

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

GIULIANA SCHMIDT FRANÇA FONSECA

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES
MÉTODOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

VITÓRIA
2013

GIULIANA SCHMIDT FRANÇA FONSECA

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES
MÉTODOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Elenice Moreira Lemos.

VITÓRIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F676a Fonseca, Giuliana Schmidt França, 1970-
Avaliação do desempenho de diferentes métodos no
diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral humana /
Giuliana Schmidt França Fonseca. – 2013.
64 f. : il.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Leishmaniose visceral – Diagnóstico. 2. Teste
imunoenzimático. 3. Citometria de fluxo. 4. Teste imunológico. I.
Lemos, Elenice Moreira. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

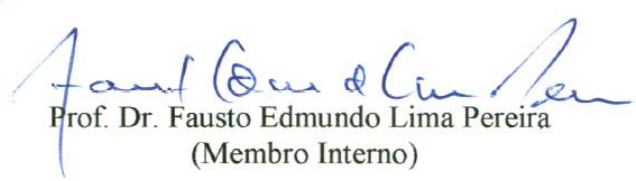
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda GIULIANA SCHMIDT FRANÇA FONSECA apresentou a dissertação intitulada “**Avaliação do desempenho de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral Humana**” em sessão pública, no dia 28 de agosto de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu () **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica GIULIANA SCHMIDT FRANÇA FONSECA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 28 de agosto de 2013


Prof. Dr. Silvio Fernando Guimarães de Carvalho
(Membro Externo)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Interno)


Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)

Ao meu marido Renato e aos meus filhos, Caio, Clara e Carolina, que participam sempre de todos os meus sonhos e conquistas. Pedacos da minha alma e motivação da minha vida! Amo vocês...

Aos meus amados pais, Luiz e Érica e meus irmãos Dorothea e Lincoln pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos:

A Deus, pela força e coragem, presença constante em minha vida;

À minha orientadora Elenice Moreira Lemos, pela oportunidade oferecida na orientação deste projeto, por acompanhar passo a passo cada etapa deste trabalho, sempre otimista e confiante, principalmente, pela compreensão e apoio oferecidos. A você, minha admiração. Você é muito guerreira! Obrigada por tudo;

Ao Dr. Silvio Fernandes Guimarães de Carvalho, pela colaboração, esclarecimentos e fornecimento de subsídios e informações sobre diagnóstico e tratamento dos pacientes portadores de Leishmaniose Visceral utilizados nesse trabalho;

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, especialmente ao Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dr^a Fernanda Freire Campos Nunes pela colaboração na realização dos ensaios de citometria e análise dos dados;

Ao Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis e Wendel Coura Vital, pela ajuda e disponibilidade em realizar experimentos em seu laboratório;

Aos amigos do lab-leish: Camila, Gregório, Juliana, Kamila, Laura, Lygia, Mariela, Natália, pelo apoio, companheirismo e amizade. Sou profundamente grata por tudo que aprendi e ainda aprendo com vocês;

TODOS contribuíram de diversas formas, mas gostaria de agradecer especialmente a Renata por ter me ensinado a “arte” da cultura de leishmanias, por ter compartilhado sua experiência e pela generosidade em transmitir o que sabe. À Priscila, pelo profissionalismo, e carinho com a qual me ensinou cada detalhe da citometria e à Aline pelo companheirismo, amizade e auxílio nos experimentos, com ela, dividi não só a bancada e o citômetro, mas muitas alegrias;

Ao Prof. Fausto, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação a tudo que faz. Verdadeiro “padrão ouro”, referência para todos nós;

Ao Marco André, pela ajuda com o abstract, sempre tão generoso;

À Teresa Gomes, pela ajuda na análise dos dados;

Aos professores da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela confiança em nosso trabalho e estímulos para aprender e ir adiante;

Aos amigos da turma de mestrado pela amizade, principalmente a Maria José, companheira de todos os momentos. Ficarão guardados na lembrança todos os momentos agradáveis que passamos juntos;

A todos os funcionários do NDI;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, em especial à Fátima e à Wayna, por todo auxílio durante o mestrado;

A CAPES, CNPq e NDI pelo apoio financeiro;

Aos meus sogros Ailmer e Ivone, pela extrema fé em Deus, dedicação e retidão de caráter me dão exemplo de vida;

Agradeço a todos os meus amigos e familiares, que sempre estiveram presentes, mesmo que virtualmente, trazendo palavras de apoio e incentivo;

A todas as pessoas que encontrei pelo caminho e que foram, cada uma a seu modo, de fundamental importância, meus sinceros agradecimentos.

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

O diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral (LV) humana é usualmente baseado em parâmetros clínicos e epidemiológicos, associado a exames parasitológicos e/ou imunológicos. Tendo em vista que a doença é fatal se não tratada, a busca por métodos diagnósticos mais efetivos, que sejam de fácil execução, simples, acessíveis, menos invasivos, e rápidos, se faz necessário, diminuindo o tempo de obtenção dos resultados. Portanto, neste estudo foi avaliado o desempenho de diferentes métodos já utilizados na rotina ou propostas como ferramentas alternativas para o diagnóstico da LV, incluindo o exame direto de punção de medula óssea, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste rápido com rK39 (Kalazar Detect®), a ELISA com antígeno solúvel de *L. chagasi* e a imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (FC-AFPA). Para isso foram avaliadas 77 amostras biológicas (punção de medula óssea e soro) de pacientes com diagnóstico clínico de LV, tratados e curados. A sensibilidade dos testes avaliados foi de 48% para o exame parasitológico direto, 74% para RIFI, 79% para o teste rápido com rK39, 88% para o teste ELISA-ASL e 94% para a FC-AFPA. A análise comparativa dos testes avaliados demonstrou que há maior concordância entre os testes sorológicos entre si, do que entre os testes sorológicos e o exame direto, devido a sua baixa sensibilidade. Foi também realizada a comparação entre os resultados dos testes sorológicos em relação ao resultado do teste parasitológico direto. Entretanto, nossos resultados mostraram que o desempenho dos testes foi semelhante independente do resultado do exame direto. Além disso, nosso estudo avaliou o desempenho de dois algoritmos para diagnóstico da LV baseados apenas em testes sorológicos. O primeiro deles utilizando a RIFI como teste de inicial, uma vez que este teste é disponibilizado pelo Ministério da Saúde (MS) para os laboratórios de referência em diagnóstico de LV e um segundo utilizando o teste rápido rK39, que tem sido recentemente sugerido como teste de triagem pelo MS. A análise dos dados demonstrou que o algoritmo para o diagnóstico da LV humana que apresentou melhor desempenho, ou seja, todos os casos foram detectados, foi aquele que utilizou o teste rápido como teste inicial, seguido de FC-AFPA.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral – Diagnóstico, Teste imunoenzimático, Citometria de fluxo, Teste imunológico

ABSTRACT

The routine diagnosis of human visceral leishmaniasis (VL) is usually based on clinical and epidemiologic parameters associated to parasitological and/or immunological tests. Being a fatal disease if not treated, the search for more effective, easy to perform, simple, affordable, and fast diagnostic methods, is necessary, decreasing the time to obtain results. Therefore, in this study the performance of different methods already used in the routine or proposed as alternative tools to the diagnose of VL was evaluated, which included the direct parasite detection (DPD) on bone marrow aspirates, indirect immunofluorescent assay (IFA), rK39 rapid test (Kalazar Detect®), ELISA test using *L.chagasi* soluble antigen, and immunofluorescence by flow cytometry (FC-AFPA). Seventy-seven biological specimens (bone marrow and serum) from patients with clinical diagnosis of VL, treated, and cured were assessed. The sensitivity of evaluated tests was 48% for DPD, 74% for IFA, 79% for rK39 rapid test, 88% for ELISA-SLA, and 94% for FC-AFPA. The comparative analysis demonstrated higher concordance among serological tests in comparison to serological tests and DPD, due to the low sensitivity of the latter. It was also done the comparison between the results of serological tests and direct examination. However, our results showed that the performance of tests was similar regardless of DPD results. In addition, our study evaluated the performance of two algorithms for the diagnosis of VL based only on serological tests. The first of them using IFA as a initial test, since this is the test provided by the Ministry of Health (MH) for reference laboratories for diagnosis of VL, and a second algorithm using the rK39 rapid test, that has recently been suggested as a screening test by the MH. It was demonstrated that the algorithm presenting the best performance, that is, all the cases were detected, was the one using rapid test as initial test followed by FC-AFPA.

Keywords: Visceral Leishmaniasis – Diagnosis, Immunoassay, Flow Cytometry, Immunological Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo evolutivo das espécies de <i>Leishmania spp</i>	19
Figura 2 - Representação esquemática da seqüência das análises da pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> , utilizando-se parâmetros de tamanho e granulosidade. (B) Histogramas individuais representando o percentual de parasitas fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação, (C) após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado e (D) um soro de um paciente portador de LV. O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado.....	38
Figura 3 - Sensibilidade dos diferentes testes utilizados para o diagnóstico de LV. .	41
Figura 4 - Desempenho dos diferentes métodos sorológicos em relação ao resultado do exame direto.....	43
Figura 5 - Porcentagem de resultados positivos em relação ao resultado do exame direto. Resultados positivos (■) e resultados negativos (□).....	44
Figura 6 – Porcentagem de resultados positivos utilizando RIFI como teste inicial para o diagnóstico de LV, seguido de rK39, ELISA-ASL e FC-AFPA.	48
Figura 7 - Porcentagem de resultados positivos utilizando rK39 como teste inicial para o diagnóstico de LV, seguido de RIFI, ELISA-ASL e FC-AFPA.	46
Figura 8 – Algoritmo utilizando o teste rápido com rK39 como teste inicial.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos do grupo de pacientes com LV	40
Tabela 2 - Sensibilidade dos diferentes testes para o diagnóstico de LV	41
Tabela 3 - Coeficiente <i>Kappa</i> e a concordância relativa para a comparação entre os testes diagnósticos para LV	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Índice de concordância	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPF-IgG	Anticorpos IgG Anti- Promastigotas Fixadas
ASL	Antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	Citometria de fluxo
DAT	Teste de Aglutinação Direta
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC-ALTA-IgG	<i>Flow Cytometry Anti-Live Trypomastigotes Antibodies-G</i>
FC-AFPA-IgG	<i>Flow Cytometry Anti-Fixed Promastigotes Antibodies-G</i>
FL2	Fluorescência do tipo 2 (laranja)
FSC	Dispersão frontal (Tamanho), do inglês <i>Forward Scatter</i>
IC	Intervalo de Confiança
IFI	Imunofluorescência Indireta (<i>Indirect Immunofluorescence</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse de Imunoglobulina IgG1
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
NNN	Meio de cultura sólido Novy, MacNeal e Nicolle
OPD	o-fenilenediamino
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	(Reação em Cadeia da Polimerase) <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PPFP	Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos
PP75	Cepa de referência para <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
qPCR	PCR em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
S	Sensibilidade
SSC	Dispersão lateral (Granulosidade), do inglês <i>Side Scatter</i>
SAPE	Estreptoavidina conjugada a ficoeritrina
SFB	Soro fetal bovino
TRALD	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i>
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	17
1.2	ASPECTOS CLÍNICOS	19
1.3	DIAGNÓSTICO DA LV	20
1.4	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	20
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	21
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	MÉTODOS	31
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	31
3.2	AMOSTRAS DO ESTUDO.....	31
3.3	EXAME PARASITOLÓGICO	32
3.3.1	PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA	32
3.3.2	EXAME DIRETO	32
3.4	TESTES SOROLÓGICOS	32
3.4.1	RIFI- REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	32
3.4.2	ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO	33
3.4.3	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA “IN HOUSE”)	34
3.4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	35

3.4.4.1	PREPARO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. CHAGASI</i> PARA OS ENSAIOS DE IMUNOFLORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
3.4.4.2	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PROMASTIGOTAS FIXADAS DE <i>L. CHAGASI</i> (FC-AFPA)	36
3.5	AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DA METODOLOGIA DE CITOMETRIA DE FLUXO	37
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS	40
4.1	PACIENTES.....	40
4.2	DESEMPENHO DAS DIFERENTES MÉTODOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LV.....	40
4.3	ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS	42
4.4	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS EM RELAÇÃO AO RESULTADO DO TESTE PARASITOLÓGICO DIRETO.....	43
4.5	PROPOSTA DE ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.....	45
4.6	ALGORITMO UTILIZANDO RK39 COMO TESTE INICIAL.....	45
4.7	ALGORITMO UTILIZANDO RIFI COMO TESTE INICIAL	47
4.8	ALGORITMO	49
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÕES.....	56
7	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). O complexo donovani compreende as espécies *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas (LAINSON & SHAW, 1987). Recentemente a *Leishmania (L.) chagasi* tem sido classificada como sinonímia de *Leishmania (L.) infantum*. A LV é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das doenças parasitárias de maior impacto sobre a saúde pública mundial devido à sua alta incidência e letalidade, especialmente entre os pacientes não tratados e crianças desnutridas, afetando aproximadamente 500.000 pessoas por ano. A doença apresenta uma ampla distribuição geográfica e é encontrada na Ásia, Europa, Oriente Médio, África, e nas Américas, sendo que nesta, é também chamada de leishmaniose visceral americana (LVA).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, com 90% dos casos ocorrendo no Brasil, sendo uma doença endêmica em nosso país. De 2001 a 2010, foram registrados 33.315 casos de LV no país, com média anual de 3.332 casos confirmados. Nesse mesmo período, ocorreram 2.287 óbitos por LV, representado por uma letalidade de 6,9%.

