



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

MAURO ROBERTO BIÁ DA SILVA

**Avaliação da Acurácia de Testes Imunocromatográficos rK39 no
Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Pacientes Coinfectados
com HIV**

**Goiânia
2014**

MAURO ROBERTO BIÁ DA SILVA

**Avaliação da Acurácia de Testes Imunocromatográficos rK39 no
Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Pacientes Coinfectados
com HIV**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

**Goiânia
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

Silva, Mauro Roberto Biá da.

Evaluation of Accuracy of tests Immunochromatographic rK39
in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Patients coinfectd with
HIV

[manuscrito] / Mauro Roberto Biá da Silva. - 2014.

87 f. : il., figs.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: Mauro Roberto Biá da Silva

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Membros titulares:

- 1. Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira - Presidente da Banca**
- 2. Prof^ª Dr^ª Ledice Inácia de Araújo Pereira**
- 3. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior**
- 4. Prof^ª Dr^ª Miriam Leandro Dorta**
- 5. Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa**

Membros suplentes:

- 5. Prof^ª Dr^ª Dorcas Lamounier Costa**
- 6. Prof^ª Dr^ª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga**
- 7. Prof^ª Dr^ª Fátima Ribeiro Dias**
- 8. Prof^ª Dr^ª Simone Gonçalves da Fonseca**

Data: 21/11/2014

Dedico este trabalho...

Ao Senhor dos Senhores: Deus!

A minha amada avó Luíza (*in memoriam*), com carinho e saudade;

Ao meu pai Cícero Biá, por toda dedicação e incentivo;

A minha mãe Maria Pinheiro, pelo seu sorriso e suas orações;

A toda minha família;

Aos pacientes, especialmente aqueles que tão gentilmente aceitaram participar deste estudo.

E a todos os amigos que fizeram possível esse labor.

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que, de diferentes formas, colaboraram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos amigos que aqui não haveria espaço suficiente para nomeá-los, agradeço o interesse e a paciência.

Ao corpo docente do DINTER IPTSP/UFMG/UFMA/UEMA/UESPI, em particular a Prof.^a Dra. Ana Maria de Castro, Prof.^a Dra. Celina Turchi Martelli, Prof.^a Dra. Cristiana Toscano, Prof.^a Dra. Fátima Ribeiro-Dias, Prof. Dr. João Bosco Siqueira Junior, Prof.^a Dra. Mariane, Prof.^a Dra. Marília Dalva Turchi, Prof.^a Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, Prof.^a Dra. Regina Maria Bringel Martins, Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, Prof.^a Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos e Prof. Dr. Wolf Christian, pelo conhecimento, pelo carinho e segurança.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por ter aceitado o desafio de orientar este trabalho de forma sempre sábia e amiga.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa pelo apoio e orientação deste trabalho.

Aos colegas de turma de doutorado: Gisella Maria Lustoza Serafim – UESPI, Ivonizete Pires de Castro – UESPI, José Eduardo Batista – UFMA, Joseneide Texeira Câmara – UEMA / CESC, Maria Edileusa Soares Moura – UEMA / CESC, Miriam Perpetua Palha Dias Parente – UESPI, Omar Khayyam Duarte do Nascimento – UEMA / SL, Raimundo Nonato Martins Fonseca – UEMA / CESC e Sheila Elke Araújo Nunes – UEMA / CESI.

Aos amigos da Universidade Estadual do Piauí, Dr. Adail, Dr. Izânio e ao Dr. Ednaldo, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Leishmaniose do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, em particular ao Fernando, Vladimir, Jailton, Alexandre, Dani e Francisca.

Aos amigos do IDTNP, Dr^a Maria das Dores, Dr. Kelsen, Dr. José Roberto, Dr^a Ada, Dr. Linduarte e Dr. Miguel.

Aos amigos do Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME do IDTNP, em particular ao Mendes e ao Jorge pela ajuda para localizar os prontuários de forma sempre cordial e organizada.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Bacteriologia do IDTNP, em especial Lúcia, José Ferreira e “Raimundinho”.

A Prof.^a Socorro e Prof.^a Ivete, da UFPI, por emprestar o leitor de Elisa, fundamental para a conclusão das análises em Teresina.

Aos amigos do Laboratório Central do Piauí – LACEN-PI, Dr. Alberto, Dr. Roberto, Dr. Letiano e Dr^a Simonara.

Aos amigos da Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Estudos Superiores de Caxias, pela acolhida e apoio, em particular a secretária Rachell e a Prof.^a Valéria Cristina.

Aos amigos do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG, especialmente ao Dr. Osmar Dias, pela acolhida e pelas orientações.

Aos amigos da Orangelife: à Dra. Margella Marconcine, Dr. Ronaldo Ferreira Dias e ao Dr. Marco Collovati.

Aos professores que fizeram parte de minha banca de qualificação, Prof. Dr. Ruy de Sousa Lino Junior – UFG, Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho – UFPI, Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa – UFPI, Prof.^a Dr^a Simone Gonçalves de Fonseca - UFG, Prof.^a Dr^a Fátima Ribeiro Dias – UFG e Prof.^a Dr^a Dorcas Lamounier Costa – UFPI, pelas valiosas sugestões para melhorar esta tese de doutorado.

Aos meus queridos primos e primas de Goiás, Zé Biá, Cleuto, Rose, Lúcia, Deusa e Ozenir, pelo carinho com que me receberam.

Ainda de Goiás, ao meu tio Aones Biá, pelas incansáveis ligações para saber se estava tudo bem.

A toda minha família, em particular, Antônia, Socorro, Júlia, Cássia e Diorgenes, pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	viii
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1. As Leishmanioses.....	16
1.2. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	16
1.3. A Leishmaniose Visceral.....	17
1.4. Leishmaniose Visceral no Brasil.....	17
1.5. Leishmaniose Visceral no Piauí.....	18
1.6. A Coinfecção <i>Leishmania</i> -HIV.....	19
1.7. Testes sorológicos no diagnóstico da LV.....	20
1.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	20
1.9. Teste de Aglutinação Direta (DAT).....	20
1.10. Testes Imunocromatográficos.....	21
1.11. Reação cruzada do teste IC rK39 com Doença de Chagas.....	26
1.12. Alternativas para o diagnóstico da LV.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
4. MÉTODO(S).....	31
5. ARTIGOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÕES.....	76
8. RECOMENDAÇÕES (se pertinentes).....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	86

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Quadro 1	Os fabricantes e os produtos aceitos para avaliação	24
Quadro 2	Sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico rápido por regiões	24
 <u>ARTIGO 1</u>		
Figura 1	Flow diagram describing the flow of patients enrolled in this study.....	51
Figure 2	Total and VL-specific IgA and IgG in serum	53
Figure 3	Total and VL-specific IgA and IgG in saliva	54
Figure 4	Amount of hemoglobin in saliva	55
 <u>ARTIGO 2</u>		
Tabela 1	Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV considerando positivos os pacientes diagnosticados pelo PCR + esfregaço de aspirado de medula óssea ou Cultura + esfregaço de aspirado de medula óssea	68
Tabela 2	Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV em indivíduos infectados ou não pelo HIV considerando positivos os pacientes diagnosticados pela PCR e/ou esfregaço de aspirado de medula óssea	69
Tabela 3	Características dos participantes do estudo	70
Figura 1	Quantidade de IgG total ou IgG específica para leishmania em soro de pacientes com LV e indivíduos controles.	71
Figura 2	Quantidade de IgG Total ou IgG específica no soro de pacientes com LV com resultados discordantes entre o teste Orangelife (OL) e o teste Kalazar Detect (KD)	72
 <u>ANEXOS</u>		
Anexo 1	Parecer do Comitê de Ética	86
Anexo 2	Carta de Aceite para publicação de artigo	87

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μm	Micrômetro
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CT	Controle
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Imunocromatográfico
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
mL	Mililitro
mM	Milimolar
n	Número de amostras
ng	Nanogramas
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
OL	Orangelife
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rK39	Antígeno recombinante K39

SBF	Soro bovino fetal
T20	Tween 20
TA	Temperatura ambiente
TDR	Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases [Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais]
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
UFG	Universidade Federal de Goiás
VPN	Valor preditivo negative
VPP	Valor preditivo positive
WHO	World Health Organization

RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, especialmente *Leishmania (Leishmania) infantum* ou *Leishmania (Leishmania) donovani*. Está presente em regiões tropicais e subtropicais e é considerada uma doença negligenciada. O diagnóstico preciso da LV é geralmente difícil, principalmente em pacientes coinfectados pelo HIV, porque a LV apresenta formas clínicas atípicas e porque o diagnóstico sorológico se torna pouco confiável.

Objetivo: Avaliar a acurácia de Testes Imunocromatográficos rK39 no diagnóstico da LV em soro e saliva de pacientes coinfectados com HIV. **Métodos:** Pacientes suspeitos de LV foram atendidos no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela - IDTNP, Teresina, Piauí, Brasil, no período de março de 2011 a outubro de 2012. Além do exame clínico, foi realizado o teste IC rK39 em saliva e sangue, aspiração de medula óssea para exames parasitológicos e PCR- RFLP. Como rotina na instituição, pacientes sugestivos de LV também foram investigados para HIV. Foram coletadas amostras de medula óssea para pesquisa de *Leishmania* em esfregaço, cultura e PCR. Para pesquisa de *Leishmania* spp. em aspirado de medula óssea, utilizou-se a coloração pelo Panótico (RANYLAB Química Farmacêutica). A leitura das lâminas coradas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão, aumento de 1000x. Para realização da cultura de aspirado de medula óssea, o aspirado foi cultivado em 3 mL de meio NNN (McNeal, Novy & Nicolle) e 500 µL de meio Schneider a 26°C. A pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania* spp. foi realizada a cada sete dias em lâmina – lamínula em microscópio óptico. Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro. Em seguida, os soros foram aliquotados em tubos de criosaio e mantidos em freezer a -70°C. A saliva foi recolhida em tubos de polipropileno de 50 mL e para aumentar a quantidade de saliva, os pacientes receberam um pedaço de Parafilm® para mastigar. A saliva foi aliquotada em tubos de criosaio e mantidas em freezer a -70°C. **Resultados:** Pacientes com LV que possuíam o teste IC rK39 positivo no soro, apresentaram uma positividade de 58,6% (n = 17) na saliva (SalPos), enquanto todos os doadores saudáveis (CT) (n = 20) foram negativos no soro e na saliva. A quantidade de IgG total e específica no soro do paciente com LV foi significativamente mais elevada do que no grupo CT. A IgG

específica do grupo SalPos foi maior do que no grupo de pacientes com LV com saliva negativa (SalNeg), mas não foi estatisticamente significativa. A quantidade de IgA total ou específica foi semelhante em todos os grupos. A quantidade de IgG específica para *Leishmania* observada na saliva de ambos os grupos SalPos e SalNeg foi maior do que no grupo controle, mas o grupo com saliva SalPos apresentou mais IgG específico para *Leishmania* do que o grupo SalNeg. Dos 86 pacientes com LV, 33 possuíam sorologia positiva para HIV, cinco apresentaram sorologia negativa, porém, eram portadores do vírus e estavam em tratamento, totalizando 37 indivíduos infectados. A sensibilidade para LV na PCR foi de 100%, já que este foi o teste considerado ouro neste estudo. Os demais testes tiveram sensibilidade de 57,14% (n= 49) (cultura de aspirado medular), 48,71% (n = 78) (análise de esfregaço de aspirado medular), 55,81% (n = 86) e 56,25% (n = 85) para os testes IC rK39 no soro Orangelife ou Kalazar Detect respectivamente. No caso do uso do teste parasitológico como padrão ouro, a sensibilidade dos testes sorológicos foi superior a 82%. Ainda não está bem esclarecido se a infecção pelo HIV é capaz de interferir nos testes sorológicos. **Conclusões:** Os testes IC rK39, com utilização de soro, tem uma baixa sensibilidade quando aplicados a pacientes coinfectados com LV-HIV, e o uso da saliva para o diagnóstico da LV é limitado.

Palavras-chave: Teste imunocromatográfico rK39. Leishmaniose Visceral. Saliva humana. Soro humano. HIV/AIDS.

