



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI  
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA

**VALIDAÇÃO DE TESTES DE CULTURAS E MICROCULTURAS PARA O  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

TERESINA

2018

AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA

**VALIDAÇÃO DE TESTES DE CULTURAS E MICROCULTURAS PARA O  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências e Saúde, para obtenção do título de mestre.

Orientadores:

Prof<sup>a</sup> Dra. Dorcas Lamounier Costa

Prof<sup>o</sup> Carlos Henttigue Nery Costa

TERESINA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Divisão de Processos Técnicos

S586v Silva, Amanda de Andrade Gomes.  
Validação de testes de culturas e microculturas para o diagnóstico da leishmaniose visceral / Amanda de Andrade Gomes Silva. -- 2018. 94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências e Saúde, Teresina, 2018.  
“Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dorcas Lamounier Costa e Prof. Carlos Henttigue Nery Costa.”

1. Leishmaniose visceral. 2. Doenças parasitárias. 3. Técnicas de Cultura de Células. I. Título.

CDD 616.936 4

AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA

**VALIDAÇÃO DE TESTES DE CULTURAS E MICROCULTURAS PARA O  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Federal do Piauí como parte das  
exigências do Programa de Pós Graduação em  
Ciências e Saúde, para obtenção do título de  
mestre.

Orientadores:

Prof<sup>a</sup> Dra. Dorcas Lamounier Costa

Prof<sup>o</sup> Carlos Hentique Nery Costa

Trabalho aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Dorcas Lamounier Costa

Presidente

Universidade Federal do Piauí – UFPI

---

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

1º Examinador

Universidade Federal do Piauí – UFPI

---

Prof. Dr. Guilherme Loureiro Werneck

2º Examinador

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

## **DEDICATÓRIA**

**À Deus,**

Aquele que me põe de pé todos os dias e me permite sempre correr atrás dos meus sonhos.

**Aos amores da minha vida,**

Socorro, Júnior, Lia e Lis, que sempre me incentivam, me compreendem e revelam o melhor de mim.

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao **LabLeish e IDTNP** pela estrutura oferecida para a execução desta pesquisa;

Ao programa de **Pós-graduação em Ciências e Saúde**, pela oportunidade de desenvolver novos conhecimentos teóricos e práticos;

À minha querida Orientadora **Dorcas Lamounier**, pelos ensinamentos, paciência, oportunidade, confiança e generosidade em sempre compartilhar seus conhecimentos e por ser sempre uma fofa, tão carinhosa e acolhedora, me estimulando sempre o crescimento pessoal e profissional. Sinto-me infinitamente grata pelos quase três anos de convivência.

Às minhas companheiras diárias: **Viviane Cavalho, Katia Carvalho, Rebeca Mavignier e em especial Jossuely Mendes**, que me receberam de braços abertos, me deram suporte para o trabalho, tornaram o Lab uma segunda casa e compartilharam comigo bons e inesquecíveis momentos. Feliz em ter uma bela e sólida relação de confiança, amizade e companheirismo.

Aos **amigos do mestrado**, em especial Larruama, Jayne e Ana Klara que tornaram a descoberta mais leve e feliz.

Aos **amigos do LabLeish** pela convivência e aprendizado no decorrer destes anos;

Aos **funcionários do IDTNP** por serem tão solícitos, em especial aos funcionários dos procedimentos de aspiração de medula óssea e ao seu José do SAME;

Aos **meus pais**, pelo amor incondicional e incentivo para que eu sempre aprenda coisas novas.

Ao meu companheiro **Junior**, pela confiança, carinho, muita paciência e amor, por acreditar e me apoiar nos momentos difíceis desta jornada.

A família que me adotou e me permitiu ser amada por essas pequenas. Tenho por vocês um amor infinito: **Lia, Lis, Lindia e Fábio.**

Aos **amigos e familiares** em especial meu pai Gilberto e meus irmãos Bruno e Bruna, pela torcida, admiração e respeito.

SILVA, Amanda de Andrade Gomes Silva. Validação de testes de culturas e microculturas para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Universidade Federal do Piauí –UFPI, Teresina, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As leishmanioses constituem um conjunto de doenças com diferentes apresentações que incluem as leishmanioses cutânea, mucocutânea, difusa e leishmaniose visceral (LV) que é quase sempre letal se não for tratada. No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos, dos quais 96% dos casos ocorreram no Brasil. Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível. Dentre os testes utilizados para o diagnóstico da LV estão os imunológicos, moleculares e parasitológicos. **OBJETIVO:** Validar técnicas de cultivo de *Leishmania spp* para o diagnóstico parasitológico da LV. **METODOLOGIA:** Foram incluídos 101 pacientes; amostras de medula óssea foram utilizadas para a realização da pesquisa direta e cultivo de parasitas utilizando as técnicas de cultura tradicional, duas técnicas utilizando medula centrifugada e duas técnicas usando culturas em tubos de microhematócrito. O teste imunocromatográfico baseado em antígeno rK39 foi realizado em soro. Reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando medula óssea e sangue periférico. Foram calculadas sensibilidade, especificidade, acurácia, razões de verossimilhança assim como o tempo necessário para a identificação de formas promastigotas. **RESULTADOS:** O teste rápido apresentou em sensibilidade de 76,7% e especificidade de 53,3%. Para a pesquisa direta a sensibilidade foi de 66,0%. Entre os distintos métodos de culturas a sensibilidade foi de 68,8% para a cultura tradicional, de 74,0% para a cultura centrifugada 3 vezes, e também de 77,5%, para a cultura centrifugada 4 vezes; a microcultura e microcultura centrifugada apresentaram sensibilidade de 7,84% e 51,0% respectivamente. A sensibilidade para PCR em material medular foi de 90,6% e em sangue periférico de 72,2%. A especificidade de todos os exames parasitológicos foi, por definição, 100%. O tempo médio para a positividade da cultura tradicional foi de 10 dias; na cultura centrifugada 3 vezes foi 6,2 dias; para a cultura centrifugada 4 vezes foi 6 dias; na microcultura foi 4,5 dias e na microcultura modificada foi 4,2 dias. **CONCLUSÃO:** As técnicas de cultura e microcultura apresentaram sensibilidade e especificidade semelhantes à da cultura tradicional, porém apresentaram um tempo de positividade muito menor, propiciando um diagnóstico oportuno e mais precoce.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral; Doenças Parasitárias; Técnicas de Cultura de Células.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimentos após aspiração medular .....	25
Figura 2 – Manipulação do material para a criação das MIC.....	26
Figura 3 – Método para criação e monitoramento da MIC .....	27
Figura 4 – Manipulação do material para criação da CC3X .....	28
Figura 5 – Manipulação do material para criação da CC3X .....	28
Figura 6 – Método para criação e monitoramento da CC3X.....	29
Figura 7 – Manipulação do material para criação da CC4X .....	30
Figura 8 – Método para criação e monitoramento da CC4X.....	31
Figura 9 – Método para criação e monitoramento da MICMOD .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC3X	Cultura centrifugada três vezes
CC4X	Cultura Centrifugada quatro vezes
CNS	Concelho Nacional de Saúde
CT	Cultura Tradicional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E0	<i>Eppendorf 0</i>
E1	<i>Eppendorf 1</i>
E2	<i>Eppendorf 2</i>
EPD	Exame parasitológico direto
EPI's	Equipamentos de proteção individual
HIV	<i>Acquired immunodeficiency virus</i> -Vírus da imunodeficiência adquirida
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portela
LabLeish	Laboratório de Leishmanioses
<i>Leishmania spp</i>	Espécies de <i>Leishmania</i>
LV	Leishmaniose visceral
MIC	Microcultura
MICMOD	Microcultura modificada
MO	Medula óssea
MS	Ministério da Saúde
NNN	Meio Novy-MacNeal-Nicole
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PCR_MO	PCR em material de medula óssea
PCR_SP	PCR em sangue periférico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPMI 1640	Meio <i>Roswel Park Memorial Institute</i> -1640
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TR	Teste rápido
UFPI	Universidade Federal do Piauí

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Geral .....	13
2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1 Diagnóstico Clínico .....	14
3.2 Diagnósticos Sorológicos e imunológicos.....	14
3.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI.....	15
3.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA .....	15
3.2.3 Testes rápidos .....	16
3.3 Diagnóstico Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	16
3.4 Diagnóstico parasitológico .....	17
3.4.1 Microscopia Direta ou Exame Direto .....	17
3.4.2 Isolamento em meio de Cultura (in vitro) .....	18
3.4.3 Técnicas aperfeiçoadas – microculturas e técnicas modificadas.....	18
<b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
5.1 Tipo de estudo .....	22
5.2 Local do estudo.....	22
5.3 Considerações éticas.....	22
5.4 Cálculo do poder e da precisão.....	23
5.5 Etapas do processo de inclusão .....	23
5.6 Procedimentos após aspiração medular .....	24
5.7 Experimento .....	25
5.7.1 Método de microcultura (MIC) .....	25
5.7.2 Método de cultura centrifugada três vezes (CC3X) .....	27
5.7.3 Método de cultura centrifugada quatro vezes (CC4X).....	29

5.7.4 Microcultura modificada (MICMOD).....	31
5.8 Procedimentos estatísticos.....	32
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	54
ANEXO B - Procedimento Operacional Padrão (POP) para coleta de material medular para exame direto e cultura para diagnóstico de leishmaniose.....	57
ANEXO C - Procedimento Operacional Padrão (POP) de exame parasitológico direto para diagnóstico de leishmaniose visceral.....	64
ANEXO D – Procedimento Operacional Padrão (POP) para cultura tradicional para diagnóstico de leishmaniose visceral por meio do cultivo de parasitos .....	66
ANEXO E –Protocolo para PCR Convencional.....	68
ANEXO F – Procedimento Operacional Padrão (POP) para preparo de meio de cultura fase líquida.....	69
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças e Pessoas Incapacitadas de Decidir e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	72
APÊNDICE B – Questionário .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças com diferentes apresentações tendo a leishmaniose visceral (LV), a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea como as três formas principais da doença. Transmitidas pela picada de flebotomos fêmeas infectadas, sabe-se que mais de 90 espécies de flebotomos podem transmitir parasitas protozoários intracelulares obrigatórios de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A LV é a apresentação mais grave e quase sempre letal se não for tratada. A maioria das espécies que causam LV pertence ao complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* (sin. *Leishmania archibaldi*) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (LUKES *et al.*, 2007; ALVAR *et al.*, 2012; OMS, 2018a).

Dos 200 países e territórios que reportam à OMS, 97 países e territórios são endêmicos para leishmaniose. Isso inclui 65 países que são endêmicos tanto para LV quanto para LC e 10 países que são endêmicos apenas para LV (OMS, 2018b). A prevalência da LV, antes predominantemente restrita a atividades de áreas de floresta nativa, a ambientes rurais e periurbanos, apresentou mudanças importantes no padrão de transmissão, num processo de rápida urbanização nas últimas décadas. O notável crescimento populacional e econômico faz surgir novos dilemas relativos à saúde pública, que precisam de soluções urgentes. (CONTEH *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2014; WHO, 2010a, 2010b).

Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano. Em 2015 mais de 90% dos casos globais de VL foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos, dos quais 96% dos casos ocorreram no Brasil, que desde 1999 tem vivenciado um forte aumento no número de casos de LV, antes com epidemias rurais em ciclos de 10 anos, mas que agora aparece em áreas urbanas ao tornar-se endêmica em 20 Unidades Federadas (ALVAR *et al.*, 2012;; LAURENTI, 2009; OPAS/OMS, 2018; WHO, , 2018a ).

Em 2016, foram registrados 3.200 casos de LV no Brasil, com uma incidência de 4,88 e 1,55 casos por 100.000 habitantes considerando a população de áreas de transmissão e população total do país, respectivamente. Dados do Ministério da Saúde apontam que dos 27 Estados brasileiros, 21 já notificaram casos autóctones da enfermidade em humanos, principalmente nas regiões Norte, Sudeste e Nordeste, com incidência da LV do ano de 2004 a 2014 nas regiões Norte e Nordeste de 4,69 e 3,38 para cada 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2016; BRASIL, 2012; OPAS/OMS, 2018).

Os indivíduos infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* podem apresentar desde a sintomatologia leve ou assintomática até às formas graves, com alta prevalência de complicações e morte. Podem não demonstrar quaisquer sinais e sintomas da doença após a infecção, mas, em situações de redução da imunidade, evoluir com sintomatologia grave e fatal. Em 2016 foi verificada uma taxa de letalidade de 7,9% nas Américas, considerada a mais elevada quando comparada a outros continentes. Dos 26.112 casos de LV notificados no Brasil entre os anos de 2007 a 2013, 1.550 evoluíram a óbito; no Nordeste o número de casos notificados foi de 13.050, com 672 óbitos e, 2.358 casos notificados no Piauí com 92 óbitos neste mesmo intervalo de tempo (BRASIL, 2016; OPAS/OMS, 2018; SARFARAZ; NAHID, 2013).

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível, sendo o diagnóstico laboratorial essencial uma vez que a apresentação dos sinais e sintomas iniciais podem ser inespecíficos para diagnóstico clínico (BRASIL, 2006; WHO, 2010a). A confirmação da LV por meio de diagnósticos laboratoriais acurados torna-se de suma importância, também, com relação à implementação do plano terapêutico por dois motivos principais: o primeiro está relacionado aos resultados falso-negativos que podem atrasar o início do tratamento,; e o segundo está relacionado aos resultados falso-positivos que podem expor o indivíduo ao tratamento tóxico com eventos adversos graves que podem agravar a doença de base e contribuir para as complicações e a morte. (BOELAERT *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2014; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). De fato, diferentes métodos laboratoriais para diagnóstico da LV foram desenvolvidos e melhorados durante as últimas décadas. Contudo, ainda não se dispõe um teste que seja barato, altamente sensível e específico, e que possa ser facilmente implementado em áreas de transmissão endêmicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Validar duas técnicas modificadas de cultura e duas técnicas de microcultura utilizando medula óssea para o isolamento de cepas de *Leishmania spp* e diagnóstico da LV em pacientes internados em hospital de referência.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o desempenho (sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança) da pesquisa direta de formas amastigotas, das culturas de *Leishmania spp*, do teste imunocromatográfico rápido e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de LV;
- Comparar o desempenho e o tempo necessário para a identificação de formas promastigotas de *Leishmania spp* usando a técnica de cultura tradicional à técnica de cultura centrifugada 3 vezes;
- Comparar o desempenho e o tempo necessário para a identificação de formas promastigotas de *Leishmania spp* usando a técnica de cultura tradicional à técnica de cultura centrifugada 4 vezes;
- Comparar o desempenho e o tempo necessário para a identificação de formas promastigotas de *Leishmania spp* usando a técnica de cultura tradicional à técnica de microcultura;
- Comparar o desempenho e o tempo necessário para a identificação de formas promastigotas de *Leishmania spp* usando a técnica de cultura tradicional à técnica de microcultura modificada.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A LV apresenta um amplo espectro clínico e pode ser confundida com diversas patologias. Apesar dos avanços científicos, até o momento o diagnóstico de LV é realizado por uma associação de diferentes técnicas que se apoiam em parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares). Dentre os métodos laboratoriais utilizados, a falta de um teste com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença em diferentes populações acometidas constitui grande limitação para o controle da doença (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SARFAZ; NAHID, 2013; SZARGIKI *et al.*, 2009).

#### 3.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LV é complexo, pois a doença pode apresentar-se com sinais e sintomas que são comuns a outras doenças infecciosas, inflamatórias e linfoproliferativas prevalentes nas áreas onde incide a LV. Dentre os sinais e sintomas comumente encontrados pode-se citar a febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso, perda ponderal, dor abdominal em quadrante superior esquerdo. Estes sinais e sintomas, isoladamente ou em combinação, não são específicos o suficiente para diferenciar a condição de LV, malária crônica, esquistossomose e outras doenças sistêmicas (WHO, 2010b; ZIJLSTRA 2016).

#### 3.2 Diagnósticos Sorológicos e imunológicos

Os primeiros testes de imunodiagnóstico para a LV foram os testes de aldeído que, por falta de sensibilidade e especificidade foram substituído na década de 1970 pelas técnicas de reação de imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). No entanto, o diagnóstico por métodos imunológicos são considerados indicadores indiretos de infecção por *Leishmania spp*, uma vez que limitações importantes podem levar ao diagnóstico incorreto, como perda de acurácia em pacientes imunossuprimidos e reações cruzadas, especialmente com espécies filogeneticamente relacionadas, tais como em soro de pessoas com leishmaniose tegumentar americana, esquistossomose, doença de Chagas, toxoplasmose e malária (ESPIR *et al.*, 2016; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; WHO, 2010b).

Para o Ministério da Saúde (2014) e Paiva-Cavalcanti *et al.* (2015) ainda que apresentem limitações importantes, os procedimentos imunológicos continuam sendo alvos de estudo para o diagnóstico de diversas doenças parasitológicas, dentre elas a LV, com a adoção de protocolos e tecnologias de aperfeiçoamento contínuo do diagnóstico sorológico, com o intuito de garantir menores riscos de resultados falso-positivos ou falso-negativos aos pacientes nos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta e ELISA.

### 3.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* através do emprego de antígenos específicos e anticorpos secundários (anticorpos anti-imunoglobulina) conjugado com um corante fluorescente. O destaque para este teste diagnóstico diz respeito à detecção de anticorpos em pessoas assintomáticas com infecção por LV em títulos baixos. Contudo, esta técnica tem se tornado menos explorada, principalmente por causa de sua baixa especificidade, em contraste com a alta sensibilidade, incompatibilidade ou má reação entre os anticorpos secundários e primários ou do antígeno, possibilidade de reação cruzada com outras infecções parasitológicas e fúngicas, além da má adaptação para as configurações de campo (SZARGIKI *et al.*, 2009; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; WHO, 2010a).