Inicialmente, a ocorrência de LV estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, hoje, encontra-se em franca expansão para grandes centros. Em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). A LV está distribuída atualmente em 21 Unidades Federativas, atingindo as cinco regiões brasileiras. A doença é mais frequente em menores de 10 anos (46,2%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (62,2%). A razão da maior suscetibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o

envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, representado principalmente pelas formas mais graves da doença (BRASIL, 2006).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é por meio da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidos por flebotomíneos. O *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil, cujo habitat é o ambiente doméstico e peridomiciliar, onde a fêmea se alimenta de sangue de cães, seres humanos e outros mamíferos. Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção, e as raposas (*Pseudalopex ventulus*) e os marsupiais (*Didelphis Ibiventris*) são os reservatórios no ambiente silvestre (BRASIL, 2009).

O ciclo biológico da *L. chagasi* é do tipo heteroxênico, envolvendo duas formas, uma promastigota flagelar presente no tubo digestivo do vetor; e outra amastigota, forma imóvel, que se desenvolve no interior de células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros mamíferos (Figura 1). Apenas as fêmeas dos flebotomos transmitem a doença por inoculação da forma promastigota na pele. Os parasitas são internalizados pelas células dendríticas e macrófagos, e se transformam em amastigotas. Estas se multiplicam e sobrevivem em fagolisossomos por meio de uma complexa interação parasito–hospedeiro. Essas formas se disseminam através dos sistemas linfático e vascular, resultando na infiltração da medula óssea, linfonodos, baço e fígado (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Durante um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados com formas amastigotas, que, no trato digestivo anterior, se rompem liberando-as, as quais posteriormente se diferenciam em promastigotas. Estas se multiplicam por divisão binária e transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes (promastigotas metacíclicas). Quando o inseto exerce novo hematofagismo, essas formas infectantes são novamente transferidas, reiniciando assim o ciclo no hospedeiro vertebrado (KILLICK-KENDRICK, 2002).

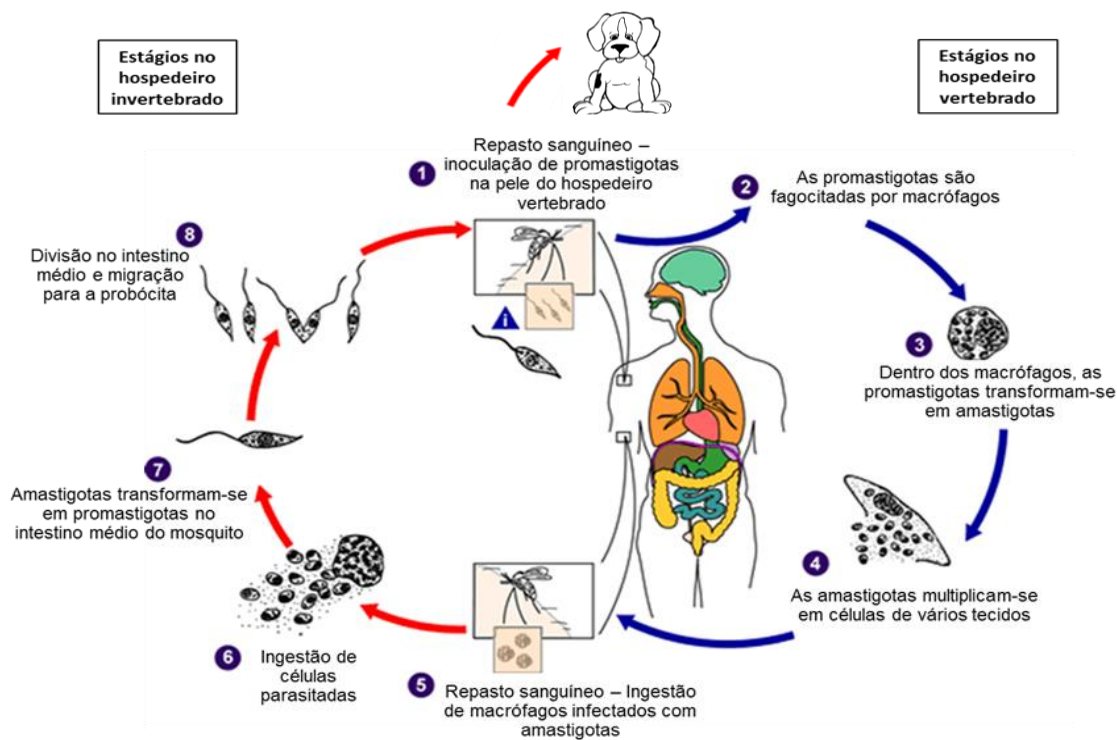


Figura 1 Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania spp*

Fonte: Adaptado de CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (2012)

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção causada por *L. chagasi* apresenta um espectro clínico amplo que varia desde formas completamente assintomáticas, passando por formas clínicas com sintomatologia discreta ou moderada, até aquelas de apresentação mais grave (DIETZE E CARVALHO, 2003).

O período de incubação da LV é geralmente de 2 a 6 meses, variando entre 10 dias a dois anos (BRYCESON, 1996). Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas têm demonstrado que um considerável percentual de indivíduos apresenta evidências de infecção por *L. chagasi*, por meio de reações sorológicas, sem, entretanto, apresentar manifestações clínicas da doença. Nessas áreas aproximadamente 20% das pessoas infectadas desenvolvem a doença clássica. A maioria desenvolve doença subclínica que pode permanecer completamente assintomática ou assumir a

forma oligossintomática. No Brasil, a proporção é de 8 a 18 assintomáticos para um caso sintomático (BADARÓ *et al.*, 1986; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

1.3 DIAGNÓSTICO DA LV

O diagnóstico da LV, até recentemente, era complexo e invasivo (microscopia direta, para avaliar punção do baço, ou aspirados de medula óssea), mas os atuais avanços tecnológicos têm levado a significantes melhorias no desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas que são úteis na rápida avaliação da doença, permitindo o estabelecimento de estratégias de controle (BOELAERT *et al.*, 2008).

1.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

A apresentação clínica típica da LV envolve febre baixa a longo prazo, aumento do baço e do fígado, perda de peso, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. A hipoalbuminemia está associada com edema e outras características de desnutrição. A diarreia pode ocorrer como resultado do parasitismo intestinal e ulceração. A função hepática pode estar normal ou alterada e, em estágios mais avançados da doença, a produção de protrombina pode estar diminuída. A LV não tratada, com o tempo, pode causar caquexia grave e sangramento por trombocitopenia, levando a hemorragia grave da mucosa, facilitando a sepse. Além disso, a perda constante de leucócitos, e as infecções bacterianas são comuns, causando a morte (KUMAR *et al.*, 2012). No entanto, outros sinais e sintomas podem estar presentes, como tosse, icterícia e juntamente com as outras manifestações clínicas citadas acima, dificulta o diagnóstico diferencial com outras doenças que cursam com quadros semelhantes como malária, febre tifoide, tuberculose, aids, brucelose, hepatite crônica, cirrose, linfomas e leucemia (WHO & ODA, 1996), retardando sua identificação e levando quase sempre o paciente a morte quando não tratada. Portanto, o diagnóstico seguro da LV se baseia em características clínicas-epidemiológicas em associação com dados laboratoriais, que ajudam na conclusão diagnóstica pela exclusão da

possibilidade de outras doenças com sintomas semelhantes (SUNDAR & RAI, 2002).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da LV baseia-se, principalmente em três tipos de abordagens: métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (SUNDAR & RAI, 2002).

O diagnóstico parasitológico é feito por meio da demonstração das formas amastigotas do parasito a partir de aspirados do baço, da medula óssea ou dos nódulos linfáticos. Esse método é considerado o padrão ouro, pois é o instrumento mais adequado de diagnóstico devido a sua alta especificidade (100%). Entretanto, é considerado um procedimento invasivo, exigindo ambientes apropriados para a coleta e profissional treinado para sua realização.

Com o material obtido é feito esfregaço ou impressão sobre lâmina de vidro, sendo então fixado e corado pela técnica de Giemsa, Leishman ou Wright. As lâminas são examinadas em microscópio, procurando amastigotas que podem estar dentro ou fora dos macrófagos (BRASIL, 2011). A sensibilidade desta técnica varia de acordo com o tecido usado, sendo mais elevada para o aspirado de baço (93,1-98,7%) em relação ao aspirado de medula óssea (52-85%) ou nódulo linfático (52-58%) (ZIJLSTRA *et al.*, 1992; HO *et al.*, 1948). No entanto, o processo de aspiração esplênica traz risco de hemorragia interna fatal, por isso deve ser realizado somente por pessoa treinada e em hospitais com retaguarda cirúrgica e banco de sangue. Na prática, devido à quase ausência de efeitos colaterais, recomenda-se o aspirado de medula óssea esternal ou crista ilíaca posterior (SUNDAR & RAI, 2002). Os resultados são dependentes de conhecimentos técnicos e qualidade dos reagentes e das lâminas preparadas. Assim, um microscopista bem treinado e um controle de qualidade eficaz são necessários para garantir a qualidade de um diagnóstico preciso. Portanto, antes de ser considerada negativa, é necessário que a lâmina seja examinada exaustivamente.

O material das punções aspirativas também pode ser inoculado em meios especiais de cultura, aumentando a sensibilidade da pesquisa (acima de 80%), ao se utilizar uma interface líquida, meio LIT (*Liver infusion Tryptose*) ou Schneider, sobre o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), mas, por outro lado, pode retardar o resultado em semanas. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscópio invertido semanalmente, por até quatro semanas (DIETZE, 2005).

Essas amostras clínicas podem ainda ser inoculadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Entretanto, esta técnica não tem valor prático no diagnóstico da doença, devido ao longo tempo de positividade, em torno de um a três meses (DIETZE & CARVALHO, 2003).

No que se refere ao diagnóstico molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) oferece um método confiável e rápido para diagnosticar a infecção por *Leishmania*, com sensibilidade de 70-100% e especificidade de 85-99% (NO *et al.*, 2001; SALOTRA *et al.*, 2001). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido (mesmo antes do aparecimento de quaisquer sintomas clínicos), o monitoramento da carga parasitária, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas (produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas), são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (GURUMURTHY *et al.*, 2012). Entretanto, esses resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, tais como: o tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação e o método de extração (BRASIL, 2006), se caracterizando como uma metodologia complexa e de custo elevado. Além disso, considerando que a molécula de DNA é estável, a sua detecção por PCR em amostras biológicas não indica necessariamente a presença de parasitos vivos na amostra, portanto, não pode ser interpretado como infecção ativa, visto que é observada a positividade em pacientes assintomáticos e curados após o tratamento (SUNDAR & RAI, 2002).

O desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) tem permitido a quantificação acurada de espécies do complexo *Leishmania* e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. A utilidade do ensaio de qPCR utilizando SYBR-Green foi

demonstrado para detecção e quantificação de parasitas de *L. donovani* em amostras clínicas de LV, usando iniciadores específicos para a sequência de kDNA. Esta técnica possui uma notável sensibilidade e especificidade, sendo considerada uma importante ferramenta molecular para monitorar a eficácia da terapia anti-*Leishmania* ou vacina (VERMA, *et al.*, 2010). As vantagens da PCR em tempo real em relação a PCR convencional são inúmeras e incluem: velocidade, reprodutibilidade e capacidade de quantificação (YANG *et al.*, 2004). Entretanto, existe a necessidade de laboratórios bem equipados e o custo ainda limita o seu uso em campo e em países em desenvolvimento (GURUMURTHY *et al.*, 2012).

Os testes sorológicos são métodos indiretos de detecção do parasito e, devido à sua praticidade, devem preceder sempre que possível os métodos parasitológicos, podendo até em algumas situações substituí-los. Na presença de dados clínicos e laboratoriais uma sorologia reagente praticamente confirma o diagnóstico de LV. Entretanto, um teste reagente na ausência de manifestações clínicas sugestivas, não autoriza o início do tratamento (DIETZE, 2005; BRASIL, 2006).

Altas taxas de anticorpos são encontradas durante a infecção por *L. chagasi* devido à estimulação policlonal de linfócitos B. A grande produção desses anticorpos, principalmente IgG, representa um importante dado para identificar os indivíduos com infecção ativa (GONTIJO *et al.*, 2004). Entretanto, os anticorpos formados durante o curso da infecção poderão mostrar reações cruzadas com antígenos semelhantes encontradas em outras doenças como a doença de Chagas, malária, tuberculose, leishmaniose tegumentar, hanseníase e outras (SUNDAR & RAI, 2002).

Diferentes testes sorológicos têm sido desenvolvidos e avaliados para o diagnóstico da LV, incluindo a imunofluorescência indireta, testes de aglutinação direta, ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA), testes imunocromatográficos e a imunofluorescência baseada em citometria de fluxo.

O teste de aglutinação direta (DAT) é um teste semi-quantitativo, muito utilizado em áreas endêmicas da Índia, desenvolvido para utilização em campo (SUNDAR *et al.*, 2006). É considerado um dos métodos mais simples e de baixo custo desenvolvidos

para o diagnóstico da LV. Pode ser realizado em laboratório com infraestrutura limitada e vários estudos têm demonstrado sensibilidade variando entre 93,4 a 98,9% e especificidade entre 85,9 a 96,9% (CHAPPUIS *et al.*, 2006; SUNDAR *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Basicamente o teste consiste em fixar as formas promastigotas de *Leishmania* em formalina, corá-las com Comassie Azul Brilhante, e posteriormente incubá-las com o soro do paciente. O resultado é inferido através da interpretação visual da aglutinação, não sendo necessário equipamento especializado para essa atividade.

Inicialmente, para a execução do teste, utilizava-se o antígeno aquoso, mas este exigia refrigeração e tinha vida curta. Posteriormente, foi desenvolvido o antígeno liofilizado que permitiu o seu transporte à temperatura ambiente.

As desvantagens dessa metodologia são: a necessidade de várias diluições da amostra, tempo de incubação relativamente longo (18h), custo elevado do antígeno, fragilidade do antígeno aquoso e falta de padronização na leitura. Destaca-se ainda que, pelo fato do DAT permanecer positivo por um longo período de tempo após a cura, este teste não pode ser utilizado para avaliar cura ou recidivas da doença. Além disso, 20 a 30% de indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas têm o teste DAT positivo (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; SUNDAR & RAI, 2002).

No Brasil, as técnicas mais usadas são a imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (BRASIL, 2006).

A RIFI, ou reação de imunofluorescência indireta, possui sensibilidade de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92%, mas requer condições de laboratório sofisticadas que inviabilizam sua utilização em campo (ASSIS *et al.*, 2008). A técnica consiste em aderir antígenos constituídos de promastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado. Ao final da reação, a ligação antígeno-anticorpo é visualizada com o auxílio de um conjugado fluorescente. De acordo com o Ministério da Saúde, o resultado da imunofluorescência é expresso em títulos do soro, sendo considerada como positivas diluições a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se a

solicitação de uma nova amostra em 30 dias. A RIFI, apesar de ser menos sensível que o teste ELISA, é o método mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas por meio do Programa de Leishmanioses do MS. Atualmente, o *kit* RIFI é produzido pela Bio-Manguinhos, unidade da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro - RJ, e distribuído para laboratórios públicos nacionais. Esse método, entretanto, requer microscópio de imunofluorescência e profissional treinado para sua execução, tornando o diagnóstico lento e difícil.

Outro método utilizado como ferramenta potencial no diagnóstico sorológico de quase todas as doenças infecciosas, incluindo a LV, é o teste imunoenzimático ELISA. É um teste de diagnóstico simples, porém sensível, para a detecção de antígenos do patógeno ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro (ENGVALL *et al.*, 1971). Este processo permite analisar grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. A técnica é altamente sensível, mas a sua especificidade depende do antígeno. De modo geral, é mais utilizado o antígeno solúvel bruto de uma suspensão de promastigotas em salina tamponada com fosfato. Esta técnica permite uma sensibilidade de 80 a 100%. Entretanto, foram observadas reações cruzadas com soros de pacientes com tripanossomíase, tuberculose e toxoplasmose (KUMAR *et al.*, 2001; SUNDAR & RAI., 2002).

Uma forma de minimizar a obtenção de reação cruzada com outros antígenos tem sido a identificação de antígenos recombinantes ou purificados, específicos do gênero *Leishmania*, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos (ALVES & BEVILACQUA, 2004). Neste sentido, vários estudos têm sido realizados na busca de novos antígenos que possam ser utilizados para o diagnóstico sorológico da LV. Como exemplo, Palatnik e colaboradores (1995) descreveram a utilização do ligante de fucose-manose como antígeno. Este ligante trata-se de uma glicoproteína de 36 kDa designada de gp36, presente ao longo de todo o ciclo de vida da *Leishmania*, nas formas amastigota e promastigota. A sua utilização resultou em um teste com 100% de sensibilidade e especificidade de 96%. Por se tratar de um complexo de glicoproteínas de

superfície, o antígeno possui alta estabilidade, o que o torna uma boa opção para trabalhos em larga escala.

O desempenho do teste ELISA também pôde ser aumentado com a utilização de antígenos solúveis derivados de promastigotas cultivadas em meio isento de proteínas, com sensibilidade de 95% (RAJASEKARIAH *et al.*, 2001; RYAN *et al.*, 2002). Barbosa-de-Deus e colaboradores (2002) descreveram a utilização de um antígeno obtido de promastigotas de *L. major*-like com 100% de especificidade e 92% de sensibilidade no diagnóstico da LV humana e canina, sem reatividade cruzada com soros de várias doenças, incluindo leishmaniose tegumentar.

Um teste que tem se mostrado altamente sensível e específico para o diagnóstico da LV é o ELISA que utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39) de *L. chagasi* (BADARÓ *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2001). A proteína recombinante K39, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase de *L. chagasi*, do complexo donovani-específico (BURNS *et al.*, 1993), é expressa predominantemente por amastigotas e tem sido o antígeno mais amplamente avaliado em testes diagnósticos para LV. Vários estudos demonstram que o uso desta proteína apresenta resultados com sensibilidade variando entre 93 a 100%, e especificidade entre 84 a 100% (ZIJLSTRA *et al.*, 1998; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008, 2012; MOHAPATRA *et al.*, 2010).

Recentemente, o uso de métodos baseados em ELISA associados a um novo antígeno de *L. donovani* (BHUP2), apresentaram resultados com sensibilidade de 94% e especificidade de 97 a 100%, indicando a pesquisa dessa proteína de 37 kDa como uma ferramenta promissora para o diagnóstico da LV (KUMAR *et al.*, 2011).

Neste mesmo contexto, Vaish e colaboradores (2012) avaliaram a utilização do rK28 como antígeno para o diagnóstico sorológico da LV na Índia. Os autores concluíram que esse método possui sensibilidade (99,6%) e especificidade semelhante ao antígeno rK39 no formato ELISA, provando assim ser uma ferramenta adicional para o diagnóstico da LV.

Apesar de o teste ELISA ser um método sensível e bastante produtivo, sua realização requer infraestrutura laboratorial e profissional especializado, além de demandar várias etapas de incubação, que conseqüentemente despendem relativo tempo de execução. Destaca-se ainda que os critérios de positividade dependem dos pontos de cortes, que devem ser fixados para cada teste.

Um avanço no diagnóstico da LV foi o desenvolvimento do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 fixado em uma membrana de nitrocelulose. A necessidade de testes rápidos para o diagnóstico de diferentes doenças, sobretudo para a utilização em campo, tem contribuído para o desenvolvimento dos testes do tipo *dipstick*, testes estes baseados em ensaios imunocromatográficos. A imunocromatografia é um método simples, preciso, específico e fornece resultados qualitativos, rápidos e econômicos. O método baseia-se na reação do soro ou sangue do paciente com o antígeno purificado recombinante, sendo de fácil interpretação, pois a leitura é feita a olho nu, dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura óptica.

Como exemplo desta metodologia, pode-se citar o teste TRALd (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*), que, no subcontinente Indiano, se mostrou 100% sensível (SUNDAR *et al.*, 1998, 2002). Entretanto, quando avaliado no Sudão, a sensibilidade do teste foi de apenas 67% (ZIJLSTRA *et al.*, 2001). No sul da Europa, o teste apresentou resultados positivos em somente 71,4% dos casos de LV (JELINEK *et al.*, 1999). Chappuis e colaboradores (2006) avaliaram o desempenho do teste rápido, por meio de meta-análise em treze estudos, relatando uma estimativa de 93,9% de sensibilidade e 90,6% de especificidade.

No Brasil, Carvalho e colaboradores (2003) obtiveram resultados com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% ao utilizar o teste *Kalazar Detect*. Este teste imunocromatográfico é fabricado pela InBios Internacional (Seattle, WA), sendo destinado à determinação qualitativa de anticorpos no soro contra o antígeno recombinante K39 de *L. chagasi*.

Posteriormente, Machado de Assis e colaboradores (2008) validaram o teste rápido IT-LEISH/DiaMed observando 93% de sensibilidade e 97% de especificidade. Em outro estudo realizado no Brasil, Amato Neto e colaboradores (2009) avaliaram o desempenho do IT-LEISH/DiaMed observando 100% de sensibilidade e 96 a 100% de especificidade.

Embora os testes rápidos baseados em rK39 tem mostrado alta sensibilidade, IgG anti-rK39 pode estar presente no soro por um período prolongado após o tratamento da LV, assim, pacientes com suspeita de recidiva, não poderão utilizar esse método de diagnóstico (SUNDAR & RAI, 2002).

Estudos recentes avaliaram o teste imunocromatográfico rK39 utilizando amostra de urina. Quando comparada ao sangue ou soro, a utilização de amostra de urina se mostra um método não invasivo e a facilidade da coleta o torna extremamente atrativo para a maioria da população, principalmente as crianças, com sensibilidade de 95% e especificidade de 93,3% (KHAN *et al.*, 2010).

Em outro estudo conduzido por Chakravarty e colaboradores (2011), foram obtidos resultados com sensibilidade de 96,4% e especificidade variando entre 62,2 a 77,08%. Entretanto, esses autores concluíram que a tira neste formato não deve ser utilizada para o diagnóstico de LV, visto que, em seus estudos o grau de positividade em amostras controles não positivas para LV, pode estar relacionado à ligação não específica de proteínas presentes na urina com o rK39.