ABSTRACT

Background: Visceral Leishmaniasis (VL) is an anthroponosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*, especially *Leishmania (Leishmania) infantum* or *Leishmania (Leishmania) donovani*. It is present in tropical and subtropical regions and it is considered a neglected disease. The LV diagnosis is difficult, mainly for patients co-infected with HIV, because LV patients present atypical clinic forms and the serology is not trustful. **Objectives:** The aim of this thesis is to evaluate the accuracy of Immunochromatographic rK39 tests in the diagnosis of Visceral Leishmaniasis in serum and saliva of HIV-co-infected patients. **Methods:** VL suspected patients were treated at the Institute of Tropical Diseases Natan Portela - IDTNP, Teresina, Piauí, Brazil, from March 2011 to October 2012. In addition to the clinical examination, it was performed the IC rK39 test in saliva and blood and also the bone marrow aspiration for parasitological and the PCR-RFLP tests. As routine in the institution, VL suggestive patients were also investigated for HIV. Bone marrow samples were collected for *Leishmania* research in smear, culture and PCR. For the research of *Leishmania* spp. in bone marrow aspirate, the Panoptic stain was used (RANYLAB Pharmaceutical Chemistry). The analyses of the stained slides were done in an optical microscope with immersion objective, magnification of 1000x. To perform the bone marrow aspirate culture, the aspirate was cultivated in 3 mL of NNN medium (McNeal, Novy & Nicolle) and 500 µL Schneider medium at 26°C. The search for promastigotes. was performed every seven days in blade - cover slip in an optical microscope. 5 mL were collected from peripheral blood in Vacutainer® tubes without any anticoagulant in order to obtain the serum. Sera were then aliquoted in cryoassay tubes and kept in a freezer at -70°C. Saliva was collected in 50 mL polypropylene tubes and, in order to increase the amount of saliva, the patients received a piece of Parafilm® for chewing. Saliva was aliquoted in cryoassay tubes and kept in a freezer at -70°C. **Results:** VL patients who possessed the IC rK39 test with positive serum showed 58.6% of positivity (n = 17) in saliva (SalPos), while all of the healthy donors (CT) (n = 20) were negative in serum and saliva. The amount of total and specific IgG in the serum of patients with VL was significantly higher than that in the CT group. The specific IgG of the SalPos group was greater than in VL patients with negative saliva (SalNeg), but it was not statistically

significant. The amount of total or specific IgA was similar in all groups. The amount of specific IgG for *Leishmania* found in saliva of both the SalPos and SalNeg groups was higher than in the control group, but the group with SalPos saliva presented more specific IgG to *Leishmania* than the SalNeg group. Among the 86 VL patients, 33 had positive serology for HIV and five tested negative serology, however, they were carriers of the virus and were being treated, totalizing 37 infected individuals. The sensitivity of VL in PCR was of 100%, since this test was considered gold standard in this study. The other tests had sensitivity of 57.14% (n = 49) (bone marrow aspiration culture), 48.71% (n = 78) (marrow aspirate smear analysis), 55.81% (n = 86) and 56.25% (n = 85) for the IC rK39 tests in Orangelife or Kalazar Detect serum, respectively. In the case of using the parasitological test as the gold standard, the sensitivity of serological tests was greater than 82%. It is not clear if HIV infection is able to interfere in the serological tests yet. **Conclusions:** The rK39 IC tests, with the utilization of serum, have a low sensitivity when applied to patients co-infected with HIV and VL, and the use of saliva for VL diagnosis is limited.

Keywords: rK39. Visceral leishmaniasis. Saliva. HIV / AIDS.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. As Leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em 98 países e em cinco continentes, sendo a maioria destes países classificados como em desenvolvimento. Elas estão presentes em regiões tropicais e subtropicais e são consideradas como doenças tropicais negligenciadas (DTN) (ALVAR *et al.*, 2012; CDC, 2014). Atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas por *Leishmania*, havendo uma incidência anual de 1,7-2,0 milhões de casos (ALVAR *et al.*, 2012).

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. O protozoário é transmitido ao homem e à outros hospedeiros através da picada de insetos fêmeas pertencentes à ordem *Díptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. Estes são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (DE ASSIS, 2012a). Existem três formas principais da doença: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LM) (WHO, 2014).

1.2. Ciclo de vida da *Leishmania*

As leishmanias têm duas formas principais durante o ciclo de vida: as formas promastigotas flageladas móveis, presentes no vetor, e as formas amastigotas não flageladas intracelulares, presentes nas células hospedeiras de mamíferos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A infecção começa quando o vetor inocula formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro. Estas formas são fagocitadas pelos macrófagos e dentro do vacúolo fagocítico, os protozoários transformam-se em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária simples. Depois de vários ciclos de divisão, elas são liberadas como amastigotas devido à ruptura da célula hospedeira (VAN ASSCHE *et al.*, 2011). As formas amastigotas serão novamente fagocitadas por macrófagos perpetuando a infecção no hospedeiro e causando as várias formas clínicas associadas à infecção por *Leishmania* (HERWALDT, 1999). Trinta espécies de flebótomos são capazes de transmitir a leishmaniose e mais de 20 espécies de *Leishmania spp.* são

patogênicas aos humanos (FAUCHER; PIARROUX, 2010). Esta diversidade de vetores e parasitos provocam grandes variações epidemiológicas que, associadas à resposta imune do hospedeiro, determina a forma clínica (FAUCHER; PIARROUX, 2010).

1.3. A Leishmaniose Visceral

A LV é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, especialmente *Leishmania (Leishmania) infantum* ou *Leishmania (Leishmania) donovani*. Ela é transmitida ao homem pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, como *Lutzomyia longipalpis*. A doença pode ser fatal se não for tratada e a maioria das mortes são subnotificadas, mesmo para indivíduos com acesso ao tratamento (WHO, 2013). Há muitos animais reservatórios dos parasitos que favorecem a transmissão da doença, incluindo *Canis familiaris* em áreas urbanas e raposas e marsupiais em áreas rurais (SILVA *et al.*, 2014a). A LV é endêmica na América do Sul e na região do Mediterrâneo (HASKER *et al.*, 2014). Estima-se que 200 000 a 400 000 novos casos de LV ocorrem no mundo a cada ano. Mais de 90% dos casos novos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014). De maneira geral, acredita-se que a LV afete as áreas mais pobres dos países em desenvolvimento (VAISH *et al.*, 2012b), podendo aparecer como epidemias em algumas áreas. Como exemplo, em 1997, o número de casos confirmados de LV no Sudão aumentou 400% em comparação com o ano anterior, provavelmente devido à migração de trabalhadores sazonais e grandes movimentos populacionais causados por distúrbios civis (WHO, 2013).

Os pacientes com LV geralmente apresentam febre prolongada, esplenomegalia e perda de peso. Os casos são facilmente confundidos com malária, febre entérica, entre outras doenças. Embora exista tratamento, este é baseado em fármacos tóxicos e de uso parenteral (VAISH *et al.*, 2012b), portanto, um diagnóstico preciso é fundamental antes de iniciar o tratamento. Novas ferramentas para diagnósticos sorológicos são desejáveis para substituir o diagnóstico parasitológico invasivo por aspiração do baço, o qual acarreta o risco de hemorragia grave (VAISH *et al.*, 2012b).

1.4. Leishmaniose Visceral no Brasil

O primeiro caso de LV no Brasil foi registrado em 1913, em Porto Esperança, Mato Grosso do Sul. Mais tarde, na década de 1930, uma investigação na parte nordeste do país confirmou 41 casos de LV durante autópsias de casos suspeitos de febre

amarela. Os anos seguintes foram caracterizados por novos casos emergentes em áreas rurais em mais de dez estados (SILVA *et al.*, 2014a). Após 1980, a distribuição geográfica da LV se expandiu, em parte devido ao aumento da urbanização. Em 1980 foram relatados 1.500 casos de LV e no período entre 1990 e 2009 já havia sido relatado um total de 57.973 casos (DE ARAÚJO *et al.*, 2012). Inicialmente, a LV era considerada endemia rural com ciclos de dez anos, até o final do século XX, as áreas rurais da região Nordeste contribuíam com 90% dos casos de LV no Brasil (BOTELHO; NATAL, 2009; WHO, 2010). Mais recentemente, houve uma mudança no padrão de transmissão da doença que passou a ser predominantemente urbano, primeiramente nas periferias das capitais dos estados nordestinos e depois se dispersou para outras cidades e regiões do País (BOTELHO; NATAL, 2009). Em 2011 a LV apareceu em 22 dos 27 estados brasileiros, cobrindo as áreas urbanas e suburbanas (SILVA *et al.*, 2013).

1.5. Leishmaniose Visceral no Piauí

No Piauí, casos de LV são notificados desde 1934. Entre 1971 e 1979, a LV apareceu como uma doença endêmica e a maioria dos casos relatados se originaram em Teresina. No interior do Piauí, a maioria dos casos se originou na região semiárida (SOARES *et al.*, 2008; DRUMOND; COSTA, 2011). No período de 2004 a 2008 foram registrados 1.311 casos de LV, o que corresponde a 15% dos casos notificados na Região Nordeste e 8% no país. O Piauí está entre os 10 estados com maior registro de casos. A letalidade média neste período foi de 6,1%. No ano de 2008, foram confirmados 178 casos novos, distribuídos em 26% dos municípios. Do total de casos, 36% ocorreram em Teresina, seguido por Parnaíba com 6% (BRASIL, 2009). Em 2009 foram registrados 157 casos de LV no estado do Piauí, sendo que a capital possuía 39,5% do total destes. O coeficiente de incidência foi de 5,0 casos por 100.000 habitantes, e destes, 80,3% foram confirmados laboratorialmente. A letalidade registrada foi de 9,6% e o percentual de cura clínica foi de 52,9% (BRASIL, 2011c).

Teresina, capital do Piauí, é considerada um dos principais focos urbanos da doença no Brasil. No início de 1980, a primeira grande epidemia de LV urbana no Brasil foi relatada neste município. A ocupação rápida e desorganizada da periferia da cidade expôs a população a extensas áreas cobertas com florestas tropicais e densa vegetação. Esse crescimento acelerado e urbanização desordenada também resultaram nas condições de vida e de moradia inadequadas, o que também pode ter contribuído

para o surgimento da doença no ambiente urbano, porque o vetor *Lu. longipalpis* se adapta facilmente às condições peridomiciliares em áreas empobrecidas (DE ALMEIDA *et al.*, 2011). A destruição das áreas de floresta também alterou o habitat dos reservatórios. As raposas, por exemplo, precisaram reorganizar a sua cadeia alimentar e passaram a ser vistas com relativa frequência nas periferias da cidade, revirando o lixo urbano em busca de alimento (WERNECK *et al.*, 2008).

1.6. A Coinfecção *Leishmania*-HIV

A maioria das infecções por LV são assintomáticas, embora o acompanhamento longitudinal mostre que alguns indivíduos infectados eventualmente evoluem para doença clínica. Desnutrição e imunossupressão, nomeadamente devido a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), predis põem à doença clínica (BABUADZE *et al.*, 2014).

O primeiro caso de coinfecção *Leishmania*-HIV foi descrito em 1985, no sul da Europa, e atualmente há registros de coinfecções em 35 países. A experiência mundial, especialmente a europeia, evidencia um aumento importante do número de casos de coinfecções na última década, levando a modificações na história natural das leishmanioses (SOUSA-GOMES *et al.*, 2011). No sul da Europa, até 70% dos casos de LV em adultos estão associados com a infecção pelo HIV (WHO, 2010). A coinfecção HIV e *Leishmania* ganhou importância clínica em vários países onde ambas as infecções são endêmicas (OKWOR; UZONNA, 2013; PATOLE *et al.*, 2014). Dentre os países latino-americanos, o Brasil tem o maior número de casos de coinfecção (SILVA *et al.*, 2013).

Um dado importante relativo à coinfecção no Brasil é que uma porcentagem grande de pacientes coinfectados apresenta uma história prévia de LV, sugerindo que o aumento na prevalência da LV pode ser devido à recidiva em face do aumento da infecção pelo HIV (OKWOR; UZONNA, 2013).

Em indivíduos coinfectados a doença é caracterizada por taxas significativamente mais baixas de cura, maior toxicidade das drogas, recidivas e aumento das taxas de mortalidade (COTA *et al.*, 2013; PATOLE *et al.*, 2014). Pacientes com a infecção pelo HIV não são apenas mais suscetíveis à leishmaniose, mas também representam um desafio importante para o diagnóstico e a terapêutica. Assim, há sérias implicações com relação à LV e estratégias de eliminação em áreas onde as infecções pelo HIV e pela LV se sobrepõem (PATOLE *et al.*, 2014). A infecção concomitante por

HIV aumenta o risco de desenvolver LV ativa entre 100 e 2320 vezes (WHO, 2010). Ressalta-se que o número de casos de coinfeção por *Leishmania*-HIV deverá subir devido à distribuição geográfica da sobreposição das duas infecções (OKWOR; UZONNA, 2013).