### 3.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA

O Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA foi base para a maioria das técnicas imunológicas de detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A sensibilidade e especificidade dos testes ELISA depende do antígeno utilizado. Neste contexto, vários antígenos com pesos moleculares diferentes foram identificados para potencial utilização no diagnóstico, cada um com sensibilidade e especificidade relacionada ao antígeno utilizado. O p-ELISA utiliza um antígeno bruto ou *crude* também, para a detecção de anticorpos em uma amostra. Um teste de ELISA mais recente tem sido desenvolvido utilizando a proteína recombinante rK39 que demonstrou 100% de especificidade e 96% de sensibilidade para o diagnóstico de LV (SARFARAZ; NAHID, 2013; SRIVASTAVA *et al.*, 2013; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; ZUINARA M. *et al.*, 2012).

### 3.2.3 Testes rápidos

Na década de 1980 surgiram duas técnicas de diagnóstico que não necessitavam de laboratório qualificado e poderiam ser utilizadas com maior facilidade nas áreas com poucos recursos para o diagnóstico laboratorial de LV, que foram a aglutinação direta de promastigotas e detecção imunocromatográfica por *dip-stick* do antígeno rK39 recombinante, clonado em meados da década de 1990 (WHO, 2010b).

A detecção imunocromatográfica é conhecida atualmente por teste rápido para diagnóstico (TRD) e são definidos como dispositivos de diagnóstico livre de equipamentos, utilizados largamente hoje em dia na rotina de hospitais. A facilidade relativa ao seu uso e interpretação, bem como os resultados rápidos têm contribuído para a sua ampla aplicação, especialmente para o rastreio. Os testes rápidos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos no soro ou no sangue periférico do paciente com LV, permitindo a visualização dos resultados a olho nu (BOELAERT *et al.*, 2014; DIRO *et al.*, 2015; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; WHO, 2010b).

O antígeno rK39 é uma proteína recombinante constituída de uma sequência de 298 aminoácidos que se repetem 5,5 vezes, que foi isolada da forma amastigota do parasito, possuindo peso molecular de 32,7Kda, tornando-se uma proteína recombinante bastante utilizada para o diagnóstico da LV, embora outros antígenos recombinantes, tais como rK9, rK16, rK26 e rK28 também estejam sendo estudados. O antígeno rK39 foi usado pela primeira vez como antígeno para ensaio de ELISA, mas a sua utilização mais recente em testes rápidos imunocromatográficos, bastante utilizados no campo ou fora dos principais centros, torna-o uma técnica barata e de fácil de execução.

A utilização dos testes rápidos para o diagnóstico de possível recaída de LV em um paciente que apresenta novamente febre após cura inicial é uma de suas limitações, uma vez que os anticorpos antileishmania diminuem lentamente após o tratamento para LV, permanecendo positivo ao teste por vários meses a anos após o tratamento, não podendo ser considerado como um diagnóstico positivo verdadeiro. Em recente revisão Cochrane (2014) estimou a sensibilidade combinada do rK39-TRD em 85% e a especificidade agrupados em 91% para a região do Leste Africano (BOELAERT *et al.*, 2014; DIRO *et al.*, 2015; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SARFARAZ; NAHID, 2013; WHO, 2010b).

### 3.3 Diagnóstico Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Na década de 1990, a detecção de DNA (ácido desoxirribonucleico) do cinetoplasto de leishmania por métodos moleculares, tais como os ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) tornaram-se muito promissores. A PCR por se demonstrar uma técnica muito mais sensível, detecta o DNA do parasita no sangue ou aspirados de medula tornando-se substancialmente mais sensível que o exame microscópico. A PCR proporciona quase 100% de especificidade e sensibilidade que varia dependendo das amostras biológicas e por esse motivo detecta mais infecções assintomáticas que o exame microscópico. A desvantagem deste teste é o fato de estar restrito a hospitais de referência e centro de pesquisas, pois requer instalações laboratoriais com pessoal treinado. Entre 2011 e 2013, os protocolos de PCR convencionais para LV apresentaram variação da sensibilidade de 53,7 - 97,78% para os seres humanos e de 72,2 - 98,7% para os cães, e a especificidade variou de 61,82 - 100% para os seres humanos e 83,3 - 96,4% para os cães (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SARFARAZ; NAHID, 2013; WHO, 2010b; ZIJLSTRA, 2016).

### 3.4 Diagnóstico parasitológico

#### 3.4.1 Microscopia Direta ou Exame Direto

As técnicas parasitológicas originais, parasitológico direto e cultura tradicional (confirmação clássica para leishmaniose) são ainda utilizadas como método de referência para o diagnóstico através da demonstração do parasita. Embora a especificidade de microscopia direta seja elevada, sua sensibilidade tem variação nos aspirados de linfonodo, medula óssea e do baço com, 53-58%, 53-89%, 95-97%, respectivamente. No exame direto uma gota do material aspirado é colocada em uma das extremidades da lâmina previamente limpa, e o material firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, o esfregaço é fixado em álcool metílico e corado. Formas amastigotas do parasita podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman, Panóptico. O encontro de parasitas por meio do exame parasitológico direto depende da carga parasitária no material examinado, do número de campos observados, e da experiência do examinador. (BRASIL, 2006; SZARGIKI *et al.*, 2009; WHO, 2010; ZIJLSTRA, 2016; ZIJLSTRA; EI-HASSAN, 2001). Além disso, a precisão do exame microscópico é influenciada pela qualificação do técnico responsável pela busca, pela qualidade dos reagentes, além do tempo despendido na busca pelo parasita, como confirma Da Silva *et al.* (2005) em sua pesquisa ao afirmarem que o encontro de parasitas no

material examinado por um examinador experiente está diretamente relacionado ao tempo dedicado ao exame.

#### 3.4.2 Isolamento em meio de Cultura (in vitro)

O cultivo *in vitro* do parasita do gênero *Leishmania* nas formas promastigotas, também conhecido por macrocultivo, é realizado em tubos de ensaio a partir de amostra coletada por meio de aspiração, seja de medula, linfonodo ou baço, semeados em meios de cultura especiais. O meio de Novy, McNeal e Nicolle, designado pela sigla NNN, é o mais comumente empregado para o isolamento e cultura das espécies do gênero *Leishmania*, associado a outros meios líquidos como, por exemplo, o de Schneider. Após serem semeados, os tubos devem ser incubados a uma temperatura entre 24°C e 26°C. Esse método de isolamento do parasito apresenta por desvantagem o tempo de incubação para a apresentação das formas promastigotas, a necessidade de um ambiente com características laboratoriais com boas condições de higiene e biossegurança para o sucesso do isolamento, além da utilização de meios especiais para o cultivo do parasito, que não está amplamente disponível na maioria regiões endêmicas da doença (BAILONA, 2012; BRASIL, 2006; CASTRO, 2010; REY 2013).

#### 3.4.3 Técnicas aperfeiçoadas – microculturas e técnicas modificadas

Allahverdiyev *et al.* (2004) desenvolveram uma nova técnica de cultura utilizando tubos microcapilares como método para o cultivo. O ensaio foi realizado utilizando amostras de pele de pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea, com base na teoria de que os tubos capilares alcançam condições microaerofílicas durante a cultura do parasita, o que facilita a transformação das amastigotas em promastigotas. Entende-se por condições microaerofílicas um ambiente em que ocorre um aumento da  $PCO_2$  e uma redução da  $PO_2$ , que favoreça a sobrevivência de promastigotas e tem efeitos regulatórios sobre o metabolismo da glicose em promastigotas. Dentre as vantagens deste ensaio destaca-se a utilização de menores quantidades de amostras e de meios de cultura, levando a uma redução de custos, aumento da sensibilidade, mesmo quando a carga parasitária é baixa e diminuição do tempo de cultivo comparado à técnica tradicional de cultura.

Para o ensaio de Allahverdiyev *et al.* (2004) foram utilizados três meios líquidos diferentes: RPMI, NNN e Scheneider's, nos tubos convencionais com a técnica de cultura

tradicional como controle e nos tubos capilares de micro-hematócritos, chamada de método de microcultura (MMC). A técnica tradicional de cultura apresentou sensibilidade entre 19,1% e 96,6% enquanto a microcultura apresentou sensibilidade de 83,3% a 100%, mostrando-se mais sensível em todos os grupos estudados, com resultados mais rápidos, em média de 4-7 dias.

Para o diagnóstico de LV utilizando a técnica de microcultura, Allahverdiyev *et al.* (2005) realizaram um estudo com amostras de sangue periférico e de medula óssea de pacientes com suspeita de LV, comparando o método de cultura tradicional (MCT) e o método de microcultura (MMC). O ensaio foi realizado em tubos microcapilares utilizando três meios de cultivo para a microcultura e para a técnica tradicional de cultura com interação destes com o NNN.

Neste estudo os autores alcançaram um período de incubação mais curto, em média de 2-7 dias com o MMC, em oposição a 4-35 dias no MCT. O MMC foi sensível para todos os grupos independentes de meios de densidade e de cultura. Além disso, este estudo tentou substituir a medula óssea por sangue periférico, como a amostra de escolha para a detecção de promastigotas devido à sua natureza menos invasiva, que devido à baixa carga parasitária em circulação no sangue periférico, tornou-se mais difícil o crescimento (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2005).

Hide *et al.* (2007) desenvolveram a técnica de microcultura em microplacas de 96 poços para o isolamento de parasitas a partir do sangue periférico de 19 pacientes. Como controle do estudo o inoculo nas microplacas também foi realizado utilizando aspirado esplênico. A cultura a partir do aspirado de baço foi mais rápido em comparação a do sangue periférico, 5-10 dias e 7-20 dias, respectivamente. Os cientistas concluíram que, enquanto eles obtiveram resultados importantes, MMC deve ainda ser usada como uma ferramenta de diagnóstico complementar e que os resultados negativos devem ser confirmados por testes adicionais com maior sensibilidade.

Utilizando protocolo e amostras semelhantes à de Allahverdiyev *et al.* (2005) e Boggild *et al.* (2007) realizaram um ensaio utilizando tubos capilares com capacidade para 70 $\mu$ L e um meio líquido de fase única (RPMI) para alcançar maior sensibilidade e menor tempo de incubação, mesmo a baixa parasitemia, e, a técnica tradicional de cultura como controle, sendo realizado uma duplicata, um tubo contendo meio NNN e o outro RPMI. A técnica de microcultura apresentou 71,7% de sensibilidade e a técnica tradicional apresentou 54,7% de sensibilidade quando utilizado o meio NNN e 35,85 quando utilizado o meio RPMI para cultivo.

Em 2010, Gutierres avaliou a viabilidade da técnica de microcultura para o crescimento primário de *Leishmania spp*, utilizando amostras de cães de um centro de zoonoses, e comparou à técnica de cultura tradicional, às técnicas sorológicas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose canina e o exame direto. A microcultura apresentou maior positividade que a cultura tradicional, que o teste sorológico e o exame direto.

Pagheh *et al.* (2014) criaram um método de microcultura melhorado, não invasiva, utilizando raspagem das lesões para o diagnóstico de leishmaniose cutânea. Esse método foi comparado ao esfregaço e a PCR, com sensibilidade e especificidade, 98,4% e 100%, respectivamente na microcultura, 88,8% de sensibilidade e 100,0% de especificidade no esfregaço e 100% de sensibilidade e especificidade para a PCR.

Embora a identificação de leishmania em tecidos seja o método diagnóstico conclusivo em pacientes com leishmaniose visceral, a pesquisa direta de leishmania apresenta sensibilidade baixa e a cultura de leishmania é um processo lento, onde a positividade pode demorar algumas semanas. Assim, este estudo pretende validar duas técnicas modificadas de cultura e duas técnicas de microcultura para o isolamento de cepas de *Leishmania spp* e diagnóstico da LV, a fim de demonstrar a importância de um diagnóstico acurado, mais rápido, com baixos custos e boa reprodutibilidade.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A LV apresenta manifestações clínicas pouco específicas, semelhantes a muitas outras doenças (malária crônica, esquistossomose e outras infecções sistêmicas), não sendo a clínica, sozinha, capaz de firmar diagnóstico na maioria dos casos, tornando-se necessária a realização de exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico e identificar indivíduos que necessitam de tratamento. Os testes sorológicos, dentre eles o teste imunocromatográfico com antígenos recombinantes, foram um grande avanço para o diagnóstico da leishmaniose, porém possuem sensibilidade e especificidade limitadas (cerca de 85%) o que pode implicar em resultados falso positivos ou falsos negativos e por sua vez interferir no tratamento de uma doença potencialmente letal. As técnicas moleculares (como por exemplo a Reação em Cadeia da Polimerase) são caras e inacessíveis em muitas regiões onde a doença é endêmica. A pesquisa direta de *Leishmania spp* é um excelente método para diagnóstico, porém depende de profissionais capacitados e muito tempo dedicado à busca microscópica do parasito, além de apresentar limitações quando a busca ocorre em medula óssea com parasitismo reduzido podendo resultar em diagnósticos falsos negativos. O método de cultura tradicional é o método diagnóstico que apresenta maior sensibilidade, contudo o tempo decorrido desde a semeadura até à identificação das formas promastigotas pode variar de 4 a 35 dias, período de espera demasiadamente longo em se tratando de doença grave que rapidamente pode evoluir para complicações clínicas e morte. Este estudo tem o objetivo de validar a cultura centrifugada 3 vezes, a cultura centrifugada 4 vezes, a microcultura e a microcultura modificada para o diagnóstico da LV. Estes podem revelar-se mais simples, rápidos, sensíveis e com prazos para resultados muito menores, que poderão ajudar a elucidar o diagnóstico dos pacientes em um período de tempo mais curto do que é exigido pelas atuais técnicas de cultura.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo transversal.

### 5.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP) em Teresina - Piauí, hospital geral da Secretaria de Saúde do Estado conveniado com a Universidade Federal do Piauí (UFPI). O IDTNP é referência em doenças infecciosas e parasitárias para o Piauí e para estados vizinhos, tem capacidade de 137 leitos sendo 23 deles destinados a pediatria. Dispõe de serviços de pronto atendimento para doenças infecciosas, unidade de terapia intensiva e serviços de ambulatório especializado em infectologia. Possui laboratório de análises clínicas com serviços de microbiologia, micologia e parasitologia. O laboratório de leishmanioses (LabLeish) é um laboratório de pesquisa vinculado à UFPI com sede no IDTNP e está capacitado a realizar técnicas de entomologia, parasitologia, sorologia e biologia molecular.

Aproximadamente 400 pacientes com LV são admitidos anualmente no IDTNP, o que representa 90% dos casos notificados no Estado. Destes pacientes, aproximadamente a metade provem de outros estados da federação, especialmente o Maranhão. Os pacientes procedentes do Piauí são residentes nos diversos municípios e apenas uma pequena parcela provém da capital, Teresina.

### 5.3 Considerações éticas

O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS 466/12 (BRASIL, 2012) que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos, da resolução CNS 347/05 que trata da análise e condução ética de projetos de pesquisa que envolvam armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores (BRASIL, 2005) e das recomendações clínicas para a redução da letalidade da LV no Brasil, que trata do diagnóstico e tratamento da LV no Brasil (BRASIL, 2011).

O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFPI sob o título “Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da LV”, e recebeu o número de cadastro CAAE 61618416.8.0000.5214 (ANEXO A).

Todos os participantes ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE (APÊNDICE A) e responderam ao questionário da pesquisa (APÊNDICE B)

#### 5.4 Cálculo do poder e da precisão

Para o cálculo amostral, assumiu-se a sensibilidade da cultura seria de 90% e que a prevalência de leishmaniose em pessoas com febre e esplenomegalia no hospital seria de 20%. Para que o erro marginal máximo não fosse superior a 7%, com nível de confiança de 95%, seria necessário incluir 186 pessoas com febre e esplenomegalia neste estudo.

Contudo, durante o desenvolvimento do estudo, verificou-se que a prevalência de leishmaniose em pessoas com febre e esplenomegalia no hospital foi 50% e que a sensibilidade da cultura para *Leishmania* no LabLeish era 74% em estudo pregresso (COSTA, 2009), de forma que a população amostral constituída por 101 participantes seria suficiente para encontrar sensibilidade das novas técnicas não inferior à sensibilidade da técnica de cultura tradicional com nível de confiança de 95% e precisão absoluta de 10%.

#### 5.5 Etapas do processo de inclusão

A população fonte foi constituída por todos os pacientes admitidos no IDTNP com sinais e sintomas sugestivos de LV como: esplenomegalia, febre, palidez, pancitopenia e emagrecimento, e com indicação de punção de medula óssea para confirmação laboratorial do diagnóstico de LV pelo médico assistente; nenhum exame laboratorial foi solicitado com o objetivo único da pesquisa.

Foi considerado caso suspeito de LV as pessoas que apresentassem febre há mais de 7 dias associada a esplenomegalia. Foi considerado um caso confirmado de LV os participantes que foram considerados casos suspeitos, confirmados por método parasitológico, a saber, visualização direta de parasitos em amostras de tecido ou em meios de cultura ou pela detecção de ácido desoxirribonucléico (DNA) em amostras de medula óssea ou sangue. Os testes sorológicos que detectam antígenos do parasito ou anticorpos antileishmania, como os testes imunocromatográficos não foram considerados com a finalidade de confirmação

laboratorial do caso suspeito. Os critérios clínicos epidemiológicos que, para o Ministério da Saúde referem-se a pacientes clinicamente suspeitos sem confirmação laboratorial, provenientes de área com transmissão de LV, mas com resposta favorável ao tratamento específico, também não foram considerados para a confirmação diagnóstica neste estudo (BRASIL, 2011).

Como rotina adotada pelo IDTNP durante o período da pesquisa, participantes com hipótese de LV foram submetidos ao teste imunocromatográfico (TR) para calazar (DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup>) e à triagem para o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) através do teste rápido (HIV TRI LINE- Quibasa Quimica Básica LTDA, Belo Horizonte-MG, BRA; ou, TR DPP<sup>®</sup> HIV 1/2 – Bio-Manguinhos | Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, BRA). Ainda que rotina adotada pelo IDTNP, não foi possível realizar o TR para calazar de alguns pacientes por indisponibilidade de TR na rede pública do SUS.

