :

Coletado em: ___/___/___

Registro:

PCR CONVENCIONAL

Método: kDNA

Material: biópsia

RESULTADO:

Material: cultura

RESULTADO:

PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Método: TaqMan

Material: biópsia

RESULTADO:

Material: cultura

RESULTADO:

NOTA: exame realizado em laboratório para fins de projeto de pesquisa sem o objetivo de diagnóstico. A correta interpretação do resultado de qualquer exame depende de outros dados. Toda técnica apresenta resultados falso positivo e falso negativo, favor correlacionar com dados clínicos do paciente.

Liberado em ___/___/___ por: Jaqueline Osiro Bergmann - CRBM 8756

Responsável: _____

Dr. Ciro Martins Gomes - MD, PhD
CRM-DF 15.846

Referências:

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, Roselino AM. 2017. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where Leishmania (Viannia) braziliensis is endemic. J Clin Microbiol 55:526 -534. <https://doi.org/10.1128/JCM.01954-16>.
Pita-Pereira, D, Lins, R, Oliveira, MP, Lima, RB, Pereira, BA, Moreira, OC, Brazil, RP, Britto, C. 2012. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. Parasites & Vectors, 5, 15. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>.

APÊNDICE 4

NÚM.	GÊNERO	IDADE	REGISTRO	PROVÁVEL CONTÁGIO	LEISHMANIOSE ANTERIORMENTE	PATOLOGIAS	NÚMEROS DE LESÕES	MAIOR DIÂMETRO DA MAIOR LESÃO	LOCAL DAS LESÕES	TEMPO DE INÍCIO (MESES)	ASPECTO PRINCIPAL	GRUPO
3	M	52	791923/6	GO	N	S	1	1	CABEÇA	24	Úlcera	LTA
46	M	22	811153/0	GO	N	N	1	3	MMII	4	Úlcera	LTA
47	M	43	144201/1	GO	N	N	1	7	MMSS	5	Placa	LTA
57	M	50	812682/3	DF	N	N	1	2	MMII	2	Úlcera	LTA
58	M	61	811867/1	DF	N	S	10	5	MMSS	2	Crosta	LTA
22	M	40	801211/4	DF	N	N	1	10	CABEÇA	2,3	Úlcera	LTA
29	M	56	802918/3	DF	N	N	1	5	MMII	2	Úlcera	LTA
34	M	18	509498/2	DF	N	N	1	1,8	MMII	2	Úlcera	LTA
35	M	58	806094/9	DF	N	N	1	2,3	MMSS	2	Úlcera	LTA
38	M	40	807712/5	DF	N	N	1	7	MMII	3	Úlcera	LTA
41	M	39	809311/4	MT	N	N	1	4	MMII	2	Úlcera	LTA
42	M	56	808897/3	DF	N	N	1	8	MMII	36	Úlcera	LTA
1	M	34	789857/0	AC	N	N	1	1	MMSS		Úlcera	LTA
2	M	30	789860/4	AC	N	N	1	1,3	MMSS	2	Placa	LTA
8	M	90	796516/3	DF	N	S	1	0,5	CABEÇA	9	Úlcera	LTA
12	M	66	798877/0	DF	N	S	1	0,5	CABEÇA	240	Úlcera	LTA
13	M	52	722563/4	DF		S	1	3	CABEÇA	3	Placa	LTA
31	M	56	803835/8	BA	N	N	17	1,8	MMII	168	Úlcera	LTA
32	M	49	790359/4	GO	N	N	1	1,5	MMSS	2	Placa	LTA
43	M	53	809631/5	GO	N	N	1	1	MMII	18	Úlcera	LTA
20	M	57	801185/0	GO	S	N	3	5	MMSS	2	Cicatriz	LTA
28	M	28	802874/8	DF	N	N	1	2	MMSS	6	Úlcera	LTA
48	M	57	149369/1	GO	S	N	1	2,5	MMII		Cicatriz	LTA
53	M	71	793965/5	DF	N	S	1	10	MMII	24	Placa	LTA
9	M	72	165125/6	DF	N	S	1	4	MMSS	6	Úlcera	LTA
40	M	59	809621/6	DF	N	S	2	1	CABEÇA	108	Placa	LTA
49	M	44	822853/1	DF	N	S	1	3	MMII	12	Cicatriz	LTA
54	M	33	812284/8	DF	N	N	1	2	MMII	1	Úlcera	LTA
30	F	61	794931/6	MG	N	N	2	7	MMSS/MMII	2	Úlcera	LTA