1.7. Testes sorológicos no diagnóstico da LV

Os testes sorológicos são os métodos indiretos mais utilizados para detectar anticorpos anti-*Leishmania*. Dentre esses testes, podemos citar o ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação direta (DAT) e o Western Blot, os quais são amplamente utilizados na África, Ásia, Europa e América Latina (READY, 2014; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). Estes testes podem permanecer positivos durante vários meses ou anos após o tratamento preconizado e a cura. Portanto, não podem diagnosticar facilmente recidivas e podem ser positivos em indivíduos assintomáticos que vivem em áreas endêmicas e expostas à infecção por *L. donovani* ainda sem história de LV ou progressão subsequente (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). Embora os anticorpos anti-*Leishmania* tenham alto valor diagnóstico em pacientes imunocompetentes, testes sorológicos são menos confiáveis para indivíduos imunossuprimidos (COTA *et al.*, 2013).

1.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria (BRASIL, 2013).

1.9. Teste de Aglutinação Direta (DAT)

A Organização Mundial de Saúde considera dois "testes rápidos" apropriados para o diagnóstico da LV em programas de controle: o Teste de Aglutinação Direta

(DAT) com base em formas promastigotas de *L. donovani* inteiras ou *L. Infantum*, e o teste imunoromatógráfico (IC) rK39 (ROMERO; BOELAERT, 2010).

O DAT para a LV foi descrito por Allain e Kagan em 1975, sendo um dos testes mais simples já desenvolvidos para o diagnóstico dessa doença. Esse teste é de fácil realização e interpretação, sendo indicado para trabalhos no campo, onde as condições são mais restritas. O teste é semi-quantitativo, e neste, soro, sangue ou urina são diluídos e misturados às partículas antigênicas de promastigotas mortas em sua forma íntegra. Após um período de incubação, a aglutinação se completa. Caso os anticorpos contra o protozoário estejam presentes, uma reação de aglutinação é visível a olho nu (DE ASSIS, 2012).

Embora desenvolvido especificamente para as condições de campo, o DAT necessita de um laboratório suficientemente equipado com técnicos qualificados para execução meticulosa e incubação durante a noite. Se um periférico não pode ser estabelecido, as amostras devem ser transportadas para um laboratório central, resultando em atraso no tratamento de 1 a 2 semanas (TER *et al.*, 2009).

O teste de aglutinação direta (DAT) para diagnóstico da LV é simples, de baixo custo, com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (PEDRAS *et al.*, 2008).

1.10. Testes Imunocromatógráficos

Teste IC rK39

O rK39 foi introduzido inicialmente como antígeno para ELISA (BADARÓ *et al.*, 1996; ZIJLSTRA *et al.*, 1998) e posteriormente no formato de fita (SUNDAR *et al.*, 1998). Este último formato é muito fácil de utilizar no campo e o estudo inicial mostrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98% (SUNDAR *et al.*, 1998). Uma avaliação no Sudão de um teste IC do mesmo produtor mostrou sensibilidade a 67% (ZIJLSTRA *et al.*, 2001). No Nepal, um protótipo mostrou uma especificidade de apenas 71% nos controles com sinais clínicos de LV (CHAPPUIS *et al.*, 2003; BOELAERT *et al.*, 2008). A introdução de testes IC rK39 no diagnóstico de primeira linha da LV permitiu simplificar o diagnóstico e diminuir o uso de técnicas mais exigentes ou procedimentos invasivos, como o aspirado esplênico (MUELLER *et al.*, 2014).

Os testes IC com tiras de nitrocelulose são simples e amplamente utilizados para o diagnóstico rápido da LV com uso de sangue ou soro humano, e é extremamente sensível e específico, além de bem aceito no nível do campo. Devido a essa aceitação, testes IC rK39 foram introduzidos no programa de eliminação LV que foi iniciado em 2005 pelos governos dos três países (Bangladesh, Índia e Nepal) com o objetivo de reduzir a incidência anual de LV para menos de um caso por 10.000 pessoas no nível subdistrito em 2015 ou anterior (SINGH, 2013).

O teste IC rK39 é usado para detectar a presença de anticorpos contra o antígeno de *Leishmania* K39 que contém uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos da proteína cinesina (MATLASHEWSKI *et al.*, 2013). Várias marcas de testes IC utilizando antígeno rK39 estão disponíveis. Algumas marcas só podem ser usadas com soro, enquanto outras podem ser usadas com o sangue total colhido por punção digital (WHO/TDR, 2008).

Uma ampla revisão de estudos científicos publicados estima a sua sensibilidade para 93,9% (87,7% - 97,1%) quando utilizado os testes parasitológicos como testes de referência. A Sensibilidade apareceu maior e mais homogênea nos estudos realizados no Sudeste da Ásia. Sua especificidade foi de 90,6% (66,8% - 97,9%) em estudos realizados na clínica, utilizando pacientes febris como controles negativos (WHO/TDR, 2008).

Testes IC rK39 validados para diagnóstico da LV

A Organização Mundial de Saúde avaliou uma série de testes rápidos para LV disponíveis atualmente no mercado. Para que estes testes fossem considerados como “Teste de Diagnóstico Rápido”, foi estabelecido que o teste deveria ter um resultado disponível em 15 minutos e ser simples para poder ser realizado após o treinamento com equipamento mínimo. Além disto, ele deve ser fácil de interpretar e possuir uma plataforma ou fita com leitura visual (WHO/TDR, 2011).

Em março de 2009, o processo de avaliação iniciou-se com um convite aberto à manifestação de interesse para as empresas que fabricam e vendem testes que se enquadram nos critérios de inclusão acima. A manifestação de interesse foi anunciada no site do TDR (*Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*) e distribuída para europeus, norte-americanos, associações de fabricantes indianos e sul-americanos, empresas de publicidade de testes disponíveis no mercado, uma lista de discussão de cientistas da TDR e membros do Comitê Diretivo TDR. Três fabricantes

com um total de quatro produtos disponíveis no mercado responderam à carta de interesse (WHO/TDR, 2011).

Quadro 1: Os fabricantes e os produtos aceitos para avaliação

Nome do produto	Fabricante	Número Catálogo	Antígeno Limite
DiaMed-IT LEISH	Bio-Rad Laboratories	46240	rK39
Crystal [®] KA	Span Diagnostics Ltd.	56IC102-25	rKE16
Signal [®] -KA	Span Diagnostics Ltd.	56FT100-050	rKE16
Kalazar Detect [™]	InBios International Inc.	INS025	rK39
Onsite Leishmania Ab Rapid Test ^c	CTK Biotech, Inc.	R0122S	rK39

Fonte: WHO/TDR, 2011.

A sensibilidade e a especificidade dos testes comerciais para diagnósticos rápido avaliadas foram variáveis entre as regiões, mas foram altamente comparáveis intra-regionalmente. Isso sugere que existem diferenças reais na realização do teste entre as três principais regiões geográficas de LV. No subcontinente indiano todos os testes tiveram um bom desempenho, no entanto, apenas um teste tinha sensibilidade média regional que excedeu 85%, tanto na África Oriental quanto no Brasil, 87,2% (82,5% - 90,8%) e 92% (87,8% - 94,8%), respectivamente (WHO/TDR, 2011).

Quadro 2: Sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico rápido por regiões

Produto	Fabricação	África Oriental		Brasil		Subcontinente indiano	
		Sensibilidade (95% CI) n=250	Especificidade (95% CI) n=250	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)	Sensibilidade (95% CI) n=250	Especificidade (95% CI) n=249
Crystal [®] KA	Span Diagnostics Ltd.	36.8% (31.1-42.9%)	98.0% (95.4-99.1%)	61.5% (55.2-67.4%) ^a	98.4% (95.9-99.4%) ^b	92.8% (88.9-95.4%)	99.2% (97.1-99.8%)
DiaMed-IT LEISH	Bio-Rad Laboratories	87.2% (82.5-90.8%)	96.4% (93.3-98.1%)	92.0% (87.8-94.8%) ^c	95.6% (92.2-97.5%) ^d	98.8% (96.5-99.6%)	97.6% (94.8-98.9%)
Kalazar Detect [™]	InBios International, Inc.	67.6% (61.6-73.1%)	90.8% (86.6-93.8%)	84.7% (79.7-88.7%) ^e	96.8% (93.9-98.4%) ^f	99.6% (97.8-99.9%)	96.0% (92.8-97.8%)
Signal [®] - KA	Span Diagnostics Ltd.	73.2% (67.4-78.3%)	96.4% (93.3-98.1%)	79.2% (73.7-83.8%) ^g	98.8% (96.6-99.6%) ^h	100% (97.9-100%) ⁱ	100% (97.8-100%) ^j
Onsite Leishmania Ab Rapid	CTK Biotech, Inc	na	Na	na	na	99.6% (97.8-99.9%)	96.8% (93.8-98.4%)

CI - intervalo de confiança; na - não aplicável.

a n=244; b n=249; c n=237; d n=248; e n=249; f n=252; g n=250; h n=254; i n=175; j n=170

Fonte: WHO/TDR, 2011.

Atualmente, alguns kits estão disponíveis comercialmente para o diagnóstico da LV: IT-LEISH[®] (Bio-Rad Laboratories), KALAZAR DETECT[®] (InBios International),

CRYSTAL[®] (Span Diagnostic) e ONSITE LEISHMANIA AB RAPID[®] (CTK Biotech). O KALA-AZAR DETECT[®] é padronizado para uso em soro e o ITLEISH[®] para uso em soro e sangue.

Uso do antígeno rK39 no Brasil

De acordo com o Ministério da Saúde, o diagnóstico da LV exige a identificação do parasito em um esfregaço ou cultura e/ou teste sorológico positivo em pacientes com febre e aumento do baço. O teste sorológico mais amplamente disponível para o diagnóstico da LV no Brasil é imunofluorescência indireta (IFI). Este método de diagnóstico é realizado em laboratórios de referência em todo o país e os resultados estão disponíveis para o médico assistente. Como o atraso no diagnóstico de LV pode estar associado com um aumento nas taxas de casos fatais, a utilização de testes de diagnósticos rápidos pode ajudar a reduzir a mortalidade (MOURA *et al.*, 2013).

O teste IC rápido IT-LEISH[®] (DiaMed IT-LEISH[®]) foi validado em um estudo para o diagnóstico da LV em quatro áreas endêmicas do Brasil. Neste estudo, a sensibilidade do ELISA usando-se o antígeno rK39 foi superior à obtida com o teste IC rápido IT-LEISH[®]. A especificidade deste teste, entretanto, foi superior à dos demais métodos avaliados, que não apresentaram diferença significativa entre si. Os resultados obtidos permitiram recomendar o teste IT-LEISH[®] para diagnóstico rápido de LV com o devido acompanhamento de sua implantação nos serviços de saúde, para avaliar seu desempenho em condições de uso rotineiro (DE ASSIS *et al.*, 2008).

Avaliou-se também o desempenho do teste IC rK39 e um de antígeno bruto no ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da LV em 128 pacientes com infecção comprovada por métodos parasitológicos (por microscopia e/ou cultura). Este estudo confirmou a precisão do teste IC rK39 no diagnóstico de pacientes com LV, sem uma infecção simultânea com o HIV, em uma região de alta prevalência. Os autores enfatizam ainda que o curso de LV é mais rápido em pacientes infectados com o HIV, dificultando, assim, o diagnóstico (CARVALHO *et al.*, 2003).

No Brasil, os testes rápidos baseados em rK39 podem ser usados para o diagnóstico “a beira do leito” da LV nas unidades básicas de saúde, porque estes ensaios têm um desempenho adequado, exigem infraestrutura laboratorial mínima e mão de obra não qualificada, fornece resultados em 30 minutos e permite o uso de sangue ou soro. Estes ensaios representam um importante avanço no diagnóstico da doença, particularmente em serviços de saúde da periferia, através da redução do tempo entre o diagnóstico e tratamento (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2012).

Kalazar Detect™

O teste Kalazar Detect™ para LV é um imunoenensaio qualitativo que possui uma membrana base para a detecção de anticorpos contra a LV no soro humano.

DiaMed-IT LEISH® (Opti-Leish)

DiaMed-IT LEISH é um teste imunocromatográfico que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania spp.* Utiliza uma tira-teste impregnada com o antígeno recombinante rK39. No caso da presença destes anticorpos na amostra, os anticorpos capturados pelo conjugado reagem com o antígeno específico rK39. As reações são demonstradas pelo aparecimento de bandas púrpuras escuras na tira-teste.

Foi realizado um extenso estudo no Nordeste da Índia, em 2003, usando o DiaMed-IT LEISH. Sundar e cols. (2003) demonstraram que 206 casos confirmados de Leishmaniose Visceral Humana foram: Sensibilidade: 99% com amostras de sangue total. Especificidade: 100% com amostras de sangue total (SUNDAR *et al.*, 2003).

Orangelife

A Orangelife Comércio e Indústria Ltda. é uma empresa 100% Brasileira, sediada na cidade do Rio de Janeiro, onde possui instalações para produção e controle de qualidade de Kits para diagnóstico, em especial Testes Rápidos (tipo “point of care”).

O teste rápido DPP Orangelife para LV Humana (LVH), se baseia em imunocromatografia e duplo percurso de fluxo lateral.

