

Universidade Federal do Espírito Santo
Núcleo de Doenças Infecciosas - Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

Jauber Fornaciari Pissinate

DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania (Leishmania) amazonensis, POR CITOMETRIA DE FLUXO,
NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Vitória
Agosto de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jauber Fornaciari Pissinate

DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania (Leishmania) amazonensis, POR CITOMETRIA DE FLUXO,
NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elenice Moreira Lemos

Vitória
2006

Dedico essa conquista aos meus amados pais, João e Madalena, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que é a inteligência suprema que nos permite estar aqui neste espaço e neste tempo, vivendo e convivendo, ensinando e aprendendo.

Agradeço aos meus queridos pais, João e Madalena, que me criaram e proporcionaram minha educação, tanto escolar quanto moral, e que me ensinaram que para viver é preciso ser perseverante.

Ao meu irmão Jander pela amizade, amor, companheirismo, por me incentivar sempre em busca dos meus ideais.

À Paula, minha namorada, por me ouvir e confortar, com muito amor e paciência, nos momentos de ansiedade e preocupação.

À Dra. Elenice Moreira Lemos, minha orientadora, com quem pude contar sempre. Muito obrigado pelos ensinamentos, sempre com muita paciência, pelos incentivos, enfim, por ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela colaboração, esclarecimentos e sugestões que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas – NDI, pela oportunidade e privilégio de poder fazer parte desta seleta equipe.

Ao coordenador deste curso, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pelos conselhos e sugestões que foram dados.

À Dra. Patrícia Duarte Deps e ao Dr. Reynaldo Dietze pela avaliação e acompanhamento dos pacientes, cujos soros foram utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Leishmaniose, Bianca, Marcela, Fábio, Fabiana, Aretha e Lucas, pelo apoio incondicional, pelo encorajamento nos momentos difíceis, pelos momentos de descontração. Por fazer da Leish um grupo de amigos sempre unido.

A todos os colegas e amigos do NDI, que sempre fazem do núcleo um ambiente alegre, com ótimo astral. Obrigado pelo incentivo, desde os tempos de estagiário da TB até hoje.

Aos meus colegas da turma do Mestrado em Doenças Infecciosas, pelo apoio.

Aos meus primos Junior e Gerliane, pela convivência e apoio por quase todo o período do mestrado.

Aos meus demais familiares que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Huxley

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Inicialmente, foi realizada a padronização do método, a partir da qual foram estabelecidas as condições que permitiram discriminar entre a reatividade de IgG de pacientes portadores de LTA e de indivíduos saudáveis. Posteriormente, para avaliar a aplicabilidade e o desempenho da metodologia no diagnóstico da LTA, foram utilizados soros de 69 pacientes com diagnóstico sorológico positivo para LTA, sendo 59 de pacientes com leishmaniose cutânea e 10 com leishmaniose mucosa. Como controles, foram também avaliados 34 soros de indivíduos saudáveis e 50 soros de pacientes portadores de diferentes doenças infecciosas, incluindo leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (DC), malária (MAL), hanseníase (HAN) e esporotricose (ESP). As amostras de soro diluídas foram incubadas com promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, posteriormente incubadas com anti-IgG humano marcado com FITC diluído 1:4.000 e analisadas no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual, estabelecendo PPFP=25% como ponto de corte entre pacientes com LTA e indivíduos saudáveis. A análise do desempenho do teste mostrou sensibilidade de 99% e especificidade de 100% quando foram avaliados como controles apenas soros de indivíduos saudáveis. Entretanto, a análise do teste com soros de pacientes com LV, DC e MAL mostrou uma alta reatividade cruzada com essas infecções, causando uma queda dos índices de especificidade de 100% para 70%. Devido a essa reatividade cruzada, foi avaliado o desempenho da pesquisa de subclasses de IgG no diagnóstico da LTA. Com relação às subclasses de IgG, foi encontrada reatividade significativa apenas para IgG1 e IgG3. A análise comparativa do desempenho da metodologia para a pesquisa de IgG, IgG1 e IgG3 mostrou sensibilidade de 96%, 88% e 100%, e especificidade de 54,5%, 63% e 65%, respectivamente, quando no grupo controle foram incluídos soros de pacientes com LV, DC e MAL. Com base nesses dados, podemos concluir que essa metodologia pode ser utilizada como ferramenta alternativa para o diagnóstico da LTA.

Abstract

In this work, the performance of a cytometry-based methodology to detect anti-*L.(L.) amazonensis* antibodies was analyzed for the diagnosis for American tegumentar leishmaniasis (ATL). As a first step, we have standardized the methodology which allowed the discrimination between patients with ATL and healthy individuals. Then, we analyzed sera from 69 patients with parasitological diagnosis for ATL (59 from cutaneous and 10 from mucosal leishmaniasis) to evaluate the performance of the methodology in diagnosing ATL. As control, sera from 34 healthy individuals and 50 patients with visceral leishmaniasis (VL), Chagas disease (CD), malária (MAL), hanseniasis (HAN) and sporotrichosis (SPO) were also assessed. Diluted sera samples were first incubated with fixed promastigote and then, with FITC conjugated anti-human IgG diluted at 1:4,000 for flow cytometry analysis. The results were expressed as percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) for each individual sample, establishing PPFP = 25% as the cut-off between positive and negatives results. The analysis of the test performance demonstrated sensibility of 99% and specificity of 100%, when only sera from healthy individuals were considered as control. However, a decrease on the specificity (from 100% to 70%) was observed when sera from VL, CD and MAL were evaluated. Due to this cross-reaction, the performance of the test using IgG subclasses was evaluated in the diagnosis of ATL. Concerning IgG subclasses, reactivity was found only for IgG1 and IgG3. The comparative analysis of the test performance using IgG, IgG1 and IgG3 showed sensibility of 96%, 88% and 100% and specificity of 54,5%, 63% and 65% , respectively, when sera from VL, CD and MAL were analyzed. Based on our results we can conclude that this methodology can be used as an alternative tool for the diagnosis of ATL.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Seqüência de análise de anticorpos anti-promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por citometria de fluxo. Seleção da população de formas promastigotas, em gráficos de tamanho e granulosidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) obtidos como controle da reação, sem soro (B), após a incubação com um soro negativo (C) e com soro positivo (D). O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle da reação.....33
- Figura 2** - Curva ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,988) e para o teste 2 (ASC=0,784).....35
- Figura 3** - Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis* (M2269) em meio LIT. Concentração inicial de parasitos na cultura foi $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia referente a dois experimentos. As setas indicam as fases de crescimento que foram analisadas neste estudo.....39
- Figura 4** - Curva de titulação de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando parasitos em diferentes dias de cultivo. O gráfico representa valores de PPFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos) diluídos 1:1.000 a 1:1.024.000 contra anticorpo anti-IgG diluído 1:2.000, utilizando promastigotas de 4 dias (■,□), 7 dias (●,○) e 9 dias (▲,△).....40
- Figura 5** - Curva de titulação de IgG anti-*L.(L.) amazonensis* utilizando diferentes concentrações do anticorpo anti-IgG humano diluído 1:2.000 (■,□) 1:4.000 (●,○) e 1:8.000 (▲,△) e diferentes diluições do soro. Os resultados estão expressos como valores de PPFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos).....41
- Figura 6** - Curva de titulação de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando parasitos de cultura em diferentes passagens no meio NNN-LIT (gráfico A), 3^a (■,□) 5^a (●,○) e 10^a (▲,△) passagens e parasitas em diferentes dias após a fixação (gráfico B), 5 dias (■,□) e 30 dias (●,○). Os resultados estão expressos como valores de PPFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos).....42
- Figura 7** - Curvas de titulação de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em mistura de soros de pacientes portadores de LTA e NOR (gráfico A) e em amostras individuais de pacientes portadores de LTA e indivíduos normais, gráficos B e C, respectivamente. Os retângulos sombreados destacam a diluição que melhor segrega os dois grupos. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.....43

- Figura 8** - Análise de TG-ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*. Sensibilidade (Sen) e especificidade (Esp) foram determinadas para cada ponto de corte (% de PFP). As linhas pontilhadas indicam a faixa de ponto de corte que permitem maior sensibilidade e especificidade do teste.....44
- Figura 9** - Curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade). O resultado está expresso pelos pontos do gráfico que representam os valores dos índices de sensibilidade e especificidade determinando assim a área sob a curva (ASC=0.999). A seta representa o ponto de corte escolhido (PFP=25%).....45
- Figura 10** - Reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais de pacientes portadores de LTA (●), e NOR (○), na diluição 1:8.000. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 25% (linha) entre resultados positivos (PFP>25%) e valores negativos (PFP≤ 25%).....46
- Figura 11** - Reatividade de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em amostras individuais de pacientes portadores de LTA, LV, DC, MAL, HAN, ESP e indivíduos NOR, na diluição 1:8.000. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte um valor de 25% (linha pontilhada).....47
- Figura 12** - Curvas de titulação de subclasses de IgG anti-*L. amazonensis* utilizando diferentes concentrações do anticorpo secundário anti- subclasses de IgG humano e diferentes diluições do soro. Os resultados estão expressos como valores de PFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos). O anticorpo secundário específico para cada subclasse foi diluído 1:1.000 (■,□) 1:2.000 (●,○) e 1:4.000 (▲,△) para IgG1 e 1:250, 1:500 e 1:1.000 para as demais subclasses.....50
- Figura 13** - Os gráficos 12A a C e 12D a F, mostram as reatividades da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis*, respectivamente, em misturas e amostras individuais de pacientes portadores de LTA (●) e NOR (○). O retângulo sombreado destaca a diluição que melhor segrega os dois grupos. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP.....51
- Figura 14** - Curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-*L. (L.) amazonensis*, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade). O resultado está expresso sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte para a reatividade de PFP, determinando a área sobre a curva (ASC=0,960) (A) e (ASC=1,00) (B). As setas representam as faixas de melhores pontos de corte sugeridos pela curva ROC para IgG1 e IgG3.....52

Figura 15 - Reatividade de anticorpos IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais de pacientes portadores de LTA, NOR, LV, DC e MAL, na diluição 1:4.000 e 1:200, respectivamente. O resultado da reatividade de IgG1 e IgG3 para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% entre resultados positivos (PFP > 50%) e negativos (PFP ≤ 50%).....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	30
Tabela 2 – Categorias de resultados do teste avaliado em uma população que inclui pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis.....	36
Tabela 3 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>L.(L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.....	46
Tabela 4 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>L.(L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.....	48
Tabela 5 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti- <i>L.(L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.....	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. Leishmanioses	14
2. Leishmaniose Tegumentar Americana.....	14
3. Manifestações Clínicas	16
4. Diagnóstico da LTA.....	18
4.1 Diagnóstico Clínico.....	18
4.2 Diagnóstico Parasitológico	18
4.3 Diagnóstico Imunológico.....	20
OBJETIVOS	23
1. Objetivo Geral.....	24
2. Objetivos Específicos	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. População do Estudo	26
2. Pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> por citometria de fluxo.....	27
2.1 Cultivo das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	27
2.2 Preparação das formas promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	28
2.3 Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo.....	29
2.4 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo.....	30
2.5 Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo.....	31
3. Análise do desempenho da metodologia para o diagnóstico da LTA.....	33
3.1 Análise da Curva ROC - <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>	33
3.2 Determinação dos índices de desempenho.....	35
RESULTADOS	37

1. Padronização da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, para o diagnóstico da LTA.....	38
1.1 Influência da fase de cultivo de promastigotas na pesquisa de anticorpos humanos anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
1.2 Influência da concentração do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	40
1.3 Avaliação de precisão do método.....	41
1.4 Análise da reatividade de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em soros de pacientes com LTA e de indivíduos saudáveis.....	42
1.5 Estudo da curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).....	43
2. Avaliação do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).....	45
2.1 Avaliação de reatividade cruzada em condições clínicas capazes de interferir no desempenho no método.....	47
3. Padronização da pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, para o diagnóstico da LTA.....	48
3.1 Influência da concentração dos anticorpos murinos anti-Fc de subclasses de IgG humano marcado com biotina na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	48
3.2 Análise da reatividade de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em soros de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis.....	50
3.3 Estudo da curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).....	52
4. Avaliação do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , por citometria de fluxo, no diagnóstico da LTA.....	53
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas de evolução crônica que acometem o homem, causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Atualmente, 21 espécies são consideradas patogênicas para o homem. Essa diversidade de espécies, associada a fatores ligados ao hospedeiro, leva a existência de uma ampla variedade de formas clínicas (SARAVIA et al. 1989). Nesse contexto, existem várias propostas de classificação clínica para a leishmaniose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004), as leishmanioses são divididas em quatro grupos clínicos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose difusa e leishmaniose visceral, sendo que nas Américas as três primeiras formas são agrupadas com a denominação de leishmaniose tegumentar americana (LTA).

2. Leishmaniose Tegumentar Americana

Anualmente, entre 1 a 1,5 milhão de pessoas desenvolvem a leishmaniose cutânea, sendo que 90% dos casos da doença ocorrem em apenas 7 países: Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Brasil e Peru (DESJEUX, 2004). Em vista dessa distribuição geográfica, a leishmaniose tegumentar permanece associada à pobreza, como uma doença negligenciada, representando, portanto, um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (YAMEY, 2002).

A LTA ocorre nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo que o foco mais importante se encontra na América do Sul onde, somente Uruguai e Chile, não apresentam casos da doença (GRIMALDI et al. 1989). No Brasil, a incidência da LTA tem aumentado tanto em magnitude, quanto em expansão geográfica. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a incidência da doença aumentou de 21.800 casos em 1998 para 60.000 casos em 2003 (WHO, 2004).

No Espírito Santo, a LTA foi, inicialmente, relatada por diferentes autores (CUNHA, 1912; CARINI, 1912; TERRA, 1913 e SILVA, 1915), estando relacionada com áreas de ocupação recente. Durante a primeira epidemia, no início do século passado, vários casos da doença foram detectados em pacientes que trabalhavam e

viviam em áreas recentemente desmatadas (MACHADO, 1913). Entretanto, mudanças no ambiente, modificaram a ocorrência da LTA no estado, onde novas epidemias em áreas desmatadas de ocupação antiga foram reportadas (BARROS et al. 1985; MAYRINK et al. 1985). A ocorrência da doença em ambos os sexos e em crianças, sugere uma transmissão peridomiciliar (GONTIJO et al. 2002). Atualmente, a LTA é endêmica e amplamente distribuída no Espírito Santo. Entre 1995 e 2003, a taxa de incidência média no Espírito Santo foi de 14,3 por 100.000 habitantes (MS, 2004).