NÚM.	GÊNERO	IDADE	REGISTRO	PROVÁVEL CONTÁGIO	LEISHMANIOSE ANTERIORMENTE	PATOLOGIAS	NÚMEROS DE LESÕES	MAIOR DIÂMETRO DA MAIOR LESÃO	LOCAL DAS LESÕES	TEMPO DE INÍCIO (MESES)	ASPECTO PRINCIPAL	GRUPO
45	F	60	811150/2	MG	N	N	1	5,5	MMII		Úlcera	LTA
26	F	46	801149/6	DF	N	S	1	3	MMII	1	Úlcera	LTA
6	F	21	795452/2	GO	N	N	1	1	MMII	1	Úlcera	LTA
10	F	73	796961/1	BA	N	S		4	MMII	36	Úlcera	LTA
14	F	25	799411/4	GO	S	N	1	8	MMII	120	Placa	LTA
39	F	81	319753/0	GO	N	N	1	10	MMII	7	Placa	LTA
56	F	54	812674/0	DF	N	S	1	3,5	MMSS	0,66	Úlcera	LTA
51	F	31	812233/5	GO	N	N		1,5	CABEÇA/ MMII	3	Úlcera	LTA
52	F	45	812256/6	DF	N	N	1	2,5	CABEÇA/ MMII	2	Úlcera	LTA
44	M	50	809826/1	GO	N	S	2	6,5	MMII	2	Úlcera	CONTROLE
4	M	36	794467/1	DF	N	N	1	1	MMII	1	Úlcera	CONTROLE
11	M	45	798395/0	DF	S	N	1	5	MMSS	24	Placa	CONTROLE
16	M	20	799766/1	BA	S	N		3	MMII		Cicatriz	CONTROLE
21	M	47	801740/2	GO	N	N	7	2	MMII	24	Placa	CONTROLE
24	M	64	801790/7	DF	N	N	1	4	MMII	12	Úlcera	CONTROLE
33	M	58	536990/5	DF	N	N		1	MMSS	60	Mácula	CONTROLE
23	M	66	801739/4	DF	N	S	1	4,3	MMSS	1	Úlcera	CONTROLE
18	M	23	800647/0	AL	N	N	1	4	MMII	72	Placa	CONTROLE
55	M	57	811494/4	DF	S	S	1	5,8	MMII	11	Úlcera	CONTROLE
7	F	62	077676/5	GO	S	S	1	1,2	MMSS	2	Placa	CONTROLE
15	F	52	799765/3	DF	N	N		0,5	MMSS	0,66	Nódulo	CONTROLE
19	F	37	801160/3	GO	N	N	2	2	MMII	0,66	Úlcera	CONTROLE
37	F	76	647451/4	DF	S	N	2		CABEÇA			CONTROLE
5	F	66	254794/1	MA	N	S	1	1,8	MMII	1	Úlcera	CONTROLE
25	F	60	664736/6	PA	N	S	1	5	MMII	12	Úlcera	CONTROLE
27	F	56	110207/8	DF	N	S	1	2,5	MMII	3	Úlcera	CONTROLE
36	F	73	771726/7	DF	N	S	1	2	CABEÇA	24	Pápula	CONTROLE
50	F	65	811849/9	MG	N	S	3	4	CABEÇA/ MMII/MMSS	12	Úlcera	CONTROLE
17	F	24	800134/9	GO	N	N	1	3	MMII	1	Úlcera	CONTROLE

Legenda: F: Feminino. M: Masculino; N: Não. S: Sim; MMII: Membros inferiores. MMSS: Membros superiores; LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana.