A Sensibilidade de 95% e a Especificidade de 100% (conforme estudos realizados com painéis de empresas de referência internacional como BBI, Boston Biomédica Inc. e Zeptometrix Corporation, de Nova York), se deve à proteína rK39 recombinante, que foi adaptada e otimizada para o uso em testes com amostras Humanas. Além disso, a plataforma tecnológica de quarta geração (DPP) amplifica em até 12 vezes a sensibilidade, se comparada a um teste convencional de fluxo lateral.

O teste ORANGE DPP LVH pode ser realizado através da utilização de Sangue, Soro ou Plasma, lembrando que oferece um resultado em 15 minutos. O Kit não necessita de geladeiras (conservação em temperatura ambiente), energia elétrica ou equipamentos para leitura. É de fácil manuseio e perfeito para atividades em campo, podendo ser usado também em ambulatórios ou laboratórios.

Uso da saliva no diagnóstico da LV

A maior limitação da utilização do teste IC rK39 é o fato dos resultados de pacientes considerados curados da LV terem resultados falsos positivos por conta da permanência de anticorpos. Os estudos mostram que o uso de expectoração e urina de pacientes com calazar mostram bons resultados, no entanto, a utilização da saliva não está bem estabelecida (SINGH *et al.*, 2009; MOHAPATRA *et al.*, 2014).

A utilização de amostras de saliva no diagnóstico da LV, por ser não invasiva, mostra ser muito importante, principalmente nas regiões endêmicas. O teste apresentou uma sensibilidade de aproximadamente 83% em pacientes com teste sorológico positivo pelo teste IC rK39 em dois ensaios (MOHAPATRA *et al.*, 2014; VAISH *et al.*, 2012a). A especificidade encontrada foi de 91,5% em controles saudáveis de áreas endêmicas.

1.11. Reação cruzada do teste IC rK39 com Doença de Chagas

Ao ser avaliada a possibilidade de reação cruzada do teste IC rK39 com a Doença de Chagas, constatou-se que a sensibilidade e especificidade do teste IC rK39 para o diagnóstico da LV foi de 100%, quando comparado com voluntários saudáveis e aqueles com Doença de Chagas, confirmado por hemocultura. O teste IC rK39 é útil e um resultado falso-positivo raramente ocorre em pacientes com diagnóstico sorológico da Doença de Chagas (AMATO NETO *et al.*, 2009). Além de Doença de Chagas, os testes IC rK39 não apresentaram reações cruzadas com malária, esquistossomose, toxoplasmose, tuberculose e febre tifoide (DOURADO *et al.*, 2007).

1.12. Alternativas para o diagnóstico da LV

Como alternativa para diagnóstico da LV, o teste de aglutinação de látex (KATEX) baseado na detecção do antígeno na urina dos casos de LV foi avaliado em vários estudos de campo, no entanto, o teste mostrou menor sensibilidade em alguns estudos. O teste rK39 em tira, com utilização de urina, seria uma ferramenta não invasiva promissora para diagnóstico rápido da LV em áreas rurais remotas, onde há uma alta prevalência desta doença (KHAN *et al.*, 2010).

Vários métodos de detecção de antígeno na urina têm sido utilizados para o diagnóstico de uma série de doenças parasitárias. No Sudão e em outros países, um teste de aglutinação em látex (KATEX; Kalon Biológicas, Reino Unido) para detecção de antígeno de *Leishmania* na urina foi avaliado em pacientes com suspeita de LV e concluiu-se que o mesmo é adequado para o diagnóstico da LV, para o

acompanhamento da eficácia do tratamento, e para a detecção de infecção subclínica (RIERA *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A melhor forma para diagnosticar a LV ainda é pela demonstração direta do parasito nos aspirados de medula óssea ou de baço sob o microscópio. A detecção do parasito no aspirado de baço é sensível, mas a aspiração do baço é invasiva e dolorosa e traz o risco de hemorragia grave ou fatal. A aspiração da medula óssea é mais segura e relativamente fácil, mas a detecção do parasito no aspirado de medula óssea é menos sensível (60 a 85%), sendo que os dois métodos de detecção exige assistência técnica especializada (SINGH *et al.*, 2009b).

Durante os últimos 70 anos, várias estratégias têm sido utilizadas para o diagnóstico sorológico da LV. O teste de formol-gel (FGT) com base em gelificação e opacificação do soro de um paciente com LV na presença de formaldeído foi o primeiro teste “a beira do leito” para confirmar o diagnóstico da LV em pacientes. Este teste demonstrou elevados níveis de imunoglobulinas no soro dos pacientes e permitiu o desenvolvimento de outros testes sorodiagnósticos para essa enfermidade (MAIA *et al.*, 2012).

O encontro da *Leishmania* no esfregaço de medula óssea é proporcional ao tempo de exame ao microscópio. Para se alcançar uma sensibilidade de 90%, é necessário que 1.200 campos sejam examinados, o que significa aproximadamente 20 minutos de observação. Recomenda-se que mais tempo seja dedicado ao exame das lâminas dos pacientes com alta probabilidade pré-teste de LV, se a pesquisa de *Leishmania* foi negativa nesta fase inicial (SILVA *et al.*, 2005).

A detecção do parasito no aspirado de baço é sensível, mas a aspiração do baço é invasiva e dolorosa e traz o risco de hemorragia grave ou fatal. A aspiração da medula óssea é mais segura e relativamente fácil, mas a detecção do parasito no aspirado de medula óssea é menos sensível (60 a 85%), sendo que os dois métodos de detecção exige assistência técnica especializada (SINGH *et al.*, 2009b).

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos (IC) utilizando o antígeno recombinante K39 (rK39) representou um avanço importante no diagnóstico da LV. No Brasil, os testes rápidos baseados em rK39 podem ser usados para o diagnóstico de cabeceira da LV em centros de cuidados primários de saúde, porque estes ensaios têm

um desempenho adequado, exigem infraestrutura laboratorial e mão de obra qualificada mínima, fornecem resultados em 15 minutos e permitem o uso de sangue ou soro (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2012).

O teste IC utilizando o antígeno rK39 é considerado pouco invasivo, porém, a execução do teste padronizado depende de sangue, o que faz com que a obtenção da amostra biológica a ser analisada seja sempre invasiva. Existem amostras corporais que podem ser obtidas com métodos menos invasivos, como saliva e urina que também possuem anticorpos os quais podem estar relacionados com a doença. O teste rK39 já foi avaliado com a utilização de urina como amostra biológica e mostrou uma sensibilidade de 95% para pacientes com LV (KHAN *et al.*, 2010).

O diagnóstico preciso da LV é geralmente difícil em pacientes coinfectados pelo HIV porque a LV apresenta formas clínicas atípicas e porque o diagnóstico sorológico se torna pouco confiável. A demonstração do parasito em amostras cultivadas ou em preparações coradas é considerada o "padrão ouro" para o diagnóstico, mas requer técnicas invasivas. Um teste não invasivo (ou pouco invasivo) e preciso é necessário, a fim de melhorar o diagnóstico de LV (VILAPLANA *et al.*, 2004).

Existem poucos trabalhos avaliando a sensibilidade dos testes rápidos em indivíduos coinfectados com LV e HIV. Embora alguns trabalhos presentes sugiram que a infecção com HIV diminua a sensibilidade dos testes rápidos (COTA *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2013), o método diagnóstico de referência utilizado nos diferentes trabalhos demonstraram que há dificuldade na interpretação dos resultados (COTA *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a acurácia de Testes Imunocromatográficos rK39 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral em soro e saliva de pacientes coinfectados com HIV.

Objetivos específicos

1. Identificar a presença de anticorpos específicos para *Leishmania* em soro e saliva de pacientes com LV/HIV.
2. Estimar a sensibilidade dos testes IC rK39 com utilização de soro em pacientes coinfectados com LV-HIV.
3. Determinar a sensibilidade dos testes IC rK39 em sangue capilar e soro no diagnóstico da LV.
4. Investigar a sensibilidade do PCR para *Leishmania*, com DNA extraído de medula óssea, em pacientes com LV e em pacientes com LV-HIV.
5. Estimar a sensibilidade do teste IC rK39 Orange Life em sangue capilar e saliva no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral.
6. Estimar a concentração de hemoglobina na saliva e avaliar sua interferência em resultados com testes rK39.
7. Testar os soros de pacientes sugestivos de LV para avaliar possíveis reações cruzadas com os testes sorológicos, ELISA, para Doença de Chagas.

4. MÉTODO(S)

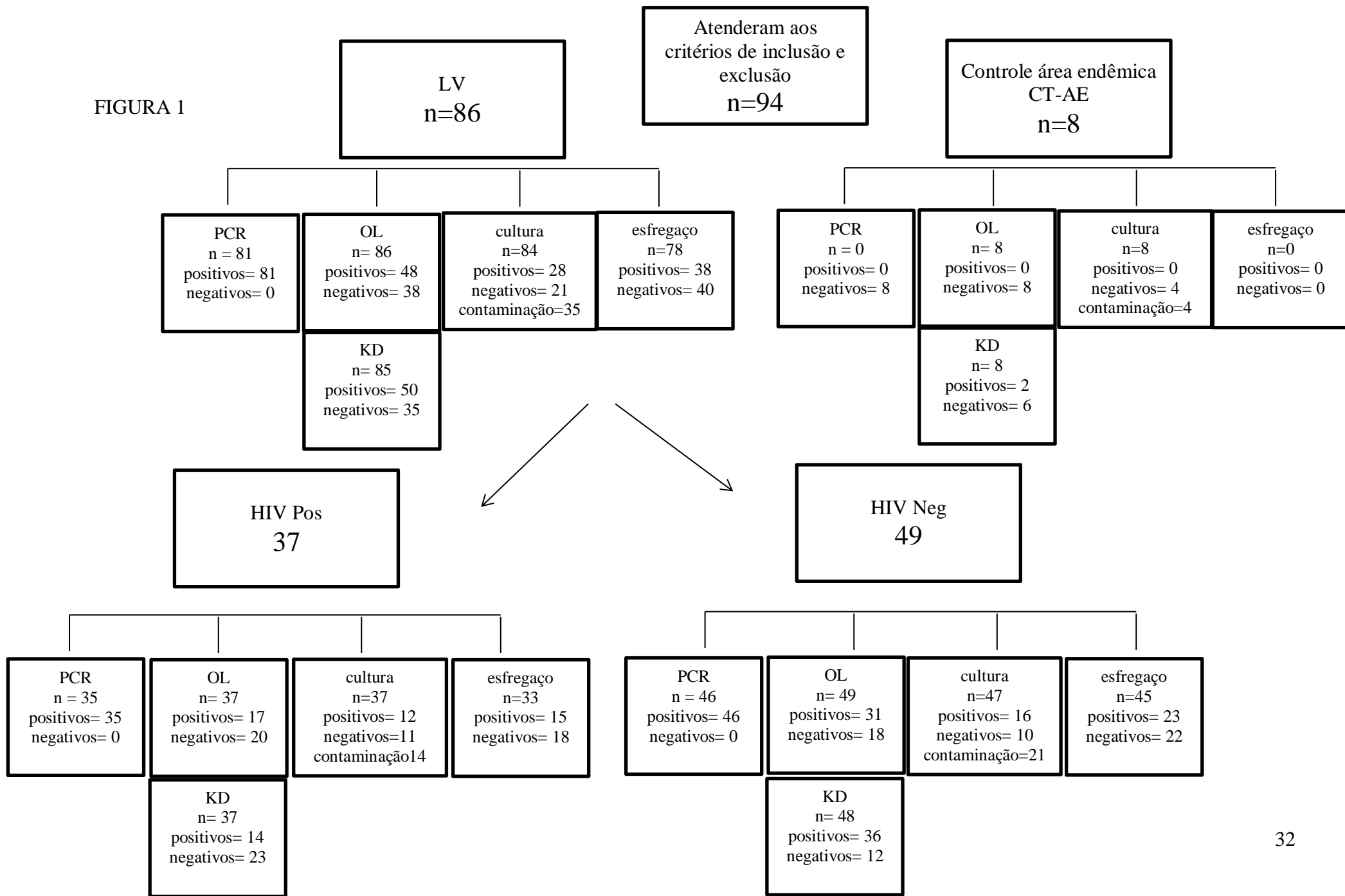
Realizou-se um estudo intitulado **Avaliação da acurácia de testes imunocromatográficos rK39 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral em pacientes coinfectados com HIV**, tendo como resultado a construção de dois artigos: Artigo 1: *Evaluation of rK39 based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva* e Artigo 2: Avaliação da sensibilidade de testes imunocromatográficos rK39 no diagnóstico da Leishmaniose Visceral em pacientes coinfectados com HIV.