#### 5.6 Procedimentos após aspiração medular

A punção aspirativa de medula óssea para a pesquisa direta e para cultura de *Leishmania* foi realizada por indicação do médico assistente. O procedimento foi realizado por médico seguindo os procedimentos operacionais padrão do IDTNP (ANEXO B).

Aproximadamente 200 µL de MO aspiradas sem anticoagulante foram usadas para o preparo de quatro extensões em lâminas, que posteriormente foram coradas com o corante panótico seguindo as orientações do fabricante e examinadas em microscópio, como já estabelecido em rotina pelo LabLeish para o EPD (ANEXO C). (Figura 1)

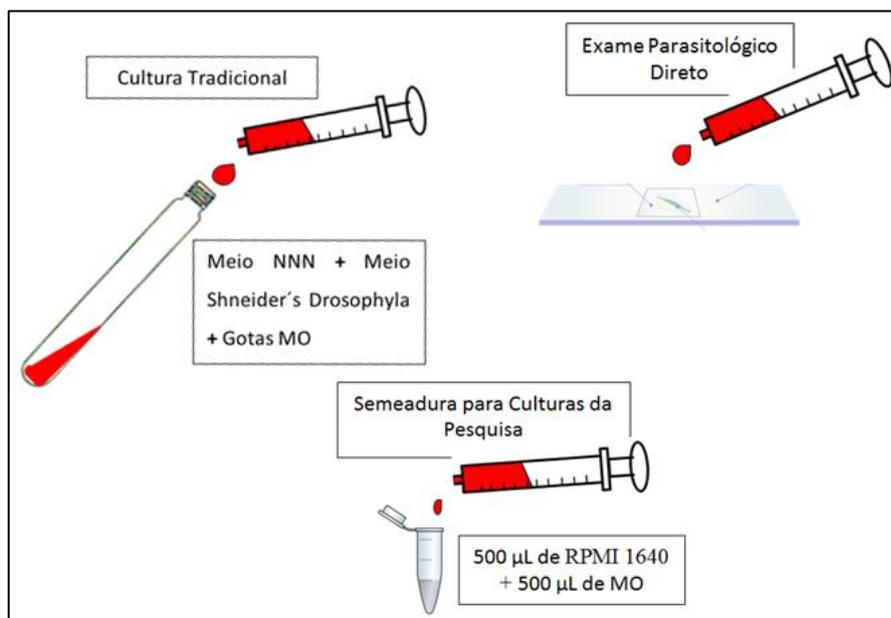
A MO sem anticoagulante (150 µL) também foi utilizada para a semeadura dos parasitos através do método de CT em meio Novy-MacNeal-Nicole (NNN) e meio Shneider's *Drosophila*, de acordo com rotina estabelecida no LabLeish para cultivo de parasitos (ANEXO D). (Figura 1)

A amostra de MO heparinizada foi usada para os procedimentos de microcultura e culturas modificadas de *Leishmania*. Foi adicionado 500 µL de MO heparinizada a um *ependorf* estéril (E0) contendo 500 µL de meio RPMI 1640 suplementado com urina humana estéril, soro fetal bovino, penicilina ou estreptomicina e gentamicina, seguindo o protocolo estabelecido no LabLeish (ANEXO F) (Figura 1).

Uma alíquota de aproximadamente 200 µL da MO heparinizada coletada e uma amostra de sangue periférico foram congeladas e armazenadas (ANEXO B), para a eventual necessidade de realizar outros procedimentos, como por exemplo para a PCR (ANEXO E).

Nesta pesquisa a extração de DNA para PCR foi realizada em sangue periférico quando as amostras de MO apresentaram quantidades insuficientes para manipulação, ou quando a amostra se apresentou inviável para extração de DNA, ou quando a quantificação de DNA foi insuficiente para a realização da PCR.

Figura 1 – Procedimentos após aspiração medular



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

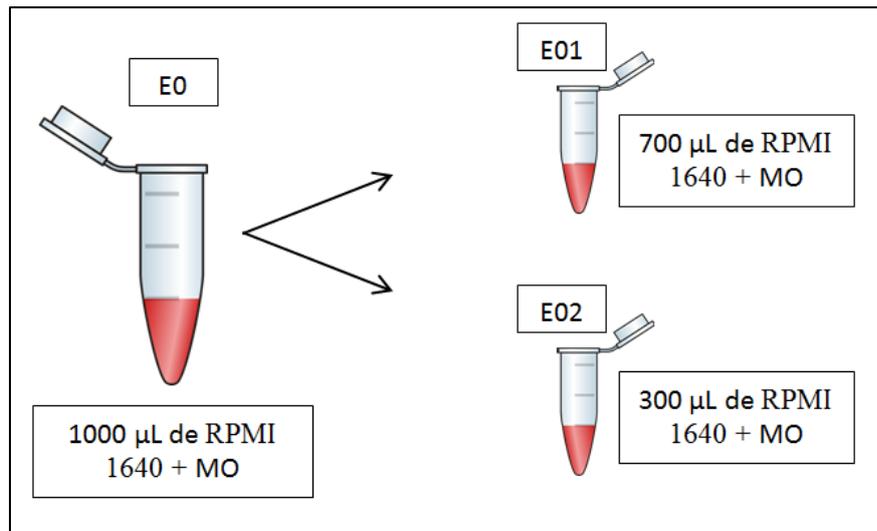
## 5.7 Experimento

As técnicas utilizadas nesta pesquisa são uma adaptação da pesquisa realizada por ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* (2004).

### 5.7.1 Método de microcultura (MIC)

Em capela de fluxo laminar e utilizando os equipamentos de proteção individual (EPI's) indicados, 300 µL da solução contendo MO heparinizada + RPMI 1640 suplementado foi retirada do E0 e, reservada em segundo eppendorf estéril (E02) (Figura 2).

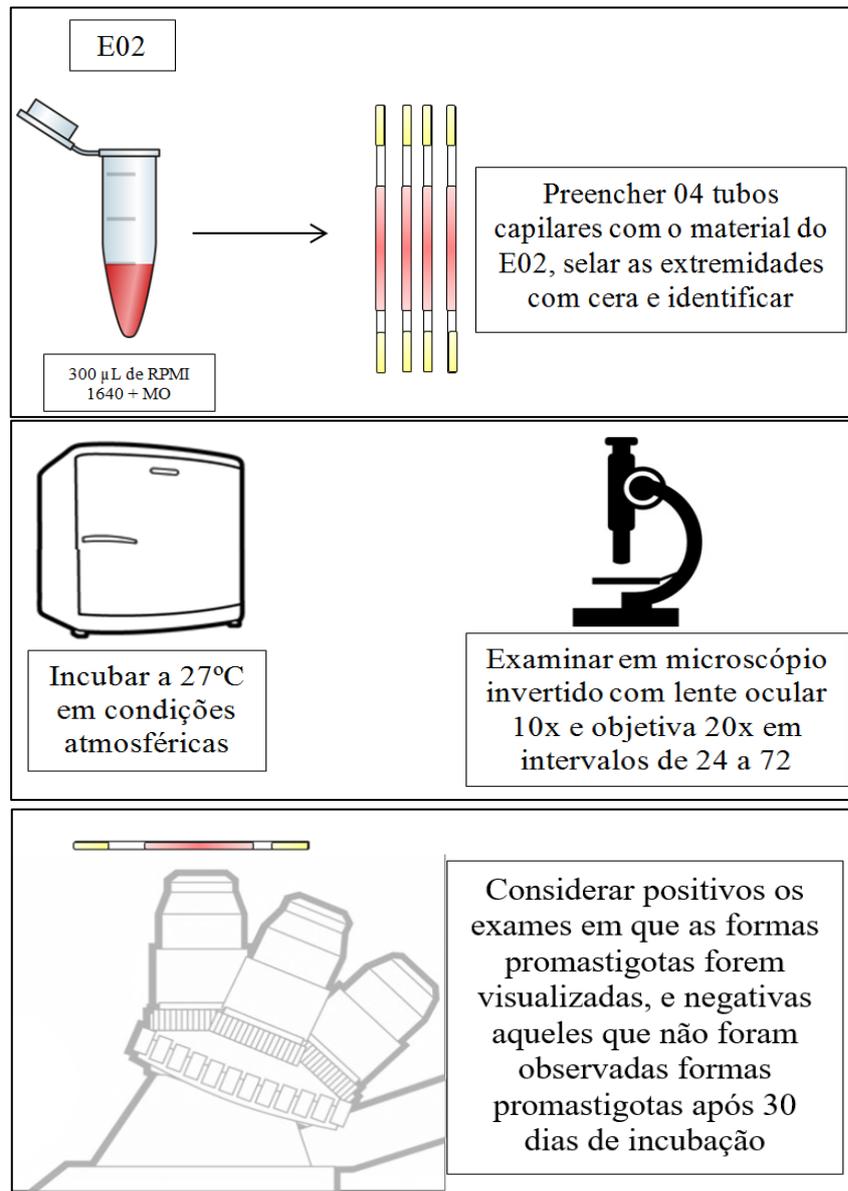
Figura 2 – Manipulação do material para a obtenção das MIC



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

Quatro tubos capilares de micro-hematócritos foram preenchidos com 25-50 µL da solução reservados no E02. Os tubos foram posteriormente selados com parafina, identificados e incubados a 27 °C em condições atmosféricas. Em microscópio invertido cada microtubo foi colocado diretamente sobre a platina e examinado utilizando lente ocular 10x e objetiva 20x em intervalos de 24 a 72 horas. Foram considerados exames positivos aqueles cujas formas promastigotas foram visualizadas, e exames negativos aqueles cujas formas promastigotas não foram visualizadas após 30 dias de incubação. (Figura 3)

Figura 3 – Método para obtenção e monitoramento da MIC

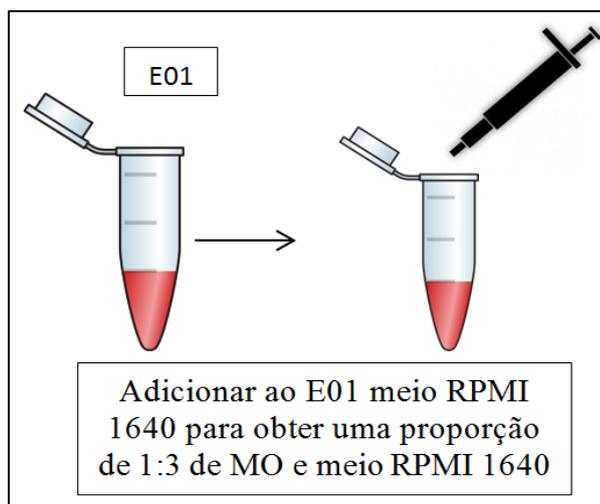


**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

### 5.7.2 Método de cultura centrifugada três vezes (CC3X)

Ainda em capela de fluxo laminar foi acrescentado meio RPMI 1640 ao E1, em uma quantidade necessária para obter a proporção 1:3 de MO heparinizada e RPMI 1640 suplementado. (Figura 4)

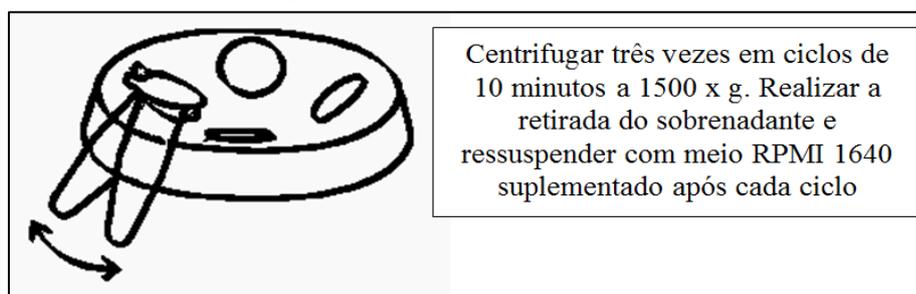
Figura 4 – Manipulação do material para obtenção da CC3X



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

Após a adição de RPMI 1640, a solução (RPMI 1640 + MO) foi lavada três vezes em centrifugação durante 10 minutos a 1500 x g. Após a terceira lavagem o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensão em meio RPMI 1640. (Figura 5)

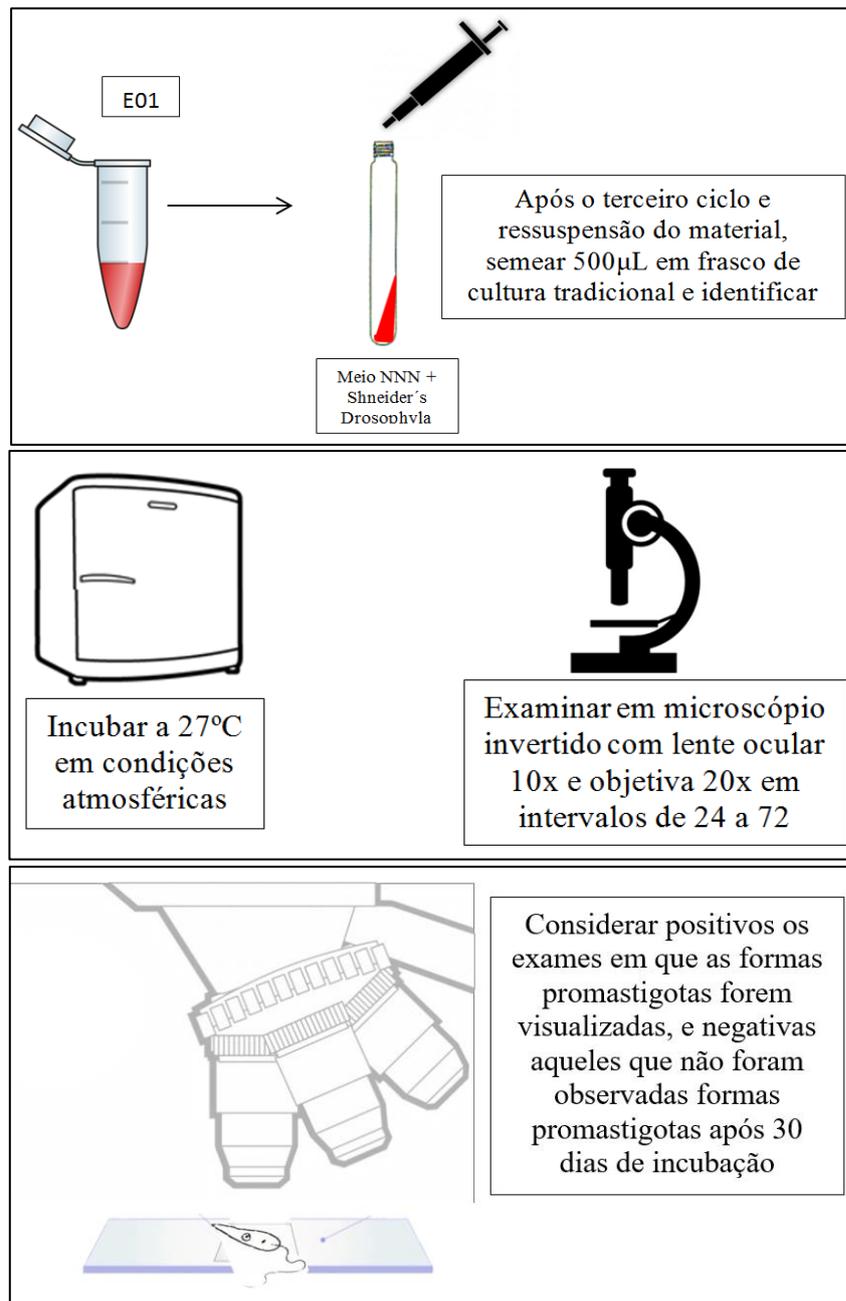
Figura 5 – Manipulação do material para obtenção da CC3X



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

Após a ressuspensão em meio RPMI 1640, 500  $\mu$ L da solução foi retirada do E01 e adicionada ao tubo (T01) contendo o meio de cultura utilizado na CT de acordo com o protocolo do Lableish (ANEXO D). O T01 foi incubado a 27 °C em condições atmosféricas e examinado em microscópio óptico com lente ocular 10x e objetiva 20x, utilizando lamina e lamínulas, em intervalos de 24 a 72 horas. Foram considerados positivos os exames cujas formas promastigotas foram visualizadas, e consideradas negativas o exame cujas formas promastigotas não foram visualizadas após 30 dias de incubação. (Figura 6)

Figura 6 – Método para obtenção e monitoramento da CC3X

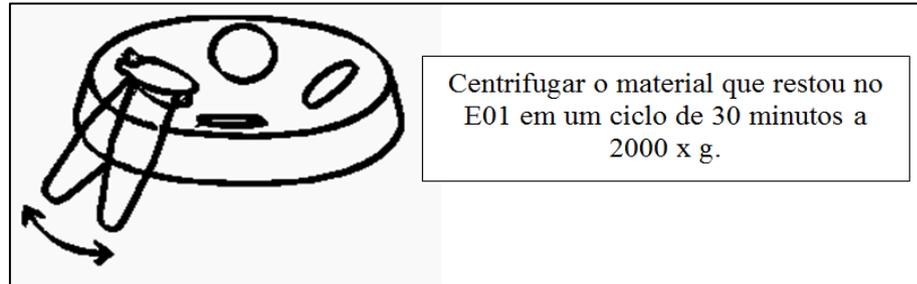


Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

### 5.7.3 Método de cultura centrifugada quatro vezes (CC4X)

Após a retirada dos 500  $\mu$ L da solução para a confecção da CC3X, o restante da solução do E01 foi novamente centrifugado durante 30 minutos a 2000 x g. (Figura 7)