No Brasil, seis espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas como agentes etiológicos da LTA. Do subgênero *Leishmania*, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é responsável pela maioria dos casos e, do subgênero *Viannia*, cinco espécies são descritas como causadoras de LTA: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

A *L. (V.) braziliensis* é a espécie de maior importância no Brasil, assim como na América Latina, podendo causar lesões cutâneas e mucosas. Essa espécie é encontrada em todas as zonas endêmicas do Brasil, tanto em áreas de colonizações antigas como em focos periurbanos, estando geralmente associada à presença de animais domésticos, como cães e eqüinos. A alta prevalência da *L. (V.) braziliensis* no Brasil pode ser justificada pela alta antropofilia apresentada pelas espécies de flebotomíneo que são seus vetores (DIETZE, 2003)

A *L. (V.) guyanensis* está associada às lesões cutâneas (SARAVIA, 1985), embora já tenha sido isolada em lesões mucosas (SANTRICH et al. 1990). Distribuiu-se por toda a calha norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente (Barret & Senra, 1989), estando associada a desdentados e marsupiais.

A *L. (L.) amazonensis* é endêmica em toda região amazônica. A espécie também foi identificada no Maranhão, Bahia (BARRAL et al. 1991), Paraná (SILVEIRA, 1990), Goiás (LAINSON, 1989), Minas Gerais (PASSOS et al. 1999 e GONTIJO, 2002) e Santa Catarina (GRISARD et al. 2000).

Outras espécies do subgênero *Viannia* têm sido isoladas recentemente de animais silvestres na região Amazônica e países vizinhos, mas, raramente, infectam o homem, como *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi* (REY, 2001).

3. Manifestações Clínicas

Levando-se em consideração as diversidades de manifestações clínicas e as possibilidades de evolução da LTA, podemos dividi-la em cinco grupos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada ou generalizada (LCD), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (DIETZE, 2003).

A manifestação clínica mais freqüente da LTA é a forma cutânea localizada (LCL), observada em 85% dos pacientes. Caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas ulceradas, podendo ser únicas ou múltiplas, com bordos elevados e emoldurados, com ou sem exsudação, com fundo granulomatoso, comumente indolores. Ocorrem, geralmente, nas áreas descobertas do corpo, como face, membros superiores e inferiores. O período de incubação situa-se entre quatro e oito semanas. As lesões ocorrem, geralmente, no local de inoculação do parasito pelo vetor, sendo que as lesões múltiplas são causadas por múltiplas picadas de flebotomíneos ou através de disseminação por contigüidade. Inicialmente, no local da picada surge um nódulo pequeno ou uma lesão de aspecto impetiginoso. Depois a lesão pode evoluir para a regressão completa, adotar um curso lento sem ulceração ou, mais freqüentemente, progredir para necrose e formar lesão ulcerada. A úlcera leishmaniótica tende à cronicidade e evolução lenta, quer para a expansão, quer para a regressão, mesmo sem tratamento. Pode haver cicatrização num prazo de seis meses a vários anos curando-se, em muitos casos, no período de 12 a 15 meses (REY, 2001). Menos freqüentemente, as lesões na LCL podem apresentar aspectos diferentes dos mencionados, tais como: lesões ulcerocromatosas, ulcerovegetantes, verrucosas, impetigóides, ectimatóides, tuberculóides e liquenóides. Na LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, o acometimento ganglionar é freqüente, podendo ocorrer em até 83% dos casos. No caso de doença causada por *L. (V.) guyanensis*, as lesões tendem a ser menores e mais numerosas, sendo o comprometimento ganglionar menos freqüente se comparado com *L. (V.) braziliensis* (ROMERO et al. 2001b).

Na LCL a resposta imune está presente, sendo evidenciada pela positividade da intradermorreação de Montenegro (IDRM) e pela presença de anticorpos anti-*Leishmania*. O diagnóstico diferencial na LCL deve ser feito com as úlceras de

estase, úlceras tropicais, esporotricose, paracoccidiodomicose, impetigo, mifase e neoplasias da pele.

A forma cutânea disseminada (LCD) caracteriza-se pela presença de numerosas lesões pequenas, ulceradas, distribuídas por todo o corpo. As lesões não possuem relação com o local de inoculação do parasito pelo inseto vetor, sendo secundárias à disseminação hematogênica do parasito. Observa-se positividade na IDRМ e a sorologia é geralmente positiva. A LCD está associada às espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, porém, recentemente, a participação da *L. (L.) amazonensis* também foi descrita (DIETZE, 2003).

A leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) caracteriza-se pela presença de numerosas lesões nodulares, papulares, e placas infiltradas que, raramente, ulceram. A LCAD é uma manifestação rara da LTA. Está associada às espécies do subgênero *Leishmania*, sendo que, no Brasil, a espécie causadora é a *L. (L.) amazonensis*. A infecção induz pouca, ou nenhuma, resposta imune celular. A IDRМ é negativa ou pouco reativa; porém, consegue-se detectar altos níveis de anticorpos circulantes.

A leishmaniose mucosa (LM) está relacionada, geralmente, com a ocorrência prévia de lesões cutâneas. Cerca de 2% dos indivíduos com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* desenvolvem a LM (GREVELINK AND LERNER, 1996). As lesões, geralmente, aparecem ao longo dos cinco anos subseqüentes ao aparecimento da lesão cutânea inicial. A disseminação para as mucosas dá-se, provavelmente, através da disseminação hematogênica, tendo predileção pela mucosa do septo nasal e menos freqüentemente pela mucosa da boca e laringe (MARSDEN et al. 1986 e MARTINEZ et al 1992). É possível a ocorrência concomitante de lesões mucosas com lesões cutâneas em atividade sendo, nesta forma, designada de leishmaniose mucocutânea (LMC). A lesão mucosa pode, ainda, ser secundária à picada do inseto vetor naquele local, sem cicatriz ou lesão cutânea em atividade. A maioria das lesões mucosas é causada pela *L. (V.) braziliensis*. Tanto a LM como a LMC apresentam IDRМ positiva e anticorpos anti-*Leishmania* circulantes.

Todas as formas clínicas da leishmaniose tegumentar, com exceção da LCAD, respondem ao tratamento com antimônio pentavalente. Entretanto, as formas mucosas exigem maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (MS, 2000).

4. Diagnóstico da LTA

4.1. Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LTA pode ser realizado com base nas características da lesão associadas à anamnese, no qual os dados epidemiológicos são de grande importância. Devido ao fato da LTA produzir um amplo espectro de lesões, o diagnóstico clínico nem sempre é simples ou imediato. A LTA deve ser diferenciada das úlceras traumáticas, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, hanseníase, tuberculose cutânea, sífilis, paracoccidioomicose, esporotricose, cromomicose e neoplasias. (GONTIJO E CARVALHO, 2003)

4.2 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico da LTA pode ser realizado com a visualização do parasito (formas amastigotas), através de microscopia, no esfregaço obtido por impressão por aposição de material de biópsia ou raspado da lesão. O exame direto é o método mais utilizado, por ser um teste mais simples, rápido e de baixo custo, entretanto, não é capaz de detectar parasitos em todos os portadores de LTA. A literatura registra valores de sensibilidade para o exame direto que variam de 33 a 65% (DE BRIJIN et al. 1993; RODRIGUEZ et al. 1994; PIRMEZ et al. 1999; AVILES et al. 1999; FABER et al. 2003). A qualidade do material corado, a experiência do microscopista e o número de campos observados podem ter grande influência nos resultados. Além disso, o encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença, com sensibilidade que varia em torno de 100% nos primeiros dois meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (DIETZE, 2003).

No exame histopatológico, o achado de um infiltrado inflamatório compatível pode sugerir a infecção, entretanto, somente a visualização das amastigotas a confirma, já que outras afecções cutâneas também podem causar o mesmo tipo de manifestação inflamatória como: blastomicose, tuberculose e doença inflamatória de Werner. A visualização do parasito no exame histopatológico convencional é

dificultada pela escassez de parasitos nas lesões e, quando presentes, podem estar deformados, devido ao processo de desidratação ocorrido durante a etapa de fixação em formol (CUBA-CUBA et al. 1984 e ROMERO et al. 2001b). A histopatologia é um processo de custo mais elevado que exige facilidades laboratoriais e um histopatologista, o que limita sua utilização na rotina laboratorial.

Além do exame direto e histopatológico, o material obtido das lesões pode ser inoculado em meio de cultura. A utilização de uma interface líquida sobre o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), como o meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) ou Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. Dados da literatura mostram valores de sensibilidade variando de 15 a 84% (CUBA-CUBA et al. 1984; MENGISTU et al. 1992; ROMERO et al. 2001b, PIRMEZ et al. 1999; FABER et al. 2003). O longo período de acompanhamento do crescimento das formas promastigotas e a ocorrência de contaminação por bactérias e fungos são limitações do teste. PIRMEZ et al. (1999) descrevem uma taxa de contaminação de 19% em culturas de biópsias de lesões cutâneas e de 46% em culturas de material de lesões mucosas.

A inoculação das amostras obtidas de biópsia de lesão em pata ou focinho de animais de laboratório também pode ser uma alternativa, porém sem valor prático para o diagnóstico da LTA devido ao longo tempo de positividade e ao elevado custo para sua realização e manutenção dos animais (DIETZE, 2003).

As técnicas moleculares, atualmente, surgem como alternativa para a identificação do parasito. O diagnóstico molecular da LTA é baseado na hibridização do DNA ou na amplificação de fragmentos de DNA utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é um método que permite amplificar em escala exponencial, seqüências de DNA, sendo capaz de identificar 1 fentograma (10^{-15}) de DNA de uma leishmânia (DE BRUJIN et al. 1993). A literatura registra valores de sensibilidade acima de 90% e especificidade em torno de 90% (GONTIJO, 1997; PIRMEZ et al. 1999; ROMERO et al. 2001a; FABER et al. 2003 e MARQUES et al. 2006). Embora a PCR seja uma técnica altamente sensível e específica, trata-se de um método sofisticado, com exigências técnicas e custo elevado, o que limita seu uso na rotina laboratorial.

4.3 Diagnóstico Imunológico

O diagnóstico imunológico da LTA baseia-se em métodos que avaliam a resposta celular do paciente (intradermorreação de Montenegro), e em métodos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi idealizada pelo médico João Batista de Freitas Montenegro em 1926 utilizando extrato bruto do parasito como antígeno (MONTENEGRO, 1926). O método é rotineiramente utilizado no Brasil e consiste na aplicação de 0,1ml do extrato bruto do antígeno de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* fenolado, por via intradérmica na face interna do antebraço. A avaliação da resposta cutânea deve ser realizada entre 48-72 horas após a inoculação, através da medida da endureção do local, sendo consideradas positivas as reações acima de 5mm. A IDRM apresenta alta sensibilidade, podendo apresentar sensibilidade em torno de 90% (SILVEIRA et al. 1999 e FABER et al. 2003). Além da boa sensibilidade, a IDRM é de fácil aplicação e leitura, possuindo um baixo custo, podendo ser utilizada em trabalhos de campo e locais com precária estrutura. Apesar da alta sensibilidade, o teste se torna positivo apenas em torno de três a seis semanas após o início da lesão e não diferencia doença atual e pregressa, permanecendo positiva, na maioria das vezes, após o tratamento (DIETZE, 2003). Além disso, recentemente, DE LIMA BARROS et al. (2005), relatou a ocorrência de reatividade cruzada da IDRM em pacientes com esporotricose que compartilha com a LTA várias características clínicas e epidemiológicas.

Vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver testes sorológicos para o diagnóstico da LTA. A primeira dificuldade enfrentada pelos pesquisadores no desenvolvimento destes testes é o baixo nível de anticorpos produzidos na LTA necessitando, assim, de métodos mais sensíveis. Outro desafio é a reação cruzada entre LTA e outras doenças infecciosas, como doença de Chagas e leishmaniose visceral, que podem ocorrer simultaneamente numa mesma área endêmica.

Dentre os testes sorológicos disponíveis, a RIFI é a mais difundida. A sensibilidade do método varia em torno de 70% e está relacionada com o tempo de evolução da lesão (MS, 2000), bem como com a espécie de *Leishmania* infectante. Segundo ROMERO et al. (2005) a RIFI apresentou uma sensibilidade de 79,6% e

71,7% em indivíduos infectados com *L. (L.) braziliensis* e *L. (L.) guyanensis*, respectivamente. A baixa especificidade também é um fator limitante da técnica, devido à reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose visceral, doença de chagas, hanseníase e tuberculose (VEXENAT et al 1996 e KAR, 1995).

O ELISA tem se mostrado mais sensível que a RIFI. Dados da literatura mostram uma sensibilidade muito variável com valores entre 62% e 97% (ROFFI et al. 1980; GUIMARÃES et al. 1986; BRITO et al. 2000; ROMERO et al. 2004). Assim como a RIFI, o método de ELISA possui uma baixa especificidade, sendo descritas reações cruzadas com soros de leishmaniose visceral, doença de Chagas, malária, toxoplasmose, hanseníase e tuberculose (ROFFI et al. 1980, KAR, 1995). Segundo VEXENAT et al. (1996), pacientes chagásicos mostram 98% de reatividade utilizando-se antígenos de *L. (L.) braziliensis*.

Outros métodos que têm sido avaliados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, como o teste de aglutinação direta (DAT) e o *Western blot*. Em um estudo na Etiópia, MENGISTU et al. (1992) utilizando *L. aethiopica* como antígeno para o DAT, obtiveram uma sensibilidade de 60% e reatividade cruzada com todos os soros de pacientes com leishmaniose visceral. HAILU (2002), também na Etiópia, avaliou o DAT para o diagnóstico de leishmaniose cutânea, utilizando antígenos *L. aethiopica*, encontrando uma sensibilidade de 88,2% e uma especificidade de 91,8%. Entretanto, foi observada uma reatividade cruzada com soros de indivíduos saudáveis de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar e em pacientes com tuberculose.

O *Western blot* é um método que fornece mais informações sobre o perfil antigênico do parasito e, além disso, possui uma maior sensibilidade e especificidade quando comparado com a RIFI e ELISA (GONÇALVES et al. 2002). Dados da literatura mostram valores de sensibilidade variando entre 79,6 e 91% e reatividade cruzada com pacientes portadores de hanseníase e doença de Chagas (BRITO et al. 2000 e GONÇALVES et al. 2002).

Devido à necessidade de se obter um método diagnóstico mais sensível e específico, capaz de estabelecer diagnóstico precoce e que não necessite de processos invasivos, vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver novas metodologias, bem como preparações antigênicas alternativas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (GONÇALVES, 2002; CELESTE et al. 2004; RYAN et al. 2002, ROCHA et al. 2006).