Locais de Estudo

Teresina: Em Teresina, capital do Piauí, o estudo foi realizado no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, hospital estadual afiliado da Universidade Federal do Piauí, atende cerca de 90% dos pacientes com LV de Teresina e a numerosos pacientes dos estados vizinhos do Maranhão e Pará. A instituição conta com o Laboratório de Leishmanioses, onde são feitos os exames parasitológicos e cultura, e o teste de ELISA e PCR para projetos de pesquisa. Trata-se de um laboratório de referência para Leishmanioses junto ao Ministério da Saúde. Em 16 de fevereiro de 2000, o Hospital de Doenças Infectocontagiosas (HDIC), teve sua denominação alterada a partir da Lei Estadual 5.122 e passou a ser denominado Instituto de Doenças Tropicais Dr. Nathan Portela – IDTNP, (homenagem ao seu primeiro Diretor o Doutor Nathan Portela). O hospital conta hoje com 146 leitos, 36 enfermarias divididas em 6 blocos cada uma delas contendo um posto de enfermagem, mais a UTI.

Goiânia: A segunda etapa do estudo foi realizada em Goiânia-Go, junto ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP-UFG) e o Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Goiás (HC-UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

FIGURA 1



Pacientes

Todos os pacientes suspeitos de LV foram atendidos no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela - IDTNP, Teresina, Piauí, Brasil, a partir de março de 2011 a outubro de 2012. As amostras de controle de área não endêmica foram obtidas de doadores sadios adultos no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. O estudo e os formulários de consentimento informados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Piauí e pela Comissão Interna de Pesquisa do IDTNP. Os pacientes foram submetidos a um exame clínico realizado de teste IC rK39, foram coletados sangue periférico e saliva para testes sorológicos e aspiração de medula óssea para exames parasitológicos e PCR- RFLP. A suspeita clínica de LV foi definida como uma história de mais de 14 dias de febre seguido por esplenomegalia, hepatomegalia, anemia ou citopenia. (Figura 1).

Para definição de caso confirmado de LV foram considerados dois critérios: clínico laboratorial e clínico epidemiológico.

Neste estudo foi considerado caso de infecção sintomática por *Leishmania spp*, paciente com a suspeita clínica descrita acima que apresente diagnóstico parasitológico ou PCR positivos.

Como definição de caso de infecção assintomática por *Leishmania spp.*, foi considerado paciente com resultado positivo (teste do k39 ou PCR) para Leishmaniose que no momento da avaliação não apresentava os sintomas sugestivos descritos acima. Pacientes positivos pela sorologia serão confirmados posteriormente por PCR.

Amostras

Foram coletadas amostras de medula óssea para pesquisa de *Leishmania* em esfregaço, cultura e PCR.

Para pesquisa de *Leishmania spp.* em aspirado de medula óssea, utilizou-se a coloração pelo Panótico (RANYLAB Química Farmacêutica). A leitura das lâminas coradas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão, aumento de 1000x.

Para realização da cultura de aspirado de medula óssea, o aspirado foi cultivado em 3 mL de meio NNN (McNeal, Novy & Nicolle) e 500 µL de meio Schneider a 26°C. A pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania spp.* foi realizada a cada sete dias em lâmina – lamínula em microscópio óptico.

Foram coletados cinco mL de sangue periférico em tubos Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro. Em seguida, os soros foram aliqüotados em tubos de crioensaio e mantidos em freezer a -70°C.

A saliva foi recolhida em tubos de polipropileno de 50 mL e para aumentar a quantidade de saliva, os pacientes receberam um pequeno pedaço de Parafilm® para mastigar. A saliva foi aliqüotada em tubos de crioensaio e mantidas em freezer a -70°C.

Testes IC rK39

Os testes IC rK39 (Orangelife, Rio de Janeiro, Brasil) e o Kalazar Detect®, fabricado pela INBIOS Internacional (Seattle, WA), foram realizados no IDTNP de acordo com as instruções do fabricante. À temperatura ambiente, 20 µL de sangue capilar ou saliva adicionada à vareta foi seguida de duas gotas de tampão. Os resultados foram lidos após 5-10 minutos. O teste foi considerado positivo quando a linha controle e a linha teste apareceram na cor vermelha.

Exames parasitológicos

Os participantes foram submetidos à coleta de aspirado de medula óssea, à coleta de sangue periférico para realização de testes sorológicos e à punção capilar digital para realização dos testes Orangelife e Kalazar Detect. Os doadores sadios forneceram sangue periférico e não foram submetidos à punção capilar digital.

Quanto à confirmação dos casos clinicamente suspeitos sugestivos de LV, foi seguido, no mínimo, um dos seguintes critérios: encontro do parasito nos exames parasitológicos diretos ou cultura ou positividade no PCR-RFLP.

PCR-RFLP

O DNA foi extraído a partir de aspirado de medula óssea, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do Kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando os iniciadores 150 : 5' GGG (G / T) AGGGGCGTTCT (C / L) CGAA 3' e 152 : 5' (C / G) (C / G) (C / L) (A / T) CTAT (A / T) TTACACCAACCCC 3' (VOLPINI, *et al.*, 2004). As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 2 µL de preparação de DNA, tampão (10 mM Tris - HCl pH 8,6, KCl 50 mM) MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1 pmol de cada iniciador e 0,8 U de Taq polimerase ADN (Invitrogen). As condições de amplificação da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de:

desnaturação a 94°C durante 45 seg, emparelhamento a 59°C durante 45 seg, extensão a 72°C durante 30 segundos, e extensão final a 72°C durante 7 min. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e para a identificação do produto PCR foi feita a coloração pela prata.

PCR - RFLP mkDNA foi realizada de acordo com Volpini *et al.* (2004). Resumidamente, cinco µL de produtos de PCR foram digeridos por uma enzima (Invitrogen) Hae III e incubadas durante 3h a 37°C em tampão fornecido pelo fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 15% e corados com prata. Os fragmentos gerados foram comparados com aqueles do DNA de cepas de referência de *Leishmania*. (*L. chagasi*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*).

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A IgA e IgG foram investigadas na saliva ou no soro por ELISA sanduíche utilizando anticorpos comerciais ((Bethyl laboratories Inc., Montgomery, TX, Estados Unidos). Para IgG e IgA específica para LV, formas promastigotes foram cultivados em frascos de cultura 75 cm² (Costar) a partir de 2×10^5 promastigotas por mL em meio de Grace (Sigma) suplementado com 20% de FBS inativado (Cripion), 2 mM de L - glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina (Sigma). Os parasitos foram colhidos aos cinco dias após o início das culturas e lavados três vezes em PBS, ressuspensos em solução de paraformaldeído a 1% na concentração de 1×10^8 *Leishmania* / mL e armazenada a -40°C até a utilização. A suspensão de parasito foi diluída em tampão carbonato / bicarbonato para 1×10^6 promastigotas em 50 µL que foram incubadas placas de ELISA de 96 poços (Costar) por 18 h a 37°C. Os poços foram lavados em 0,05% de PBS - Tween e depois bloqueados com PBS contendo 3% de SBF durante 1h a TA. Os poços foram lavados novamente e as amostras de soro ou saliva humana diluídas de 1:200 a 1:20.000 foram adicionadas por duas horas à TA e, em seguida, os poços foram lavados em 0,05% de PBS - Tween. Oitenta microlitros de HRP - conjugado com anti-IgG humana (1:5000) ou anti- IgA humana (1:2000) PBS contendo em 3% de SBF foram adicionados e incubados durante 20 min à temperatura ambiente, seguido por lavagem da placa com 0,05% de PBS. O substrato (50 µL de TMB) foi então adicionado e incubado durante 10 min Ta e a reação foi parada com 20 µL de H₂SO₄ 1 N e foi feita a leitura da placa em leitor de ELISA (Thermo Labsystems, Multiskan) com densidade óptica de 450.

IgA e IgG Total foram detectadas como descrito acima, exceto que as placas de ELISA foram revestidas com anti IgG -humana ou anticorpos anti- IgA em tampão de carbonato / bicarbonato, em vez de formas promastigotas do parasito. O protocolo para a imunoglobulina total detecta as curvas padrão para IgG e IgA específicos ou total usando um soro padrão com uma quantidade conhecida de imunoglobulina.

Dosagem de Hemoglobina

A quantidade de hemoglobina na saliva foi quantificada por um kit de Hemoglobina colorimétrico (Doles, Goiânia, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm DP e foram comparados para significância pelo teste t de Student ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey utilizando o Graph- Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, EUA). $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. ARTIGOS

Artigo 1: Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva

Mauro Roberto Biá da Silva^{1, 2}, Natália Alberto Alves Brandão¹, Miriam Leandro Dorta¹, Fátima Ribeiro-Dias¹, Dorcas Lamounier Costa², Carlos Henrique Nery Costa², Milton Adriano Pelli de Oliveira¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil.

² Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, Rua Artur de Vasconcelos 151-Sul, 64001-450 Teresina, PI, Brasil.

Revista Tropical Biomedicine (Aceito) – Anexo 2

Artigo 2: Avaliação da Sensibilidade de Dois Testes Imunocromatográficos rK39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Pacientes Coinfectados com HIV

Mauro Roberto Biá da Silva^{1, 2}, Natália Alberto Alves Brandão¹, Miriam Leandro Dorta¹, Fátima Ribeiro-Dias¹, Dorcas Lamounier Costa², Carlos Henrique Nery Costa², Milton Adriano Pelli de Oliveira¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil.

² Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, Rua Artur de Vasconcelos 151-Sul, 64001-450 Teresina, PI, Brasil.

Revista (Em elaboração)

Artigo 1

Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva

Mauro Roberto Biá da Silva^{1, 2}, Natália Alberto Alves Brandão¹, Miriam Leandro Dorta¹, Fátima Ribeiro-Dias¹, Dorcas Lamounier Costa², Carlos Henrique Nery Costa², Milton Adriano Pelli de Oliveira¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil

² Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, R. Artur de Vasconcelos 151-Sul, 64001-450 Teresina, PI, Brasil.

*Corresponding author email: miltonoliveira.ufg@gmail.com

Abstract. Visceral leishmaniasis (VL) is a tropical neglected disease endemic in 98 countries and affects more than 58 000 individuals per year. Several serological tests are available for VL diagnosis, including an immunochromatographic (IC) test with the rK39 antigen and finger prick-collected blood, a rapid and low-invasive test. Here, we investigate the possibility to use saliva as a non-invasive source of biological material for the rK39 IC test. Blood samples from 84 patients with suspected VL were screened by the rK39 IC test, and 29 were confirmed as being infected by a positive rK39 IC test and the presence of amastigotes on smears slides or parasite DNA (detected using PCR-RFLP) from bone marrow aspirate. The rK39 IC test using saliva samples was positive for 17 of the 29 confirmed VL cases (58.6%). The amount of *Leishmania*-specific IgG or total IgG, as evaluated by an immunoenzymatic assay, was higher in the saliva of patients who had rK39 IC test positivity using saliva, whereas the amount of *Leishmania*-specific IgA or total IgA was similar to the healthy donors. These results suggest that saliva is not an appropriated material for diagnosing VL with this test.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is an endemic infectious disease present in 98 countries on five continents, affecting more than 58 000 individuals per year (WHO, 2012). In Brazil, VL is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Syn. *Leishmania (Leishmania) chagasi*) and affected approximately 1.97/100 000 inhabitants between 1998 and 2009 (Brasil, 2011b). The laboratory diagnosis of VL is variable and the lack of a gold standard makes diagnostic research difficult (de Assis *et al.*, 2012). Demonstration of the parasite in a smear or culture is still the reference parasitological standard test for the diagnosis of VL in Brazil (Brasil, 2011b, de Assis *et al.*, 2012). The most common source used to search for the parasite is bone marrow aspirate, with sensitivity varying from 40 to 95% and specificity close to 100% (da Silva *et al.*, 2005, WHO, 2010). However, it is important to note that to reach a good sensitivity in smear analyses requires time-consuming steps in examining each slide (da Silva *et al.*, 2005). In addition to the variability in their sensitivity, parasitological tests are invasive, making them difficult to perform under field conditions.

Several serological tests are available for the diagnosis of VL. An immunofluorescence test is recommended by the Ministry of Health in Brazil and has a sensitivity ranging from 50 to 95% (Brasil, 2011b, Brasil, 2011a). The rapid immunochromatographic (IC) test using the rK39 antigen was validated in several countries and is most likely the best assay for the diagnosis of VL in peripheral services and reference centers (de Assis *et al.*, 2012).