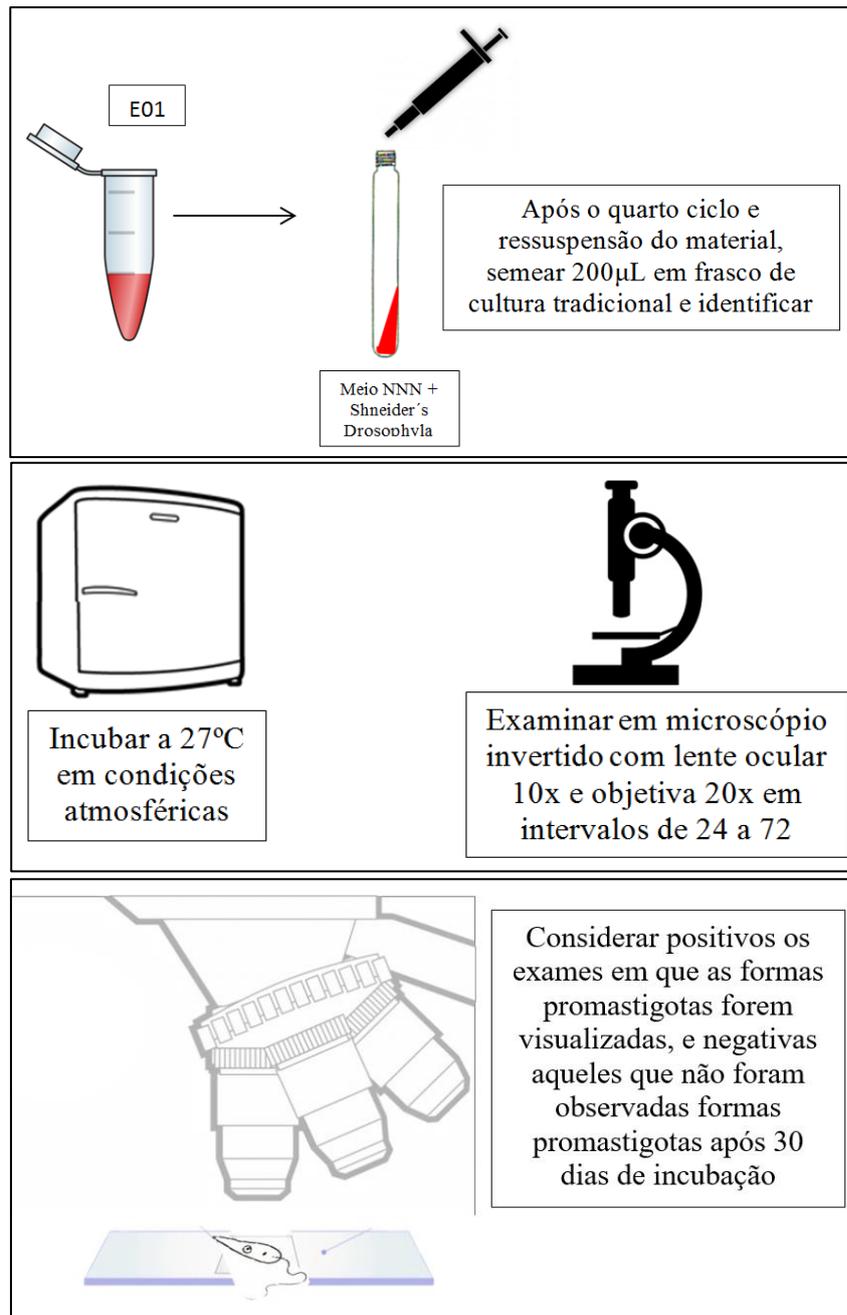
Figura 7 – Manipulação do material para obtenção da CC4X



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensão com RPMI 1640. Foram retirados 200  $\mu$ L da solução e adicionados diretamente a outro tubo (T02) contendo o meio de cultura utilizado na CT de acordo com o protocolo do Lableish (ANEXO D). O T02 foi incubado a 27 °C em condições atmosféricas e examinado em microscópio óptico com lente ocular 10x e objetiva 20x, utilizando lamina e lamínulas, em intervalos de 24 a 72 horas. Foram considerados positivos os exames cujas formas promastigotas foram visualizadas, e consideradas negativas o exame cujas formas promastigotas não foram visualizadas após 30 dias de incubação. (Figura 8)

Figura 8 – Método para obtenção e monitoramento da CC4X



Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

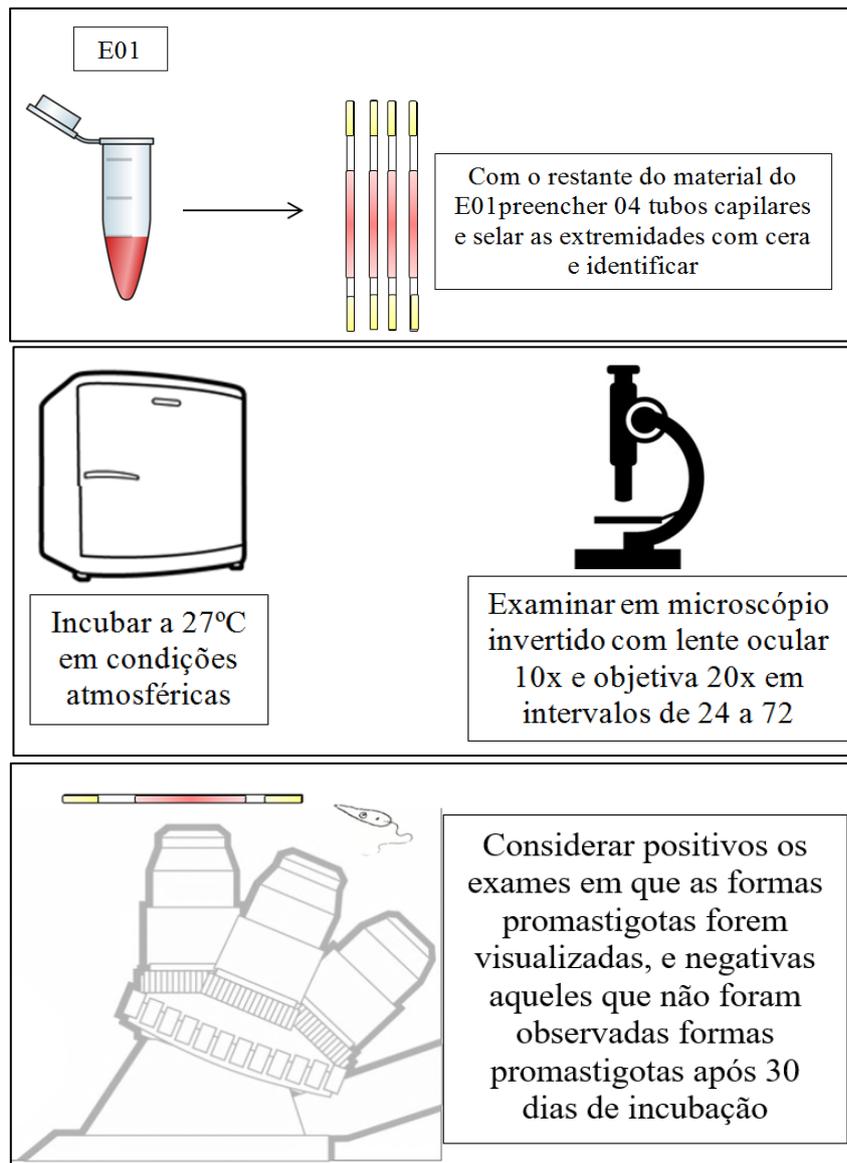
#### 5.7.4 Microcultura modificada (MICMOD)

O restante da solução do E01 que foi centrifugada quatro vezes foi utilizado para a confecção das MICMOD. Foram preenchidos quatro tubos capilares de micro-hematócitos com 25-50  $\mu$ L da solução, posteriormente selados com parafina e identificados.

Os tubos foram incubados a 27 °C em condições atmosféricas. Em microscópio invertido cada microtubo foi colocado diretamente sobre a platina e examinado utilizando

lente ocular 10x e objetiva 20x em intervalos de 24 a 72 horas. Foram considerados exames positivos aqueles cujas formas promastigotas foram visualizadas, e exames negativos aqueles cujas formas promastigotas não foram visualizadas após 30 dias de incubação. (Figura 9)

Figura 9 – Método para obtenção e monitoramento da MICMOD



**Fonte:** elaborada pelo autor, 2018.

## 5.8 Procedimentos estatísticos

Os dados coletados foram transportados para o programa Microsoft Windows Excell 2003<sup>®</sup>. A análise estatística foi realizada pelo programa Stata/SE<sup>®</sup> 10.0 for Windows (College

*Station, Texas, USA).*

Os dados quantitativos foram apresentados em valores absolutos, proporções, médias, intervalos de confiança. O teste  $t$  de Student foi usado para comparar diferenças entre médias de variáveis contínuas de amostras independentes com distribuição normal. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar diferenças entre médias de variáveis com distribuições não-paramétricas. Em todas as análises foram considerados os testes bi-caudais e um nível de significância estatística  $\alpha$  de 0,05.

## 6 RESULTADOS

Foram incluídos 101 participantes com idades que variaram entre 06 meses e 83 anos. A média de idade foi 27,6 anos (IC 95% 23,5 – 31,8). A idade média entre as crianças com 15 anos ou menos foi de 3,3 anos (IC 95% 2,0 – 4,6) e, para participantes com mais de 15 anos a idade média foi de 38,2 anos (IC 95% 34,6 e 41,9). No grupo de participantes maiores de 15 anos, 78,7% dos participantes eram do sexo masculino ( $p < 0.001$ ), enquanto no grupo de participantes com idade inferior a 15 anos exatamente 50% dos participantes eram sexo masculino e 50% do sexo feminino. Um participante foi incluído pós-mortem, e somente as culturas foram realizadas.

Quanto à procedência, 79% dos participantes desta pesquisa eram procedentes do Piauí, 19% do Maranhão e 1% do Ceará, dos quais 78% residiam em áreas urbanas enquanto 21% residiam em áreas rurais. (Tabela 1)

Do total dos 101 participantes, 47 realizaram teste rápido para HIV durante a internação e 30 apresentaram diagnóstico positivo prévio para essa infecção. No total, 36 participantes apresentaram sorologia reagente para o HIV, sendo 06 (seis) deles diagnosticados durante a internação para a investigação diagnóstica da LV, dos quais 03 (três) apresentam diagnóstico positivo para LV. Dos 30 participantes com diagnóstico prévio de infecção pelo HIV, 07 (sete) também receberam diagnóstico de LV. De 30 participantes não foi possível obter informações a respeito da realização deste teste.

Tabela 1 – Caracterização demográfica da população de estudo, da população com infecção pelo HIV e da população com diagnóstico parasitológico de LV. Teresina, 2018.

	<b>População geral n (%)</b>	<b>População HIV+ n (%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>Gênero</b>			
Masculino	71 (71,0)	27 (75,0)	0,47
Feminino	29 (29,0)	9 (25,0)	
Sem informação	01 (1,0)		
<b>Idade</b>			
≤ 15 anos	30 (30,0)	1 (2,7)	<0,001
> 15 anos	69 (69,0)	35 (97,3)	
S/informação	01 (01,0)	-	
<b>Procedência</b>			
Piauí	80 (79,0)	31 (86,1)	0,52
Maranhão	19 (19,0)	5 (13,9)	
Ceará	01 (1,0)	-	
S/informação	01 (1,0)	-	
<b>Local de residência</b>			
Urbana	79 (78,0)	29 (80,6)	0,71
Rural	21 (21,0)	7 (19,4)	
Sem informação	01 (1,0)		
<b>Coinfecção HIV/LV*</b>			
Diagnostico anterior a LV		7 (19,4)	-
Diagnóstico concomitante a LV		3 (8,3)	
S/informação		30	

\*LV diagnosticada por critério parasitológico

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

O TR foi realizado com o soro de sangue periférico em 60 participantes e mostrou-se reagente em 23 (38,3%) dos 60 que se submeteram ao exame; o EPD resultou positivo em

33 (33%) dos 100 participantes que se submeteram ao exame. Das 65 amostras viáveis utilizadas para a realização da PCR em MO (PCR\_MO) 29 amostras (44,6%) foram positivas ao método; e, das 35 amostras utilizando sangue periférico para realizar a PCR (PCR\_SP), 13 amostras (37,1%) foram positivas ao método.

Houve contaminação bacteriana de algumas culturas de forma que o número CT foi reduzido para 96, a CC3X foi reduzida para 96 e a CC4X para 93. A CT resultou positiva em 34 (35%) amostras e a CC3X apresentou 37 resultados positivos (38,5%) dos 96 participantes que realizaram o exame; a CC4X mostrou 38 resultados positivos (40,9%) de 93 participantes que realizaram o exame. A MIC teve 4 resultados positivos (3,96%) e MICMOD teve 26 resultados positivos (25,74%) dos 101 participantes que realizaram o exame. A tabela 2 apresenta os resultados destes testes.

Tabela 2 – Resultados dos testes diagnósticos para LV na população de estudo.

	População Geral			População LV+ *		População LV+/ HIV-		População LV+/ HIV+		Valor de <i>p</i>
	Testes realizados	Testes válidos ** (%)	Testes positivos (%)	Positivo por critério diagnóstico	Testes positivos (%)	Positivo por critério diagnóstico	Testes positivos (%)	Positivo por critério diagnóstico	Testes positivos (%)	
<b>Teste rK39</b>	60	60 (100)	23 (38,3)	30	23 (76,7)	25	18 (72)	5	5 (100)	0,18
<b>Microscopia direta</b>	100	100 (100)	33 (33)	50	33 (66)	40	25 (62,5)	10	8 (80)	0,09
<b>PCR de MO</b>	65	65 (100)	29 (44,6)	32	29 (90,6)	27	24 (88,8)	5	5 (100)	0,43
<b>PCR de SP</b>	35	35 (100)	13 (37,1)	18	13 (72,2)	13	9 (69,2)	5	4 (80)	0,64
<b>Cultura Tradicional</b>	100	96 (95,0)	34 (35,4)	48	33 (68,8)	38	25 (65,8)	10	8 (80)	0,07
<b>Cultura de MO centrifugada 3x</b>	101	96 (95,0)	37 (38,5)	50	37 (74)	40	30 (75)	10	7 (70)	0,75
<b>Cultura de MO centrifugada 4x</b>	101	93 (92,1)	38 (40,9)	49	38 (77,5)	39	30 (76,9)	10	8 (80)	0,83
<b>Microcultura de MO</b>	101	101 (100,0)	4 (03,96)	51	4 (7,8)	41	3 (7,3)	10	1 (10)	0,78
<b>Microcultura de MO centrifugada</b>	101	101 (100,0)	26 (25,7)	51	26 (51)	41	20 (48,8)	10	6 (60)	0,53

\* Caso de LV definido como indivíduo com pelo menos um exame parasitológico positivo ou PCR positiva

\*\* Testes validos referem-se aos testes que puderam ser avaliados, visto que algumas culturas foram contaminadas por bactérias.

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

Como nesta pesquisa adotamos a presença de pelo menos um exame parasitológico positivo para a definição de caso confirmado para LV, a especificidade destes exames foi, por definição 100% em todos estes casos.

O teste rápido baseado em antígeno rK39 recombinante obteve uma sensibilidade de 76,7% (95% CI 61,6 -91,8). O mesmo teste foi não reagente em 14 dos 30 pacientes sem diagnóstico parasitológico de LV, conferindo-lhe especificidade de 53,3% (95% CI 35,4-71,2).

Para o EPD a sensibilidade na população estudada de foi de 66,0%. A sensibilidade entre os distintos métodos de culturas foi de 68,8% para a CT, de 74,0% para a CC3X, e também de 77,5%, para a CC4X; a MIC e MICMOD apresentaram sensibilidade de 7,84% e 51,0% respectivamente.

Considerando a CT como método de comparação observou-se que a técnica de PCR usando material medular foi mais sensível do que a técnica de CT e que as técnicas de MIC e MICMOD foram menos sensíveis que a técnica de CT. A Tabela 3 apresenta a sensibilidade e a área sob a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) dos diversos testes.

Tabela 3 – Sensibilidade e área sob a curva ROC dos testes realizados

	<b>Testes realizados</b> <b>População LV+ *</b>	<b>Testes positivos</b> <b>(%)</b>	<b>Sensibilidade</b> <b>(%)</b>	<b>95% IC</b> <b>sensibilidade</b>	<b>Área sob a</b> <b>curva ROC</b>	<b>IC95% área sob</b> <b>a curva ROC</b>
<b>Teste rápido rK39</b>	30	23 (76,7)	76,7	66,0-87,4	0,80	0,70 - 0,91
<b>Microscopia direta</b>	50	33 (66)	66,0	56,7-75,3	0,75	0,69 – 0,81
<b>PCR de MO</b>	32	29 (90,6)	90,6	0,84-0,98	0,78	0,70 - 0,86
<b>PCR de SP</b>	18	13 (72,2)	72,2	0,57-0,87	0,80	0,69 - 0,90
<b>Cultura Tradicional</b>	48	33 (68,8)	68,8	59,5-78,1	0,75	0,68 – 0,81
<b>Cultura de MO</b> <b>centrifugada 3x</b>	50	37 (74)	74,0	65,2-82,8	0,77	0,71 – 0,84
<b>Cultura de MO</b> <b>centrifugada 4x</b>	49	38 (77,5)	77,5	69,1-86,1	0,76	0,70 – 0,83
<b>Microcultura</b>	51	4 (7,8)	7,84	2,6-13,0	0,67	0,62 – 0,72
<b>Microcultura de MO</b> <b>centrifugada</b>	51	26 (51)	51,0	41,3-60,7	0,72	0,66 – 0,78

\* Caso de calazar definido como indivíduo com pelo menos um exame parasitológico positivo ou PCR positiva

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

A tabela 4 apresenta os resultados dos cálculos de razões de verossimilhança dos testes positivos e negativos. Conforme critério de diagnóstico definido, os testes baseados em identificação direta do parasito e PCR apresentam razão de verossimilhança positiva máxima.