Recentemente, ROCHA et al. (2002, 2006), utilizando uma metodologia de pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo descrita por MARTINS-FILHO et al. (1995), avaliaram a aplicabilidade dessa metodologia no diagnóstico da LCL. Esses autores demonstraram que a pesquisa de anticorpos anti-promastigotas vivas de *L.(V.) braziliensis* foi capaz de identificar LCL ativa. Nosso grupo, em colaboração com esses pesquisadores, tem avaliado a aplicabilidade dessa nova metodologia para a pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* e avaliado sua aplicabilidade no diagnóstico e monitoração de cura após o tratamento na LV (GOMES, 2003, 2006).

Dando continuidade aos trabalhos, utilizando essa mesma metodologia, nós nos propusemos a avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da LTA. A justificativa para avaliar a utilização de parasitos fixados de *L. (L.) amazonensis* ao invés de parasitos vivos de *L. (V.) braziliensis*, baseou-se na dificuldade de manipulação de parasitos vivos, bem como na necessidade da manutenção de cultura para obtenção contínua desses parasitos, o que não seria necessário no caso da utilização de parasitos fixados. Além disso, a adaptação do teste com a espécie *L. (L.) amazonensis* foi devido ao fato dessa espécie ser mais facilmente cultivada e de melhor manutenção em cultura em comparação com *L. (V.) braziliensis*.

A imunofluorescência por citometria de fluxo é um método de execução rápido, de boa reprodutibilidade e isenta de variabilidade metodológica inerente ao analista. Trata-se de um método de alta sensibilidade analítica que permite avaliar maiores diluições do soro comparadas àquelas usualmente utilizadas por metodologias convencionais, como a RIFI.

OBJETIVOS

I. Objetivo Geral

Padronizar e avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

II. Objetivos Específicos

1. Padronizar a preparação antigênica, a diluição do soro e do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano marcado com FITC, para a metodologia de pesquisa de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo.
2. Avaliar a aplicabilidade e o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.
3. Padronizar a diluição do soro e do anticorpo secundário marcado com biotina para a pesquisa de subclasses de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo.
4. Avaliar a aplicabilidade e o desempenho da pesquisa subclasses de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. População do estudo

O estabelecimento de uma nova metodologia para diagnóstico requer a análise do seu desempenho em um grupo de indivíduos comprovadamente portadores da doença para a qual o teste foi desenvolvido (grupo caso), assim como em um grupo de indivíduos sem a doença referida (grupo controle). No grupo controle, devem estar contidos, indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de outras doenças que influenciem no diagnóstico clínico. Desta forma, foram avaliadas amostras de soros de indivíduos residentes no estado do Espírito Santo que apresentavam lesão cutânea ou mucosa com diagnóstico positivo para LTA. O diagnóstico dos pacientes foi confirmado parasitologicamente através da detecção de amastigotas em biópsia da lesão, cujo material foi utilizado para o preparo de lâminas para microscopia direta e inoculação em meio de cultura. Como controle, foram avaliadas amostras de soros de indivíduos que não apresentavam lesão ativa e/ou cicatriz compatível com LTA e intradermorreação de Montenegro negativa, bem como amostras de indivíduos portadores de outras doenças infecciosas.

Para a análise do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG e suas subclasses anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da LTA, foram utilizadas amostras de soros de 69 indivíduos portadores de LTA com exame parasitológico positivo, sendo 59 portadores de leishmaniose cutânea (LC) e 10 portadores de leishmaniose mucosa (LM). O grupo controle negativo (NOR) foi constituído de 34 amostras de soros de indivíduos saudáveis com intradermorreação de Montenegro negativa todos procedentes do Espírito Santo. Para a avaliação da reatividade cruzada do método, foram também utilizadas amostras de soros de pacientes portadores de hanseníase (HA, n=10), esporotricose (ESP, n=10), malária (MAL, n=10), leishmaniose visceral (LV, n=10) e doença de Chagas (DC, n=10).

Dos 59 indivíduos do grupo LC, todos eram procedentes de áreas endêmicas para LTA do Espírito Santo, 78% (46/59) eram do sexo masculino e 22% (13/59) do sexo feminino. A idade, neste grupo, variou de 4 a 71 anos, com média de $32,3 \pm 16,9$ anos. Com relação ao número de lesão, 72,9% (43/59) apresentavam uma única lesão, 18,7% (11/59) apresentavam 2 a 3 lesões, e 8,5% (5/59) apresentavam de 4 a 8 lesões. O tempo de desenvolvimento da lesão variou de 2 a

48 semanas, com média de 12 ± 12 semanas, sendo que 62% dos pacientes apresentavam o tempo de evolução menor ou igual a 4 semanas.

Dos 10 pacientes portadores de LM, 9 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino. A idade neste grupo variou de 33 a 68 anos, com uma média de 47 ± 12 anos. O número de lesões, neste grupo, variou de 1 a 7. O tempo de desenvolvimento da lesão variou de 6 a 168 meses, com média de 44 ± 59 meses.

O grupo NOR foi constituído por 34 indivíduos saudáveis. Destes, 35,3% (12/34) eram do sexo masculino e 64,7% (22/34) do sexo feminino. Neste grupo, a idade variou de 20 a 60 anos, com média de 36 ± 10 anos.

A avaliação, o tratamento e o acompanhamento de todos os pacientes portadores de LTA foram realizados sob a supervisão da Dra. Patrícia Duarte Deps e do Dr. Reynaldo Dietze, no Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes e no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES.

Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

2. Pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* por citometria de fluxo.

2.1 Cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em meio NNN-LIT. Os parasitos foram cultivados em frasco de cultura (Corning, Cambridge) contendo meio ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN* (NOVY & MACNEAL 1903, NICOLE 1908), associado com meio líquido Liver Infusion Tryptose – LIT** (CAMARGO, 1964), conhecido como meio NNN-LIT. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante quatro dias. Após este período, as culturas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação e os parasitos re-inoculados em um novo frasco contendo NNN-LIT na concentração final de 1×10^6 promastigotas/mL. Este procedimento foi repetido a

cada quatro dias com o objetivo de manter os parasitos em fase log de crescimento. Parasitos nesta fase de crescimento em meio NNN-LIT também foram utilizados para o inóculo (5×10^5 promastigotas/mL) em um frasco contendo 10mL de meio LIT. Os parasitos foram cultivados em meio LIT por um período de 7 dias para serem utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. Considerando as possíveis alterações inerentes ao processo de cultivo *in vitro*, os parasitos com mais de 10 passagens em meio de cultura foram descartados. Isto permitiu a obtenção de formas promastigotas morfolologicamente homogêneas, garantindo também a composição antigênica dos parasitos.

Para determinar o perfil de crescimento dos parasitos no meio LIT foram feitas curvas de crescimento. Após o inóculo em meio líquido, os parasitos foram cultivados por 10 dias e, diariamente, uma alíquota da cultura foi retirada e a concentração dos parasitos determinada através da contagem em câmara de Neubauer.

*Meio NNN: 14,0g/L de Agar (Becton Dickinson); 6,0g/L de NaCl (Biotec); 10% de sangue desfibrinado de coelho.

**Meio LIT: 5,0g/L de infuso de fígado (Difco); 5,0g/L de triptose (Difco); 4,0 g/L de NaCl (Biotec); 2,0g/L de glicose (Sigma)

2.2 Preparação das formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

Parasitos de 7 dias, cultivados em meio LIT, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego), homogeneizados em vórtex à baixa rotação para desfazer os grumos. Em seguida, a suspensão foi submetida à centrifugação diferencial (25°C, 100g por 10 minutos) para remoção de contaminantes como hemácias, parasitos mortos e grumos de parasitos. Para a recuperação dos parasitos no sobrenadante, estes foram deixados em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento desprezado. Em seguida, os parasitos foram lavados 2 vezes em solução salina tamponada PBS (0,15M, 8,0g/L de NaCl, 0,2g/L de KH₂PO₄ e 1,115g/L de Na₂PO₄, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino-SFB

(Sigma Chemical Corp., St Louis, MO), por centrifugação a 4°C, 1000g por 10 minutos. O sedimento foi homogeneizado cuidadosamente. Ao final das etapas de lavagem, as promastigotas foram fixadas adicionando-se 20mL de solução fixadora (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) diluída 1:1 em PBS e mantida a 4°C. Após 24 horas foram centrifugadas a 1000g, 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10mL de PBS. Posteriormente, procedeu-se a contagem do número de parasitos e a suspensão celular foi ajustada para 5x10⁶ promastigotas/mL.

2.3 Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo

Os anticorpos reveladores utilizados nos ensaios de fluorescência por citometria de fluxo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou biotina foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St Louis, MO; o reagente secundário estreptoavidina-ficoeritrina foi obtido da SouthernBiotech Associates, Birmingham, AL. A relação dos anticorpos, sua especificidade, procedência e diluições nos ensaios estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Especificidade	Origem	Marcação	Diluição
AcP. Anti IgG	-	Fragmento Fc	Cabra	FITC	1:4000
AcM. Anti IgG ₁	8c/6-39	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:2000
AcM. Anti IgG ₂	HP-6014	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:250
AcM. Anti IgG ₃	HP-6050	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:500
AcM. Anti IgG ₄	HP-6025	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:250

AcM. = anticorpo monoclonal; AcP. = anticorpo policlonal

FITC = isotiocianato de fluoresceína

*AcM. biotinizados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) para detecção.

2.4 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo

As amostras de soros utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo foram centrifugadas a 13000g, a 4°C, por 5 minutos para remoção de partículas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliqotado e estocado a -20°C até sua utilização. No momento do uso, as amostras de soro foram descongeladas, diluídas em PBS suplementado com 3% de SFB, centrifugadas a 13000g, a 4°C por 5 minutos, e os sobrenadantes utilizados para os ensaios de citometria de fluxo.

Os ensaios de citometria de fluxo, para detecção de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, foram realizados segundo protocolo descrito por Rocha et al. (2002) com algumas modificações. Em placas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Dinamarca), foram adicionados 50µL de soro diluído (1:1.000 a 1:128.000) em PBS-3% SFB e incubados a 37°C por 30 minutos, na presença de 50µL da suspensão de parasitos fixados ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados com 200µL de PBS-3% SFB, por centrifugação a 1000g, a 4°C durante 10 minutos. Em seguida, para a revelação dos anticorpos IgG ligados aos parasitos, estes foram incubados a 37°C por 30 minutos, com 50µL de anticorpo policlonal anti-IgG humano (específico pra porção Fc) marcado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (Sigma Chemical Corp., St Louis, MO) diluído em PBS-3% SFB. Os parasitos foram novamente lavados 2 vezes e o sobrenadante desprezado.

Para a pesquisa de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), os parasitos foram incubados na presença dos soros diluídos e em seguida lavados (como descrito acima). Os parasitos foram incubados a 37°C por 30 minutos com 50µL de anticorpo anti-subclasses de IgG humano marcado com biotina, diluídos em PBS-3% SFB. Após a incubação os parasitos foram lavados 2 vezes e, em seguida, incubados com 20µL de estreptoavidina conjugada a ficoeritrina – SAPE, diluído 1:400 em PBS-3% SFB. Posteriormente, os parasitos foram novamente lavados 2 vezes e o sobrenadante desprezado.

Depois de incubados com os anticorpos reveladores e lavados, os parasitos foram ressuspensos com 200µL de solução fixadora. As amostras foram mantidas a 4°C ao abrigo da luz, por pelo menos 30 minutos, antes de ser efetuada a leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), que acontecia num período máximo de 24h após a fixação.

Para cada ensaio foi incluído um controle interno da reação, para avaliar a ligação inespecífica do anticorpo secundário. Neste controle, os parasitos foram incubados na presença dos reagentes secundários, porém, na ausência de soro. Em todas as baterias de teste foram incluídas, também, amostras de soros controles positivos e negativos para LTA.

2.5 Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a avaliação de características morfométricas e fluorescentes de células individuais. Através de um sistema ótico eletrônico é possível avaliar a emissão de fluorescência, bem como a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, possibilitando a análise de três parâmetros: tamanho (*FSC-Forward Scatter*), complexidade interna ou granulosidade (*SSC-Side Scatter*) e emissão de fluorescência.

A aquisição e análise dos dados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSort (Becton Dickinson), empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual, foram adquiridas informações relativas aos parâmetros: tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência analisando-se 5.000 parasitos. A Figura 1 mostra a distribuição característica e homogênea das formas promastigotas apresentadas em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), permitindo o posicionamento de um marcador sobre a população de interesse (R1). Esse perfil foi obtido ajustando-se os ganhos de tamanho e granulosidade, em escala log, com valores E00 e 300, respectivamente. Utilizando-se histogramas de intensidade de fluorescência em função de número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Dois tipos de anticorpos marcados foram usados nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo: anticorpos marcados com FITC ou marcados pelo sistema biotina/SAPE. Quando excitados, os anticorpos marcados com FITC, emitem fluorescência verde (FL1 - fluorescência tipo 1), enquanto anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE, emitem fluorescência laranja (FL2 - fluorescência tipo 2).

Para cada experimento, foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função de curva de fluorescência do tubo controle sem soro (M1,

Figura 1B). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 1C e D). Para cada conjunto de ensaios, o marcador M1 foi posicionado empregando o controle sem soro daquele experimento.

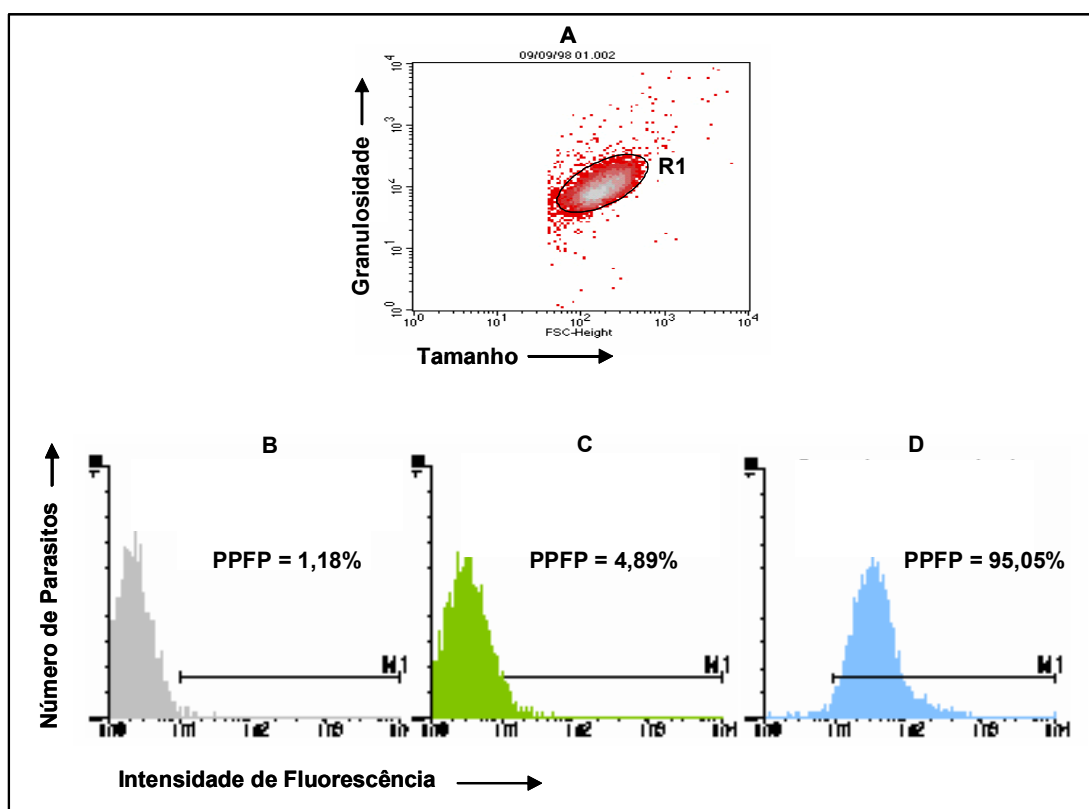


Figura 1 - Seqüência de análise de anticorpos anti-promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por citometria de fluxo. Seleção da população de formas promastigotas, em gráficos de tamanho e granulidade (A). Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) obtidos como controle da reação, sem soro (B), após a incubação com um soro negativo (C) e com soro positivo (D). O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle da reação.