Um novo método que tem se mostrado promissor para o diagnóstico sorológico da LV é a imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (CF). De modo geral, a citometria de fluxo permite a avaliação de qualquer material biológico que possua células ou partículas em suspensão. A caracterização da célula inclui o tamanho, granulosidade (ou complexidade interna) e a intensidade de fluorescência emitida (BROWN & WITTEWER *et al.*, 2000). Todos esses parâmetros podem ser detectados e analisados simultaneamente, medidos, armazenados e analisados em programas de computador.

Em 1995, Martins-Filho e colaboradores introduziram a citometria de fluxo como ferramenta metodológica na detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, obtendo alto grau de sensibilidade em seus resultados, trazendo novas perspectivas para o estudo de diferentes doenças parasitárias. Em seus trabalhos com doença de Chagas, os autores desenvolveram uma metodologia baseada na citometria de fluxo, capaz de detectar anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas de *Trypanosoma cruzi*, denominada *Flow Cytometry Anti-Live Trypomastigotes Antibodies-G* (FC-ALTA-IgG).

Com o intuito de contribuir com o avanço do diagnóstico das leishmanioses, nosso grupo demonstrou a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L.chagasi*, utilizadas para o diagnóstico e monitoração de cura da LV (GARCIA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010) denominada FC-AFPA-IgG (*Flow Cytometry Anti-Fixed Promastigotes Antibodies-G*), ou AAPF-IgG (Anticorpos IgG Anti-Promastigotas Fixadas), com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Portanto, considerando a existência de diferentes métodos para o diagnóstico da LV, a escolha do método de diagnóstico mais acessível e eficaz deve ser bem definida, uma vez que dela depende a precocidade do início do tratamento do doente. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar e comparar o desempenho de diferentes métodos utilizados, ou propostas, para o diagnóstico da LV humana, e ainda propor um algoritmo para ser usado na rotina laboratorial melhorando a qualidade do diagnóstico desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de diferentes métodos no diagnóstico da LV humana, na tentativa de propor o melhor algoritmo a ser utilizado na rotina laboratorial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o desempenho do exame parasitológico direto, da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), do ensaio imunocromatográfico rK39, do ensaio imunoenzimático (ELISA) e da Imunofluorescência por citometria de fluxo no diagnóstico da LV.
2. Analisar a concordância entre os métodos diagnósticos avaliados.
3. Comparar os resultados dos diferentes testes sorológicos em relação ao resultado do teste parasitológico direto.
4. Propor um algoritmo para ser usado na rotina laboratorial.

3 MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Montes Claros em 02 de junho de 2010 (Processo 1467). Foi conduzido de acordo com os preceitos determinados pela resolução 196/88 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

3.2 AMOSTRAS DO ESTUDO

Para avaliar o desempenho das diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial da LV foram utilizadas 77 amostras de punção de medula óssea e soro, obtidas de pacientes com sinais e sintomas da doença, tratados e curados, coletadas antes do tratamento. Os pacientes foram tratados com desoxicolato de Anfotericina B 1mg/kg/dia + N-metil Glucamina 20mg/kg/dia durante sete dias. As amostras de soro foram cedidas pelo professor doutor Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho, do Hospital Universitário Clemente de Farias, Montes Claros, MG.

Para cada paciente foi obtida a história clínica e realizado exame físico completo. Todos os pacientes foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea para a pesquisa de parasitos e coleta de sangue para a realização de RIFI e teste rápido rK39, no momento do diagnóstico. Os demais métodos sorológicos para LV (Ensaio imunoenzimático e Citometria de fluxo) foram realizadas utilizando as mesmas amostras de soro coletadas para o diagnóstico de rotina realizado no Hospital Universitário, não sendo, portanto necessário uma nova coleta para a realização do estudo. Todos os pacientes foram acompanhados por 12 meses após o tratamento e após esse período, foram considerados clinicamente curados.

3.3 EXAME PARASITOLÓGICO

3.3.1 PUNÇÃO ASPIRATIVA DE MEDULA ÓSSEA

Todos os pacientes com história clínica característica de LV e exame físico compatível com LV foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea para a pesquisa dos parasitos. O local da punção foi anestesiado injetando-se de 0,5 a 1 ml de Xilocaína 2% e feita punção de crista ilíaca ou externo.

3.3.2 EXAME DIRETO

Após o procedimento acima, uma gota do aspirado foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina previamente limpa, e o material foi firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, o esfregaço foi fixado em álcool metílico e corado. As formas amastigotas do parasito foram visualizadas pela coloração de Giemsa utilizando microscopia de imersão. Foram examinados 200 campos antes de se considerar uma lâmina negativa. O resultado positivo foi dado quando se visualizou formas amastigotas (formas arredondadas, com presença de núcleo e cinetoplasto) livres e/ou inclusas em células do sistema fagocítico mononuclear.

3.4 TESTES SOROLÓGICOS

3.4.1 RIFI- REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

A reação de Imunofluorescência indireta tem como princípio uma reação antígeno-anticorpo, visualizada pela adição de um anti-anticorpo (conjugado) acoplado à fluoresceína. Esta absorve luz azul (comprimento de onda de 490nm) e emite uma intensa fluorescência amarelo-esverdeada. A reação será tanto mais intensa quanto maior a quantidade de anticorpos específicos no soro avaliado.

A RIFI para o diagnóstico da LV foi realizada utilizando o Kit IFI – Leishmaniose Visceral Humana – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro nas diluições de 1:40 e 1:80, foram

transferidas para lâminas recobertas com formas promastigotas de *Leishmania major*-like fixadas. Anticorpos policlonais anti-IgG humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína foram adicionados às lâminas para revelação da reatividade dos anticorpos IgG presentes no soro. Para a leitura e interpretação da reação de fluorescência focalizaram-se, inicialmente, os controles positivos e negativos de cada lâmina para confirmação do padrão esperado: presença de fluorescência uniforme na membrana dos parasitos, a partir da diluição 1:80, inclusive (controle positivo) e ausência total de fluorescência nos parasitos (controle negativo). De modo a confirmar os resultados obtidos pela leitura e interpretação da reação, contou-se com auxílio de profissional experiente nesta técnica, objetivando minimizar possíveis vieses.

3.4.2 ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO

Os soros dos pacientes foram submetidos ao teste rápido imunocromatográfico *Kalazar Detect*® (InBios International, Seattle, WA, USA) para a pesquisa qualitativa de anticorpos IgG contra o antígeno recombinante K39 de *L. chagasi*. Foram adicionados à parte inferior da fita reagente 20 µl de soro e incubados durante 10 minutos em um microtubo contendo duas gotas de tampão de corrida. A fita apresenta uma membrana pré-coberta com o antígeno recombinante (rK39) na região da banda teste e anti-proteína A na região da banda controle. Durante o teste, a amostra de soro reage com o conjugado colorimétrico (proteína A conjugada com ouro coloidal) e a mistura então migra através da membrana por capilaridade, reagindo com o antígeno e produzindo uma banda vermelha. A mistura continua a migrar através da membrana até a região contendo anticorpos anti-proteína A, dando origem a uma nova banda vermelha nesta região. A presença desta linha indica um volume adequado da amostra de soro utilizada, um fluxo adequado através da fita e a viabilidade dos reagentes. Desta forma, o teste foi considerado positivo quando se formaram duas faixas vermelhas e, negativo, quando aparecia somente a faixa controle. Os resultados foram determinados individualmente, de forma qualitativa (positivo ou negativo).

3.4.3 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA “IN HOUSE”)

O método é baseado na leitura do espectro de cor resultante da reação antígeno-anticorpo e conjugado com peroxidase. A gradação de cores gerada pela reação da peroxidase varia de amarelo pálido a amarelo intenso. Assim sendo, quanto mais alto o nível de anticorpos presentes na amostra sorológica, mais intensa será a cor. Neste estudo foi realizada pesquisa de anticorpos por ensaio imunoenzimático em amostras de soro humano contra antígenos solúvel de *L. chagasi* (ASL), produzidos como descrito a seguir.

Formas promastigotas de *L. chagasi* (MHON/BR/74/PP75) na fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio líquido Liver Infusion Tryptose- LIT a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e lisadas por congelamento e descongelamento. A suspensão de parasitos foi homogeneizada usando um triturador de tecidos em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado como antígeno solúvel total. O conteúdo de proteína foi estimado através do método de Bradford (BRADFORD MM, 1976).

Resumidamente, placas Immulon # 4 (Dynatech, Chantilly, VA, USA) foram sensibilizadas com 2 μg de antígeno solúvel de *L. chagasi* por poço e incubado a 4°C, durante 1h. As placas foram aspiradas, bloqueadas com PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T) e 2% de leite Mólico desnatado durante 1h a 37°C e lavadas quatro vezes com PBS-T. Soro diluído 1/200 em PBS-T contendo 1% de leite Mólico desnatado foi adicionado em cada poço e incubado durante 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes e os anticorpos ligados foram detectados usando anti-IgG marcado com peroxidase, diluído 1/5000 (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). Após incubação durante 45 minutos a 37°C as placas foram lavadas novamente e incubadas com 0.005 g de O-fenilenediamino (OPD) e três μl de H₂O₂ em tampão citrato, durante 15 minutos. A densidade ótica foi lida a 492 nm. Soros controles positivos e negativos foram avaliados em cada placa para padronizar as leituras e variações das placas. O ponto de corte entre as leituras dos

pacientes positivos e negativos foi calculado através da média das densidades óticas dos negativos mais três desvios padrões.

3.4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

3.4.4.1 PREPARO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. chagasi* PARA OS ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Parasitas de sete dias de crescimento (fase estacionária), cultivadas em meio LIT, suplementado com 10% de SFBi e 2% de urina masculina, foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 ml (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego) e homogeneizadas em vórtex a baixa rotação para desfazer possíveis agregados celulares. Em seguida, a suspensão foi submetida a uma centrifugação diferencial a 300g, 18°C por 10 minutos, para remoção, de grumos de parasitas contaminantes remanescentes. Para maximizar a recuperação dos parasitas no sobrenadante, a suspensão de promastigotas foi deixada em repouso por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi então coletado e transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL e o sedimento desprezado. Em seguida os parasitas foram lavados em PBS contendo 10% de SFB, por duas vezes, por centrifugação a 1000g, 4°C por 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Ao final das etapas de lavagem, os parasitas foram fixados, adicionando-se 20 mL de solução fixadora (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) diluída em 1/1 em PBS. As formas promastigotas fixadas foram mantidas a 4°C por 24 horas. Após esse período, os parasitas fixados foram centrifugados a 1000g, 4°C por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em 10 mL de PBS. Após essa etapa, foi realizada a contagem do número de parasitos e a suspensão celular ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL.

3.4.4.2 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PROMASTIGOTAS FIXADAS DE *L. chagasi* (FC-AFPA)

Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. chagasi* foram realizadas segundo o protocolo descrito por Gomes e colaboradores (2010), adaptado como a seguir: alíquotas de 50µl de soro teste diluído em PBS-3% SFB foram adicionadas em microplacas de 96 poços de fundo “U” (Nunc, Dinamarca). Em seguida foram adicionadas 50µl da suspensão de parasitos ($2,5 \times 10^5$ / poço) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 150µl de PBS-3% SFB, por centrifugação a 1000g, 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Os parasitos foram reincubados a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz, com de 50µl de anticorpos anti-IgG1 humano marcados com biotina (Sigma Chemical Corp., St. Luis, MO), diluído em PBS-3% SFB. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes e o sobrenadante desprezado. Na etapa seguinte, os parasitos foram incubados com 20µl de estreptoavidina conjugada a ficoeritrina- SAPE (Southern Biotec), diluído 1:400 em PBS-3% SFB e incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação com anticorpos reveladores, os parasitos foram lavados duas vezes e fixados com 200µl de solução fixadora. As amostras foram mantidas pelo menos por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur- Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As leituras no citômetro de fluxo foram realizadas no máximo 24 horas após fixação. Os dados coletados foram armazenados e analisados posteriormente, empregando o software Cell-Quest.

Para cada ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo, foi realizado um controle interno da reação, para avaliar as ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Nesse controle, os parasitos foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença do anticorpo secundário. Em todos os testes foram incluídas amostras de soro controles positivos e negativos para LV. Nas etapas de padronização da metodologia, foram testadas diferentes diluições da amostra teste.