The rK39 IC test shows different sensitivities in Africa and India, with a sensitivity of 90-95% and specificity of 93-100% in Brazil (de Assis *et al.*, 2008, de Assis *et al.*, 2011). The test is less invasive than the others described here because it uses a finger prick to sample blood. However, there is a possibility to use non-invasive sources of biological material for the VL diagnosis. Indeed, the rK39 IC test was evaluated in Bangladesh using urine and showed a sensitivity and specificity of 95% and 93.3%, respectively, in patients that were positive for VL by the rK-39 IC test using serum samples (Khan *et al.*, 2010). Using sputum for the diagnosis of VL, the rK39 IC test showed a sensitivity of 99.2% in parasitologically confirmed patients (Singh *et al.*, 2009). More recently, the rK39 IC test was evaluated using saliva from Indian patients, detecting 82.5% of VL cases in rK-39 serum-positive patients (Vaish *et al.*, 2012).

Here, we evaluated the efficiency of the rK39 IC test for diagnosing VL using saliva in positive finger prick-tested Brazilian VL patients. Additionally, the amount of total or Leishmania-specific IgG and IgA was also analyzed in serum and saliva.

MATERIALS AND METHODS

Patients

All suspected VL patients (n = 84) were attended at the Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP, Terezina, Piauí, Brazil, from July 2011 to May 2012. Control samples (n = 20) from a non-endemic area were obtained from adult healthy donors at the Blood Bank of Clinical Hospital of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil. The study and informed consent forms were approved by the Ethical Committee of the Universidade Estadual do Piauí and by the Committee for Research of the Universidade Federal do Piauí. After patients underwent a clinical examination, venous peripheral blood and saliva were collected for serological tests, and bone marrow aspirate was collected for parasitological and PCR-RFLP tests. Clinical suspicion for VL was defined as a fever, anemia, and hepatosplenomegaly. Patients were excluded if an insufficient amount of saliva was collected or no saliva was. An HIV test using the Genscreen ultra HIV ab-Ag test (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and a test for Chagas Disease using the ELISA Chagas III (Grupo-Bios, Santiago, Chile) were performed. Both HIV and Chagas Disease testing was performed at the Central Laboratory of the Piauí (LACEN).

Samples

A finger-pricked blood sample was collected onto a slide and immediately transferred to cassette for the rk39 IC assay. A volume of 1.0 to 5.0 mL of saliva was collected in the afternoon at two or more hours after the last meal into a 50 mL polypropylene tube. The patients received a small piece of Parafilm® to chew for 2-5 minutes to increase the amount of saliva. Peripheral blood (4 mL) was collected in 5 mL Vacutainer® tubes to obtain serum. Both the serum and saliva were kept at -80°C, with at least 3 replicates, until use. The samples were thawed only once prior to use.

rK39 IC test.

The rK39 IC test (Orangelife, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was performed at IDTNP according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20 µL of finger-pricked blood or saliva was added to the cassette at room temperature, followed by two drops of the

chase buffer. The results were determined after 5-15 minutes. The test was considered positive when both the control and the test line appeared black in color.

Parasitological exam

Bone marrow (1-2 mL) was aspirated from the sternum or ileum to prepare smears by slides apposition. The slides were stained with panoptic (Ranylab, Barbacena, Brazil) and evaluated under a light microscope (1000 X). At least three bone marrow smears were evaluated for each patient.

PCR-RFLP

DNA was extracted from bone marrow aspirates using QIAamp® DNA Mini Kit following the described protocol (Qiagen Inc., Hilden, Germany). PCR was performed using the primers 150: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3' and 152: 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3' (Volpini *et al.*, 2004). The reactions were carried out in a final volume of 20 µL containing 2 µL of DNA preparation, buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.6, 50 mM KCl) 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µmol of each primer and 0,8U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). The PCR amplification condition were an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, annealing at 59 °C for 45 sec, and extension at 72°C for 30 sec, and a final extension at 72°C for 7 min. After amplification, the samples were electrophoresed through an 8% polyacrylamide gel and silver-stained to identify the PCR products.

PCR-RFLP mkDNA to discriminate *L. infantum* was carried out according to a described protocol (de Andrade *et al.*, 2006). Briefly, 5 µL of PCR product was digested with 1 U Hae III (Invitrogen) and incubated for 3 h at 37°C in the manufacturer's buffer. The restriction fragments were separated using a 15% polyacrylamide gel to identify the PCR products. The fragments generated were compared with those from the DNA of a *Leishmania* reference strain, *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75).

Immunoenzymatic assay (ELISA)

IgA and IgG antibodies were assayed in saliva or serum by sandwich ELISA using antibodies obtained from Bethyl laboratories (Bethyl laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). To detect *Leishmania*-specific IgG and IgA by ELISA, promastigote parasites of *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) were cultured in 75 cm² culture

flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland), starting at 2×10^5 promastigotes per mL in Grace's Insect Medium (Sigma Chemical Co., USA) supplemented with inactivated 20% fetal bovine serum (FBS, Cripion, Andradina, SP, Brazil), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma). The parasites were harvested at 5 days after starting the cultures, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), suspended in 1% of paraformaldehyde solution to 1×10^8 *Leishmania*/mL and stored at 4°C until use. The parasite suspension was washed with PBS and, diluted in carbonate/bicarbonate buffer and 1×10^6 promastigotes per 50 μ L was incubated in 96-well ELISA plates (Costar) overnight at 37°C to dry completely. The wells were washed with 0.05% PBS-Tween and then blocked with 3% of FBS in PBS for 1 h at room temperature (RT). The wells were washed again, and successively diluted (5-fold) human serum (from 1:100 to 1: 62 500) or saliva (from 1:10 to 1: 6 250) was added for 2 h at RT, then wells were washed with 0.05% PBS-Tween. Fifty microliters of HRP-conjugated anti-human IgG (1:5 000) or anti-human IgA (1:2 000) (both from Bethyl laboratories) diluted in 3% FBS in PBS was added for 20 min at RT, followed by washing of the plate with PBS-Tween. The substrate (50 μ L of TMB, Invitrogen) was then added for 10 min at RT, the reaction was stopped with 20 μ L of 1 N H₂SO₄, and the optical density was measured at 450 nm

Total IgA and IgG antibodies were detected as described above, except that the ELISA plates were coated with anti-human IgG or IgA antibodies (both from Bethyl laboratories) in carbonate/bicarbonate buffer instead of promastigote parasites. The protocol for total immunoglobulin was used to prepare standard curves for specific or total IgG and IgA using a standard serum with a known amount each isotype of immunoglobulin.

Hemoglobin assay

The amount of hemoglobin in saliva was quantified using a colorimetric Hemoglobin kit (Doles, Goiânia, Brazil) following the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

The data are presented as the mean \pm SD. The data were compared for significance using Student's *t* test or ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test using the GraphPad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

During the period from July 2011 to May 2012, blood samples from 84 patients with suspected VL were screened by the rK39 IC test (Figure 1). Thirty-nine patients had a positive IC test using serum, and VL was confirmed in 25 patients by PCR-RFLP and in 4 patients by amastigote observation on smear slides prepared from bone marrow aspirate. The confirmatory tests were not performed in 10 patients because no bone marrow aspirate was collected, and these patient were excluded from further analysis. Of the 29 VL-confirmed cases, the rK39IC test using saliva was positive for 17 samples (SalPos) (58.6%; 95% CI = 40.71-74.51%) and negative for 12 samples (SalNeg) (41.4%; 95% CI = 25.49-59.29%). Twenty healthy donors from a non-endemic area (CT) were included in this study, and all were negative by the rK39 IC test using blood and saliva, showing a specificity of 100%. The rK39 IC test was also negative for the saliva of all patients who had a negative rK39 IC test using serum.

The studied groups were composed mainly largely of males, with ages ranging from 18 to 68 years old (Table 1). All VL patients presented splenomegaly, and more than 58% presented hepatomegaly. Serological cross reaction with *Trypanosoma cruzi* was similar in the SalPos and SalNeg groups and was present in more than 52% of the VL patients. HIV infection was higher the in SalNeg group (66.67%, 95% CI = 38.38-86.45%) than in the SalPos group (23.53%; 95% CI = 9.05-47.77%).

The amount of total and *Leishmania*-specific IgG in the serum of the VL patients was significantly higher than in the healthy donors from the non-endemic area (Figure 2). The levels of specific IgG in the SalNeg group was lower than in the SalPos group but was not statistically significant. The amount of total or specific IgA was similar in all groups. The highest amount of total IgG was also observed in the saliva of the VL patients (Figure 3) but was statistically significant only in the SalPos group. The amount of *Leishmania*-specific IgG observed in the saliva of both the SalPos and SalNeg groups was higher than in the control group, but SalPos saliva presented more *Leishmania*-specific IgGs than the SalNeg saliva. The levels of specific and total IgA were similar in the saliva of all groups. The specificity of the *Leishmania*-specific IgG ELISA with regard to serum and saliva was 95% (95% CI = 74.59-99.99%) and 90% (95% CI = 68.68-98.43%), respectively.

Some of the VL patients enrolled in this study had a precarious oral hygiene condition, and some saliva collected was contaminated with blood. To evaluate whether the differences in positivity by kK39 IC test using saliva were due blood contamination, we compared the amount of hemoglobin present in the saliva of the different groups. Hemoglobin was slightly higher in the saliva from the SalPos group than in the saliva from the SalNeg group (Figure 4), but this difference was not statistically significant ($p = 0.37$).

DISCUSSION

This study evaluated the ability of the rK39 IC test to diagnose VL using the saliva of VL-confirmed patients who had a positive rK39 IC test using finger-pricked blood samples, 58.6% positivity was detected using saliva. All 45 patients with suspected VL that had a negative rK39 IC test using finger-pricked blood samples were also negative using saliva, showing that the detection of VL using saliva in the rK39 IC test was not better than the detection using blood. A similar study performed in India showed that the rK39 IC test and rK39 ELISA using saliva were able to detect 82.5% and 83.3% of VL cases, respectively, while both tests detected 100% of VL cases when using serum (Vaish *et al.*, 2012).

In an attempt to understand why the rK39 IC test using saliva did not confirm the presence of specific antibodies detected in blood, we investigated the levels of non-specific and *Leishmania*-specific antibodies in the serum and saliva of VL patients. An increase in *Leishmania*-specific and non-specific circulating antibodies in serum, which is a hallmark of VL infection (Ghose *et al.*, 1980), was observed for the patients in this study. In addition to the increase in serum IgG, we demonstrate here that *Leishmania*-specific and total IgG also increased in the saliva of several VL-infected patients. The amount of total IgG in the saliva of the SalNeg group was lower than in the SalPos group, suggesting that the low sensitivity of the rK39 IC test using the saliva was partially due to the lack of an increase in the IgG secretion in the saliva of some patients.

It is important to note that some patients from the SalNeg group presented a higher amount of *Leishmania*-specific IgG in their saliva, as detected by ELISA, than the average observed in the SalPos group. This finding suggests a low avidity of the antibodies from these patients to the antigen present in the rK39 IC test. It was recently

proposed that a polymorphism in the K39 region of the parasite is responsible for variability in the results among subjects living in different areas and using different brands (Bhattacharyya *et al.*, 2013). Additionally, a lower amount of K39-specific antibody was also described in some VL-infected patients in Africa (Chappuis *et al.*, 2006). Although variability in the K39 region in Brazilian strains has not yet been studied (Bhattacharyya *et al.*, 2013), the K39 polymorphism and/or the low production of K39 specific IgG by some patients can be responsible for a decrease in the sensitivity of the test when using saliva.

The Orangelife IC test platform was designed to detect IgG against the rK39 antigen. Because saliva is enriched with IgA antibodies, we supposed that the presence of *Leishmania*-specific IgA would bind to the antigen and decrease the sensitivity of the test. Indeed, it was demonstrated that *Leishmania*-specific IgA was increased in serum in the early phase of the infection in VL patients from Espírito Santo and Bahia/Brazil (da Matta *et al.*, 2000). Conversely, changes in the IgA profile in VL patients from Africa and India were not observed (Ghose *et al.*, 1980, el Amin *et al.*, 1986, Elasad *et al.*, 1994, Anam *et al.*, 1999). In the present study, we were unable to observe a significant alteration of total or specific IgA in serum or saliva during VL infection, suggesting that the negative results in the SalNeg group were not due to IgA interference. IgM is another isotype that could bind to the rK39 antigen and decrease the sensitivity of the test, but it was not tested in our experiments.

The patients in both the SalPos and SalNeg groups were similar with regard to most parameters used to compare the groups, though the SalPos did present a smaller number of HIV⁺ subjects than the SalNeg group. It is not clear whether HIV infection could interfere with the sensitivity of the rK39 IC test (Cota *et al.*, 2013), but our data suggest that HIV infection can decrease the sensitivity of rK39 IC test, even though the amount of *Leishmania*-specific IgG in serum and saliva was similar in patients infected or not with HIV (data not shown).