3. Análise do desempenho da metodologia para o diagnóstico da LTA.

3.1 Análise da Curva ROC - *Receiver Operating Characteristic Curve*.

Para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade para o método diagnóstico avaliado foi necessária a definição de pontos de corte, ou seja, um valor que permitisse classificar os resultados do teste como positivos e negativos. Para cada ponto de corte estabelecido obtemos uma sensibilidade e uma especificidade correspondente. A definição do ponto de corte deve ser feita levando-se em conta os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos. Portanto, deve haver um contrabalanço entre a sensibilidade e a especificidade. Para os ensaios de citometria de fluxo, os pontos de corte foram definidos através da construção da *receiver operating characteristic curve* – curva ROC.

A *Receiver Operating Characteristic Curve*, conhecida como Curva ROC, foi utilizada neste estudo para determinação do ponto de corte, bem como para avaliação da acurácia global da pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis* por citometria de fluxo no diagnóstico de LTA. As curvas ROC foram obtidas utilizando-se o programa MedCalc Statistical.

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical e o complemento da especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal, para diferentes pontos de corte do teste diagnóstico avaliado. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva (ASC). A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere SWETS (1988), em função do valor da ASC podemos classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ($ASC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < ASC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < ASC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < ASC \leq 1$) e como teste perfeito ($ASC=1$).

A Figura 2 mostra uma representação esquemática de uma curva ROC na qual dois testes diagnósticos são comparados. A análise dos valores da ASC de cada teste permite-nos concluir que o teste 1 ($ASC= 0,98$) é mais eficiente que o

teste 2 (ASC= 0,78) por apresentar maior ASC, ou seja, possui uma melhor capacidade de diferenciar dois grupos (doentes e não-doentes).

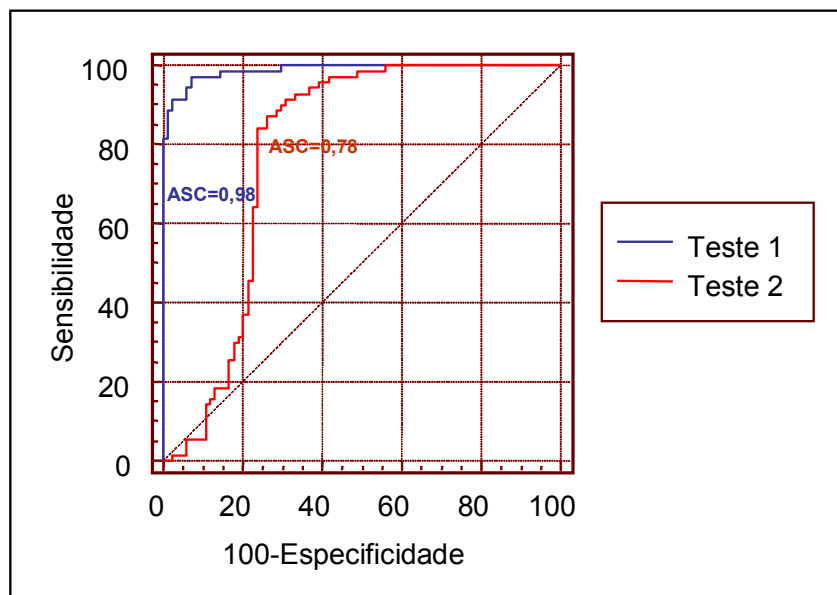


Figura 2 - Curva ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,988) e para o teste 2 (0,784).

3.2. Determinação dos índices de desempenho

Para a avaliação do desempenho da pesquisa de IgG anti-L. (L.) amazonensis, por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA, foram utilizados índices expressos em porcentagem, que foram calculados a partir da classificação dos resultados em quatro categorias de acordo com presença (LTA) ou ausência da doença (NOR). Tais categorias estão expressas na Tabela 2 e foram definidas da seguinte forma: “verdadeiros positivos” (VPos) = Pacientes portadores de LTA e teste positivo; “falso-positivo” (FPos) = indivíduos saudáveis e teste positivo; “falso negativo” (FNeg) = pacientes portadores de LTA e teste negativo; e “verdadeiro negativo” (VNeg) indivíduos saudáveis e teste negativo.

Tabela 2 - Categorias de resultados do teste avaliado em uma população que inclui pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis.

Resultado do teste		LTA		TOTAL
		Presença	Ausência	
Teste Avaliado	Positivo	<u>VPos</u> (a)	<u>FPos</u> (b)	(a+b)
	Negativo	<u>FNeg</u> (c)	<u>VNeg</u> (d)	(c+d)
TOTAL		(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Com base nesses fundamentos, tabelas similares foram preenchidas de acordo com o modelo da Tabela 2 com o número de ocorrências de cada uma das categorias (a, b, c e d). A partir dos resultados obtidos, o desempenho dos testes sorológicos foi avaliado segundo diferentes índices, incluindo sensibilidade e especificidade.

RESULTADOS

1. Padronização da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico da LTA.

Para a padronização da metodologia foram avaliadas algumas variáveis relativas à reação antígeno anticorpo, buscando desenvolver um método capaz de evidenciar diferenças de reatividade entre pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis. Inicialmente, foi determinada a concentração ideal do anticorpo anti-Fc de IgG, a diluição ideal da mistura de soros positivos e negativos para LTA, além da melhor fase de cultivo das formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

Outras variáveis, como o número de parasitos em suspensão ($2,5 \times 10^5$ promastigotas/mL), a temperatura e tempo de reação (37°C por 30 minutos) basearam-se nas condições descritas por ROCHA *et al.*, (2002).

1.1 Influência da fase de cultivo de promastigotas na pesquisa de anticorpos humanos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

A curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis* em meio LIT está representada na Figura 3. A avaliação dos dados mostrou que o parasito apresentou um crescimento da ordem de 10^7 parasitos/mL. Os parasitos apresentaram uma fase lag de crescimento até o terceiro dia, a partir do qual entraram em fase logarítmica (log) de crescimento ou fase exponencial que se estendeu até o oitavo dia de crescimento. Os parasitos entraram em declínio a partir do décimo dia de cultivo evidenciando uma fase estacionária muito curta.

Considerando as fases de crescimento do parasito em meio LIT, foi avaliada a reatividade de anticorpos IgG utilizando promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no início da fase exponencial, final da fase exponencial e fase estacionária que correspondem, respectivamente, a parasitos de 4, 7 e 9 dias de cultivo. O objetivo deste experimento foi escolher uma preparação antigênica que permitisse diferenciar a reatividade de pacientes positivos dos indivíduos negativos e que, também, permitisse obter formas promastigotas morfológicamente mais homogêneas, com um perfil de tamanho e granulosidade como observado na Figura 1A descrito em Materiais e Métodos.

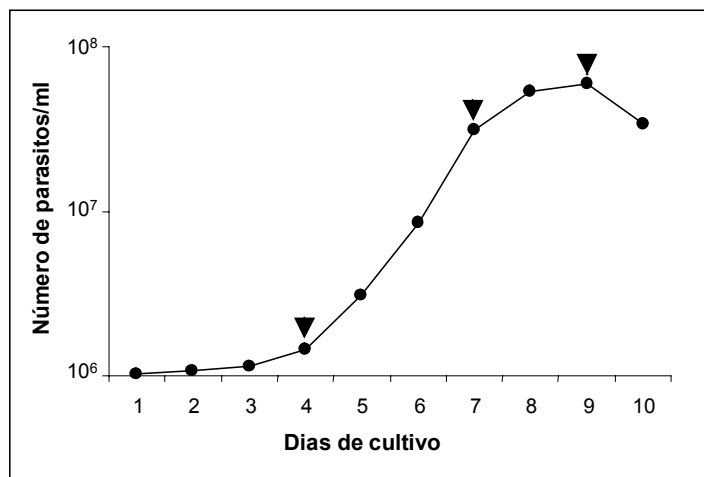


Figura 3 - Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis* (M2269) em meio LIT. Concentração inicial de parasitos na cultura foi $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia referente a dois experimentos. As setas indicam as fases de crescimento que foram analisadas neste estudo.

A Figura 4 mostra os resultados da reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, expressos em PFP, em mistura de soros de indivíduos saudáveis (NOR) e de indivíduos portadores de LTA diluídos 1:1.000 a 1:1.024.000, contra anticorpo anti-IgG diluído 1:2.000 e parasitos de 4, 7 e 9 dias de cultivo. A análise dos resultados mostrou que, independente do dia de cultura, foi observada uma maior reatividade de IgG no grupo LTA comparado com o grupo NOR. Entretanto, foi observada maior reatividade do grupo NOR quando foram utilizados parasitos de 4 dias, e menor reatividade no grupo LTA para parasitos de 9 dias. Assim, para a pesquisa de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, foi escolhido promastigotas de 7 dias de cultura.

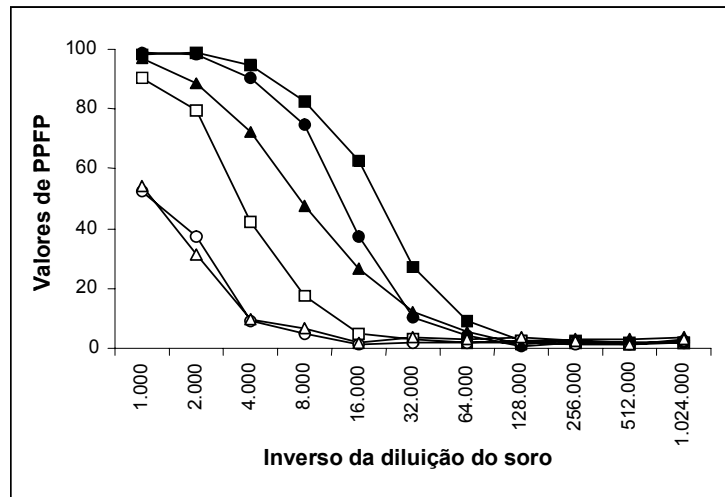


Figura 4 - Curva de titulação de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando parasitos em diferentes dias de cultivo. O gráfico representa valores de PFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos) diluídos 1:1.000 a 1:1.024.000 contra anticorpo anti-IgG diluído 1:2.000, utilizando promastigotas de 4 dias (■, □), 7 dias (●, ○) e 9 dias (▲, △).

1.2 Influência da concentração do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

A Figura 5 mostra os resultados da reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, expressos em PFP, em mistura de soros de indivíduos saudáveis (NOR) e de indivíduos portadores de LTA, utilizando-se parasitos de 7 dias de cultivo. Foram avaliadas 3 diluições do anticorpo secundário: 1:2.000, 1:4.000 e 1:8.000. A análise dos resultados mostrou que a diluição do anticorpo secundário a 1:2.000 permitiu uma boa separação das reatividades dos grupos LTA e NOR. Por sua vez, a diluição 1:4.000 levou a uma pequena diminuição na reatividade tanto no grupo LTA como no grupo NOR, não afetando a capacidade de distinguir entre os dois grupos. Já a diluição do 1:8.000 promoveu uma diminuição mais acentuada nos valores de PFP em ambos os grupos. Embora, as diluições 1:2.000 e 1:4.000 tenham apresentado resultados semelhantes, foi escolhida a diluição 1:4.000 para pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, visando reduzir o custo da metodologia.

A análise dos dados também mostrou que a faixa de diluição do soro 1:1.000 a 1:128.000 foi adequada para a realização dos ensaios, não necessitando de diluições maiores que 1:128.000.

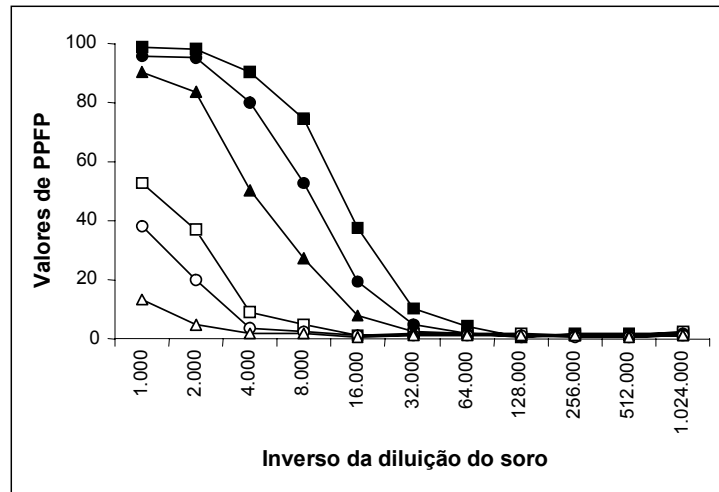


Figura 5 – Curva de titulação de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando diferentes concentrações do anticorpo anti-IgG humano diluído 1:2.000 (■, □) 1:4.000 (●, ○) e 1:8.000 (▲, △) e diferentes diluições do soro. Os resultados estão expressos como valores de PFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos).

1.3. Avaliação de reprodutibilidade do método

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da metodologia, ou seja, determinar se existe concordância dos resultados obtidos quando o teste era feito repetidas vezes, foram testadas as mesmas amostras de soros utilizando parasitos derivados de diferentes culturas, bem como, utilizando parasitos em diferentes tempos de armazenamento após serem fixados.

A Figura 6A mostra o resultado da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, expressos em PFP, em misturas de soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos NOR, utilizando parasitos derivados de culturas em diferentes passagens no meio NNN-LIT (3^a, 5^a e 10^a passagens). A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença na reatividade contra as diferentes preparações antigênicas avaliadas.

A Figura 6B mostra a reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando parasitos em diferentes dias após a fixação (5 e 30 dias). A análise dos dados demonstrou que não houve diferença na reatividade utilizando-se preparações antigênicas armazenadas até 30 dias após a fixação.