3.5 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DA METODOLOGIA DE CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema óptico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC-*Forward Scatter*), granulosidade ou complexidade interna (SSC-*Side Scatter*) e a emissão de fluorescência. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson) empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros, tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitos. Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados pelo sistema biotina/SAPE que, quando excitados emitem sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo2 (FL2-fluorescência laranja).

A análise da reatividade de anticorpos foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 2A). Por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7 μ m) e de pequena complexidade interna (tripanosomatídeos) os ganhos de tamanho e granulosidade, foram empregados na escala LOG, com valores E00 e 300, respectivamente, para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). As formas promastigotas apresentaram uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho *versus* granulosidade, o que permitiu o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos, após incubação com soros de pacientes e indivíduos negativos e os respectivos reagentes fluorocromos, foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada amostra individual em relação ao controle do conjugado. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de

positividade de, no máximo, 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 2B). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores do percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 2C e 2D).

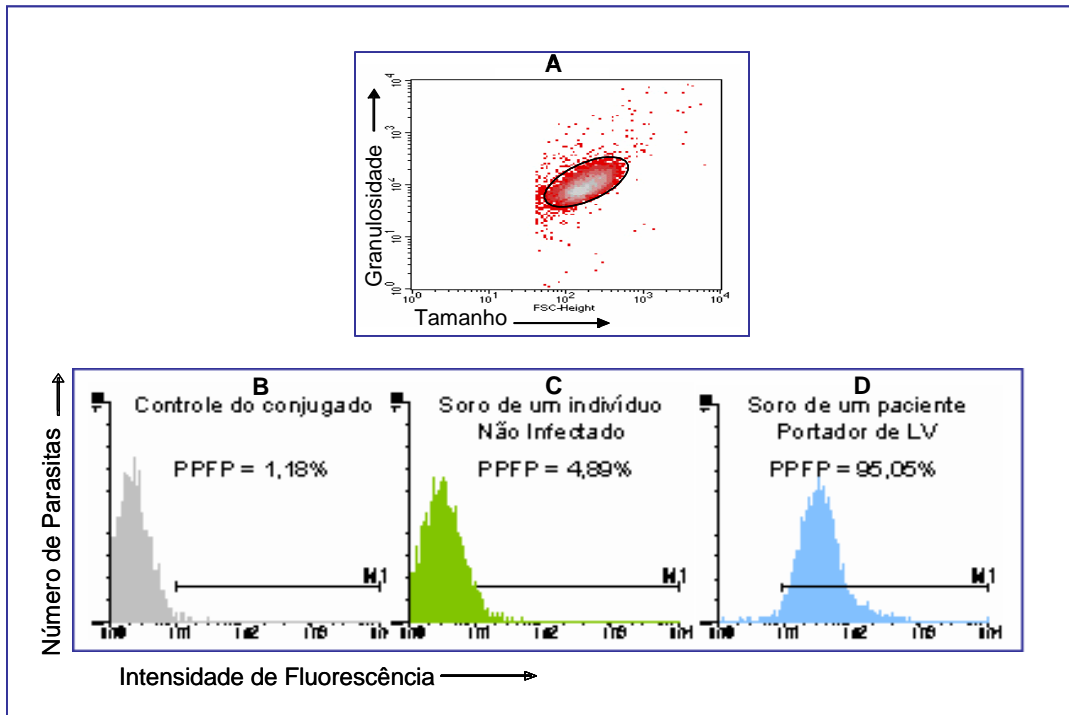


Figura 2 - Representação esquemática da seqüência das análises da pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de formas promastigotas de *L. chagasi*, utilizando-se parâmetros de tamanho e granulosidade. (B) Histogramas individuais representando o percentual de parasitas fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação, (C) após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado e (D) um soro de um paciente portador de LV. O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi determinada a sensibilidade dos testes com base na fórmula apresentada abaixo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Para a análise do índice de concordância foi utilizado o índice *kappa* (*k*). A relação entre os valores de *kappa* e a força de concordância estão relacionados no Quadro 1.

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Quadro 1 – Relação entre os valores de *kappa* e a força de concordância (adaptado de LANDIS & KOCH, BIOMETRICS, 1977)

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

De um total de 77 amostras de soro ou punção de medula óssea de pacientes portadores de LV analisados neste estudo, 34 pacientes eram do sexo masculino (44,16%) e 43 eram do sexo feminino (55,84%). A média da idade dos indivíduos foi de 4,3 anos com intervalo de seis meses a 30 anos. Os dados demográficos dos indivíduos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos do grupo de pacientes com LV

Gênero	
Feminino ^a	43 (55,84%)
Masculino ^a	34 (44,16%)
Idade em anos ^b	4,3 (0,5 a 30)

^a número de casos (%)

^b média (intervalo)

4.2 DESEMPENHO DAS DIFERENTES MÉTODOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LV

Neste estudo foram avaliadas amostras biológicas de 77 pacientes cujo diagnóstico foi baseado em diferentes métodos utilizadas para o diagnóstico laboratorial da LV, como exame direto, RIFI, rK39, ELISA e FC-AFPA. Os resultados mostraram que 20 pacientes apresentaram todos os cinco testes positivos (26%), enquanto, 32 apresentaram quatro testes positivos (41,5%), 17 apresentaram três testes positivos (22%), seis apresentaram dois testes positivos (8%) e apenas dois apresentaram um teste positivo (2,5%), sendo estes testes o teste rápido rK39 e FC-AFPA.

Das 77 amostras avaliadas, 37 apresentaram resultado positivo no exame direto do esfregaço de punção de medula óssea (48%), 57 amostras foram positivas para RIFI utilizando o kit IFI-Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (74%), 61 foram positivas para o teste rápido rK39 Kalazar Detect (79%), 68 foram positivas na técnica de ELISA “in house”

com ASL (88%) e 72 amostras foram positivas na FC-AFPA (94%). Os resultados estão demonstrados na Figura 3 e Tabela 2.

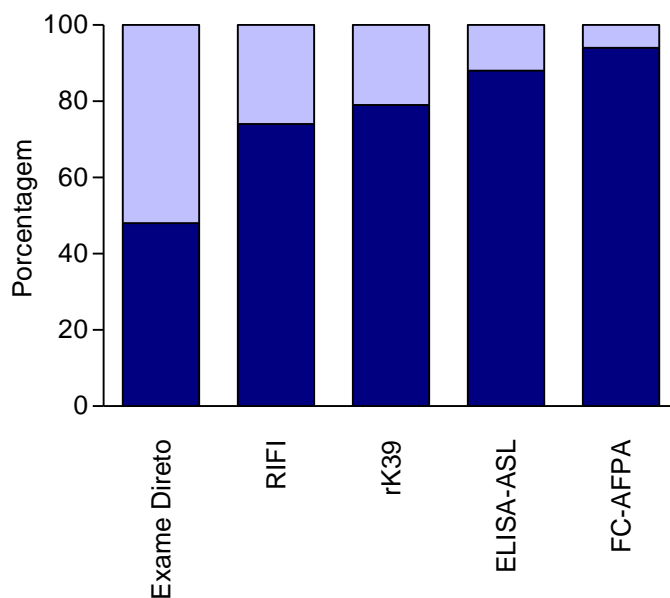


Figura 3 - Sensibilidade dos diferentes testes utilizados para o diagnóstico de LV. Resultados positivos (■) e resultados negativos (□).

Tabela 2 - Sensibilidade dos diferentes testes para o diagnóstico de LV

Teste diagnóstico	Sensibilidade % (IC-95%)
Exame direto	48 % (37-59%)
RIFI	74 % (64-84%)
rK39	79 % (70-88%)
ELISA-ASL	88 % (81-96%)
FC-AFPA	94 % (88-99%)

4.3 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS

As análises comparativas dos testes revelaram uma concordância regular entre o teste parasitológico direto e os testes sorológicos, com porcentagens variando de 48 a 50% e valores dos coeficientes *Kappa*, variando de 0,42 a 0,52.

Entre os testes sorológicos, a RIFI apresentou uma boa concordância quando comparado ao rK39 (0,65), ELISA (0,68) e FC-AFPA (0,69). Também foi observado uma boa concordância entre o teste rK39 comparado a ELISA (0,72) e a FC-AFPA (0,74). A análise comparativa entre os testes sorológicos mostraram melhores resultados para o teste ELISA e FC-AFPA (0,80) com concordância de 86% entre esses dois testes, considerada como ótima. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Coeficiente *Kappa* e a concordância relativa para a comparação entre os testes diagnósticos para LV humana

Teste diagnóstico	<i>Kappa</i>	Concordância
ED vs RIFI	0,42	48
ED vs rK39	0,52	48
ED vs ELISA	0,49	49
ED vs FC-AFPA	0,48	50
RIFI vs rK39	0,65	68
RIFI vs ELISA	0,68	70
RIFI vs FC-AFPA	0,69	74
rK39 vs ELISA	0,72	75
rK39 vs FC-AFPA	0,74	70
ELISA vs FC-AFPA	0,80	86

4.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS EM RELAÇÃO AO RESULTADO DO TESTE PARASITOLÓGICO DIRETO

Com o objetivo de comparar os resultados dos testes sorológicos em relação ao resultado do teste parasitológico direto, foram avaliadas 37 amostras de pacientes com resultado positivo no teste direto e 40 amostras de pacientes com resultado negativo. Os resultados estão demonstrados nas Figura 4 e Figura 5.

O teste RIFI foi positivo em 73% (27/37) das amostras com resultado parasitológico positivo e em 75% (30/40) das amostras com resultado negativo. Para o teste rápido com rK39 foi observado uma positividade de 78% (29/37) para as amostras positivas no exame direto e em 80% (32/40) para as amostras com exame direto negativo. O teste ELISA foi positivo em 89% (33/37) dos pacientes que apresentaram exame direto positivo e 88% (35/40) para os pacientes que apresentaram exame direto negativo e a positividade para a FC- AFPA foi de 95% (35/40) para os pacientes que apresentaram exame direto positivo e 93% (37/40) para pacientes que apresentaram exame direto negativo.

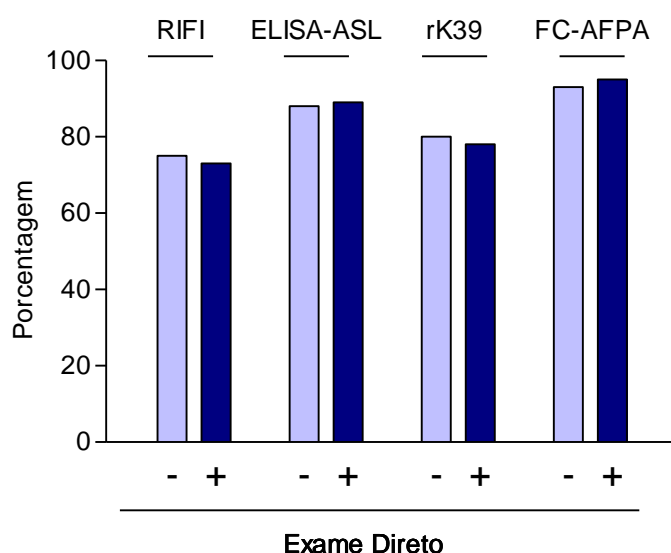


Figura 4 - Desempenho dos diferentes métodos sorológicos em relação ao resultado do exame direto.

4.5 PROPOSTA DE ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Tendo em vista a baixa sensibilidade do exame direto para o exame do aspirado de medula óssea, 53 a 86% (Ho *et al.*, 1948), e por se tratar de um método invasivo que necessita de pessoal especializado, propomos neste estudo um algoritmo para diagnóstico de pacientes com suspeita de LV utilizando apenas os métodos sorológicos.

4.6 ALGORITMO UTILIZANDO rK39 COMO TESTE INICIAL

Devido ao fato de recentemente o Ministério da Saúde ter preconizado o uso do teste rápido rK39 para o diagnóstico de LV, neste algoritmo foi avaliado o desempenho do teste rK39 Kalazar Detect® como teste inicial para o diagnóstico.