Tabela 4 – Razão de verossimilhanças dos testes positivos e negativos

	Sensibilidade (%)	Especificidade	RVP <sup>1</sup> T+	RVN <sup>2</sup>
<b>Teste rápido rK39</b>	76,7	53,3	1,64	0,43
<b>Microscopia direta</b>	66,0	100	~ ∞	0,34
<b>PCR de MO</b>	90,6	100	~ ∞	0,10
<b>PCR de SP</b>	72,2	100	~ ∞	0,28
<b>Cultura Tradicional</b>	68,8	100	~ ∞	0,31
<b>Cultura de MO centrifugada 3x</b>	74,0	100	~ ∞	0,26
<b>Cultura de MO centrifugada 4x</b>	77,5	100	~ ∞	0,23
<b>Microcultura</b>	7,84	100	~ ∞	0,92
<b>Microcultura de MO centrifugada</b>	51,0	100	~ ∞	0,49

1- Razão de verossimilhança do teste positivo; 2 – Razão de verossimilhança do teste negativo

Com relação ao tempo decorrido entre a semeadura e a positivação observou-se que dos 34 resultados positivos da CT obtidos ao final do estudo, nenhum resultado foi positivo entre 1-3 dias após semeadura, 1 (2,9%) foi positivo entre 4-6 dias após a semeadura, 22 (64,8%) foram positivos com 7 dias após a semeadura, 8 (23,5%) foram positivos entre 8-14 dias após a semeadura, 3 (8,8%) foram positivos entre 15 e 21 dias e nenhum foi positivo com mais de 21 dias após a semeadura.

Dos 37 resultados positivos da CC3X obtidos ao final do estudo, 8 (21,7%) resultados foram positivos entre 1-3 dias após semeadura, 14 (37,8%) foram positivos entre 4-6 dias após a semeadura, 10 (27%) foram positivos com 7 dias após a semeadura, 4 (10,8%) foram positivos entre 8-14 dias após a semeadura, e 1 (2,7%) foi positivo com mais de 21 dias após a semeadura.

Dos 38 resultados positivos da CC4X obtidos ao final do estudo, 7 (18,4%) resultados foram positivos entre 1-3 dias após semeadura, 21 (53,3%) foram positivos entre 4-6 dias após a semeadura, 5 (13,2%) foram positivos com 7 dias após a semeadura, 4 (10,5%) foram

positivos entre 8-14 dias após a sementeira e 1 (2,6%) foi positivo com mais de 21 dias após a sementeira.

Dos 4 resultados positivos da MIC obtidos ao final do estudo, 2 (50%) foram positivos entre 1-3 dias após sementeira, 1 (25%) foi positivo entre 4-6 dias após a sementeira, 1 (25%) foi positivo com 7 dias após a sementeira e nenhum foi positivo após 8 dias da sementeira.

Dos 26 resultados positivos da MICMOD obtidos ao final do estudo, 13 (50%) foram positivos entre 1-3 dias após sementeira, 5 (19,2%) foi positivo entre 4-6 dias após a sementeira, 8 (30,8%) foram positivos com 7 dias após a sementeira e nenhum foi positivo após 8 dias da sementeira.

O número médio de dias para a positividade da CT foi de 10 dias (IC 95% 8,5 – 11,5); na CC3X o número médio de dias foi de 6,2 dias com IC de 4,9 – 7,4 dias significativamente menor do que o tempo necessário para positividade na CT ( $p < 0,0001$ ); para a CC4X o número médio de dias foi de 6 dias com IC de 4,7 – 7,2 dias dias significativamente menor do que o tempo necessário para positividade na CT ( $p < 0,0001$ ); na MIC o número médio de dias foi de 4,5 dias com IC de 1,4 – 7,5 dias; e na MICMOD o número médio de dias para positividade foi de 4,2 dias com IC de 3,4 – 5,0 dias dias significativamente menor do que o tempo necessário para positividade na CT ( $p < 0,0001$ ).

Considerando a CT como método de comparação observou-se que houve diferença estatisticamente significativa com relação ao número médio de dias para positividade quando comparada aos outros métodos de culturas. O número médio de dias para a positividade na CT foi superior ao demais métodos. (Tabela 5).

Tabela 5 – Tempo decorrido entre a semeadura e a positividade das culturas de *Leishmania spp*

<b>Tempo de positivação</b>	<b>1-3 dias (%)</b>	<b>4-6 dias (%)</b>	<b>7 dias (%)</b>	<b>8-14 dias (%)</b>	<b>15-21 dias (%)</b>	<b>&gt;21 dias (%)</b>	<b>Nº médio de dias</b>	<b>Intervalo de Confiança de 95%</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Cultura Tradicional</b>	0 (0)	1 (2,9)	22 (64,8)	8 (23,5)	3 (8,8)	0 (0)	10	8,5 – 11,5	-
<b>Cultura de MO centrifugada 3x</b>	8 (21,7)	14 (37,8)	10 (27,0)	4 (10,8)	0 (0)	1 (2,7)	6,2	4,9 – 7,4	$p < 0,001$
<b>Cultura de MO centrifugada 3x</b>	7 (18,4)	21 (55,3)	5 (13,2)	4 (10,5)	0 (0)	1 (2,6)	6,0	4,7 – 7,2	$p < 0,001$
<b>Microcultura de MO centrifugada 4x</b>	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4,5	1,4 – 7,5	$p = 0,02$
<b>Microcultura de MO centrifugada 4x</b>	13 (50)	5 (19,2)	8 (30,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4,2	3,4 – 5,0	$p < 0,001$

Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

## 7 DISCUSSÃO

A frequência da LV entre homens e mulheres demonstrados no presente estudo foi predominantemente masculina com 71% dos casos e média de idade de idade de 27,6 anos, corroborando com os dados de Luz *et al.* (2018), Araújo *et al.* (2016), Varani *et al.* (2017) e OPAS/OMS (2018) em que claramente a maioria dos casos de LV ocorrem em pessoas do sexo masculino.

Conforme descrito na literatura, neste estudo a frequência de LV foi maior entre homens adultos, mas não houve diferença na distribuição de sexos entre crianças com 15 anos de idade ou menos. Dados semelhantes foram reportados na pesquisa realizada por Reis *et al.* (2017) ao afirmar que frequência da LV nos homens aumenta com a idade e, Araújo *et al.* (2016) em que as porcentagens de LV em pacientes com menos de 9 anos foram semelhantes entre os sexos masculino e feminino, enquanto pacientes entre 20 e 59 anos, obteve maior frequência no sexo masculino.

Houve uma maior frequência da LV nos participantes que residiam nas zonas urbanas (78%), quando comparados àqueles que residiam em áreas rurais (21%), esse padrão também foi descrito nas pesquisas de Luz *et al.* (2018) e Reis *et al.* (2017) e justificado pela mudança no perfil epidemiológico da doença causado pelo aumento da urbanização das cidades de forma desordenada, não planejada e condições sanitárias precárias (WERNECK, 2008).

Por se tratar de uma doença cujos parasitas infectam células do sistema fagocitário mononuclear, a leishmaniose costuma estar atrelada a infecção pelo vírus do HIV, relação esta ainda não totalmente esclarecida uma vez que a LV desencadeia uma supressão temporária e específica da imunidade mediada por células, ao passo que o HIV facilita a progressão da LV (BRASIL, 2009). Neste estudo, o percentual de pacientes coinfectados pelo HIV/LV correspondeu a 14,08% dos sujeitos que participaram da pesquisa, porcentagem estatística esta superior ao encontrado por Luz *et al.* (2018) em que a coinfeção LV/HIV foi observada em 9,9% dos casos de LV, e, semelhante aos 14,5% dos casos de coinfeção encontrados por Araújo *et al.* (2016), e com os 15,9% casos registrados de coinfeção LV/HIV por Varani *et al.* (2017).

Os estudos que avaliam o desempenho de testes laboratoriais para LV apresentam resultados muito variáveis porque estes exames são muito influenciados pelo operador, pelo tempo dedicado à análise, no caso da pesquisa direta de parasitos e pela variação nos antígenos utilizados no caso de exames sorológicos. Outra possível explicação para esta grande variabilidade inter-testes é a própria definição de caso confirmado de LV. Neste

estudo, adotou-se somente os critérios parasitológico e molecular para não se incorrer em diagnósticos falso-positivos com muita frequência. O critério clínico epidemiológico não foi levado em consideração nesta pesquisa como critério de diagnóstico final para LV para fins de cálculos estatísticos, uma vez que tais dados comprometeriam a análise de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos laboratoriais aqui avaliados, mas é muito possível que alguns indivíduos que foram classificados como não sendo portadores de LV, na verdade o fossem. Dessa forma as sensibilidades dos testes parasitológicos calculadas nesse estudo muito provavelmente estão superestimadas uma vez que os testes avaliados faziam parte da definição de caso confirmado de LV.

De fato, nove indivíduos que foram classificados como não sendo casos de LV, foram diagnosticados pelo teste rK39, tratados com medicações específicas e evoluíram com melhora. Se estes indivíduos tivessem recebido o diagnóstico de LV, a sensibilidade do teste imunocromatográfico teria sido de 81,1 (IC 95% 0,71-0,90). É possível ainda que outros indivíduos que tiveram todos os testes negativos fossem portadores de LV e que a sensibilidade dos testes tenha sido de alguma forma superestimada. Da mesma forma, é possível que alguns indivíduos diagnosticados pelo método molecular, sem confirmação parasitológica, tenham tido falso-diagnósticos. Analisamos as conclusões finais dos médicos assistentes e vimos que todos os pacientes com PCR positiva na medula óssea ou no sangue receberam o tratamento específico. Um deles faleceu, mas a hipótese diagnóstica do médico assistente se manteve. Por outro lado, 14 participantes que não foram diagnosticados como LV apresentaram o teste imunocromatográfico reagente como único exame sugestivo da infecção. Destes, 11 receberam o tratamento com boa resposta clínica, mas três evoluíram para a morte apesar do tratamento. Estas dúvidas são justificadas visto que o médico assistente, diante da possibilidade de doença potencialmente letal conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), prefere tratar o paciente sem confirmação diagnóstica ao invés de vê-lo evoluir para situações de maior gravidade enquanto se pesquisa outros diagnósticos.

Os exames sorológicos são uma arma importante para o diagnóstico, mas suas especificidades deixam a desejar, uma vez que muitos falsos positivos podem acontecer. Em nossa pesquisa a sensibilidade global do TR com rK39 foi de 76,7% e especificidade de 53,3%. Uma sensibilidade semelhante foi descrita na pesquisa de Elmahallawy *et al.* (2014) em que sensibilidade foi de 75 – 98% e especificidade de 79 – 89%; e um pouco maior que os resultados de Varani *et al.* (2017) em que a sensibilidade foi de 52,4% para TR realizado. Elmahallawy *et al.* (2014) ressalta que as diferenças nas sensibilidades do ensaio

imunocromatográfico podem estar relacionadas às diferenças nas respostas de anticorpos observadas em diferentes grupos étnicos.

A pesquisa direta de *Leishmania spp* continua sendo em qualquer tecido, mas principalmente na medula, a grande ferramenta para o diagnóstico precoce e preciso da doença, porém necessita de um rigoroso treinamento de profissionais além de ser influenciada pela carga parasitária que o material apresenta, é um diagnóstico tempo dependente, uma vez que se o profissional não obtiver treinamento suficiente e não dedicar tempo suficiente à busca por parasitos, a pesquisa direta pode ser de sensibilidade muito pequena. A identificação de *Leishmania spp* em pesquisa microscópica direta apresentou neste estudo uma sensibilidade de apenas de 66,0%, sensibilidade baixa quando comparada aos dados de outros autores, que apresentaram uma sensibilidade 88,8% (IC 95% = 84,2-92,2%) e especificidade de 100,0% nos esfregaços (EPD) de lesões de pacientes com suspeita de LC (PAGHEH *et al.*, 2014) e de 53 a 86% em exame microscópico (EPD) de material de aspirado MO corada com Giemsa (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016), mas semelhante a sensibilidade de 63,33% para diagnóstico de LV encontrada por Da Silva *et al.* em 2018.

Para que ocorra o diagnóstico de LV em todos os pacientes são necessárias à utilização de duas ou mais técnicas com princípios diferentes, uma vez que os métodos diagnósticos utilizados para o diagnóstico de LV carecem em sensibilidade e especificidade. Nesta pesquisa as duas técnicas de microcultura avaliadas apresentaram uma sensibilidade baixa de 7,8% e 51,0% respectivamente, valores muito inferiores quando comparados aos resultados obtidos por outras pesquisas que demonstraram uma sensibilidade de 98,4% (IC 95% = 96,1-99,1%) e especificidade de 100% no diagnóstico de LC (PAGHEH *et al.*, 2014) e no diagnóstico de LV (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2005).

Para a cultura de parasitos realizada em tubos com meio NNN e *Schneiders*, também conhecida por macrocultura (CT), a partir de material medular houve uma sensibilidade de 68,8%, valor equivalente ao apresentado por pesquisas que utilizaram a mesma técnica de cultivo e apresentaram sensibilidade de 77,77% (DA SILVA *et al.*, 2018) e de 70 a 80% (MAURYA *et al.*, 2010).

Observamos em nosso estudo uma sensibilidade de 90,6% na PCR convencional realizadas em amostras de MO e uma sensibilidade de 72,2% na PCR em amostras de SP, valor pouco inferior ao encontrado por outros autores, que relataram sensibilidade de 100% em amostras do baço ou da medula e de 70% a 100% nas amostras que utilizando sangue periférico. (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

O grande valor deste estudo foi demonstrar que as culturas que utilizaram material medular lavado e concentrado por meio de centrifugação (CC3X, CC4X, MIC e MICMOD) quando comparadas a mielocultura tradicional (CT) apresentaram tempo menor de positividade entre semeadura e o diagnóstico, o que pode, apesar da sensibilidade reduzida, justificar o emprego desta técnica pela possibilidade de diagnóstico parasitológico mais precoce. Muitos fatores podem ter contribuído para que as culturas centrifugadas obtivessem um tempo de resposta menor e isso nos desperta para a necessidade de uma investigação mais aprofundada a respeito da influência das diluições e centrifugações seriadas para um melhor crescimento dos parasitos. Maurya *et al.* (2010) discorre que um menor tempo de positividade pode ser justificado pelo fato de as diluições e centrifugações seriadas melhorarem o crescimento do parasita ao propiciarem condições de cultura para o crescimento das promastigotas ao removerem as células sanguíneas que morrem como resultado das condições de cultura com sangue periférico e tornam o ambiente tóxico para os parasitas, além de, concentrar a amostra nas preparações enriquecidas de leucócitos.

Ainda que as proporções de microculturas positivas nesta pesquisa tenha sido insatisfatórias, 75% dos resultados da MIC e 69,2% dos resultados da MICMOD foram verificados em menos de 7 dias pós-semeadura, com média de 4,5 dias e 4,2 dias respectivamente para verificação de resultados positivos, um tempo de positividade significativamente inferior ao tempo necessário para positividade da CT que apresentou média de 10 dias para verificação de resultado positivo, corroborando com outras pesquisas em que o tempo necessário para positividade da MIC no diagnóstico da LC foi de 2 a 7 dias em 83 a 97% das amostras (PAGHEH *et al.*, 2014; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2004), e no diagnóstico da LV que demonstrou um período de tempo médio de incubação para detectar promastigotas muito menor na MIC quando comparada à CT, de 2 a 7 dias versus 2 a 30 dias (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2005).

A CC3X e a CC4X apresentaram um desempenho satisfatório em relação ao período de incubação necessário para a detecção das promastigotas. Em 59,4% dos resultados obtidos por meio da CC3X o tempo necessário para positividade foi de menos de 7 dias e, na CC4X esse percentual foi ainda maior, com 71,7% dos resultados foram obtidos antes do 7º dia pós-semeadura. A CT, contudo, precisou de um período de incubação maior, uma vez que apenas 2,9% dos diagnósticos por CT foram positivos antes do 7º dia pós-semeadura. Dos diagnósticos realizados por meio da CT, 88,3% só foram determinados no 7º ou 14º dia pós-semeadura, 64,8% e 29,7% respectivamente.

Com a utilização do método de CC3X ou de CC4X a maioria dos participantes com resultados positivos recebem o diagnóstico antes do período mínimo necessário para a positividade do método de CT uma vez que número médio de dias para a positividade da CT foi de 10 dias e o da CC3X e CC4X foi de 6,2 dias e 6 dias, respectivamente. Diante destes fatos é essencial chamar a atenção para o período de incubação necessário para o aparecimento das promastigotas com a utilização das técnicas centrifugadas, levando-nos a acreditar que a utilização destas técnicas será uma promissora ferramenta para o diagnóstico precoce do LV, principalmente para aqueles pacientes que não tiveram um diagnóstico através de pesquisa direta e que não podem aguardar duas ou três semanas para um diagnóstico por meio de uma cultura tradicional devido a gravidade da doença. Ainda que apresentem baixa sensibilidade, essas técnicas prometem muito em benefício aos pacientes por apresentarem um tempo menor para o resultado quando associada a outras técnicas diagnósticas.

Por não existir um padrão ouro no diagnóstico de LV, os estudos que trabalham com os valores de sensibilidade e especificidade podem variar bastante, uma vez que os critérios de definição de caso também variam muito, assim quando os critérios de definição de casos são muito exigentes ou não tão exigentes pode ocorrer um aumento de casos falsos positivos ou falsos negativos. Por esse motivo a variação nos critérios de definição da doença pode gerar também uma não comparabilidade da sensibilidade e especificidade dos testes.