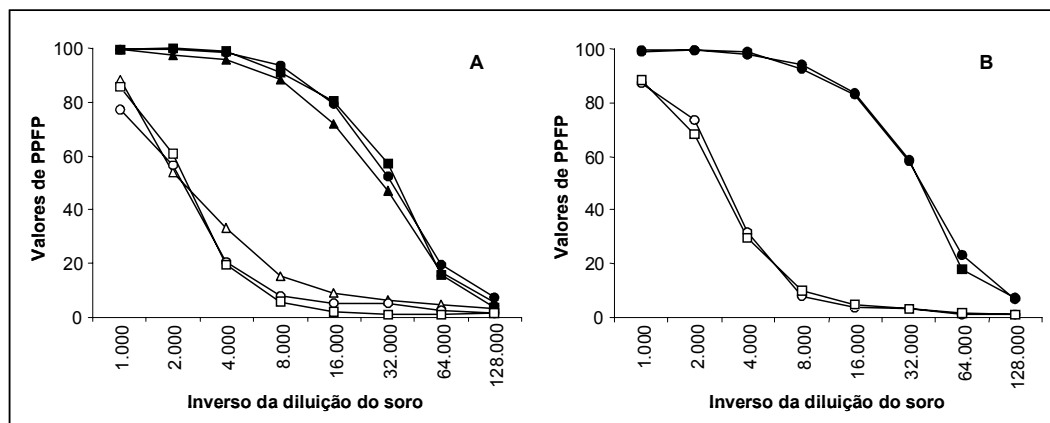


Figura 6 - Curva de titulação de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* utilizando parasitos de cultura em diferentes passagens no meio NNN-LIT (gráfico A), 3^a (■,□) 5^a (●,○) e 10^a (▲,△) passagens e parasitas em diferentes dias após a fixação (gráfico B), 5 dias (■,□) e 30 dias (●,○). Os resultados estão expressos como valores de PFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos).

1.4. Análise da reatividade de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes com LTA e de indivíduos saudáveis.

O objetivo desta etapa foi avaliar a melhor diluição do soro que permitisse segregar a reatividade entre os grupos LTA e NOR e, assim, avaliar o desempenho da metodologia para o diagnóstico da LTA.

A Figura 7A mostra a reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, expressos como valores de PFP, em misturas de soros de pacientes portadores de LTA e de indivíduos saudáveis. Através da análise da curva de titulação foi demonstrado que a diluição do soro 1:8.000 possuiu uma maior amplitude de segregação entre os grupos LTA e NOR, sugerindo esta diluição como a mais apropriada para segregar os dois grupos. As figuras 7B e 7C mostram os resultados da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* dos soros individuais de pacientes portadores de LTA e de indivíduos saudáveis, respectivamente. A análise individual dos soros confirmou a diluição 1:8.000 como a que melhor diferencia o grupo LTA do NOR.

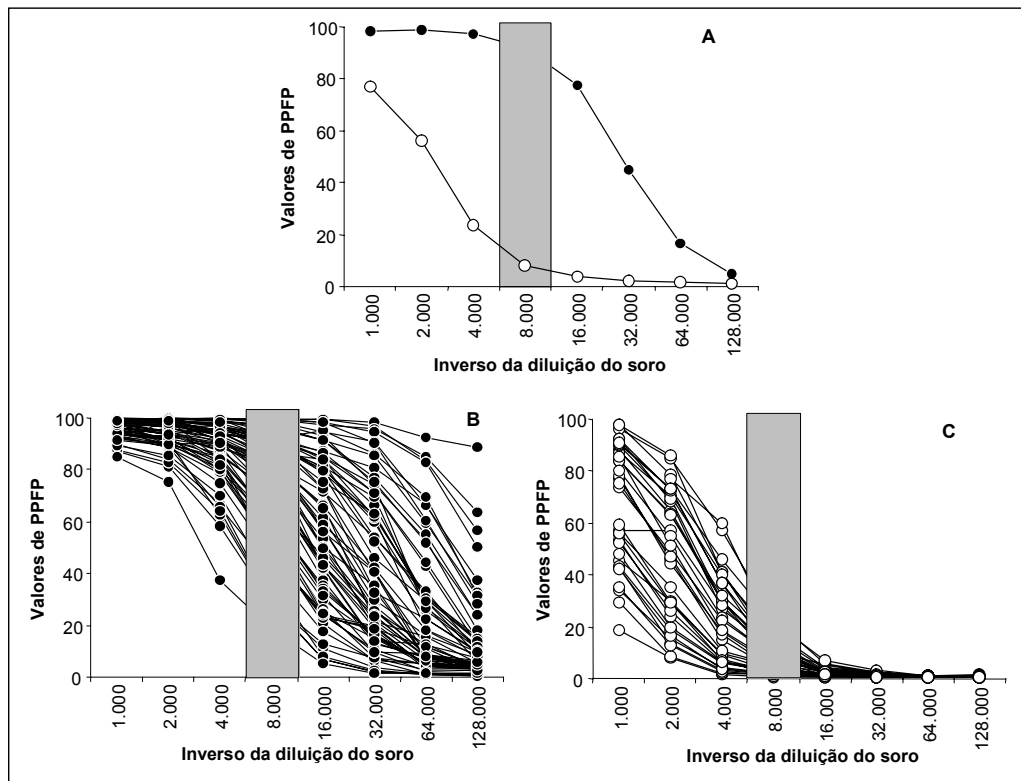


Figura 7 - Curvas de titulação de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em mistura de soros de pacientes portadores de LTA e NOR (gráfico A) e em amostras individuais de pacientes portadores de LTA e indivíduos normais, gráficos B e C, respectivamente. Os retângulos sombreados destacam a diluição que melhor segrega os dois grupos. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP.

1.5 Estudo da curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).

Os valores de PFP das amostras individuais dos grupos LTA e NOR foram utilizados para construir a curva ROC e calcular os índices de desempenho do teste. Através da construção das curvas ROC foi possível confirmar a diluição 1:8.000 como a mais apropriada para segregar os dois grupos, corroborando com os resultados obtidos anteriormente.

Como a curva ROC não permite visualizar o valor numérico do ponto de corte, foi utilizada a TG-ROC, exemplificando uma nova análise gráfica que permite visualizar todos os pontos de corte com seus respectivos índices de sensibilidade e especificidade (Figura 8). A análise da curva TG-ROC demonstrou que, na diluição do soro 1:8.000, o ponto de corte (PC) para segregação dos grupos LTA e NOR

situava entre 23% e 28%, sem variação na sensibilidade e especificidade. Com base neste achado, o ponto de corte escolhido foi 25% de PFP

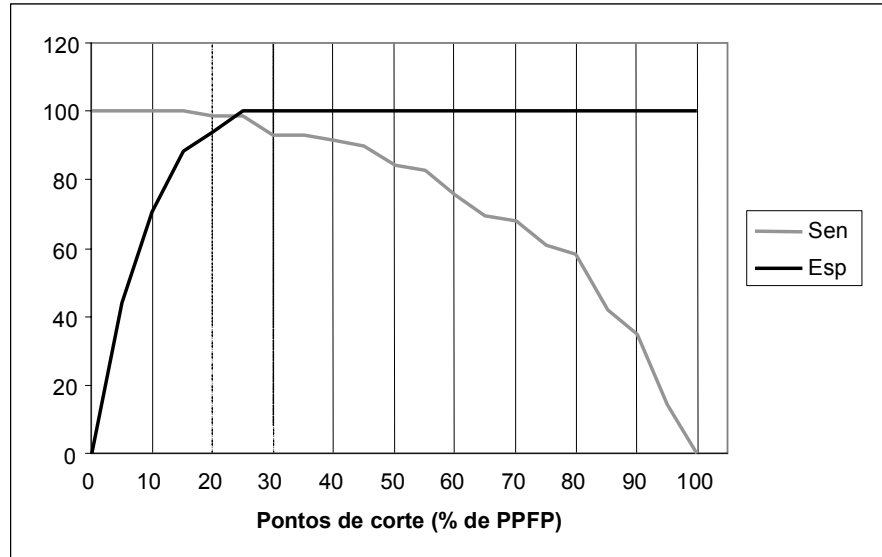


Figura 8 – Análise de TG-ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*. Sensibilidade (Sen) e especificidade (Esp) foram determinadas para cada ponto de corte (% de PFP). As linhas pontilhadas indicam a faixa de ponto de corte que permitem maior sensibilidade e especificidade do teste.

A análise do resultado da Curva ROC demonstrou que o valor da ASC foi de 0,999 ($IC_{95\%}=0,963-1,000$) para o ponto de corte de 25%. Conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 0,999 indica uma ótima eficiência da metodologia (Figura 9).

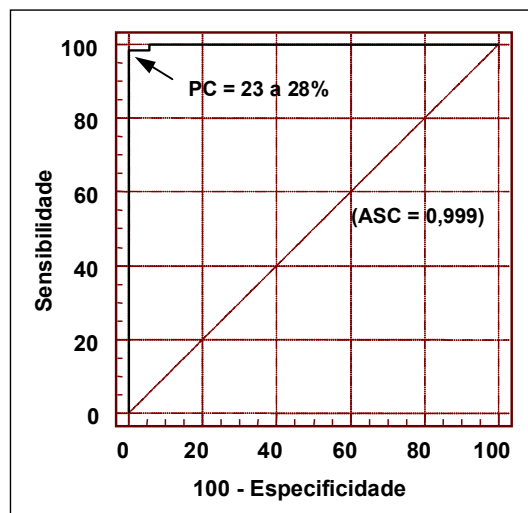


Figura 9 - Curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade). O resultado está expresso pelos pontos do gráfico que representam os valores dos índices de sensibilidade e especificidade determinando, assim, a área sob a curva (ASC=0,999). A seta representa o ponto de corte escolhido (PPFP=25%).

2. Avaliação do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).

A Figura 10 mostra a reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais dos grupos LTA e NOR. O grupo LTA foi constituído por 59 pacientes portadores de leishmaniose cutânea (LC) e por 10 pacientes com leishmaniose mucosa (LM). Empregando o ponto de corte de 25% de PPFP, foi possível identificar 99% dos portadores de LTA como positivos (PPFP>25%) e 100% dos indivíduos saudáveis como negativos (PPFP≤25%). A análise dos índices de desempenho mostrou que a metodologia apresentou um ótimo desempenho na identificação de indivíduos portadores de LTA e saudáveis.

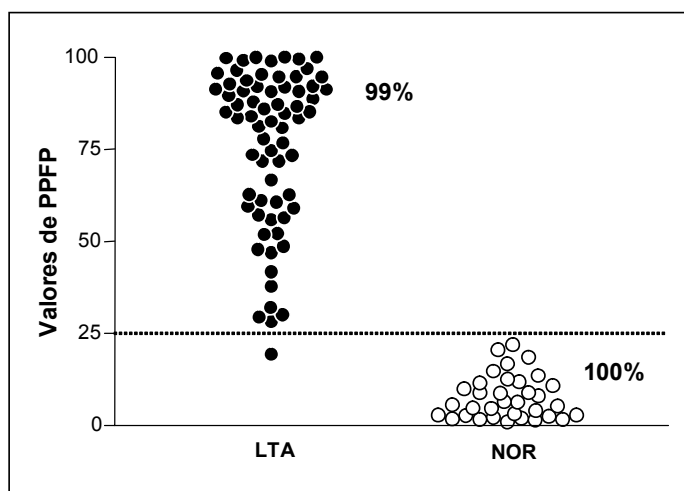


Figura 10 - Reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais de pacientes portadores de LTA (●), e NOR (○), na diluição 1:8.000. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PPFP, empregando-se, como ponto de corte, o valor de 25% (linha) entre resultados positivos (PPFP>25%) e valores negativos (PPFP≤ 25%).

A tabela 3 resume as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa de IgG anti-*L.(L.) amazonensis* com seus respectivos intervalos de confiança a 95%, utilizando como controle soros de indivíduos saudáveis.

Tabela 3 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L.(L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.

	LTA	NOR	Sen (IC 95%)	Esp (IC 95%)
IgG anti-<i>L. amazonensis</i>				
Positivo (>25%)	68	0	99%	100 %
Negativo (≤25%)	1	34	(92,2 - 99,8)	(89,6 -100)
TOTAL	69	34		

Sen = sensibilidade; Esp = especificidade.

2.1 Avaliação de reatividade cruzada em condições clínicas capazes de interferir no desempenho no método.

Amostras de soros de indivíduos portadores de diferentes doenças infecciosas foram utilizadas para avaliar a ocorrência de resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada. A Figura 11 mostra a reatividade de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em amostras individuais de soros de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (DC), hanseníase (HAN), malária (MAL), esporotricose (ESP) e LTA. A análise dos resultados demonstrou que, entre as diferentes condições clínicas avaliadas, LV e DC apresentaram valores de PFP numa região de alta reatividade. Por outro lado, metade das amostras de soros de pacientes portadores de Malária apresentou reatividade acima do ponto do corte.

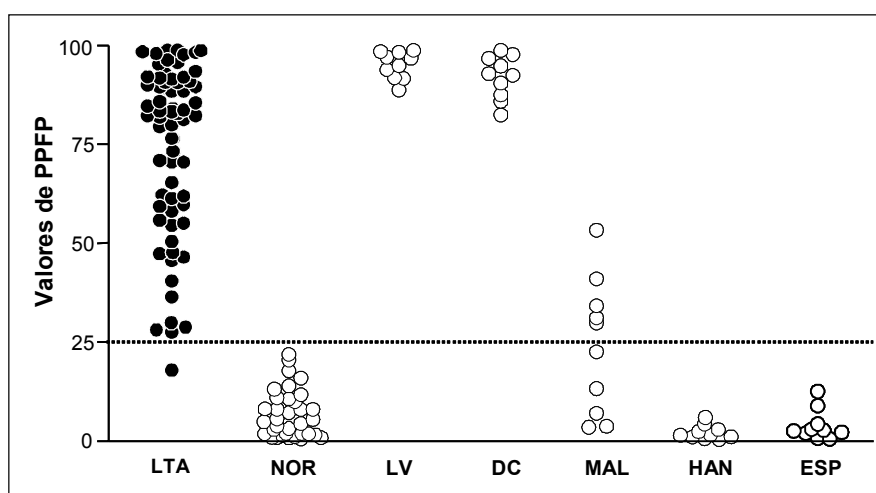


Figura 11 - Reatividade de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em amostras individuais de pacientes portadores de LTA, LV, DC, MAL, HAN, ESP e indivíduos NOR, na diluição 1:8.000. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PFP, empregando-se, como ponto de corte, um valor de 25% (linha pontilhada).