Aplicando o teste rápido rK39 nas 77 amostras de soro de pacientes portadores de LV, 61 amostras foram positivas (79%) e 16 foram consideradas negativas (21%). Posteriormente, foram aplicados outros testes sorológicos nas amostras de soro com resultado negativo, na tentativa de obter o diagnóstico. Das 16 amostras negativas, 11 foram positivas na RIFI (14%), 13 foram positivas na técnica de ELISA (17%), e todas foram positivas na FC-AFPA (21%). Portanto, o desempenho final obtido com a associação dos métodos seria de 94% para rK39 seguido de RIFI, 96% para rK39 seguido de ELISA e 100% para rK39 seguido de citometria. Os resultados, mostram que o algoritmo utilizando rK39 como teste inicial, seguido de FC-AFPA, foi capaz de identificar 100% dos pacientes portadores de LV (Figura 7).

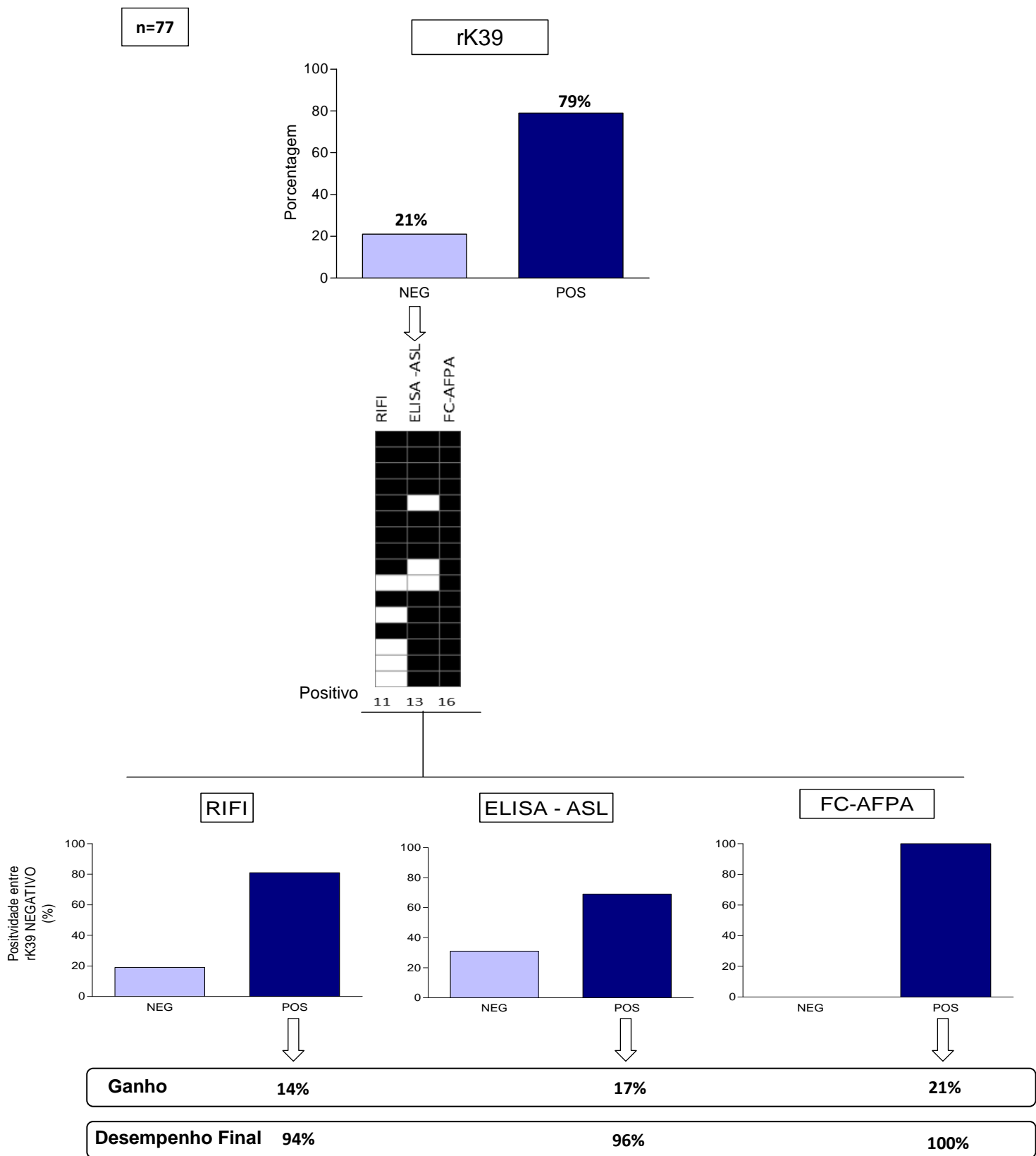


Figura 6 - Porcentagem de resultados positivos utilizando rK39 como teste inicial para o diagnóstico de LV, seguido de RIFI, ELISA-ASL e FC-AFPA.

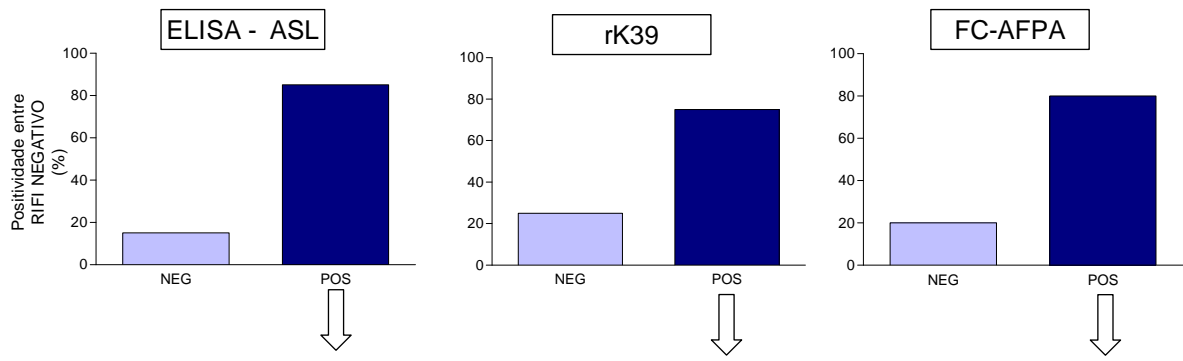
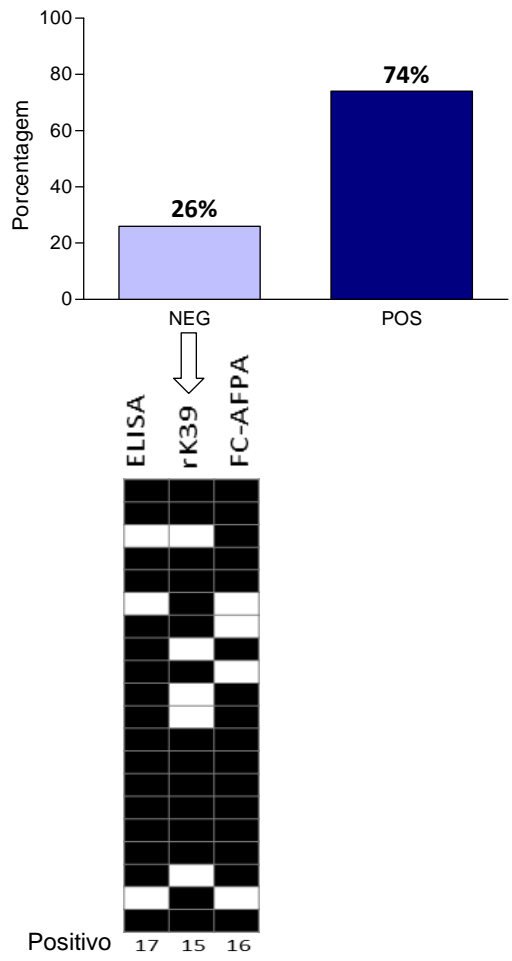
4.7 ALGORITMO UTILIZANDO RIFI COMO TESTE INICIAL

Foi avaliado o desempenho da RIFI como ensaio inicial para o diagnóstico de LV, tendo em vista que este teste tem sido disponibilizado pelo Ministério da Saúde no Brasil e utilizado como ferramenta para o diagnóstico da doença.

Aplicando o teste RIFI nas 77 amostras de soro de pacientes portadores de LV, 57 foram positivas (74%) e 20 amostras foram consideradas negativas (26%). Na tentativa de se obter o diagnóstico, foram utilizados outros métodos sorológicos. Assim, observamos que 17 amostras foram positivas utilizando ELISA (22%), 15 amostras foram positivas utilizando o teste rápido com rK39 (19%) e 16 amostras foram positivas utilizando a imunofluorescência por citometria de fluxo (21%). Portanto, o desempenho final obtido com a associação dos métodos seria de 96% para RIFI seguido de ELISA, 94% para RIFI seguido de rK39 e 95% para RIFI seguido de citometria. Os dados obtidos nos mostra que utilizando a RIFI como teste inicial, nenhum dos testes sorológicos utilizados posteriormente para avaliar as amostras negativas foi capaz de identificar 100% dos pacientes portadores de LV (Figura 6).

n=77

RIFI



Ganho	22%	19%	21%
Desempenho Final	96%	94%	95%

Figura 7 – Porcentagem de resultados positivos utilizando RIFI como teste inicial para o diagnóstico de LV, seguido de rK39, ELISA-ASL e FC-AFPA.

4.8 ALGORITMO

Considerando que o teste rápido rK39 apresentou melhor desempenho como teste inicial para o diagnóstico de LV foi proposto um algoritmo utilizando este teste como inicial, seguido de FC-AFPA para o diagnóstico das amostras negativas.

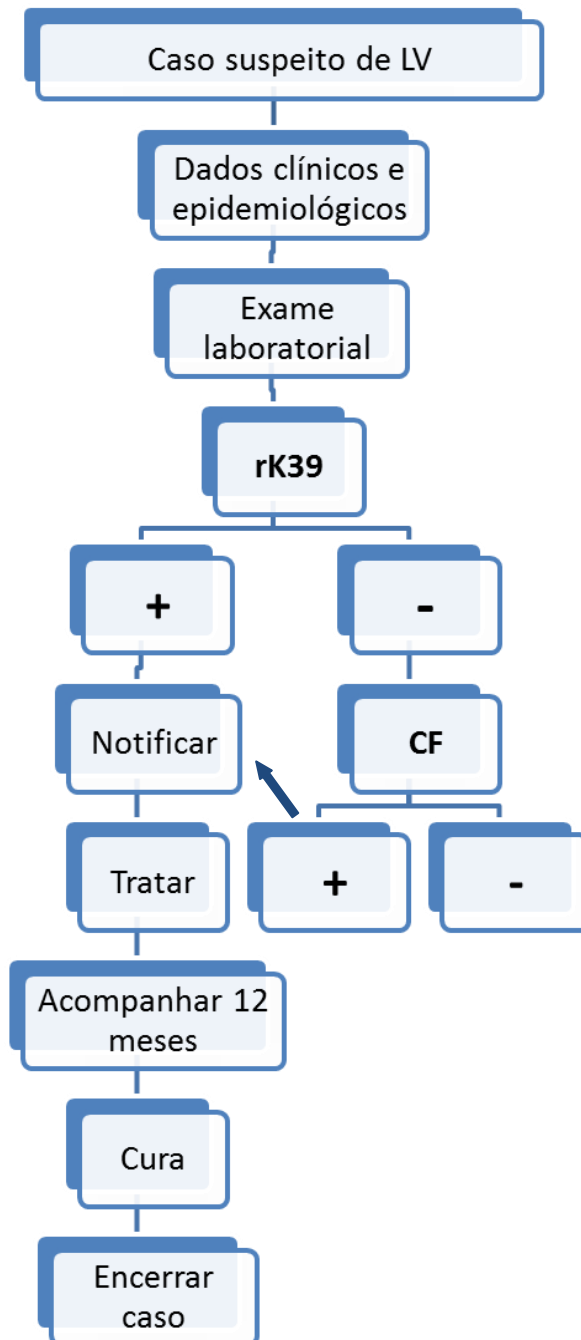


Figura 8 – Algoritmo utilizando o teste rápido com rK39 como teste inicial

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico de rotina da LV humana é usualmente baseado em parâmetros clínicos e epidemiológicos, associados a exames parasitológicos e/ou imunológicos. Tendo em vista que a doença é fatal se não tratada, a busca por métodos diagnósticos mais efetivos, que sejam de fácil execução, simples, acessíveis, e rápidos, se faz necessária com o objetivo de melhorar o desempenho, diminuindo o tempo de obtenção de resultados (SUNDAR *et al.*, 2012).