APÊNDICE 5

NÚM.	GÊNERO	REGISTRO	EXAME DIRETO	PCR BIÓPSIA ITS	PCR BIÓPSIA Kdna	qPCR BIÓPSIA	CULTURA	PCR CULTURA ITS	PCR CULTURA kDNA	qPCR CULTURA
1	M	789857/0	P	P	P	P	P	P	P	P
2	M	789860/4	P	P	P	P	P	P	P	P
3	M	791923/6	N	N	N	N	P	P	P	P
4	M	794467/1	N	N	N	N	N	N	N	N
5	F	254794/1	N	N	N	N	N	N	N	N
6	F	795452/2	N	N	N	N	N	N	N	N
7	F	077676/5	N	N	N	N	N	N	N	N
8	M	796516/3	N	N	N	N	N	N	N	N
9	M	165125/6	N	N	N	P	N	N	N	N
10	F	796961/1	N	N	N	P	N	N	N	N
11	M	798395/0	N	N	N	N	N	N	N	N
12	M	798877/0	N	N	N	P	P	P	P	P
13	M	722563/4	N	N	N	P	N	N	N	N
14	F	799411/4	N	N	N	P	N	N	N	N
15	F	799765/3	N	N	N	N	N	N	N	N
16	M	799766/1	N	N	N	N	N	N	N	N
17	F	800134/9	N	N	N	N	N	N	N	N
18	M	800647/0	N	N	N	N	N	N	N	N
19	F	801160/3	N	N	N	N	N	N	N	N
20	M	801185/0	N	N	N	N	N	N	P	P
21	M	801740/2	N	N	N	N	N	N	N	N
22	M	801211/4	N	N	N	N	P	P	P	P
23	M	801739/4	N	N	N	N	N	N	N	N
24	M	801790/7	N	N	N	N	N	N	N	N
25	F	664736/6	N	N	N	N	N	N	N	N
26	F	801149/6	P	N	N	N	P	P	P	P
27	F	110207/8	N	N	N	N	N	N	N	N
28	M	802874/8	N	P	P	P	P	P	P	N
29	M	802918/3	N	P	P	P	P	P	P	P
30	F	794931/6	N	N	N	N	P	P	P	P
31	M	803835/8	N	P	P	P	N	N	N	N

NÚM.	GÊNERO	REGISTRO	EXAME DIRETO	PCR BIÓPSIA ITS	PCR BIÓPSIA kDNA	qPCR BIÓPSIA	CULTURA	PCR CULTURA ITS	PCR CULTURA kDNA	qPCR CULTURA
32	M	790359/4	N	N	N	P	N	N	N	N
33	M	536990/5	N	N	N	N	N	N	P	N
34	M	509498/2	N	P	N	P	P	P	P	P
35	M	806094/9	N	P	N	P	P	N	P	P
36	F	771726/7	N	N	N	N	N	N	N	N
37	F	647451/4	N	N	N	N	N	N	N	N
38	M	807712/5	P	N	N	P	P	N	N	P
39	F	319753/0	P	N	P	P	N	N	P	P
40	M	809621/6	N	N	N	P	N	N	P	N
41	M	809311/4	N	N	N	P	N	N	N	N
42	M	808897/3	N	N	P	P	P	N	P	P
43	M	809631/5	N	N	P	P	N	N	N	N
44	M	809826/1	N	N	N	N	N	N	N	N
45	F	811150/2	N	N	N	N	N	N	N	N
46	M	811153/0	N	N	N	N	P	P	P	P
47	M	144201/1	N	N	N	N	N	N	N	P
48	M	149369/1	N	N	N	N	N	P	N	P
49	M	822853/1	N	N	N	N	N	N	N	P
50	F	811849/9	N	N	N	N	N	N	N	P
51	F	812233/5	N	N	N	N	P	P	P	P
52	F	812256/6	N	N	N	N	P	P	P	P
53	M	793965/5	N	N	N	N	N	N	N	P
54	M	812284/8	N	N	N	N	N	N	N	P
55	M	811494/4	N	N	N	N	N	N	N	N
56	F	812674/0	N	N	N	N	N	N	N	P
57	M	812682/3	N	N	N	P	N	N	N	P
58	M	811867/1	P	P	P	P	P	N	P	P

Legenda: F: Feminino. M: Masculino; N: Negativo. P: Positivo.