A Tabela 4 mostra as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L.(L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. A pesquisa de anticorpos IgG anti-*L.(L.) amazonensis* empregada do diagnóstico da LTA demonstrou uma sensibilidade de 99% e uma especificidade de 70%. A análise dos resultados mostra

uma perda na especificidade, atribuída a resultados falso-positivos apresentados por soros dos grupos LV, DC e MAL.

Tabela 4 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.

	LTA	NOR	CONT*	Sen (IC95%)	Esp (IC95%)
IgG anti-<i>L. amazonensis</i>					
Positivo (>25%)	68	0	25	99 %	70%
Negativo (≤25%)	1	34	25	(92,2- 99,8)	(59,3- 79,7)
TOTAL	69	34	50		

Sen = sensibilidade; Esp = especificidade.

*leishmaniose visceral, doença de Chagas, malária, hanseníase, esporotricose.

3. Padronização da pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico da LTA.

Na tentativa de diminuir a ocorrência de reatividade cruzada de soros de indivíduos portadores de LV, CH e MAL com *L. (L.) amazonensis*, avaliamos a reatividade das subclasses de IgG, buscando uma maior especificidade por parte destes anticorpos.

3.1 Influência da concentração dos anticorpos murinos anti-Fc de subclasses de IgG humano marcado com biotina na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

A Figura 12 mostra os resultados da reatividade de subclasses de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, em misturas de soros de indivíduos saudáveis e de indivíduos com LTA, utilizando diferentes diluições do anticorpo secundário. As diluições analisadas do anticorpo secundário foram 1:1.000, 1:2.000 e 1:4.000 para IgG1 e 1:250, 1:500 e 1:1.000 para as demais subclasses. Os soros foram incubados nas diluições 1:1.000 a 1:128.000 para pesquisa de anticorpos IgG1 e nas diluições 1:50

a 1:6400 para pesquisa das demais subclasses de IgG, nas condições previamente padronizadas.

A análise dos resultados da pesquisa de anticorpos IgG1 anti-L. (L.) amazonensis mostrou que, em todas as diluições do anticorpo secundário, foi possível separar os grupos LTA e NOR, sendo que as diluições do conjugado 1:1.000 e 1:2.000 mostraram-se mais reativas para o grupo LTA. Desta forma, optou-se pelo uso da diluição do conjugado 1:2.000 para os demais experimentos (Figura 12A).

Para a subclasse IgG3 a análise dos resultados mostrou que as três diluições de conjugado puderam separar as misturas de soros LTA e NOR. Optamos, porém, pela diluição 1:500 que apresentou uma alta reatividade para a mistura de soros LTA e uma baixa reatividade para a mistura de soros NOR (Figura 12C).

As subclasses IgG2 e IgG4 mostraram-se menos reativas (Figuras 12B e D). Para as duas subclasses, a diluição do anticorpo secundário que melhor distinguiu entre os grupos LTA e NOR foi 1:250, ainda assim, a reatividade de anticorpos encontrados na mistura de soros do grupo LTA diminuiu, acentuadamente, a partir da diluição 1:200 do soro LTA. Com base nestes resultados, foi avaliado o desempenho da metodologia utilizando apenas anticorpos IgG1 e IgG3.

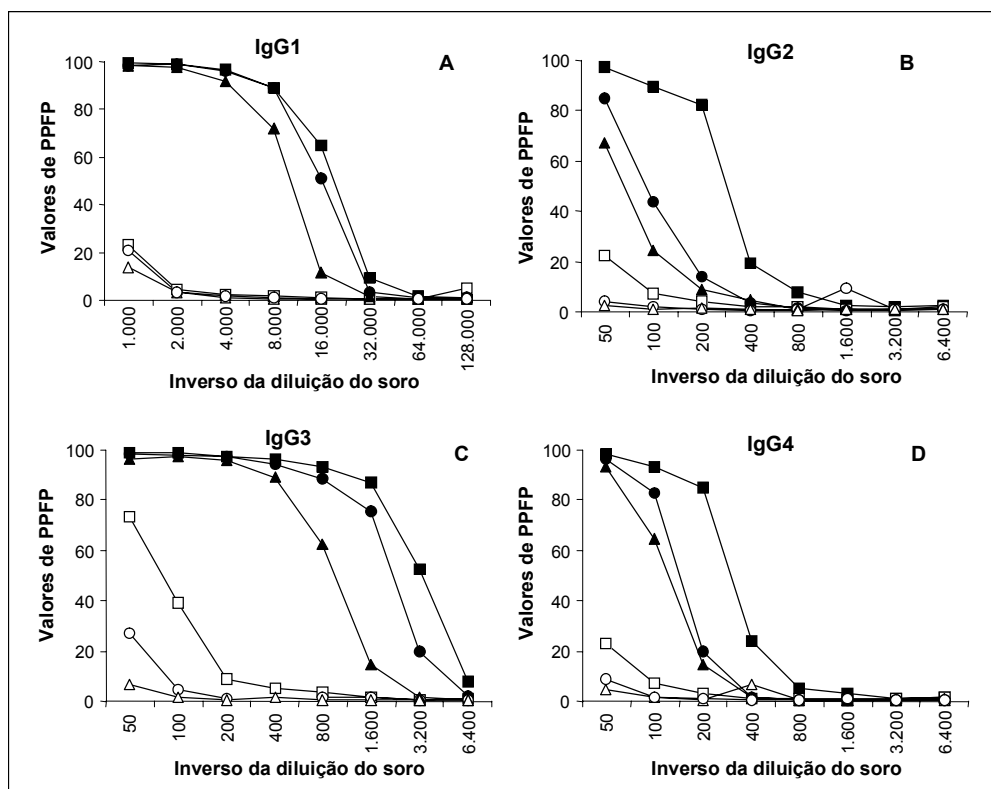


Figura 12 - Curvas de titulação de subclasses de IgG anti-*L. amazonensis* utilizando diferentes concentrações do anticorpo secundário anti- subclasses de IgG humano e diferentes diluições do soro. Os resultados estão expressos como valores de PFP de uma mistura de soros positivos (símbolos fechados) e negativos (símbolos abertos). O anticorpo secundário específico para cada subclasse foi diluído 1:1.000 (■, □) 1:2.000 (●, ○) e 1:4.000 (▲, △) para IgG1 e 1:250, 1:500 e 1:1.000 para as demais subclasse.

3.2 Análise da reatividade de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis.

A Figura 13 mostra a reatividade de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes portadores de LTA e de indivíduos saudáveis. Através da análise da curva de titulação de IgG1 foi demonstrado que a diluição do soro 1:4.000 possuiu uma maior amplitude de segregação entre os grupos LTA e NOR (Figura 13A). As figuras 13B e 13C mostram os resultados da pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais de pacientes portadores de LTA e de indivíduos NOR. A análise dos soros individuais confirmou a diluição 1:4.000 como a que discrimina entre os grupos LTA e NOR.

A análise dos resultados para IgG3 mostrou que a melhor diluição para a segregação entre os grupos LTA e NOR foi 1:200, caracterizado por uma maior

amplitude entre as curvas. As Figuras 13E e 13F mostram os resultados da pesquisa de anticorpos IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* dos soros individuais de pacientes portadores de LTA e de indivíduos NOR. A análise dos soros individuais confirmou a diluição 1:200 como a mais apropriada para discriminar entre os grupos LTA e NOR.

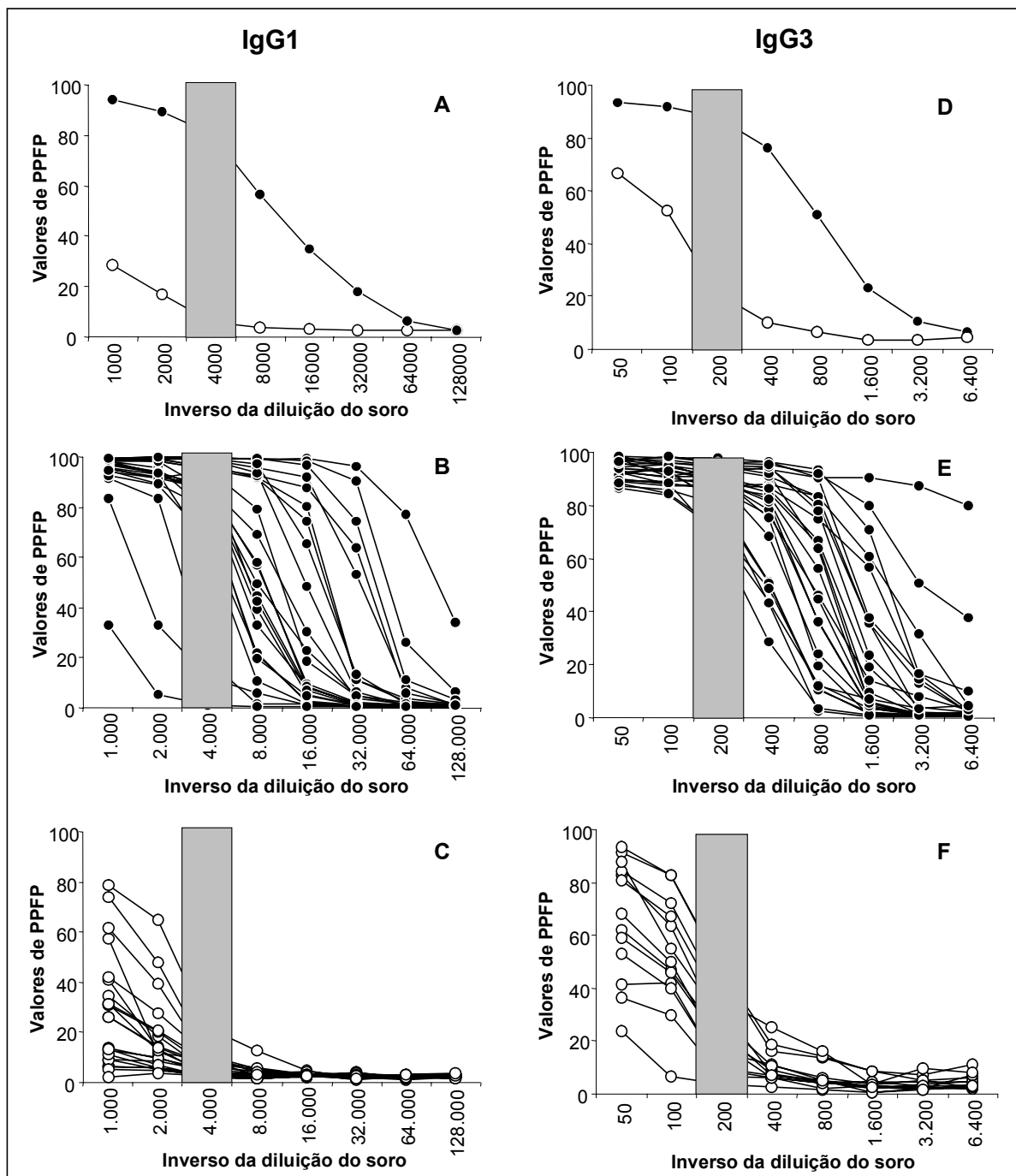


Figura 13 - Os gráficos 13A a C e 13D a F, mostram as reatividades da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis*, respectivamente, em misturas e amostras individuais de pacientes portadores de LTA (●) e NOR (○). O retângulo sombreado destaca a diluição que melhor segrega os dois grupos. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores de PPFP.

3.3 Estudo da curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em soros de pacientes portadores de LTA e indivíduos saudáveis (NOR).

O estudo da curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG1 anti-*L. (L.) amazonensis* demonstrou que, na diluição do soro 1:4.000, o ponto de corte (PC) para segregação dos grupos LTA e NOR situava entre 22% e 63% sem variação na sensibilidade e especificidade (Figura 14A). Com base neste achado, o ponto de corte escolhido foi 50% de PFP. A análise da curva ROC para a pesquisa de IgG1 anti-*L. (L.) amazonensis* indicou um valor da ASC de 0,960 (IC95% = 0,853-0,993) para o ponto de corte de 50%, indicando uma boa acurácia da metodologia

A Figura 14 B mostra a curva TG-ROC para a pesquisa de anticorpos IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* na diluição do soro 1:200, indicando um ponto de corte entre 47 e 67%. A partir destes resultados, o ponto de corte escolhido foi 50%. O estudo da curva ROC para IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* indicou um valor da ASC de 1,00 (IC95% = 1,00-0,924) para o ponto de corte de 50%, indicando uma ótima acurácia do teste .

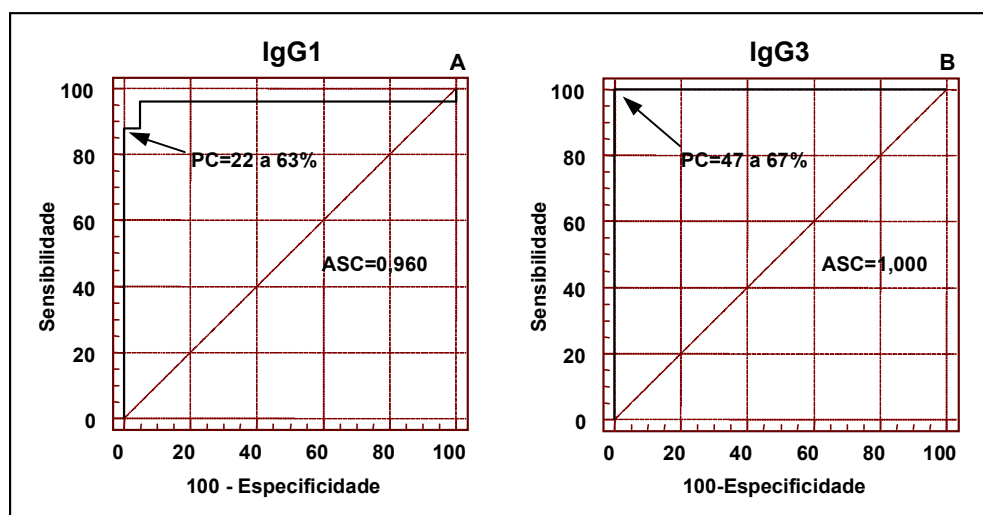


Figura 14 - Curva ROC da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 (B) anti-*L. (L.) amazonensis*, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 - especificidade). O resultado está expresso sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte para a reatividade de PFP, determinando a área sobre a curva (ASC=0,960) (A) e (ASC=1,00) (B). As setas representam as faixas de melhores pontos de corte sugeridos pela curva ROC para IgG1 e IgG3.

4. Avaliação do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, no diagnóstico da LTA.

Para avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos IgG1 e IgG3 anti- *L.(L.) amazonensis* foram utilizados 25 amostras de soros de pacientes portadores de LTA, 25 amostras de indivíduos saudáveis e 10 amostras para cada uma das seguintes condições clínicas: LV, DC e MAL.