Portanto, neste estudo foi avaliado o desempenho de diferentes métodos já utilizadas na rotina laboratorial ou propostas como ferramentas alternativas para o diagnóstico da LV, incluindo o exame direto de punção de medula óssea, RIFI, teste rápido com rK39 (Kalazar Detect®), ELISA com antígeno solúvel de *L. chagasi* e imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (FC-AFPA). Para isso, foram avaliadas 77 amostras biológicas (punção de medula óssea e soro) de pacientes com diagnóstico clínico de LV.

Todos os pacientes deste estudo apresentaram sinais clínicos e epidemiológicos característicos de LV, foram tratados e curados e apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos cinco testes analisados.

No Brasil, a punção aspirativa da medula óssea para a realização do exame direto e isolamento em cultivo é considerado o padrão de referência para o diagnóstico da doença, devido sua alta especificidade. Entretanto, apresenta baixa sensibilidade, é um método invasivo e requer profissional treinado e infraestrutura laboratorial para sua realização (BRASIL, 2006; 2011). Com relação ao exame direto, nossos resultados demonstraram sensibilidade de 48%, o que corroboram os dados da literatura, visto que o exame direto utilizando a punção de medula óssea é considerado pouco sensível (52 a 85%), porém altamente específico (100%) (HO *et al.*, 1948; SIDDIG *et al.*, 1988; ZIJLSTRA *et al.*, 1992). De acordo com a literatura, são vários os fatores que podem afetar o desempenho desta técnica, uma vez que o encontro das formas amastigotas do parasita é diretamente proporcional à qualidade do material do aspirado de medula óssea, à experiência do microscopista e ao

número de campos observados (DA SILVA MR *et al.*, 2005). Badaró & Reed (2001) também descrevem a baixa positividade do teste e sugerem que seja devido ao tempo de doença, baixo parasitismo, problemas técnicos na retirada dos aspirados de medula óssea, além de outros fatores.

Considerando a baixa sensibilidade do exame direto, vários métodos sorológicos têm sido utilizados no diagnóstico da LV humana, porém nenhum teste apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO *et al.*, 2004). Neste estudo, como descrito acima, no momento do diagnóstico foram avaliados o desempenho dos testes sorológicos RIFI e o teste rápido rK39, já preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de LV humana.

Nossos resultados mostraram que a sensibilidade para a RIFI foi de 74%. No Brasil, estudos têm demonstrado sensibilidade variando de 77 a 100% (MAYRINK *et al.*, 1967; BADARÓ *et al.*, 1983; GARCEZ *et al.*, 1996; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; PEDRAS *et al.*, 2008). Entretanto, Maia e colaboradores (2012) avaliaram o desempenho da RIFI por meio de meta-análise e relataram sensibilidade estimada de 88% e especificidade de 90%. É importante ressaltar que esses estudos têm avaliado RIFI utilizando diferentes antígenos e esses valores mais elevados podem ser devido a essa diferença, bem como ao ensaio utilizado.

Com relação ao teste rápido rK39, foi observado que 79% (61/77) dos pacientes portadores de LV apresentaram resultado positivo no teste. Estudos têm demonstrado que o teste rápido com rK39 (Kalazar Detect®) possui sensibilidade variando entre 71 a 100% (BERN *et al.*, 2000; CHAPPUIS *et al.*, 2005; DIRO *et al.*, 2007; SINGH *et al.* 2010; EL- MOAMLY *et al.*, 2012). Por outro lado, no Brasil, Schallig e colaboradores (2002), encontraram uma sensibilidade 85,7% para o Kalazar Detect® e nosso grupo, avaliando o desempenho desse mesmo teste, encontrou sensibilidade de 90% (CARVALHO *et al.*, 2003). Em um estudo recente conduzido por Peruhype-Magalhães e colaboradores (2012) a sensibilidade relatada foi de 88,1% para o teste rápido utilizando também o Kalazar Detect®.

Neste estudo foi também avaliado o desempenho dos testes sorológicos, ELISA com antígeno solúvel de *L. chagasi* e imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (FC-AFPA), que tem sido descritas como ferramentas alternativas para o diagnóstico de LV.

A sensibilidade encontrada em nosso estudo para o ensaio ELISA foi de 88%, ou seja, 68/77 amostras foram consideradas positivas. De acordo com a literatura, a sensibilidade do ELISA utilizando o antígeno bruto de *Leishmania* spp. varia entre 60 a 100% (SRIVASTAVA *et al.*, 1984, 1989; EL HARITH *et al.* 1987; ABASS *et al.* 2006, 2011; MANDAL *et al.* 2008). Estudos realizados no Brasil demonstraram uma sensibilidade variando entre 88 a 100% (BADARÓ *et al.*, 1986; GARCEZ *et al.*, 1996; BABOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002; BRAZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; PEDRAS *et al.*, 2008). Portanto, os dados obtidos no nosso estudo corroboram os dados da literatura.

Com relação ao desempenho da FC-AFPA, a sensibilidade encontrada em nosso estudo foi de 94% (72/77). Embora seja uma sensibilidade menor em comparação com a sensibilidade de 100% relatada na literatura (GARCIA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010), essa metodologia apresentou sensibilidade superior aos diferentes testes avaliados.

A análise comparativa dos testes avaliados demonstrou que há maior concordância entre os testes sorológicos entre si, do que entre os testes sorológicos e o exame direto, devido a sua baixa sensibilidade comparada aos demais testes.

Nós também comparamos os resultados dos diferentes testes sorológicos em relação ao resultado do teste parasitológico direto. Se considerarmos que pacientes portadores de LV com resultados negativos no exame parasitológico direto, provavelmente, seriam aqueles com menor carga parasitária, seria razoável esperar que também apresentassem menor intensidade na resposta de anticorpos e, conseqüentemente, resultados negativos nos testes sorológicos. Entretanto, foi observado que o desempenho dos testes sorológicos foi semelhante independente do resultado do exame direto. É importante ressaltar que, como descrito acima, o

resultado do exame direto pode ser influenciado por outros fatores além da carga parasitária. Os resultados confirmam os dados da literatura em relação à baixa sensibilidade do exame parasitológico direto e o melhor desempenho dos testes sorológicos.

De acordo com Boelaert e colaboradores (2004), quando se utiliza um teste de referência com baixa sensibilidade, os verdadeiros casos positivos se perdem, assumindo resultado positivo em qualquer novo teste, tendo em vista que esse novo teste tenha uma sensibilidade mais alta.

Portanto, os achados encontrados neste estudo sugerem que a sorologia positiva aliada à clínica, são ferramentas confiáveis para o diagnóstico da LV, pois de acordo com Machado de Assis e colaboradores (2008) é comum a observação de sucesso de testes terapêuticos com drogas leishmanicidas em pacientes com resultados parasitológicos negativos na medula óssea e que apresentam diagnóstico sorológico positivo. No nosso estudo, todos os pacientes com resultado negativo no exame direto apresentaram pelo menos um teste sorológico positivo, curaram após o tratamento e, portanto, foram considerados como portadores de LV.

Considerando que uma estratégia para aumentar o desempenho de testes diagnósticos é usar a associação de testes, nós avaliamos dois algoritmos utilizando apenas métodos sorológicos para o diagnóstico da LV humana, uma vez que o exame direto apresenta baixa sensibilidade e é de difícil execução.

Inicialmente, avaliamos o algoritmo utilizando o teste rápido com rK39 como teste inicial para o diagnóstico da LV, visto que se trata de uma abordagem diagnóstica não invasiva, permite a detecção rápida de anticorpos e apresenta alta especificidade de 90,6 a 100% (CARVALHO *et al.*, 2003; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2012). Além disso, este teste tem sido proposto pelo Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral como um teste de triagem para o diagnóstico de LV humana. Os resultados mostraram que, utilizando este algoritmo, 61 pacientes foram diagnosticados pelo teste rápido com rK39. Utilizando um segundo teste sorológico para avaliar os 16 pacientes negativos, observamos que

100% dos pacientes foram diagnosticados por rK39 seguido de FC-AFPA, 96% foram diagnosticados por rK39 seguido pela técnica ELISA e 94% foram diagnosticados por rK39 seguido pela RIFI.

Posteriormente, foi também avaliado um algoritmo utilizando a RIFI como teste inicial, por ser um teste disponibilizado pelo Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral para o diagnóstico de LV humana. Os resultados mostraram que utilizando esse algoritmo, 57 pacientes apresentaram resultado positivo por esse método. Utilizando um segundo teste sorológico para avaliar os 20 pacientes negativos, observamos que 95% dos pacientes foram diagnosticados por RIFI seguido de FC-AFPA, 96% foram diagnosticados por RIFI seguido pela técnica ELISA e 94% foram diagnosticados por RIFI seguido por rK39.

Portanto, nossos resultados demonstram que, embora a associação do teste rápido rK39 com FC-AFPA tenha sido capaz de diagnosticar 100% dos casos de LV, a associação deste teste com outros testes sorológicos também apresentou um alto desempenho. Entretanto, considerando que a citometria de fluxo não está disponível em todos os centros de referência, a utilização da RIFI como segundo teste seria de grande utilidade, o que corrobora a norma técnica do Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral no Brasil, que recentemente sugeriu a utilização do teste rápido rK39 como teste de triagem para o diagnóstico de LV, seguido de RIFI ou exame direto.

Devido a alta especificidade para pacientes com leishmaniose visceral, o teste rápido com rK39 pode substituir métodos diagnósticos mais invasivos para a avaliação inicial de pacientes com suspeita de LV. Além disso, destacam-se outras vantagens como a facilidade de execução, praticidade, rapidez de seus resultados e baixo custo. Este diagnóstico simples é de grande utilidade no âmbito da atenção primária de saúde, onde os profissionais necessitam dispor de testes mais simples e confiáveis para o diagnóstico precoce dos pacientes com suspeitas de LV. Seu resultado positivo poderia orientar o profissional para o início imediato do tratamento

farmacológico específico. Entretanto, pacientes com resultados negativos para o teste rápido devem ser confirmados em um centro de referência através de técnicas sorológicas mais sensíveis como a FC-APPA, se disponível.

6 CONCLUSÕES

1. A sensibilidade dos testes avaliados foi de 48% para o exame parasitológico direto, 74% para RIFI, 79% para o teste rápido com rK39, 88% para o teste ELISA-ASL e 94% para a FC-AFPA.
2. Foi observada uma maior concordância entre os testes sorológicos do que entre o exame parasitológico direto e os testes sorológicos.
3. O resultado do exame direto não influenciou os resultados dos testes sorológicos.
4. O algoritmo para o diagnóstico da LV humana que apresentou melhor desempenho foi aquele que utilizou o teste rápido como triagem, seguido de FC-AFPA.

7 REFERÊNCIAS

- ABASS E.M.; MANSOUR D.; EL MUTASIM M.; HUSSEIN M.; EL HARITH A. Beta-mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. **J Med Microbiol**, Set; 55(9): 1193-96. 2006.
- ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 20(1): 259-265. 2004.
- AMATO NETO, V.S; TUON F.F; GAKIYA E; MARCHI C.R DE; SOUZA RM DE; et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **Int J Infect Dis Mar**; 13(2): 182-185. 2009.
- ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.; SIQUEIRA, I.C., COSTA, C.H.N. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.2, abr-jun. 2008.
- BADARÓ R.; REED S.G.; CARVALHO E.M. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensibility and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg** Mai; 32(3): 480-84.1983.
- BADARÓ R.; JONES, R.; LORENÇO, B.; CERF J.; SAMPAIO D.; CARVALHO E. M. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis** Vol. 154, No. 4 Oct., pp. 639-649.1986.
- BADARÓ R.; REED S.G.; BARRAL A.; ORGE G.; JONES T.C. Evaluation of micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies in American visceral leishmaniasis antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am J Trop Med Hyg** Jan; 35(1): 72-8. 1986.
- BADARÓ, R., D.; BENSON, M. C.; EULALIO, M.; FREIRE, S.; CUNHA, E. M.; NETTO, D.; et al. rK39: a cloned antigen for *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 173:758–761.1996.
- BADARÓ, R. & REED, S.G. Leishmanioses in FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S.L.M.; Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 255-262, 2001.
- BARBOSA-DE-DEUS R.; MARES-GUIA ML.; NUNES A.Z.; COSTA K,M; JUNQUEIRA R.G; MAYRINK W. et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol** Nov; 9(6): 1361-66. 2002.