The salivary concentration of immunoglobulin is higher in the early morning, with a minimal variation of IgA and IgG concentrations from 10:00 am to 5:00 pm (Rantonen & Meurman, 2000). Because the VL patients attended at the IDTNP arrive all day long, we collected the saliva in the afternoon. Although it is possible that collecting saliva early in the morning would increase the sensitivity of the test, this does not reflect what is observed under routine hospital conditions. Additionally, we froze the saliva to be able to collect sufficient material for immediately to performing the

ELISA assay. Indeed, successive freezing and thawing of saliva can denature immunoglobulin and decrease the sensitivity of serological tests; however, the saliva in our study was frozen in replicate and thawed only once to avoid denaturation.

It is known that the incidence of asymptomatic and subclinical leishmaniasis can outnumber clinical cases in endemic areas (Hasker *et al.*, 2014). A recent cohort study in India and Nepal showed that asymptomatic individuals who present a strong rK39 IC test reaction have an increased risk of progression to severe disease (Hasker *et al.*, 2014). During the screening of the patients in the present study, we also observed that the rK39 IC test performed with blood developed a strong or weak reaction, but we considered all of them to be positive because it was difficult to define parameters to rank the results of such a test. Furthermore, the difficulty in evaluating the density of the bands formed in the rK39 IC test is increased by the background observed when blood is used (Matlashewski *et al.*, 2013). Because our results suggest that there is more *Leishmania*-specific IgG in the sera from the SalPos group than SalNeg group ($p = 0.055$, *Student's t* test) and high serum titers in asymptomatic individuals appears to be a risk factor for developing more severe VL disease, it is possible that rK39 IC test positivity in asymptomatic individuals can be a risk factor for VL progression.

The rk39 IC test using serum had sensitivity of 96% and specificity of 93% in the area of this study (Assis *et al.*, 2008). Because of this good sensitivity found using serum, the major aim of this study was to evaluate whether the sensitivity of rk39 IC test described for serum is maintained when saliva is used. We showed here that the sensitivity decreased when saliva was used and we also showed that the specificity of the test was 100%. However, this last data must be interpreted with caution because in this study was not included healthy controls from endemic area.

In conclusion, our study demonstrates that the saliva of VL-infected patients has limited use for the diagnosis of VL. We also suggest that IgA in saliva and serum has no value for VL diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks Dr. Marco Collovati from OrangeLife, Rio de Janeiro, Brazil for the donation of rK39 IC test Kits. This work was supported by CNPq and CAPES. MRBS had a fellowship from CAPES and CHNC and FRD are CNPq fellows.

REFERENCES

- Assis T.S., Braga, A.S., Pedras, M.J., Oliveira, E., Siqueira, I.C., Costa, C.H., Costa, D.L., Holanda, T.A., Soares, V.Y., Bia, M., Caldas, A.J., Romero G. A & Rabello A.(2008). Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **17**(2): 107-116.
- Anam K., Afrin F., Banerjee D., Pramanik N., Guha S.K., Goswami R.P., Gupta P.N., Saha S.K. & Ali N. (1999). Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **6**(2): 231-235.
- Bhattacharyya T., Boelaert M. & Miles M.A. (2013). Comparison of visceral leishmaniasis diagnostic antigens in African and Asian *Leishmania donovani* reveals extensive diversity and region-specific polymorphisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**(2): e2057.
- Brasil. (2011a). Leishmaniose Visceral: Recomendações Clínicas para Redução da Letalidade In: SdVe Saúde., Ed. Ministério da Saúde do Brasil, pp. 77.
- Brasil. (2011b). Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeccao *Leishmania*-HIV In: SdVe Saúde, Ed. Ministério da Saúde do Brasil, pp. 106.
- Chappuis F., Rijal S., Soto A., Menten J. & Boelaert M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *British Medical Journal* **333**(7571): 723.
- Cota G.F., de Sousa M.R., de Freitas Nogueira B.M., Gomes L.I., Oliveira E., Assis T.S., de Mendonca A.L., Pinto B.F., Saliba J.W. & Rabello A. (2013). Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **89**(3): 570-577.
- da Matta V.L., Hoshino-Shimizu S., Dietze R. & Corbett C.E. (2000). Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **14**(1): 5-12.

- da Silva M.R., Stewart J.M. & Costa C.H. (2005). Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**(6): 811-814.
- de Andrade H.M., Reis A.B., dos Santos S.L., Volpini A.C., Marques M.J. & Romanha A.J. (2006). Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* **140**(3-4): 231-238.
- de Assis T.S., Braga A.S., Pedras M.J., Oliveira E., Barral A., de Siqueira I.C., Costa C.H., Costa D.L., Holanda T.A., Soares V.Y., Bia M., Caldas Ade J., Romero G.A. & Rabello A. (2011). Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* **105**(2): 81-85.
- de Assis T.S.M., Braga A.S., Pedras M.J., Barral A., Siqueira I.C., Costa C.H., Costa D.L., Holanda T.A., Soares V.Y., Bia M., Caldas Ade J., Romero G.A. & Rabello A. (2008). Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **17**(2): 9.
- de Assis T.S.M., Rabello A. & Werneck G.L. (2012). Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**(2): e1542.
- el Amin E.M., Wright E.P. & Vlug A. (1986). Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. *Clinical and Experimental Immunology* **64**(1): 14-19.
- Elassad A.M., Younis S.A., Siddig M., Grayson J., Petersen E. & Ghalib H.W. (1994). The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clinical and Experimental Immunology* **95**(2): 294-299.
- Ghose A.C., Haldar J.P., Pal S.C., Mishra B.P. & Mishra K.K. (1980). Serological investigations on Indian kala-azar. *Clinical and Experimental Immunology* **40**(2): 318-326.
- Hasker E., Malaviya P., Gidwani K., Picado A., Ostyn B., Kansal S., Singh R.P., Singh O.P., Chourasia A., Kumar Singh A., Shankar R., Wilson M.E., Khanal B., Rijal S., Boelaert M. & Sundar S. (2014). Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in

- prospective cohort studies in India and Nepal. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**(1): e2657.
- Khan M.G., Alam M.S., Podder M.P., Itoh M., Jamil K.M., Haque R. & Wagatsuma Y. (2010). Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. *Parasite and Vectors* **3**: 114.
- Matlashewski G., Das V.N., Pandey K., Singh D., Das S., Ghosh A.K., Pandey R.N. & Das P. (2013). Diagnosis of visceral leishmaniasis in Bihar India: comparison of the rK39 rapid diagnostic test on whole blood versus serum. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**(5): e2233.
- Rantonen P.J. & Meurman J.H. (2000). Correlations between total protein, lysozyme, immunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. *Acta Odontologica Scandinavica* **58**(4): 160-165.
- Singh D., Pandey K., Das V.N., Das S., Kumar S., Topno R.K. & Das P. (2009). Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology* **47**(8): 2684-2685.
- Vaish M., Singh O.P., Chakravarty J. & Sundar S. (2012). rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **86**(4): 598-600.
- Volpini A.C., Passos V.M., Oliveira G.C. & Romanha A.J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* **90**(1): 31-37.
- WHO (2010). Control of the Leishmaniasis. Geneva, pp. 199. from http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.
- WHO. (2012). Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. Retrieved February 30, 2014, from http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/

Legend to the figures

Figure 1: Flow diagram describing the flow of patients enrolled in this study.

Figure 2: Total and VL-specific IgA and IgG in serum. Total or *Leishmania*-specific IgG or IgA in the serum of healthy donors from a non-endemic area (CT, n = 20) or *Leishmania infantum*-infected patients was quantified by ELISA. Patients were divided into a positive (SalPos, n =17) or negative (SalNeg, n =12) group according to the result of the rK39 IC test using saliva. The symbols represent the amount of immunoglobulin from each subject, and the line represents the mean of the amount of immunoglobulin in each group. * indicates significant difference from the CT group ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test)

Figure 3: Total and VL-specific IgA and IgG in saliva. Total or *Leishmania*-specific IgG or IgA in the saliva of healthy donors from a non-endemic area (CT) or *Leishmania infantum*-infected patients was quantified by ELISA. Patients were divided into a positive (SalPos, 17) or negative (SalNeg, 12) group according to the result of the rK39 IC test using saliva. The symbols represent the amount of immunoglobulin from each subject, and the line represents the mean of the amount of immunoglobulin in each group. * indicates significant difference from CT group and # indicates significant difference between the SalPos and SalNeg groups ($p < 0.05$, ANOVA, followed by Tukey's test)

Figure 4: Amount of hemoglobin in saliva. Hemoglobin in the saliva of VL-infected patients was quantified by a colorimetric assay. VL patients were divided into a positive (SalPos, n = 17) or negative (SalNeg, n = 12) group according to the result of the rK39 IC test using saliva. The symbols represent the amount of hemoglobin in the saliva and the line represents the mean of the amount of hemoglobin in each group.

FIGURE 1

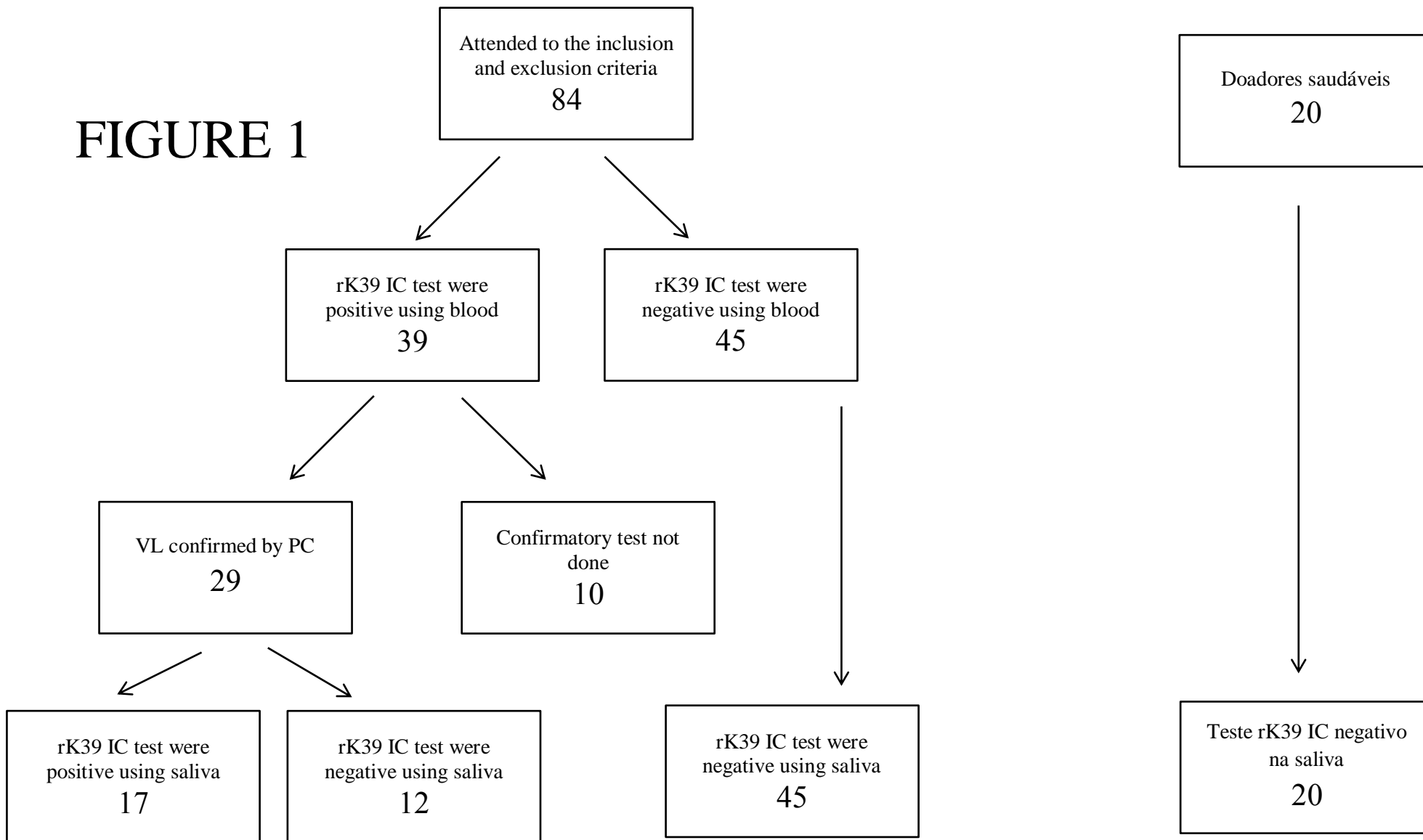


Table 1

Table 1

Characteristics of the patients and healthy donors from non-endemic area			
	Sal Pos* (n=17)	Sal Neg* (n=12)	CT* (n=20)
Gender			
Female	2 (11.8%)	3 (25.00%)	6 (30.00%)
Male	15 (88.2%)	9 (75.00%)	14 (70.00%)
Age (years)			
16-20	3 (17.64%)	4 (33.33%)	4 (20.00%)
21-40	6 (35.29%)	4 (33.33%)	13 (65.00%)
41-70	8 (47.05%)	4 (33.33%)	3 (15.00%)
HIV infection	4 (23.52%)	8 (66.67%)	0