A Figura 15 mostra a reatividade de IgG1 e IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* em amostras individuais de soros de pacientes com LTA, indivíduos saudáveis e portadores de LV, DC e MAL,. A análise dos resultados para IgG1 (Figura 15A) mostrou que foi possível identificar 88% (22/25) dos indivíduos do grupo LTA como positivos, por outro lado, 100% (25/25) dos indivíduos do grupo NOR mostraram-se negativos. Da mesma forma que o observado para IgG total, os soros dos grupos LV e DC apresentaram uma alta reatividade. Entretanto, não houve reatividade cruzada com soros de indivíduos do grupo MAL.

Com relação à pesquisa de IgG3 (Figura 15B), que foi possível identificar 100% (25/25) dos indivíduos portadores de LTA como positivos, bem como 100% (25/25) dos indivíduos saudáveis como negativos. Foi observada uma alta reatividade dos soros de indivíduos dos grupos LV e das amostras de soros do grupo DC apenas uma foi considerada negativa pelo teste. Para os soros do grupo MAL, o mesmo resultado obtido para IgG1 foi observado, ou seja, todas as amostras mostraram-se negativas.

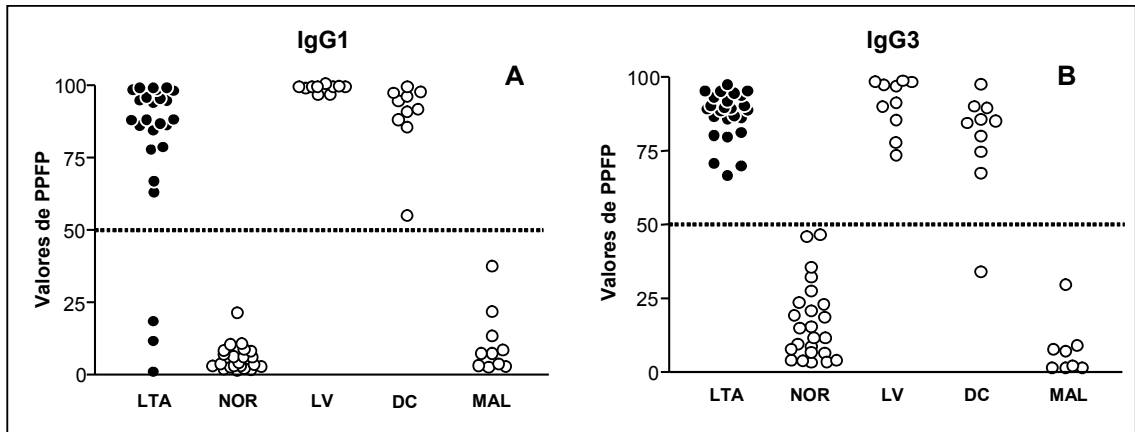


Figura 15 - Reatividade de anticorpos IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-*L. (L.) amazonensis* em soros individuais de pacientes portadores de LTA, NOR, LV, DC e MAL, na diluição 1:4.000 e 1:200, respectivamente. O resultado da reatividade de IgG1 e IgG3 para cada amostra individual está expresso como valores de PPFP, empregando-se, como ponto de corte, o valor de 50% entre resultados positivos (PPFP > 50%) e negativos (PPFP ≤ 50%).

A Tabela 5 mostra as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa de anticorpos IgG, IgG1 e IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Para análise comparativa entre o desempenho de IgG, IgG1 e IgG3, foram utilizados os mesmos soros em todos os ensaios, ou seja, 25 amostras de pacientes portadores de LTA, 25 de indivíduos saudáveis e 30 de pacientes portadores de outras infecções. A análise dos resultados mostrou uma queda de sensibilidade e um ganho em especificidade da pesquisa de IgG1 anti-*L. (L.) amazonensis* frente à pesquisa de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*. Em relação IgG3 houve ganho, tanto em sensibilidade quanto em especificidade, quando comparada com a pesquisa de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, no mesmo grupo de pacientes.

Tabela 5 – Desempenho da pesquisa de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG3 anti-*L.(L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, para o diagnóstico de LTA.

	LTA	NOR	CONT*	Sen (IC95%)	Esp (IC95%)
IgG anti- <i>L. amazonensis</i>					
Positivo (>25%)	24	0	25	96%	54,5%
Negativo (≤25%)	1	25	5	(79,6- 99,3)	(40,6- 68,0)
IgG1 anti-<i>L. amazonensis</i>					
Positivo (>50%)	22	0	20	88%	63,5%
Negativo (≤50%)	3	25	10	(68,8-97,3)	(47-74,7)
IgG3 anti-<i>L. amazonensis</i>					
Positivo (>50%)	25	0	19	100%	65%
Negativo (≤50%)	0	25	11	(86,2-100)	(50,6-77,3)

Sen = sensibilidade; Esp = especificidade.

*leishmaniose visceral, doença de Chagas, malária.

DISCUSSÃO

Com o objetivo de melhor caracterizar a participação da resposta imune humoral na LTA, diversos estudos têm focalizado a atenção na pesquisa de diferentes isotipos e subclasses de anticorpos, demonstrando assim que a resposta imune humoral também desempenha um importante papel na evolução clínica da doença (O'NEIL et al. 1993 e VALLI et al. 1999). Dentre os tópicos abordados no estudo da resposta humoral, podemos destacar aqueles que avaliam o uso de investigações sorológicas para o diagnóstico da LTA.

Em se tratando de diagnóstico, a avaliação clínico-epidemiológica, associada à pesquisa de parasitos por microscopia e/ou à IDR, é a conduta rotineiramente empregada. Contudo, como a LTA possui um amplo espectro de lesões, o diagnóstico clínico nem sempre se torna simples ou imediato. Os métodos parasitológicos, embora 100% específicos, são métodos invasivos e apresentam baixa sensibilidade (CUBA-CUBA et al. 1984; CUBA-CUBA et al. 1986; NAVIN et al. 1990). A IDR constitui um importante recurso no diagnóstico da LTA, por ser um teste simples, de baixo custo, de sensibilidade em torno de 90% (SILVEIRA et al. 1999 e FABER et al. 2003) e boa especificidade, embora haja descrição de reação cruzada com pacientes portadores de esporotricose sem histórico de LTA (BRITO et al. 2005). Além disso, o teste se torna positivo apenas em torno de três a seis semanas após o início da lesão, e não diferencia doença atual e pregressa, permanecendo positivo, na maioria das vezes, após o tratamento (DIETZE, 2003).

A utilização de métodos sorológicos, tais como a RIFI, ELISA, DAT e *Western blot*, para o diagnóstico da LTA, tem sido objeto de estudo de muitos trabalhos (MALESH et al. 1995; BRITO et al. 2000; GONÇALVES et al. 2002; HAILU, 2002, ROMERO et al. 2004), porém a utilização desses testes sorológicos no diagnóstico da LTA permanece controversa, devido à baixa sensibilidade e especificidade. Um dos fatores relacionados ao baixo desempenho dos métodos sorológicos para o diagnóstico da LTA está relacionado com os baixos títulos de anticorpos no soro destes pacientes (BRITO et al. 2000). Com o objetivo de superar estas dificuldades, vários trabalhos têm buscado desenvolver novas metodologias ou preparações antigênicas alternativas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que possam ser utilizadas para o diagnóstico seguro da LTA (GONÇALVES et al. 2002; RYAN et al. 2002; CELESTE et al. 2004).

Neste contexto, ROCHA et al. (2002 e 2006) utilizando a metodologia de imunofluorescência baseada na citometria de fluxo, descrita por MARTINS-FILHO et

al. (1995), demonstraram sua aplicabilidade na detecção de casos de LCL ativa através da pesquisa de anticorpos anti-promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*.

Dados da literatura têm mostrado que a utilização de antígenos de *L. (L.) amazonensis* para diagnóstico de LTA em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* não prejudica o desempenho da metodologia (SARAVIA et al 1998 e PEDRAS, 2003). Com base nestes achados, e considerando a dificuldade operacional de trabalhar com parasitos vivos, e o cultivo e manutenção da espécie *L. (V.) braziliensis*, neste trabalho nós avaliamos a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo, utilizando como preparação antigênica promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*.

Numa abordagem inicial, a pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis* foi padronizada considerando algumas variáveis importantes da reação antígeno-anticorpo. Inicialmente, foi avaliada a reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* em diferentes fases de crescimento em cultura, visando identificar a preparação antigênica que melhor permitiria diferenciar pacientes portadores de LTA de indivíduos saudáveis. Uma vez identificadas as fases de crescimento do parasito, e considerando a relevância do estágio de crescimento na sua composição antigênica, foram avaliados parasitos na fase exponencial, final da fase exponencial e durante a fase estacionária, correspondentes a 4, 7 e 9 dias de cultivo, respectivamente. Embora todas as preparações antigênicas testadas fossem capazes de discriminar indivíduos saudáveis de pacientes portadores de LTA, parasitos cultivados por 7 dias demonstraram uma maior diferença de reatividade entre os grupos. Além disso, esses parasitos apresentaram uma população com perfil de tamanho e granulosidade mais homogêneo.

No procedimento de padronização da diluição do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano marcado com FITC, a análise dos resultados conduziu à escolha da diluição do conjugado 1:4.000, a qual permitiu distinguir mistura de soros de pacientes com LTA de mistura de soros de indivíduos saudáveis. A diluição 1:2.000 mostrou-se também apropriada na diferenciação dos dois grupos, entretanto, optou-se pela diluição 1:4.000, que garantiria maior especificidade e redução no custo da técnica. Na diluição 1:8.000, os títulos de anticorpos decaíram rapidamente, o que poderia promover perda da sensibilidade da metodologia. Através desses

experimentos iniciais de padronização, foi possível também definir a faixa de diluição dos soros de 1:1.000 a 1:128.000 para os ensaios de titulação de anticorpos.

Outro parâmetro avaliado foi a reprodutibilidade do teste, ou seja, a determinação da concordância dos resultados quando o teste era realizado utilizando promastigotas de mesmo dia de cultivo, porém em diferentes dias após a fixação ou promastigotas de diferentes passagens em cultura. A análise dos dados demonstrou que o teste apresenta uma ótima reprodutibilidade para as condições avaliadas. Embora não tenhamos testado a utilização de parasitos fixados armazenados por mais de 30 dias, baseado na nossa experiência com este tipo de preparação antigênica, após 30 dias os parasitos poderiam apresentar autofluorescência devido a alterações provocadas pela fixação com paraformaldeído.

Uma vez padronizadas as condições metodológicas para a pesquisa de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, o próximo passo foi avaliar a aplicabilidade e o desempenho dessa metodologia no diagnóstico da LTA.

Durante a avaliação do desempenho do teste, foi possível demonstrar que todos os pacientes com LTA, com exceção de um paciente, apresentaram alta reatividade comparada à reatividade de indivíduos saudáveis, demonstrados pelos altos valores de PFP. Embora não tenha sido investigado neste presente estudo, dados da literatura sugerem que a espécie mais prevalente no Espírito Santo seja *L. (V.) braziliensis* (FALQUETO et al. 2003). Com base nestes dados podemos supor que todos os pacientes com LTA, cujos soros foram avaliados neste estudo, teriam sido infectados por essa espécie e, portanto, estariam apresentando uma alta reatividade para antígenos heterólogos, neste caso *L. (L.) amazonensis*, fato já descrito na literatura por outros autores (PEDRAS et al. 2003 e SARAVIA et al. 1998).

Apenas um dos pacientes do grupo LTA apresentou resultado negativo no teste. A avaliação dos dados clínicos deste paciente não demonstrou diferença quanto ao número e tamanho de lesões, tempo de duração da doença, reatividade no teste de Montenegro, quando comparado aos demais pacientes do grupo. Entretanto, os dados epidemiológicos relataram que o paciente poderia ter sido infectado no Estado de Rondônia, devido ao aparecimento da lesão após o paciente ter retornado de uma estada neste local. A literatura mostra a ocorrência na região amazônica de espécies de *Leishmania* que não são descritas no Espírito Santo,

como a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* (DIETZE, 2003). Com base nestes relatos, podemos supor que este paciente possa ter sido infectado por uma espécie diferente de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, o que pode ter causado a baixa reatividade frente ao antígeno utilizado no estudo.

A análise global do desempenho do teste demonstrou sensibilidade de 99% e especificidade de 100%. Embora tenha sido descrito que pacientes com LTA apresentam baixos níveis de anticorpos específicos, o que torna os métodos sorológicos pouco sensíveis (KAR, 1995), a utilização da citometria de fluxo conferiu uma alta sensibilidade à técnica de pesquisa de anticorpos anti- *L. (L.) amazonensis* descrita neste estudo.

Vários estudos têm avaliado a sensibilidade e a especificidade de diferentes metodologias para o diagnóstico sorológico da LTA. BRITO et al. (2000), em um estudo comparativo entre RIFI, ELISA e Western blot, utilizando *L. (V.) braziliensis*, demonstraram uma sensibilidade de 52%, 62% e 91%, respectivamente. Por outro lado, PEDRAS et al. (2003) avaliando o desempenho de antígenos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, demonstraram sensibilidade de 97,4% e 95% para ELISA e de 95% e 89% para a RIFI. ROMERO et al. (2004), avaliando um novo teste de ELISA baseado na detecção de anticorpos contra antígenos exógenos de *Leishmania*, encontraram uma sensibilidade de 89% para antígenos derivados de *L. mexicana*, e 71% para antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Em outro estudo, ROMERO et al. (2005) relataram uma sensibilidade de 79,6% e 71,7%, utilizando RIFI com antígeno de *L. (L.) amazonensis*, para o diagnóstico de indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, respectivamente. Entretanto, uma sensibilidade de 98% e 85% foi observada para o teste de ELISA utilizando esse mesmo antígeno. Comparado a esses achados, a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo, de forma geral, mostrou maior capacidade de detecção de pacientes portadores de LTA, como demonstrado pelos índices de sensibilidade de 94% relatado por ROCHA et al (2006) e de 99% apresentados no presente trabalho.

Baseado em dados da literatura que relatam a presença de reatividade cruzada entre leishmanioses e outras doenças infecciosas, foram testados soros de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (DC), malária (MAL), hanseníase (HAN) e esporotricose (ESP). A análise dos dados demonstrou reatividade cruzada com 100% dos soros de LV e DC e com 50% dos soros de MAL. Entretanto, 100% dos pacientes portadores de HAN e ESP, os quais

podem apresentar sinais da doença muitas vezes semelhantes a LTA, apresentaram resultados negativos para a pesquisa de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis*.