Vale relatar aqui que, logo depois da realização desse estudo, os colaboradores do mesmo laboratório em que esta pesquisa foi realizada, preocupados com a baixa sensibilidade da técnica de cultura tradicional em comparação com períodos anteriores, hipotetizaram que uma das possíveis explicações seria a adição de gentamicina, aminoglicosídeo com ação leishmanicida reconhecida, aos meios de cultura preparados (Anexo D). Está sendo realizado uma avaliação para a possibilidade de um melhor crescimento de parasitos com a retirada da gentamicina, ainda quem em concentrações baixas, do protocolo de suplementação de meios, contudo os resultados deste procedimento ainda não foram analisados. Se este pressuposto for verdadeiro, é possível que o regular desempenho destas técnicas de culturas tenha sido ocasionado pela inibição do crescimento do protozoário associada à ação leishmanicida da gentamicina, o que nos leva a crer que se esse trabalho for repetido sem o acréscimo de gentamicina poderá apresentar uma sensibilidade e uma especificidade ainda melhor do que as encontradas.

## 8 CONCLUSÃO

O grande valor deste estudo reside, em suma, na proposta de técnicas de microculturas e culturas centrifugadas de *Leishmania spp* com possibilidade de resultados confirmatórios em tempo muito mais reduzido do que é necessário pelas técnicas tradicionais em uso. As culturas centrifugadas mostraram-se muito uteis com um tempo entre a semeadura e a positivação muito inferior e, sensibilidade não inferior à cultura tradicional, levando-nos a um diagnóstico mais oportuno, que é desejável a essa população em se tratando de uma doença grave que pode progredir rapidamente para situações de gravidade e para a morte.

## REFERÊNCIAS

- ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 3, p. 294-297, 2004.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 276-80, 2005.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Estimates of Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e3567, 2012.
- ARAÚJO, A. C. *et al.* Visceral leishmaniasis in Petrolina, state of Pernambuco, Brazil, 2007-2013. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 29, 2016.
- BOELAERT, M. *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n.1, p. 72-77, 2004.
- BOELAERT, M. *et al.* Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **The Cochrane data base of systematic reviews**, v. 6, n. 6, p. CD009135, 2014
- BOGGILD, A. K. *et al.* Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2006.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Conselho Nacional de Saúde (BR). **Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos**. Resolução n. 466/12 de 12 de dezembro de 2012 – CNS. Brasília, DF, 2012.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde/SVS. **Sistema de Informação SINAN**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>>. Acesso em: 13 mai 2016.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde (BR). **Normas regulamentadoras para o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa**. Resolução n. 347/05 de 13 de janeiro de 2005 – CNS. Brasília, DF, 2005.

CASTRO, N. J. C. **Estudo do microcultivo *in vitro* para o isolamento de *Leishmania spp* no Estado de Pará**. 2010. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará -UFPA.

CONTEH, L. *et al.* Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, p. 239–47, 2010.

COSTA, D. L. **Fatores de prognóstico na leishmaniose visceral: alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte**. Tese de doutorado. Belo Horizonte: 2009. 214f.

DA SILVA, *et al.* Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 811–814, 2005.

DA SILVA, *et al.* Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. **Parasitology Research**, v. 117, p.419–427, 2018.

DIRO, E. *et al.* Impact of the Use of a Rapid Diagnostic Test for Visceral Leishmaniasis on Clinical Practice in Ethiopia: A Retrospective Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1.-11, 2015.

ELMAHALLAWY, E. K. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8(8), p. 961-972, 2014.

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

GOMES, C. M. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of american tegumentar leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.89, n. 5, p. 701-11, 2014.

GUTIERRES, A. **Desenvolvimento, padronização e avaliação da técnica de microcultura para o crescimento primário e proliferação de *Leishmania spp*, no diagnóstico etiológico das leishmanioses**. 2010. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2010.

HIDE, M. *et al.* A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, v. 102, n. 3, p. 197-200, 2007.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bepa. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p.13-23, 2009.

LUKES J, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.22, p.9375-80, 2007.

LUZ, J. G. G. *et al.* Visceral leishmaniasis in a Brazilian endemic area: an overview of occurrence, HIV coinfection and lethality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, e 12, 2018.

MAURYA, R. *et al.* Evaluation of Blood Agar Microtiter Plates for Culturing *Leishmania* Parasites To Titrate Parasite Burden in Spleen and Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1932–1934, 2010.

OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde. **LEISHMANIOSES Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses Nº 6 - Fevereiro, 2018.

PAGHEH, A. *et al.* An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 38, n. 4, p. 347-351, 2014.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an up date on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, p. 31, 2015.

REIS, L. L. *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 53, p. 8–16, 2016.

SARFARAZ A. E.; NAHID A. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 1, 2013.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, p. 548-554, 2013.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

VARANI, S. *et al.* Serological and molecular tools to diagnose visceral leishmaniasis: 2-years' experience of a single center in Northern Italy. **PLoS ONE** v.12(8), e0183699, 2017.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, n.12, p.2937-2940, 2008.

WHO. World Health Organization. **First WHO report on neglected tropical diseases:** working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, 2010a.

\_\_\_\_\_ World Health Organization. **Control of the leishmaniasis:** report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 2010b.

\_\_\_\_\_ World Health Organization. **Leishmaniasis: Key Facts.** Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 19/09/2018a

\_\_\_\_\_ World Health Organization. **Leishmaniasis:** Situation and trends. Disponível em: [http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso em 20/09/2018b.

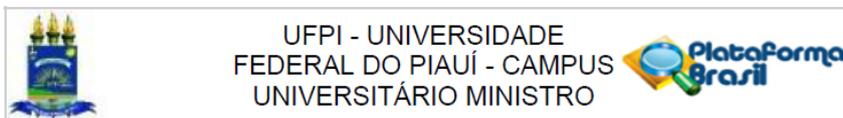
ZIJLSTRA, E. E. Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic. **Archives of Disease in Childhood.** v. 101, p. 561–567, 2016.

ZIJLSTRA, E E; EL-HASSAN, A M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 95 Suppl1, p. S27-S58, 2001.

ZUINARA M. *et al.* Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS neglected tropical diseases.** V. 6(1), e1484, 2012.

**ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** VALIDAÇÃO DE TESTES PARASITOLÓGICOS PARA O DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

**Pesquisador:** AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 61618416.8.0000.5214

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO CULTURAL E DE FOMENTO A PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO - FADEX

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.871.752

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal prospectivo e observacional para avaliação de diagnóstico laboratorial. Serão convidados a participar deste estudo pacientes admitidos no Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella (IDTNP) em Teresina, Piauí, Brasil, com suspeita diagnóstica de leishmaniose visceral. Após a identificação do paciente e admissão hospitalar no IDTNP, o médico assistente solicita a punção de medula óssea para diagnóstico laboratorial rotineira e o paciente será convidado pelo pesquisador a participar voluntariamente do projeto.

#### Objetivo da Pesquisa:

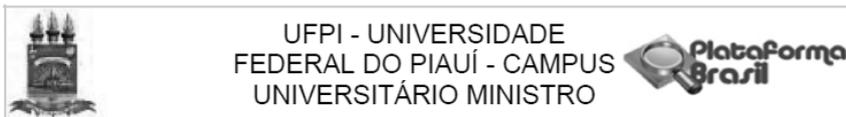
Objetivo Primário:

- Validar duas técnicas modificadas de cultura de parasito e duas técnicas de microcultura para diagnóstico da leishmaniose visceral em pacientes internados em hospital de referência.

Objetivos Secundários:

1. Comparar o desempenho do exame parasitológico direto, teste rápido, PCR e cultura para leishmania em meio NNN com duas técnicas de cultura modificadas e duas técnicas de microcultura para diagnóstico de leishmaniose visceral;
2. Verificar a relação custo benefício e reprodutibilidade das duas técnicas de cultura modificadas e

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
**Bairro:** Ininga **CEP:** 64.049-550  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.871.752

das duas técnicas de microcultura para diagnóstico de leishmaniose visceral;  
3. Comparar o tempo para positividade da cultura para leishmania em meio NNN com duas técnicas de cultura modificadas e duas técnicas de microcultura para diagnóstico de leishmaniose visceral.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Possíveis constrangimentos pela revelação de questões relacionadas ao questionário poderão ocorrer, riscos estes que serão evitados e minimizados por meio da adoção de intervenções como: a garantia de sigilo, confidencialidade e realização da entrevista em locais que asseguraram a segurança, além da aplicação de uma abordagem livre de julgamentos e valores.

**Benefícios:**

Não haverá benefício pessoal direto, mas poderá receber benefícios secundários da pesquisa como atenção diferenciada e diagnóstico mais precoce caso a hipótese desta pesquisa se confirme.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante pois visa validar quatro testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral que podem revelar-se mais simples e rápidos, muito sensível e com prazo para resultados muito menores, que poderá ajudar a elucidar o diagnóstico dos pacientes em um prazo de 48 a 72 horas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos anexados e conferidos pelo secretário do CEP durante a validação documental.

**Recomendações:**

Sem Recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto apto a ser iniciado pois encontra-se elaborado em consonância com a Resolução 466/12.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	02/12/2016		Aceito

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550  
 UF: PI Município: TERESINA  
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 1.871.752

Básicas do Projeto	ETO_817610.pdf	13:32:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento.pdf	02/12/2016 13:30:00	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECriancaeIncapacitadosdeDecidir.pdf	02/12/2016 13:29:46	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEadulto.pdf	02/12/2016 13:25:35	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito

Outros	InstColetaDadosModificado.pdf	02/12/2016 06:45:05	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Outros	CurriculoLattesAmanda.pdf	03/11/2016 11:39:14	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOSubmissaoPlataformaBrasil.pdf	31/10/2016 09:37:33	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoNOVA.pdf	28/10/2016 13:00:12	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Outros	termodeconfidencialidades.pdf	28/10/2016 12:41:27	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Outros	TCUD.pdf	28/10/2016 12:39:49	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	28/10/2016 12:38:24	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	28/10/2016 12:37:05	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoinstitucional.pdf	28/10/2016 12:35:16	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodopesquisador.pdf	28/10/2016 12:34:39	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	28/10/2016 12:33:19	AMANDA DE ANDRADE GOMES SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550  
 UF: PI Município: TERESINA  
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br

Página 03 de 04



Continuação do Parecer: 1.871.752

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

TERESINA, 12 de Dezembro de 2016

Assinado por:  
 Lúcia de Fátima Almeida de Deus Moura  
 (Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550  
 UF: PI Município: TERESINA  
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br

Página 04 de 04

## **ANEXO B - Procedimento Operacional Padrão (POP) para coleta de material medular para exame direto e cultura para diagnóstico de leishmaniose**

### **1.Objetivo**

Avaliar a presença de protozoários do gênero *Leishmania* em pacientes com suspeita de leishmaniose visceral.

### **2. Siglas**

IDTNP – Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

LABLEISH - Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses

POP – Procedimento Operacional Padrão

EPIs – Equipamento de Proteção Individual

NNN – Meio de Fase Sólida a base de água com sangue

EDTA –

mL – Mililitro

µL – Microlitro

### **3.Responsabilidades**

#### 3.1. Profissional responsável:

- ✓ Punção aspirativa: Médico devidamente treinado e autorizado pelo IDTNP.
- ✓ Processamento do material coletado: Técnico devidamente treinado e autorizado pelo LABLEISH.

### **4.Procedimentos**

#### **4.1. Material necessário para realização:**

Punção aspirativa:

- ✓ Luvas para procedimento cirúrgico
- ✓ Gaze
- ✓ Xilocaína 2%
- ✓ 2 Seringas de 5 mL
- ✓ 1 seringa de 3 mL
- ✓ Agulha com mandril
- ✓ Povidine
- ✓ Agulhas estéreis
- ✓ Heparina

Processamento do material coletado:

- ✓ Lâminas para microscopia

- ✓ Lamparina e fósforo/isqueiro
- ✓ Tubos de hemocultura estéreis com tampa contendo meio de cultura NNN adicionado com meio de Schneider's
- ✓ Caixa de transporte
- ✓ Lápis para identificação das lâminas
- ✓ Caneta para registro no livro de cultura
- ✓ Tubos de EDTA-K3 para coleta de sangue venoso
- ✓ Tubos sem anticoagulante e com gel separador
- ✓ Eppendorf estéril contendo uma gota de EDTA
- ✓ Agulha estéril
- ✓ Álcool a 70%
- ✓ Seringa de 5 mL

#### **4.2. EPIs**

- ✓ Luvas descartáveis
- ✓ Máscara
- ✓ Jaleco de mangas compridas
- ✓ Sapatos fechados

#### **4.3. Coleta de material medular**

##### **4.3.1. Local de realização:**

Ambulatório ou hospital

##### **4.3.2. Técnica de coleta de material medular**

###### **4.3.2.1. Punção aspirativa**

Antissepsia: o médico, usando luvas esterilizadas e máscara, procede à limpeza do local da punção com povidine (respeitando a regra de limpeza do centro para a periferia e nunca retornando ao centro com a gaze já utilizada).

Anestesia: anestesiar o local da punção com 0,5mL a 1,0 mL de xilocaína 1%, iniciando pelos tecidos superficiais e terminando com infiltração do periósteo.

### **LOCAIS DO CORPO QUE DEVEM SER PUNÇIONADOS**

#### **1ª OPÇÃO – PUNÇÃO DE CRISTA ILÍACA:**

- Recomendada para adultos e crianças de qualquer idade, sendo satisfatória inclusive em lactentes;

Punção de crista ilíaca anterior, apesar de ser menos satisfatória, pode ser utilizada caso não seja possível realizar a punção na crista ilíaca posterior.

- Não está recomendada em pacientes obesos ou com imobilidade.
- Com o polegar posicionado abaixo da crista ilíaca e o indicador acima da crista ilíaca para firmarem a pele, penetrar a epiderme com a agulha, posicioná-la em 90° e proceder à introdução desta em osso, com firmeza.
- Quando a agulha estiver firmemente posicionada no osso, retirar o mandril, conectar a seringa e primeiramente aspirar 0,1 a 0,2 mL de medula, para a confecção das lâminas e semeio em meio de cultura utilizando a seringa estéril e sem aditivos, trocar a seringa e aspirar 0,5 mL de material medular para estocagem no LABLEISH.
- *Vantagens*: menos doloroso e mais seguro que a punção esternal.
- *Risco*: existe a rara possibilidade de ultrapassar a tábua óssea interna e atingir a alça intestinal.

## **2ª OPCÃO – PUNÇÃO ESTERNAL**

- Recomendada para pacientes obesos ou com imobilidade, usando-se agulha com proteção de profundidade.
- Não se recomenda essa punção em crianças menores de 2 anos.
- Esterno, na altura do primeiro, do segundo ou do terceiro espaço intercostal.
- Com o dedo mínimo na fúrcula e o polegar e o indicador nos espaços intercostais, penetrar a epiderme com a agulha posicionada em 90° e proceder à introdução desta no osso, com firmeza, porém com delicadeza.
- Quando a agulha estiver firmemente posicionada no osso, retirar o mandril, conectar a seringa e primeiramente aspirar 0,1 a 0,2 mL de medula, para a confecção das lâminas e semeio em meio de cultura utilizando a seringa estéril e sem aditivos, trocar a seringa e aspirar 0,5mL de material medular para estocagem no LABLEISH.

*Vantagem*: é de fácil execução e a tábua óssea delgada pode ser penetrada com facilidade.

- *Risco*: ultrapassar a tábua óssea interna e atingir vasos nobres (risco menor na punção do manúbrio, porque o esôfago encontra-se posterior).

### **3ª OPCÃO – PUNÇÃO TIBIAL**

- Recomendada para crianças menores de 2 meses e na impossibilidade da punção na crista ilíaca.
- Deve ser feita na superfície medial e achatada da diáfise proximal (1/3 superior), um a dois centímetros abaixo da tuberosidade tibial.
- Com o polegar e o indicador posicionados para firmarem a pele, penetrar a epiderme com a agulha, posicioná-la em um ângulo de 10° a partir do plano vertical, no sentido caudo-cranial, e proceder à introdução desta no osso, com firmeza, porém, com delicadeza.
- Quando a agulha estiver firmemente posicionada no osso, retirar o mandril, conectar a seringa e primeiramente aspirar 0,1 a 0,2 mL de medula, para a confecção das lâminas e semeio em meio de cultura utilizando a seringa estéril e sem aditivos, trocar a seringa e aspirar 0,5mL de material medular para estocagem no LABLEISH.
- *Riscos*: osteomielite, hematomas, abscesso subcutâneo e fratura óssea são complicações raras.

#### **4.4. Processamento do material medular aspirado**

- Quando solicitado pelo IDTNP, o técnico do LABLEISH deverá organizar e colocar na caixa de transporte o material necessário para o processamento da amostra coletada descrito no item 4.1.2;
- Na sala de pequena cirurgia do IDTNP, equipar-se de jaleco, luvas e máscara;
- Proceder com a limpeza da bancada a ser utilizada com álcool a 70%, em seguida forrar a bancada com papel toalha, organizando o material necessário;
- Registrar no livro de cultura do LABLEISH as seguintes informações: código do aspirado; nome completo do paciente; bloco, enfermaria, leito referente a internação; idade do paciente; data do aspirado e o nome do médico que realizou o procedimento.
- Identificar as lâminas, tubos de coleta de sangue venoso, tubos de hemocultura e eppendorf, com o mesmo código, nome completo do paciente e data do aspirado registrado no livro;

- Receber do médico duas seringas: a seringa com material medular sem aditivo deverá ser utilizada para o semeio de *Leishmania* em cultura e confecção de esfregaços, já a segunda seringa com aditivo(heparina);

- Descartar as seringas que foram utilizadas na caixa de perfurocortante;

#### **4.4.1. Semeio de *Leishmania* em cultura**

- Receber do médico a primeira seringa sem aditivos, acender a lamparina e próximo a chama, transferir para o tubo de cultura com NNN + Schneider's de duas a três gotas de material medular, e com o restante do material confeccionar os esfregaços;

- As culturas deverão ser levadas ao LABLEISH e acondicionadas em estufa a 25°C.