BERN C.; JHA S.N.; JOSHI A.B.; THAKUR G.D & BISTA M.B. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **Am J Trop Med Hyg** Set; 63(3,4): 153-7. 2000.

BOELAERT M.; RIJAL S.; REGMI S.; SINGH R.; KARKI B.; JACQUET D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** Jan; 70(1): 72-77. 2004.

BOELAERT M.; EL-SAFI S.; HAILU A.; MUKHTAR M.; RIJAL S.; SUNDAR S.; et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 102:32–40. 2008.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 77: 248–254. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e manuais técnicos. 7ª edição. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília, 2011.

BRAZ R.F.S.; NASCIMENTO E.T.; MARTINS D.R.A.; WILSON M.E.; PEARSON R.D.; REED S.G, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am J Trop Med Hyg** Out; 67(4): 344-48. 2002.

BROWN M. AND WITTEWER C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clin Chemistry** 46:8(B) 1221–1229. 2000.

BRYCESON A.M. Leishmaniasis. In: Manson's tropical Diseases, 20th edition, cook, g.c. (editor). London: W.B. Saunders; 1213-1243. 1996.

BURNS, J. M, JR.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W BADARO R.; AND REED S. G.. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in both African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA 90:775–790.1993.

CARVALHO S.F.G.; LEMOS E.M.; COREY R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** Mar; 68(3): 321-4. 2003.

CHAKRAVARTY J; KUMAR S.; KUMAR R.; GAUTAM S.; RAI M.; AND SUNDAR S. Evaluation of rk39 immunochromatographic test with Urine for diagnosis of *Visceral leishmaniasis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. September; 105(9): 537–539. 2011.

CHAPPUIS F.; MUELLER Y.; NGUIMFACK A.; RWAKIMARI J.B.; COUFFIGNAL S.; BOELAERT M. et al. Diagnostic accuracy of two rk39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. **J Clin Microbiol** Dez; 43(12): 5973-77. 2005.

CHAPPUIS, F., RIJAL, S., SOTO, A., MENTEN, J., BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rk39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ** 333, 723. 2006.

CHAPPUIS F.; SUNDAR S.; HAILU A.; GHALIB H.; RIJAL S.; PEELING RW. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol** 5:873–882. 2007.

DA SILVA, M.R.B.; STEWART, J.M.; COSTA, C.H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **J Trop Med Hyg**. v. 76. n. 6. p. 811-814. 2005.

DIETZE, R.; CARVALHO, S. G. Leishmaniose Visceral- Calazar. In: Cimerman, S.; Cimerman, B. *Medicina Tropical*. Atheneu, 72-73, 2003.

DIETZE, R. Diagnóstico Sorológico e Parasitológico da Leishmaniose Visceral. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. p.63-65, nov. 2005.

DIRO E.; TECHANE Y.; TEFERA T.; ASSEFA Y.; KEBEDE T.; GENETU A., et al. Field evaluation of FDDAT, rk39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. **Trans R Soc Trop Med Hyg** Set; 101(9): 908-14. 2007.

EL HARITH A.; KOLK A.H.J.; KAGER P.A.; LEEUWENBURG J.; FABER F.J.; MUIGAI R, et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; 81(4): 603-6. 1987.

EL-MOAMLY A.; EL-SWEIFY M.; HAFEEZ M. Performance of rk39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis. **Parasitol Res** Jan; 110(1): 349-54. 2012.

ENGVALL E.; PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry** 8: 871-874.1971.

GARCEZ L.M.; SHAW J.J & SILVEIRA F. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Rev Bras Soc Med Trop** Mar; 29(2): 165-80. 1996.

GARCIA, L.M.; COELHO-DOS-REIS, J.G.A.; PERUHYPE-MAGALHÃES V.; TEIXEIRA-CARVALHO A; ROCHA R.D.R.; ARAÚJO M.S.S. et al. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. **J Immunological Methods** 350, 36–45. 2009.

GOMES I.T.; CARVALHO S.F.G.; ROCHA R. D. R.; PERUHYPE-MAGALHÃES V.; DIETZE R.; MARTINS-FILHO O. A.; LEMOS E.M. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. **J Immunological Methods** 360, 76–83. 2010.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** Vol. 7, nº 3, 2004.

GURUMURTHY S., KULSHRESTHA A., SINGH R., SALOTRA P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol Res** 110:1065–1078. 2012.

HO E.A.; SOONG T.; LI Y. Comparative merits of sternum, spleen, e liver punctures in the study of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** Mar; 41(5): 629-36. 1948.

JELINEK T.; EICHENLAUD S.; LOSCHER T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** Set; 18(9): 669-70. 1999.

KHAN M.G.M.; ALAM M.S.; PODDER M.P.; JAMIL M.I.K.M.; RAQUE S.; WAGATSUMA Y. Evaluation of rK- 39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasites & Vectors**; 3: 114. 2010

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycles of leishmania in the sand-fly and transmission of leishmaniasis by bite. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain. 2002.

KUMAR, R.; PAI K.; PATHAK K.; AND SUNDAR S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 8:1220–1224. 2001.

KUMAR S.; KUMAR D.; CHAKRAVARTY J.; AND SUNDAR S. Identification and Characterization of a Novel, 37-Kilodalton *Leishmania donovani* Antigen for Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, may, p. 772–775 vol. 18. 2011.

KUMAR R.; NYLÉN S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol.** 3:251. Epub Aug 14. 2012.

LAINSON, R., AND SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1–120. *In* W. Peters and R. Killick-Kendric (ed.), *The leishmaniasis in biology and medicine*. Academic Press, London, England. 1987.

LANDIS JR, KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*; 33:159-75. 1977.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.** 30:1252. 1903.

MACHADO DE ASSIS T.S.; BRAGA A.S.C.; PEDRAS M.J.; BARRAL A.M.P.; SIQUEIRA I.C.; COSTA C.H.N. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde** Jun; 17(2): 105-116. 2008.

MACHADO DE ASSIS T.S.; RABELLO A.; WERNECK G.L.; Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Trop Med Int Health.** Aug 16. 2012.

MAIA Z.; LIRIO M.; MENDES C.M.C.; MEHTA S.R.; BADARÓ R. Comparative study of Rk39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with metaanalysis. **PLOS Negl Trop Dis** Jan; 6(1): 1-8. 2012.

MANDAL J.; KHURANA S.; DUBEY M.L.; BHATIA P.; VARMA N & MALLA N. Short report: Evaluation of direct agglutination test, rK39 test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**; 79(1): 76-8. 2008.

MARTINS-FILHO O.A.; PEREIRA M.E.S.; CARVALHO J.F.; CANÇADO J.; BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live Trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in Human Chagas' disease. **Clin Diag Lab Immunol**; 2(5): 569-73. 1995.

MAYRINK W.; ARAUJO F.G.; MAGALHÃES P.A. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; 172-175. 1967.

MOHAPATRA T.M.; SINGH D.P.; RANJAN M.S.; BHARTI K. AND SUNDAR S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**; 4(2):114-117. 2010.

NO. E.T.; MUSTAFA E.F.; MAURICIO I.; MICHAEL A. M.; OSKAM L.; et al. *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Experimental Parasitology** 97, 35–44. 2001.

OLIVEIRA E.; PEDRAS M.J.; DE ASSIS I.E.; RABELLO A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** Dez; 103(12): 1279-81. 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES E. M.; PARAGUAIL-DE-SOUZA E.; PALATNIK M.; LEEZ K; and. BOROJEVIC R. *Leishmania donovani*: titration of the antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 89:390–393.1995.

PEDRAS M.J.; VIANA L.G.; OLIVEIRA E.J DE.; RABELLO A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** Fev; 102(2): 172-78. 2008

PERUHYPE-MAGALHÃES V.; MACHADO-DE-ASSIS T. S.; RABELLO A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 107(7): 951-952, November 2012.

RAJASEKARIAH, G. H.; RYKAN J. R.; HILLIER S. R.; YI L. P.; STITELER J. M, L.; CUI. et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **J. Immunol. Methods** 252:105–119. 2001.

RYAN, J. R.; SMITHYMAN A. M.; RAJASEKARIAH G. H.; HOCHBERG L.; M. STITELER J.; and MARTIN S. K.. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 40:1037–1043. 2002.

SCHALLIG H.D.F.H.; CANTO-CAVALHEIRO M.; SILVA E.S. DA. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** Out; 97(7): 1015-18b. 2002.

SIDDIG M.; GHALIB H.; SHILLINGTON D.C.; PETERSEN E.A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; 82(1): 66-8. 1988.

SINGH D.P.; GOYAL R.K.; SINGH R.K.; SUNDAR S & MOHAPATRA T.M. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of Kala-azar. **J Health Popul Nutr** Jun; 28(3): 281-85. 2010.

SRIVASTAVA L.; CHAKRAVARTY A.K.; KUMAR A.; KUMAR P. Comparison of ELISA & indirect immunofluorescence in sero-epidemiology of Kalazar. **Indian J Med Res** Jun; 79: 744-8. 1984.

SRIVASTAVA P.; MEHROTRA S.; TIWARY P.; CHAKRAVARTY J.; SUNDAR S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. **PLoS One** 6:e19304. 2011.

SRIVASTAVA P.; DAYAMA A.; MEHROTRA S.; SUNDAR S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** Jan; 105(1): 1-6. 2011.

SUNDAR, S.; REED, S.G.; SINGH, V.P.; KUMAR, P.C.; MURRAY, H.W. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet** 351, 563-565. 1998.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clin Diagn. Lab Immunol**; 9: 951-958, 2002.

SUNDAR S., R.K. SINGH, R. MAURYA, B. KUMAR, A. CHHABRA, V. SINGH, M. RAI. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 100, 533—537, 2006.

SUNDAR S.; SINGH R.K.; BIMAL S.K.; GIDWANI K.; MISHRA A.; SINGH S.K. et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in india: a phase III diagnostic accuracy study. **Trop Med Int Health** Feb; 12(2): 284-89. 2007.

SUNDAR S.; CHAKRAVARTY J. Recent advances in the diagnosis and treatment of kala-azar. **The National Medical Journal of India** vol. 25, no. 2. 2012.

WHO & ODA Manual on visceral leishmaniasis control. Geneva: World Health Organization. **WHO/Leish/96.40**.1996.

VAISH M.; BHATIA A.; REED S.G.; CHAKRAVARTY J.; SUNDAR S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. **Clin Microbiol Infect** Jan; 18(1): 81-5. 2012.

VERMA S.; KUMAR R.; KATARA G.K.; SINGH L.C.; NEGI N.S.; RAMESH V.; SALOTRA P. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS One** 5:e10107. 2010.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, London, v. 4, p.337-348, 2004.

ZIJLSTRA, E.E.; ALI, M.S.; el-HASSAN, A.M.; el-TOUM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W.; KAGER, P.A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. vol. 86. n.5. p.505-507, 1992.

ZIJLSTRA E.E.; DAIFALLA N.S.; KAGER P.A.; KHALIL E.A.; EL-HASSAN A.M.; REED S.G.; GHALIB H.W. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection **Clin Diagn Lab Immunol.** Sep; 5(5):717-20. 1998.

ZIJLSTRA, E.E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E.A.; EL HASSAN, A.M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Trop. Med. Int. Health** 6, 108—113 2001.