Devido a reações cruzadas com LV, DC e MAL, o desempenho do teste apresentou uma menor especificidade (70%) quando foi utilizada como controle uma população que incluía portadores dessas doenças, comparada à especificidade do teste quando foram utilizados como controle apenas soros de indivíduos saudáveis. De forma similar, ROCHA et al. (2006) relataram reatividade cruzada com 100% dos soros de pacientes portadores de LV e DC. Com relação à reatividade cruzada com soros de pacientes com Malária, não foi possível fazer uma análise comparativa, uma vez que esses autores avaliaram apenas mistura de soros e não amostras individuais. Esses achados, portanto, reforçam que embora esses autores tenham utilizado parasitas vivos na tentativa de diminuir a reatividade cruzada com LV e CH, a utilização de parasitas fixados não diminuiu o desempenho do teste, uma vez que foi encontrada a mesma reatividade descrita em nosso estudo.

Outros autores também têm demonstrado reatividade cruzada com LV e DC ao avaliarem a especificidade da ELISA, RIFI ou DOT-ELISA no diagnóstico da LTA, utilizando como antígeno *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* (PEDRAS et al. 2003, BRITO et al 2000, GUIMARÃES et al, 1986). Vale ressaltar que um grande número de trabalhos descritos na literatura não utiliza soros de pacientes com LV na avaliação da especificidade dos métodos sorológicos, dificultando assim a comparação com os nossos dados.

Visando o desenvolvimento de um teste com maior especificidade, o nosso próximo passo foi avaliar a aplicabilidade da pesquisa de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* no diagnóstico da LTA.

Inicialmente, buscamos padronizar as concentrações dos anticorpos murinos anti-Fc para cada subclasse de IgG na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis*. Para IgG1, observamos que tanto a diluição 1:1000 como 1:2000 propiciou uma alta reatividade da mistura de soro de LTA e uma baixa reatividade do grupo NOR. Contudo, a diluição selecionada foi 1:2000, buscando uma maior especificidade para a metodologia. As subclasses IgG2 e IgG4 mostraram-se pouco reativas, mesmo utilizando a diluição do anticorpo secundário 1:250; conseqüentemente, não avaliamos estas duas subclasses nos experimentos posteriores. Para a pesquisa de IgG3, embora todas as diluições do anticorpo

secundário pudessem diferenciar os grupos LTA e NOR, optamos pela diluição 1:500, que permitiu uma maior reatividade dos soros do grupo LTA e menor reatividade dos soros do grupo NOR.

A análise dos dados demonstrou maior reatividade para IgG1 seguida de IgG3 e menor reatividade para IgG2 e IgG4. Resultados semelhantes foram encontrados por diferentes autores ao avaliarem o perfil de subclasses de IgG através da técnica de ELISA com antígeno solúvel de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* (RODRIGUEZ et al. 1996, PEDRAS et al. 2003 e SOUZA et al. 2005). Por outro lado, ROCHA et al. (2006), empregando a citometria de fluxo, encontraram predomínio de IgG1 e IgG2 utilizando promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*. O uso de parasitos vivos permite a ligação de anticorpos apenas a antígenos de superfície, enquanto o uso de parasitos fixados ou antígenos solúveis permite também o reconhecimento de antígenos internos. Esse fato poderia, portanto, explicar a diferença nos perfis de reatividade de subclasses de IgG observada por esses autores, que utilizaram como antígenos parasitos vivos, ao invés de parasitos fixados ou antígenos solúveis.

Uma vez definido o perfil de subclasses anti-*L. (L.) amazonensis*, foi avaliado o desempenho de IgG1 e IgG3 no diagnóstico da LTA.

Utilizando a curva ROC, foi estabelecido o mesmo ponto de corte para IgG1 e IgG3 (PPFP=50%). A análise do desempenho do teste demonstrou que, na diluição 1:4000, a pesquisa de IgG1 foi capaz de identificar 88% dos pacientes com LTA e 100% dos indivíduos saudáveis; e que na diluição 1:200, IgG3 identificou 100% dos pacientes com LTA e 100% dos indivíduos saudáveis.

Em uma análise comparativa, avaliando os mesmos soros para todos os testes, foi observado que a pesquisa de IgG1 apresentou um menor desempenho comparada à de IgG total em relação à sensibilidade, cujos índices foram de 88% e 96%, respectivamente. IgG total e IgG1 apresentaram a mesma porcentagem de reatividade cruzada para LV e DC. Por outro lado, anticorpos IgG1 não mostraram reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de malária, o que levou a uma maior especificidade do teste com IgG1.

Com relação ao teste utilizando IgG3, ocorreu aumento da sensibilidade quando comparada a IgG total e IgG1, uma vez que IgG3 foi capaz de detectar 100% dos pacientes com LTA. Além disso, não foi encontrada reatividade cruzada com nenhum dos pacientes com MAL e com um dos pacientes com DC, o que promoveu aumento da especificidade do teste comparada a IgG total e IgG1.

Apesar da pesquisa de IgG3 anti-*L. (L.) amazonensis* ter obtido melhores índices de desempenho em relação à pesquisa de IgG total, acreditamos que esses valores não são significativos para justificar seu uso na prática de um laboratório, pois devido a sua baixa reatividade torna-se necessário o uso de maiores concentrações do anticorpo secundário, elevando o custo do teste comparado ao uso de IgG total. Além disso, a necessidade do uso do sistema avidina-biotina para a revelação de subclasses de IgG promove um acréscimo no tempo de execução da técnica.

Em suma, no presente trabalho foi possível estabelecer uma metodologia para a detecção de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) amazonensis* por citometria de fluxo. Com base no seu desempenho, podemos concluir que essa metodologia pode ser utilizada como ferramenta alternativa para o diagnóstico da LTA. Tendo em vista a reação cruzada com outras infecções, o uso desta técnica no diagnóstico da LTA em regiões endêmicas para LV, DC e MAL deve ser sempre complementar aos achados clínicos e epidemiológicos, para que seja feito o diagnóstico diferencial.

Vale ainda ressaltar que a citometria de fluxo é um método de execução rápida, de boa reprodutibilidade e isenta de variabilidade metodológica inerente ao analista. A alta sensibilidade da citometria de fluxo se deve à presença de fotomultiplicadores associada à possibilidade de avaliar maiores diluições do soro comparadas àquelas usualmente utilizadas por metodologias convencionais, que são provavelmente as principais características da metodologia proposta neste estudo. Além disso, a capacidade ajustável da citometria de fluxo de analisar um grande número de parasitas por ensaio aumenta a confiabilidade da variável proposta, PFP. Entretanto, ainda apresenta limitações, devido ao alto custo para a aquisição e manutenção do equipamento. No que se refere ao gasto de reagentes, a possibilidade de trabalhar com microtécnicas tem se mostrado uma estratégia de redução do custo final do teste. É importante ainda mencionar que vários laboratórios têm investido na aquisição de um citômetro de fluxo, o que poderá permitir no futuro a implementação desta nova metodologia.

CONCLUSÕES

1. A melhor preparação antigênica para a pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L.(L.) amazonensis*, por citometria de fluxo, foi obtida com parasitos cultivados por 7 dias em meio LIT;
2. A melhor diluição do anticorpo murino anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC na pesquisa de anticorpos IgG anti-pormastigitas fixadas de *L.(L.) amazonensis* foi 1:4000;
3. A análise do desempenho da metodologia para a pesquisa de IgG mostrou sensibilidade de 99% e especificidade de 100% quando foram avaliados como controles soros de indivíduos saudáveis;
4. A metodologia proposta apresentou reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de LV, DC e MAL, o que causou uma diminuição da especificidade para 70% quando no grupo controle foram incluídos soros de pacientes com essas infecções;
5. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada para soros de pacientes com esporotricose ou hanseníase, as quais poderiam interferir no diagnóstico da LTA;
6. As concentrações escolhidas dos anticorpos murinos anti-Fc de IgG1 e IgG3 humano, marcados com biotina, para a pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L.(L.) amazonensis* foram 1:2000 e 1:500, respectivamente;
7. A análise comparativa do desempenho da metodologia para a pesquisa de IgG, IgG1 e IgG3 mostrou sensibilidade de 96%, 88% e 100% e especificidade de 54,5%, 63% e 65% quando no grupo controle foram incluídos soros de pacientes com LV, DC e MAL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol. 1999;85(2):181-7.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 1991;44(5):536-46.

Barrett TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. Parasitol Today. 1989;5(8):255-7.

Barros GC, Sessa PA, de Mattos EA, Carias VR, Mayrink W, de Alencar JT, Falqueto A, de Jesus AC. A focus of American cutaneous leishmaniasis in the municipalities of Viana and Cariacica, State of Espírito Santo, Brazil. Rev Saúde Publica. 1985;19(2):146-53..

Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. Clin Diagn Lab Immunol. 2000;7(2):318-21.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964;12:93-100.

Carini A. Um novo caso da Leishmaniose das mucosas. Arch Soc Méd Cir S Paulo. 1912; 14:364-6

Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2004;37(11):1591-3.

Cuba Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, Roitman I, Vexenat A, de Lima LM, de Sa MH. Identification of human stocks of *Leishmania spp.* isolated from patients with mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1984;78(5):708-10.

Cuba-Cuba CA, Llanos-Cuentas EA, Marsden PD. Failure to detect circulating *Leishmania* in mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(2):346.

Cunha C. Comunicação à sessão de 28 de julho da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Bol Soc Bras Dermatol. 1912; 1:42.

De Brujin MH, Labrada LA, Smyth AJ, Santrich C, Barker DC. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. Trop Med Parasitol. 1993;44(3):201-7.

De Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TM, Conceição-Silva F, de Matos Salgueiro M, Mouta-Confort E, Reis RS, de Fatima Madeira M, Cuzzi T, Quintella LP, da Silva Passos JP, Conceição MJ, de

Almeida Marzochi MC Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. *Acta Trop.* 2005;93(1):41-7.

De Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(2):137-41.

Desjeux P. Leishmaniasis. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives.* *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-18.

Dietze, R. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Cimerman, S.; Cimerman, B. *Medicina Tropical.* São Paulo: Ateneu, 2003. cap. 6, p.85-103.

Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Knecht-Junk KJ, Hofwegen H, van der Wal AC, Kager PA. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(1):70-4.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejao JB, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Junior G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(8):1003-10.

Gomes Izabelle Teixeira. Avaliação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral humana. 2003. 34f. Monografia (conclusão de curso) – Centro de Estudos Gerais, graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2003.

Gomes Izabelle Teixeira. Desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, por citometria de fluxo, na monitoração de cura na leishmaniose visceral humana. 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2006.

Gonçalves CC, Reiche EM, De Abreu Filho BA, Silveira TG, Felizardo TC, Maia KR, Costacurta R, Padovesi EJ, Dias Filho BP, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(1):91-102.

Gontijo BA. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. 1997. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

Gontijo CM, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MC, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2002;81(2):143-50.

Gontijo B, de Carvalho Mde L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996;34(2 Pt 1):257-72.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg. 1989;41(6):687-725.

Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EA, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, Toma HK, Lima JH, Romanha AJ, Campbell DA. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. Acta Trop. 2000;74(1):89-93

Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1986;24(3):364-7.

Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;42(4):251-6.

Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VM, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;47(3):477-85.

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol. 1995;21(2):123-52.

Lainson R. Demographic changes and their influences on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demography and Vector-Borne Diseases (MW Servue, ed.). Boca Raton: CRC Press; 1989.85-106.

Machado W. Comunicação à sessão de 28 de maio da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Bol Soc Bras Dermatol. 1915; 2:25-28.

Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, Machado-Pinto J, da Costa CA, Mayrink W, Genaro O, Romanha AJ. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;54(1):37-43.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(6):859-76.

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

Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF, Cancado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. Clin Diagn Lab Immunol. 1995;2(5):569-7

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Publica*. 1994;10 Supl 2: 359-75.

Mayrink W, Williams P, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Oliveira Lima A, Michalick MS, Ferreira Carvalho E, Barros GC, et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1985;79(3):259-69.

Mengistu G, Akuffo H, Fehniger TE, Negese Y, Nilsen R. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(2):154-7.

Ministério da Saúde (MS). Fundação nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI) & Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Manual de controlo de da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 2000.

Mistério da Saúde (MS). Rede Interagencial Informações para a Saúde. Indicadores e Dados Básicos. [on line]. Brasil; 2004. [Capturado 8 junho 2006] Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2004/d0204.def>>

Motenegro J. Cutaneous Reaction in Leishmaniasis. *Archiver of Dermatology and Syphilology*. 1926; 187-194.

Navin TR, Arana FE, de Merida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42(1):36-42.

Nolle C. Nouvelles acquisition sur le Kala-azar culture; inovation auchien; etiologie – C. R. Hedd. *Scienes et Acad Sci* 1908; 146: 498-9

Novy FG, Mcneal WJ. The cultivation of *Trypanossoma brucei*: a preliminary note. *J American Med Assoc*. 1903; 41: 1266-8

O'Neil CE, Labrada M, Saravia NG. *Leishmania (Viannia) panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(2):181-8.

Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop*. 1999;72(3):251-8.

Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Goncalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6): 1819-23.

Rey, L. Complexo “*Leishmania braziliensis*” e as Leishmaníases Tegumentar Americana. In _____. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 16, p. 227-246.

Rocha RD, Gontijo CM, Eloi-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Correa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(6):551-62.

Rocha RD, Gontijo CM, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Correa-Oliveira R, Ferrari TC, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2006;11(2):156-66.

Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):2246-52.

Rodriguez V, Centeno M, Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol.* 1996;18(7):341-5.

Roffi J, Dedet JP, Desjeux P, Garre MT. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29(2):183-9.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macedo VO, Fernandes O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop.* 2001a. 22;79(3):225-9.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001b;65(5):456-65.

Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, Collins KM, Chan AS, Ryan JR. Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *J Microbiol Methods.* 2004;57(3):391-7.

Romero GA, de la Gloria Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macedo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop.* 2005;93(1):49-56.

ROSS R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med* 1903; 14:161.

Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3):1037-43.

Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. Am J Trop Med Hyg. 1990; 42(1):51-5.

Saravia NG, Holguin AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. Am J Trop Med Hyg. 1985;34(4):714-20.

Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguin AF, Navas C, Palma G, Weigle KA. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. J Infect Dis. 1989 Apr;159(4):725-35.

Silva OD. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1915; 7:213-48.

Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, Lonardoni MV, Dias ML, Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Parana State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85(4):475-6.

Silveira TG, Arraes SM, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MV, Roberto AC, Ramos M, Nerilo Sobrinho A, Ishikawa E, Shaw J. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Parana State, southern Brazil Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(4):413-23.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science. 1988;240(4857):1285-93.

Terra F. Leishmaniose tégumentaire au Brésil. Bol Soc Bras Dermatol. 1913; 2(2/3): 58-67.

Valli LC, Passos VM, Dietze R, Callahan HL, Berman JD, Grogl M. Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. J Parasitol. 1999;85(6):1076-83.

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

World Health Organization (WHO). Tropical Diseases Research. Leishmaniasis. [online]. Geneva; 2004. [capturado 7 junho 2006] Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>

Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. BMJ. 2002. 27;325 (7357):176-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)