#### **4.4.2. Confecção de esfregaços de medula óssea**

- Com as lâminas devidamente identificadas com o código e nome completo do paciente, realizar o esfregaço confeccionando 5 lâminas para cada paciente;

- Uma das lâminas deverá ser entregue no Laboratório de bioquímica do IDTNP junto com a requisição médica, as demais lâminas deverão ser levadas ao LABLEISH.

#### **4.4.3 Coleta de sangue**

- Identificar os tubos de coletas (EDTA-K3/tampa roxa e sem anticoagulante/tampa vermelha) com o código, nome completo do paciente e a data;

- Identificar o melhor local para punção venosa, colocar as luvas e garrotear o indivíduo;

- Solicitar ao indivíduo para abrir e fechar a mão até a veia ficar mais proeminente, lembrando que o garroteamento não poderá ultrapassar 1 minuto;

- Realizar a antisepsia da região, em posse de seringa de 10mL e agulha descartáveis, retirar o protetor da agulha e puncionar a veia com o bisel da agulha voltado para cima;

- Coletar:

Adultos: até 10 mL de sangue;

Crianças e neonatos: a retirada de 2,5 a 3 mL/kg a cada punção é considerada segura ou, ainda, 3 a 7% do volume de sangue circulante total. Para casos envolvendo coletas múltiplas, sugere-se que 5 a 10% do volume de sangue total possa ser retirado no prazo de um mês;

Tabela 6.13.2 Quantidade de sangue total e que pode ser retirada em coleta

Peso (kg)	Volume total de sangue (mL)	Volume por coleta isolada (mL) (3 mL/kg)	Volume retirado em 4 a 6 semanas (mL) 5%
< 1,8	< 207	< 6	< 10
1,8 a 2,7	135 a 297	6 a 8	6 a 14
2,7 a 3,6	202 a 396	8 a 11	10 a 20
3,6 a 4,5	270 a 495	11 a 13	17 a 24
4,5 a 6,8	338 a 748	13 a 20	16 a 38
6,8 a 9,1	510 a 910	20 a 27	26 a 46
9,1 a 11,4	682 a 1.140	27 a 34	34 a 56
11,4 a 13,6	855 a 1.360	34 a 41	41 a 68
13,6 a 15,9	1.020 a 1.590	41 a 48	50 a 80
15,9 a 18,2	1.192 a 1.820	48 a 55	60 a 92
18,2 a 20,4	1.365 a 2.040	55 a 61	68 a 102
20,4 a 22,7	1.530 a 2.170	61 a 68	76 a 108
22,7 a 25,0	1.589 a 2.250	68 a 75	80 a 112
25,0 a 27,2	1.750 a 2.448	75 a 82	88 a 122
27,2 a 29,5	1.904 a 2.655	82 a 88	96 a 132
29,5 a 31,8	2.065 a 2.862	88 a 95	104 a 144
31,8 a 34,0	2.126 a 2.880	95 a 102	106 a 148
34,0 a 36,3	2.210 a 2.904	102 a 109	110 a 150
36,3 a 38,6	2.360 a 3.088	109 a 116	118 a 154
38,6 a 40,9	2.509 a 3.272	116 a 123	126 a 164
40,9 a 43,1	2.658 a 3.448	123 a 129	132 a 172
43,1 a 45,4	2.801 a 3.632	129 a 136	140 a 182

- Desgarrotar, remover a agulha e pressionar o local da punção com algodão orientando o paciente a não dobrar o braço;
- Transferir o sangue para os tubos de coletas (EDTA-K3/tampa roxa e sem anticoagulante/tampa vermelha);
- Descartar a seringa e agulha utilizada na caixa de perfurocortante;
- Levar o sangue coletado para ser processado e estocado no LABLEISH;

## 5. Precauções de segurança

- Manipule com precaução os materiais e amostras de origem humana. Considerando que não existe nenhum método de teste passível de garantir uma total ausência de agentes infecciosos, considere todas as amostras críticas como potencialmente infecciosa.
- Realize a assepsia das mãos e a troca de luvas entre o atendimento dos pacientes;

## 6. Referências Bibliográficas

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011

## **ANEXO C - Procedimento Operacional Padrão (POP) de exame parasitológico direto para diagnóstico de leishmaniose visceral**

**OBJETIVO:** Avaliar a presença de protozoários do gênero *Leishmania* em lâminas com material medular de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral

### **MATERIAL:**

1. Luvas de procedimento
2. Máscara
3. Caixa para transporte
4. Lâminas para microscopia
5. Lápis para identificação de lâminas
6. Óculos de proteção.
7. Corante Panótico Rápido
8. Microscópio ótico

### **PROCEDIMENTOS:**

1. Separa lâminas conforme o pedido e o protocolo.
2. Aguardar um médico habilitado realizar a punção para aspiração de MO
3. Pegar a seringa com o material medular e adicionar um pouco do conteúdo em quatro lâminas devidamente limpas e desengorduradas
4. Após adicionar uma gota do material medular em cada lâmina, pega-se outra lâmina e faz-se confecção dos esfregaços das lâminas
5. Com fita adesiva pregar as lâminas na requisição médica de realização do exame
6. Realizar o transporte das lâminas em caixa térmica para o laboratório de pesquisa de Leishmaniose
7. Separar duas lâminas para enviar para o laboratório de análises clínicas
8. No laboratório de pesquisa, espera-se as lâminas secar e depois procede-se a coloração das mesmas usando corante Panótico rápido (Laborclin produtos para laboratórios Ltda, Pinhais – Paraná, BRA)
9. Para tanto mergulha-se a lâminas durante 30 segundos na solução 1, depois 30 segundos na solução 2 e mais 30 segundos na solução 3
10. Lava-se em água corrente para retirar o excesso de corante
11. Colocar as lâminas inclinadas para secar

12. Após secarem, proceder a leitura das mesmas em microscópio ótico, varrendo toda a lâmina
13. Realizar o registro do resultado em livro próprio;
14. Guardar as lâminas em arquivos de cartolina devidamente identificados e em um armário específico no laboratório

## **ANEXO D – Procedimento Operacional Padrão (POP) para cultura tradicional para diagnóstico de leishmaniose visceral por meio do cultivo de parasitos**

**OBJETIVO:** Isolar cepas de *Leishmania spp* usando o método tradicional

### **MATERIAL:**

1. Lâminas para microscópio
2. Microscópio ótico
3. Frascos para cultura
4. Meio Shneider's Drosophyla
5. Meio Novy, McNealand Nicolle (NNN)
6. Urina humana estéril
7. Soro Bovino fetal
8. Gentamicina
9. Aspirado de medula óssea (de acordo com protocolo estabelecido em rotina pelo IDTNP)

### **PROCEDIMENTOS:**

1. Os frascos com meio de cultura contendo 1,0 mL de meio NNN com 15% de sangue de carneiro desfibrinado e 1,0 ML de meio Schneider's Drosophila suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 % de urina humana estéril e 2g/mL de gentamicina devem estar preparados com antecedência e guardados na geladeira, ao abrigo da luz.
2. O operador deve usar luvas e máscaras durante o procedimento.
3. Retirar da geladeira 2 frascos de meio de cultura para cada paciente e deixá-los à temperatura ambiente por 30 minutos
4. Identificar os frascos com o NOME COMPLETO do paciente e a DATA da COLETA para cada paciente. Coloque a etiqueta na lateral do frasco.
5. Adicionar 2 gotas (150 µL) do aspirado de medula óssea dentro de cada frasco antes de realizar o esfregaço para evitar contaminação. Fechar o frasco de cultura imediatamente após a inoculação do aspirado de medula.
6. Após esse procedimento realizar o esfregaço.
7. Enviar os frascos de cultura para o Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas o mais rápido possível.
8. No laboratório, incubar os frascos semeados a 27°. C em condições atmosféricas

9. Examinar em microscópio ótico a cada 7 dias.
10. Considerar o exame positivo quando formas promastigotas forem visualizadas
11. Considerar o exame negativo se não se observar formas promastigotas após 30 dias de incubação.

**Observações:** Mantenha os frascos contendo o meio de cultura em geladeira ao abrigo da luz. Recomenda-se retirar a lâmpada das geladeiras utilizadas para manutenção de meios de cultura. A luz causa degradação de substâncias presentes no meio como por exemplo aminoácidos e antibióticos.

#### REFERÊNCIA

POP – LRNTL/CLIOC- 022. Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz

## ANEXO E –Protocolo para PCR Convencional

### 1 Extração de DNA

A extração de DNA da MO ou do SP seguiu o protocolo do Kit de Extração da QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit seguindo o protocolo descrito (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha)

### 2 PCR

A PCR foi realizada utilizando o primers 150: 5'GGG (G / T) AGGGGCGTTCT (C / G) CGAA3 ' e 152: 5 ' (C / G) (C / G) (C / G) (A / T) CTAT (A / T) TTACACCA ACCCC 3 '

### Pré- PCR

- 1) Após a extração e quantificação do DNA, cerca de 2 µL de DNA foi misturado ao Master Mix (contendo Primers, dNTPS (nucleotídeos) e a enzima Taq Polimerase), seguindo o protocolo vigente no LabLeish para os Primers 150 e 152.
- 2) Em seguida o material foi levado a Termocicladora para replicação do DNA (duração: 1'26")
  - ❖ Enquanto o DNA estava sendo replicado, foi preparado o tampão de corrida – TBE 1x (500mL), utilizado para o processo de eletroforese em gel; e o gel de agarose 2%, também utilizado para o processo de eletroforese em gel (gel a 2% feito com 100 mL de TBE 1x)
- 3) Após os ciclos de replicação, 5 µL de DNA foi misturado a 5 µL de Gel Red (proporção 1:1)
- 4) As amostras foram então adicionadas aos poços do gel, para que ocorresse o processo de eletroforese em gel (duração de 1'25")

#### OBS:

- No primeiro poço foi colocado o peso molecular misturado ao gel red (mesma proporção das amostras)
  - As demais amostras ficaram na sequência.
  - A ultima amostra de cada fileira de poços correspondia ao controle negativo
- 5) Após o tempo necessário para que ocorresse o processo da eletroforese em gel, o gel foi retirado da cuba e analisado sob luz UV.

## **ANEXO F – Procedimento Operacional Padrão (POP) para preparo de meio de cultura fase líquida**

**1 Objetivo:** estabelecer procedimentos para a preparação de meios de cultura SHNEIDER’S, utilizado para manutenção “*in vitro*” de espécimes/cepas de *Leishmania spp.* no LABLEISH

### **2 Siglas**

IDTNP: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela

LABLEISH: Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses

POP: Procedimento Operacional Padrão

EPIs: Equipamentos de Proteção Individual

NNN: meio de cultura de fase sólida a base de ágar e sangue

mL: mililitro

µL: microlitro

g? gramas

°C: graus Celsius

### **3 Profissional responsável**

Técnico devidamente treinado e autorizado pelo LABLEISH

## **4 Procedimentos necessários para o preparo de 500 mL de meio de cultura líquido**

### **4.1 Equipamentos**

- a) Cabine de segurança biológica
- b) Pipetas automáticas
- c) Banho maria
- d) Sistema de filtração a vácuo com capacidade de 500mL
- e) Tubos de Falcon 50 mL
- f) Seringa 10mL
- g) Filtro para seringa
- h) Estante para tubos de 50 mL
- i) Membrana com poro de 0,22µM
- j) Bomba a vácuo

### **4.2 Substâncias necessárias**

- a) Soro fetal bovino inativado – 50 mL

- b) Urina humana masculina – 10mL
- c) Penicilina – 1mL
- d) Gentamicina 80mg – 2 mL
- e) Meio Shneider's Insect Medium – 1 frasco de 500mL

#### **4.3 EPIs**

- a) Luvas de procedimentos descartáveis
- b) Jaleco de mangas compridas
- c) Sapato fechado

#### **4.4 Para o preparo da solução**

- Organizar antecipadamente todo o material que será utilizado e na cabine de segurança realizar os procedimentos a seguir:
  - a) Filtrara a urina, utilizando o filtro para seringa
  - b) Retiras uma alíquota de 50 mL de meio de cultura do frasco de 500ml de meio Shneider's e transferi-lo para um tubo Falcon de 50 mL, previamente esterilizado, e identifica-lo por meio SHNEIDER'S NÃO ATIVADO
  - c) Em seguida conecte a bomba a vácuo ao sistema de filtração e transferir 450mL de meio Shneider's, 1mL de penicilina, 10mL de urina humana masculina filtrada, 50mL de soro bovino fetal inativado e 80mg de gentamicina. OBS: realizar todo o procedimento próximo a chama do bico de Bunsen, evitando o risco de contaminação.
  - d) Após a filtração do meio, transferir para tubos de Falcon de 50 mL estéreis, identificando a tampa com a DATA do preparo do meio e SHNEIDER'S ATIVADO.
  - e) Armazenar no refrigerador 01 – meios de cultura e teste rápido

#### **5.0 Precauções de segurança**

- Usar as técnicas de assepsia conhecidas para o bom andamento do preparo, evitando assim uma contaminação

**APÊNDICES**

**APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Termo de  
Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças e Pessoas Incapacitadas de Decidir e  
Termo de Assentimento Livre e Esclarecido**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE**

**Título da pesquisa: Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral**

**Pesquisadores responsáveis: Amanda de Andrade Gomes Silva e Dorcas Lamounier Costa**

**Telefone: (86) 98125 9995**

**e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com**

**Informações ao voluntário**

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal do Piauí do Programa de Pós-graduação - Mestrado em Ciências e Saúde. A pesquisa tem como objetivo validar duas técnicas de cultura modificadas e duas técnicas de microcultura para diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes internados em hospital de referência do Piauí.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um parasita chamado leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax. O diagnóstico pode também ser feito por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil são realizados alguns diagnósticos laboratoriais para a detecção da leishmaniose visceral dos quais podemos citar os testes parasitológicos e testes imunológicos – dentre eles Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Intradermorreação de Montenegro (IDRM); e ainda de maneira complementar o hemograma.

No Brasil os diferentes métodos para diagnóstico de leishmaniose visceral e suas respectivas taxas de sensibilidade e especificidade, nos despertou a necessidade de validar quatro testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral que podem revelar-se

mais simples e rápido, muito sensível e com prazo para resultados muito menores, que poderá ajudar a elucidar o diagnóstico dos pacientes em um prazo de 48 a 72 horas.

#### Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças que apresentarem esplenomegalia associada ou não a febre que define o quadro suspeito para calazar, com indicação de punção de medula óssea para fins diagnósticos, após a identificação e admissão hospitalar no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP).

Apenas os pacientes com indicação médica para diagnóstico de doenças a partir de aspirado de medula óssea serão convidados a participar do estudo, uma vez que o material (aspirado de medula óssea) necessário para o presente estudo será obtido na punção medular como prática de diagnóstico no IDTNP, não sendo os participantes submetidos a nova punção medular, procedimento doloroso e invasivo, somente com a finalidade de pesquisa – **NENHUM PROCEDIMENTO SERÁ REALIZADO SOMENTE COM A FINALIDADE DE PESQUISA.**

Após o consentimento do paciente no estudo, será realizado o procedimento de aspiração de medula óssea como já estabelecido em rotina pelo IDTNP, e verificado em prontuário se já foi realizado o teste rápido para leishmaniose (rotina estabelecida na admissão hospitalar), se sim, será registrado o resultado, se não, o pesquisador irá realiza-lo de acordo com as orientações do teste utilizado pelo IDTNP. O material coletado (aspirado de medula óssea) será semeado em Método de Cultura Tradicional (MCT), como já realizado pelo IDTNP e uma alíquota será destinada ao experimento a ser realizado pelo presente estudo. Será realizada também a coloração das lamina para o exame parasitológico direto como já estabelecido em rotina pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas do IDTNP e será realizado a PCR como já estabelecido em rotina.

#### Riscos possíveis

No que se refere aos riscos considerando Resolução 466/12 quando diz que toda pesquisa envolvendo seres humanos representa riscos ao participante, o presente estudo representará riscos mínimos aos participantes. Desse modo, será devidamente esclarecido ao paciente a possibilidade de possível sensação de incomodo, dúvidas ou possíveis

constrangimentos pela revelação de questões relacionadas ao questionário e ao procedimento de aspiração de medula óssea, riscos estes que foram evitados e minimizados por meio da adoção de intervenções como: a garantia de sigilo, confidencialidade e realização da entrevista em locais que asseguraram a segurança, além da aplicação de uma abordagem livre de julgamentos e valores. Além disso, a maior parte dos exames que serão realizados, fazem parte de uma rotina para qualquer pessoa com a possibilidade de estar com calazar. Uma pequena quantidade a mais de sangue e de medula óssea vai ser necessária para os testes. É importante que você saiba que há riscos envolvendo o tratamento do calazar, independentes da pesquisa. O calazar é quase sempre fatal quando não tratado e o tratamento, embora quase sempre seja eficaz, ocasionalmente pode falhar.

#### Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de medula óssea que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral e para a realização desta pesquisa, serão guardadas no laboratório de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

#### Esclarecimentos sobre garantias aos pacientes que aceitarem participar do estudo.

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2. Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às

informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Se você tiver qualquer dúvida com relação a pesquisa entrar em contato com:

Nome: Amanda de Andrade e Dorcas Lamounier

Telefone: (86) 98125-9995; e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com

5. A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo.

6. O uso das amostras de sangue e outras que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

8. Os pacientes internados receberão atestado médico, frente às implicações trabalhistas, devido à falta no trabalho durante o período de internação.

#### Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10. CEP: 64.049-550. Teresina-PI.

Tel.: (86) 3215.5734. email: cep.ufpi@ufpi.br. web: www.ufpi.br/cep

### “VALIDAÇÃO DE TESTES PARASITOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL”

#### Formulário de contato com o paciente

No do paciente em estudo: \_\_\_\_\_ Registro do IDTNP: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_  
 Informante/  
 Acompanhante: \_\_\_\_\_  
 Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Tel.residencial:( ) \_\_\_\_\_ Tel.comercial:( ) \_\_\_\_\_  
 Endereço para correspondência: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Ponto de referência: \_\_\_\_\_

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos

#### Declaração do paciente

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais,  
(nome do voluntário)  
 em pleno gozo das minhas faculdades mentais, concordo em participar como voluntário no estudo denominado “Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral”. As implicações de minha participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra da minha medula óssea seja armazenada para pesquisas futuras. Entendo que em qualquer momento posso desistir de participar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de meus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
 Nome do voluntário

\_\_\_\_\_  
 Assinatura ou impressão digital do voluntário

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas  
 Data Hora

#### Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

\_\_\_\_\_  
 Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
 Assinatura ou impressão digital da testemunha

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas  
 Data Hora

Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o paciente recebeu uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

---

Nome do investigador

Assinatura do investigador

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

Data

Hora

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças e Pessoas incapacitadas de Decidir**

**Título da pesquisa :Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral**

**Pesquisadores responsáveis: Amanda de Andrade Gomes Silva e Dorcas Lamounier Costa**

**Telefone: (86) 98125 9995**

**e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com**

Informações ao voluntário

Estamos convidando \_\_\_\_\_ para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal do Piauí do Programa de Pós-graduação - Mestrado em Ciências e Saúde. A pesquisa tem como objetivo validar duas técnicas de cultura modificadas e duas técnicas de microcultura para diagnóstico de infecção e/ou doença da Leishmaniose visceral em pacientes internados em hospital de referência do Piauí.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um parasita chamado leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax. O diagnóstico pode também ser feito por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil são realizados alguns diagnósticos laboratoriais para a detecção da leishmaniose visceral dos quais podemos citar os testes parasitológicos e testes imunológicos – dentre eles Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Intradermorreação de Montenegro (IDRM); e ainda de maneira complementar o hemograma.

No Brasil os diferentes métodos para diagnóstico de leishmaniose visceral e suas respectivas taxas de sensibilidade e especificidade, nos despertou a necessidade de validar quatro testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral que podem revelar-se mais simples e rápido, muito sensível e com prazo para resultados muito menores, que poderá ajudar a elucidar o diagnóstico dos pacientes em um prazo de 48 a 72 horas.

## Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças que apresentarem esplenomegalia associada ou não a febre que define o quadro suspeito para calazar, com indicação de punção de medula óssea para fins diagnósticos, após a identificação e admissão hospitalar no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP).

Apenas os pacientes com indicação médica para diagnóstico de doenças a partir de aspirado de medula óssea serão convidados a participar do estudo, uma vez que o material (aspirado de medula óssea) necessário para o presente estudo será obtido na punção medular como prática de diagnóstico no IDTNP, não sendo os participantes submetidos a nova punção medular, procedimento doloroso e invasivo, somente com a finalidade de pesquisa – **NENHUM PROCEDIMENTO SERÁ REALIZADO SOMENTE COM A FINALIDADE DE PESQUISA.**

Após o seu consentimento para a participação de \_\_\_\_\_ no estudo, será realizado o procedimento de aspiração de medula óssea como já estabelecido em rotina pelo IDTNP, e verificado em prontuário se já foi realizado o teste rápido para leishmaniose (rotina estabelecida na admissão hospitalar), se sim, será registrado o resultado, se não, o pesquisador irá realizá-lo de acordo com as orientações do teste utilizado pelo IDTNP. O material coletado (aspirado de medula óssea) será semeado em Método de Cultura Tradicional (MCT), como já realizado pelo IDTNP e uma alíquota será destinada ao experimento a ser realizado pelo presente estudo. Será realizada também a coloração das laminais para parasitológico direto como já estabelecido em rotina pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas do IDTNP e será realizado a PCR como já estabelecido em rotina.

## Riscos possíveis

No que se refere aos riscos considerando Resolução 466/12 quando diz que toda pesquisa envolvendo seres humanos representa riscos ao participante, o presente estudo representará riscos mínimos aos participantes. Desse modo, será devidamente esclarecido ao paciente a possibilidade de possível sensação de desconforto, dúvidas ou possíveis constrangimentos pela revelação de questões relacionadas ao questionário e ao procedimento

de aspiração de medula óssea, riscos estes que foram evitados e minimizados por meio da adoção de intervenções como: a garantia de sigilo, confidencialidade e realização da entrevista em locais que asseguraram a segurança, além da aplicação de uma abordagem livre de julgamentos e valores. Além disso, a maior parte dos exames que serão realizados, fazem parte de uma rotina para qualquer pessoa com a possibilidade de estar com calazar. Uma pequena quantidade a mais de sangue e de medula óssea vai ser necessária para os testes. É importante que você saiba que há riscos envolvendo o tratamento do calazar, independentes da pesquisa. O calazar é quase sempre fatal quando não tratado e o tratamento, embora quase sempre seja eficaz, ocasionalmente pode falhar.

#### Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de medula óssea que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral e para a realização desta pesquisa, serão guardadas no laboratório de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

#### Esclarecimentos sobre garantias aos pacientes que aceitarem participar do estudo.

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2. A participação de \_\_\_\_\_ nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se vocês decidirem por não mais participar da pesquisa, pode-se retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às

informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Se você tiver qualquer dúvida com relação a pesquisa entrar em contato com:

Nome: Amanda de Andrade e Dorcas Lamounier

Telefone: (86) 98125-9995; e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com

5. A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo.

6. O uso das amostras de sangue e outras que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

8. Os pacientes internados receberão atestado médico, frente às implicações trabalhistas, devido à falta no trabalho durante o período de internação.

#### Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10. CEP: 64.049-550. Teresina-PI.

Tel.: (86) 3215.5734. e mail: cep.ufpi@ufpi.br web: www.ufpi.br/cep

### “VALIDAÇÃO DE TESTES PARASITOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL”

#### Formulário de contato com o paciente

No do paciente em estudo: \_\_\_\_\_ Registro do IDTNP: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_  
 Responsável Legal: \_\_\_\_\_  
 Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Tel.residencial:( ) \_\_\_\_\_ Tel.comercial:( ) \_\_\_\_\_  
 Endereço para correspondência: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Ponto de referência: \_\_\_\_\_

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças e Pessoas Incapacitadas de Decidir

#### Declaração do responsável

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais, <sup>(nome do responsável)</sup> detentor de integral competência para decidir por \_\_\_\_\_ <sup>(nome do paciente)</sup> torno-o um voluntário para participar do estudo denominado “Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral”. As implicações desta participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra do sangue e da medula óssea sejam armazenados para pesquisas futuras. Entendo que em qualquer momento posso desistir da participação neste estudo sem que este indivíduo sofra nenhuma punição ou perda de seus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
 Nome do voluntário

\_\_\_\_\_  
 Assinatura ou impressão digital do responsável

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

Data

Hora

#### Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao responsável pelo paciente de fazer perguntas neste documento e testemunhar a assinatura do mesmo.

\_\_\_\_\_  
 Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
 Assinatura ou impressão digital da testemunha

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas  
Data Hora

Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o responsável paciente recebeu uma cópia do termo de consentimento.

---

Nome do investigador

Assinatura do investigador

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas  
Data Hora

**Termo de assentimento livre e esclarecido  
(destinado aos pacientes de 07 a 17 anos de idade)**

**Título da pesquisa: Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral**

**Pesquisadores responsáveis: Amanda de Andrade Gomes Silva e Dorcas Lamounier Costa**

**Telefone: (86) 98125 9995**

**e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com**

Informações ao voluntário participante da pesquisa

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal do Piauí do Programa de Pós-graduação - Mestrado em Ciências e Saúde. Nós discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo.

Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir à vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que seja explicado melhor, porque você ficou mais interessado ou preocupado. Quando tiver qualquer dúvida pare a leitura e peça explicação.

A pesquisa tem como objetivo “testar” duas técnicas de cultura modificadas e duas técnicas de microcultura para o diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes internados em hospital de referência do Piauí.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um parasita chamado leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax (próximo a região do “peito”). O diagnóstico pode também ser feito por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil são realizados alguns diagnósticos laboratoriais para a detecção da leishmaniose visceral como por exemplo os testes parasitológicos e testes imunológicos – dentre eles Imunofluorescência

Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Intradermorreação de Montenegro (IDRM); e ainda de maneira complementar o hemograma.

No Brasil os diferentes métodos para diagnóstico de leishmaniose visceral e suas respectivas taxas de sensibilidade e especificidade, nos despertou a necessidade de “testar” quatro testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral que podem ser mais simples e rápido, muito sensível e com tempo para resultados muito menores, com resultado do diagnóstico dos pacientes em um tempo de 48 a 72 horas.

#### Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças que apresentarem esplenomegalia associada ou não a febre que define o quadro suspeito para calazar, com indicação de punção de medula óssea para fins diagnósticos, após a identificação e admissão hospitalar no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP).

Apenas os pacientes que o medico pedir o exame para diagnóstico de doenças usando a medula óssea serão convidados a participar do estudo, pois a medula óssea que precisamos para o estudo, já vai ser coletada como pratica de diagnóstico no hospital (IDTNP), não sendo realizado uma nova coleta da medula óssea, procedimento doloroso e invasivo, somente com a finalidade de pesquisa – **NENHUM PROCEDIMENTO SERÁ REALIZADO SOMENTE COM A FINALIDADE DE PESQUISA.**

Após o consentimento do paciente no estudo, será realizado o procedimento de aspiração de medula óssea como já estabelecido em rotina pelo IDTNP, e verificado em prontuário se já foi realizado o teste rápido para leishmaniose (rotina estabelecida na admissão hospitalar), se sim, será registrado o resultado, se não, o pesquisador irá realiza-lo de acordo com as orientações do teste utilizado pelo IDTNP. O material coletado (aspirado de medula óssea) será semeado em Método de Cultura Tradicional (MCT), como já realizado pelo IDTNP e uma alíquota será destinada ao experimento a ser realizado pelo presente estudo. Será realizada também a coloração das lamina para parasitológico direto como já estabelecido em rotina pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas do IDTNP e será realizado a PCR como já estabelecido em rotina.

#### Riscos possíveis

No que se refere aos riscos considerando Resolução 466/12 quando diz que toda pesquisa envolvendo seres humanos representa riscos ao participante, o presente estudo representará riscos mínimos aos participantes. Desse modo, será devidamente esclarecido ao paciente a possibilidade de possível sensação de incomodo, dúvidas ou possíveis constrangimentos pela revelação de questões relacionadas ao questionário e ao procedimento de aspiração de medula óssea, riscos estes que foram evitados e minimizados por meio da adoção de intervenções como: a garantia de sigilo, confidencialidade e realização da entrevista em locais que asseguraram a segurança, além da aplicação de uma abordagem livre de julgamentos e valores. Além disso, a maior parte dos exames que serão realizados, fazem parte de uma rotina para qualquer pessoa com a possibilidade de estar com calazar. Uma pequena quantidade a mais de sangue e de medula óssea vai ser necessária para os testes. É importante que você saiba que há riscos envolvendo o tratamento do calazar, independentes da pesquisa. O calazar é quase sempre fatal quando não tratado e o tratamento, embora quase sempre seja eficaz, ocasionalmente pode falhar.

#### Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de medula óssea que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral e para a realização desta pesquisa, serão guardadas no laboratório de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

#### Esclarecimentos sobre garantias aos pacientes que aceitarem participar do estudo.

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2. Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Se você tiver qualquer dúvida com relação a pesquisa entrar em contato com:

Nome: Amanda de Andrade e Dorcas Lamounier

Telefone: (86) 98125-9995; e-mail: a.manda.andrade@hotmail.com

5. A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo.

6. O uso das amostras de sangue e outras que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

8. Os pacientes internados receberão atestado médico, frente às implicações trabalhistas, devido à falta no trabalho durante o período de internação.

#### Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10. CEP: 64.049-550. Teresina-PI.

Tel.: (86) 3215.5734. email: cep.ufpi@ufpi.br web: www.ufpi.br/cep

### “VALIDAÇÃO DE TESTES PARASITOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL”

#### Formulário de contato com o paciente

No do paciente em estudo: \_\_\_\_\_ Registro do IDTNP: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Informante/

Acompanhante: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Tel.residencial:( ) \_\_\_\_\_ Tel.comercial:( ) \_\_\_\_\_

Endereço para correspondência: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ponto de referência: \_\_\_\_\_

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido  
(destinado aos pacientes de 11 a 17 anos de idade)

Declaração do paciente

Eu, \_\_\_\_\_, com idade entre 07 e 17 anos em pleno gozo das minhas faculdades mentais, concordo em participar como voluntário no denominado “Validação de testes parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral”. As implicações de minha participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra da minha medula óssea seja armazenada para pesquisas futuras. Entendo que em qualquer momento posso desistir de participar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de meus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

---

Nome do voluntário

Assinatura ou impressão digital do voluntário

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

Data

Hora

Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

---

Nome da testemunha

Assinatura ou impressão digital da testemunha

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

Data

Hora

Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o paciente recebeu uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

---

Nome do investigador

Assinatura do investigador

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas  
Data Hora

## APÊNDICE B – Questionário

### QUESTIONÁRIO

#### 1. IDENTIFICAÇÃO

No. do paciente no estudo: \_\_\_\_\_ . Número do prontuário no IDTNP: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F

Data do nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da admissão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da alta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Procedência (UF) : \_\_\_\_\_ Município : \_\_\_\_\_

#### 2. HISTÓRIA CLÍNICA

Tempo de doença: \_\_\_\_\_ dias

Perda de peso..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, quantificar: \_\_\_\_\_ g

Febre..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim duração da febre: \_\_\_\_\_ dias

Calafrios..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Palidez..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Apatia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Agitação / irritabilidade..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Fadiga / astenia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Vômitos..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sonolência..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Insônia ..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Inapetência..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Aumento do volume abdominal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Diarréia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Constipação intestinal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dor abdominal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Tosse..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dispnéia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Alteração da cor da urina..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Oligúria..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Queda de cabelo.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Edema.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Petéquiias.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Equimoses.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Epistaxe.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento gengival.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento em locais de punção.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento digestivo.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Hematúria macroscópica.....	( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

### 3. EXAME FÍSICO

- Peso: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ kg Estatura: \_\_\_\_\_ cm PA: \_\_\_\_\_x\_\_\_\_\_ mmHg FC: \_\_\_\_\_ bpm FR: \_\_\_\_\_ irpm
- Temperatura axilar máxima durante a internação \_\_\_\_\_ oC
- Estado geral ( ) 1. Bom 2. Regular 3. Comprometido
- Consciente ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Cor das mucosas ( ) 1. Normocoradas 2. Palidez leve/moderada 3. Palidez acentuada
- Icterícia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Perfusão periférica ( ) 1. Boa 2. Cianose de extremidades 3. Cianose generalizada
- Lesões de pele / Especificar ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Se sim, especificar (tipo da lesão, localização, tamanho, forma, contornos, ulceração, elevação, secreção)

- Alopecia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Linfonomegalia ( ) 1. Ausente 2. Em 1-2 cadeias 3. Em mais de 3 cadeias
- Hidratação ( ) 1. Hidratado 2. Desidratado I 3. Desidratado II 4. Desidratado III 9. Ignorado
- Edema ( ) 1. Ausente 2. Edema de MMII 3. Edema generalizado
- Estado nutricional: ( ) 1. Eutrófico 2. Desnutrido I 3. Desnutrido II 4. Desnutrido III 9. Ignorado
- Dispnéia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Se sim, retrações intercostais ou subdiafragmáticas ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Ausculta pulmonar ( ) Normal ( ) Estertores crepitantes ( ) Estertores bolhosos
- ( ) Sibilos ( ) Roncos
- Outras: \_\_\_\_\_
- Ausculta cardíaca ( ) Normal ( ) Sopros ( ) Arritmia ( ) Ritmo de galope ( ) Frêmito
- ( ) Atrito pericárdico ( ) Abafamento de bulhas
- ( ) Outras: \_\_\_\_\_
- Esplenomegalia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Se sim, baço a \_\_\_\_\_ cm do BCE, na linha hemiclavicular, em direção à ponta

- Hepatomegalia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
- Se sim, fígado a \_\_\_\_\_ cm do BCD e \_\_\_\_\_ cm do apêndice xifóide
- Outros dados relevantes:

---



---



---

- Diagnóstico anterior de LV: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

4. TERAPÊUTICA UTILIZADA 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Terapia de suporte:

- ( ) Antibióticos
- ( ) Concentrado de hemácias
- ( ) Concentrado de plaquetas
- ( ) Plasma
- ( ) Vitamina K
- ( ) Complexo protrombínico
- ( ) Ácido acetil salicílico ou terapia anticoagulante

Terapia específica

- ( ) Antimonial de N metil glucamina  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- ( ) Desoxicolato de anfotericina B  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- ( ) Anfotericina B lipossomal  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- ( ) Miltefosina  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Outras: \_\_\_\_\_

---



---

5. COMPLICAÇÕES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

- ( ) Infecção urinária
- ( ) Insuficiência renal
- ( ) Pneumonia
- ( ) Infecção cutânea ou do tecido celular subcutâneo
- ( ) Sepsis
- ( ) Hemorragia
- ( ) Convulsões
- ( ) Outra: \_\_\_\_\_

---

6. CO-MORBIDADES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

( ) HIV / aids

( ) Uso de drogas imunossupressoras

( ) Câncer.

Especificar: \_\_\_\_\_

( ) Transplante.

Especificar: \_\_\_\_\_

( ) Doença renal crônica

( ) Doença hepática crônica

( ) Outra:

\_\_\_\_\_

## 7. EVOLUÇÃO CLÍNICA

Número de dias de febre após o início da terapia específica: \_\_\_\_ dias

Tamanho do baço à saída do hospital: \_\_\_\_ cm do RCE

Tamanho do fígado à saída do hospital: \_\_\_\_ cm do RCD

( ) Alta hospitalar com melhora

( ) Alta hospitalar sem melhora

( ) Transferência para UTI

( ) Transferência para outro serviço

( ) Óbito

Em caso de óbito, data do óbito: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Causa

mortis: \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_