* Sal Pos (rK39 IC were positive using saliva); Sal Neg (rK39 IC were negative using saliva); CT (healthy donors from non-endemic area)

FIGURE 2

Serum

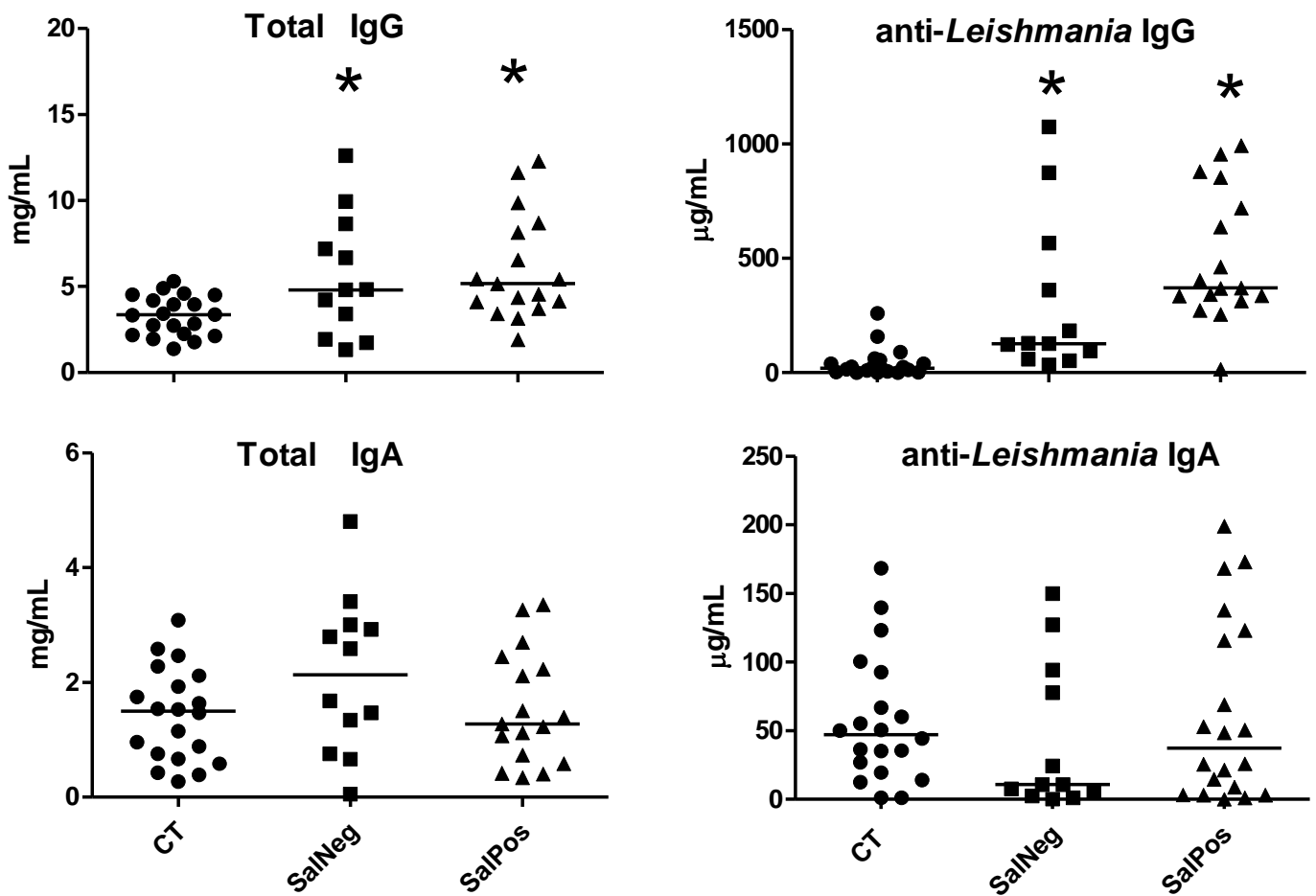
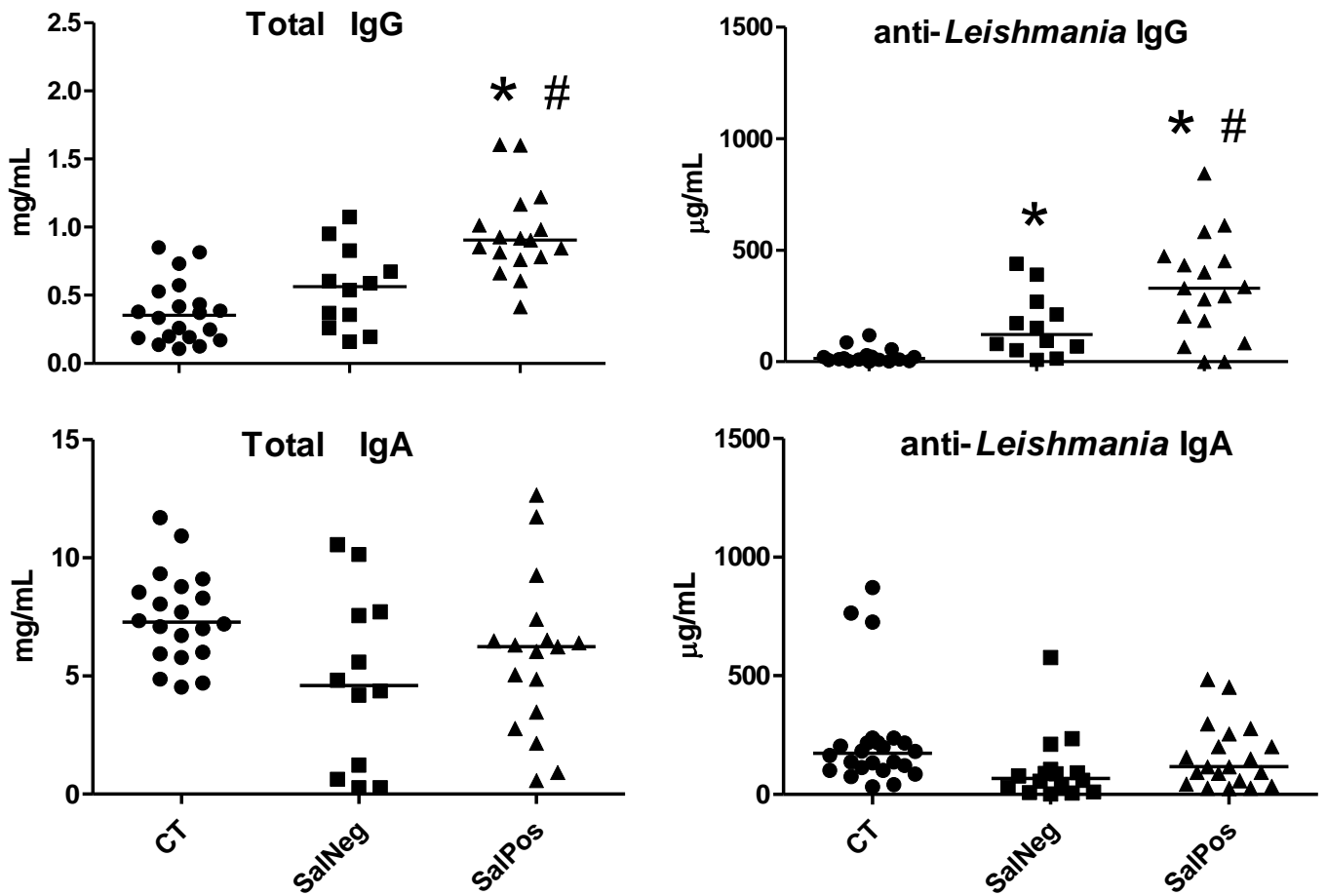


FIGURE 3

Saliva



Artigo 2

Avaliação da Sensibilidade de Dois Testes Imunocromatográficos rK39 para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Pacientes Coinfectados com HIV

Mauro Roberto Biá da Silva^{1,2}, Natália Alberto Alves Brandão¹, Miriam Leandro Dorta¹, Dorcas Lamounier Costa², Carlos Henrique Nery Costa², Milton Adriano Pelli de Oliveira¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil

² Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, R. Artur de Vasconcelos 151-Sul, 64001-450 Teresina, PI, Brasil.

*Corresponding author email: miltonoliveira.ufg@gmail.com

RESUMO

Vários testes sorológicos estão disponíveis para o diagnóstico da LV, incluindo os testes imunocromatográficos (IC) baseados no antígeno rK39. A sensibilidade dos testes IC rK39 de detectar indivíduos coinfectados com LV/HIV não está bem esclarecida. O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade do IC rK39 no diagnóstico da LV em indivíduos coinfectados LV/HIV. Entre janeiro de 2011 e maio de 2012, 94 pacientes com suspeita de LV atendidos no ambulatório do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela foram incluídos no estudo, sendo 86 confirmados como casos de LV por PCR e 5 por testes parasitológicos. Oito pacientes foram confirmados como negativos para LV em todos os testes realizados. Dos 86 pacientes com LV, 38 estavam coinfectados com HIV. A sensibilidade da PCR em aspirado de medula óssea foi de 100%, enquanto a análise do esfregaço e da cultura de aspirado de medula óssea apresentaram sensibilidades de 45,5% e 48% respectivamente. A coinfeção HIV/LV proporcionou uma redução na sensibilidade dos testes IC rK39 da marca Orangelife de 63,26 (LV) para 45,95 (LV/HIV) e de 61,53 (LV) para 37,84 (LV/HIV) para o teste da marca Kalazar detect. Os resultados sugerem que testes IC baseados em antígenos rK39 possuem uma baixa sensibilidade quando aplicados a pacientes coinfectados com LV-HIV.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozooze distribuída em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. O protozoário *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico desta doença na Índia e na África Oriental e o protozoário *L.(L.) infantum* responsável pela LV no resto do mundo (SILVA *et al.*, 2014). Uma das principais ameaças para o controle da LV é sua interação com a infecção pelo HIV. A infecção concomitante com HIV aumenta o risco de desenvolver LV ativa entre 100 e 2320 vezes (WHO, 2010). No sul da Europa, até 70% dos casos de LV em adultos estão associados com a infecção pelo HIV. A coinfeção LV / HIV tem uma importante implicação na clínica, diagnóstico e epidemiologia das duas doenças, pois elas se reforçam mutuamente. Assim, pessoas infectadas pelo HIV são particularmente vulneráveis à LV, enquanto a LV acelera a replicação do HIV e a progressão para a AIDS (WHO, 2010). O risco de falha no tratamento da LV é alto, independentemente do medicamento utilizado. Todos os pacientes coinfectados que apresentam recaídas frequentes podem vir a óbito, a menos que recebam tratamento antirretroviral (WHO, 2010).

Não existe um teste padrão ouro para o diagnóstico da LV, sendo o teste de imunofluorescência indireta (IFAT) o mais utilizado no Brasil (DE ASSIS *et al.*, 2008, COTA *et al.*, 2012). Entretanto, tem sido demonstrado que os testes sorológicos para indivíduos coinfectados com LV e HIV possuem uma sensibilidade diminuída (COTA *et al.*, 2012), por isso, os testes parasitológicos são mais indicados para os indivíduos coinfectados (COTA *et al.*, 2012, LINDOSO *et al.*, 2013). O teste parasitológico mais utilizado nos dias atuais é o exame de aspirados de linfonodo, medula óssea ou baço (COTA *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2013, WHO/TDR, 2008). Aspirados de medula óssea e de linfonodo são mais seguros, mas menos sensíveis. Essas técnicas exigem conhecimentos técnicos que frequentemente não está disponível em campo.

Frente à complexidade do diagnóstico da LV, métodos laboratoriais de fácil realização e interpretação e que forneçam resultado rápido são cada vez mais necessários. O desenvolvimento de testes rápidos utilizando o antígeno recombinante K39 (rK39) representou um avanço importante no diagnóstico da LV. No Brasil, os testes rápidos baseados em rK39 podem ser usados para o diagnóstico da LV em centros de cuidados primários de saúde, porque estes ensaios têm um desempenho adequado, exigem infraestrutura laboratorial e mão de obra qualificada mínima, fornecem

resultados em até 30 minutos e permitem o uso de sangue ou soro. Por possibilitarem uma redução do tempo entre o diagnóstico e o tratamento, esses ensaios representam um importante avanço no diagnóstico da doença, sendo de extrema importância para os centros de saúde, particularmente as unidades básicas situadas na periferia (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2012). Uma revisão sistemática de estudos científicos estima a sensibilidade deste teste em 93,9% (87,7% - 97,1%) (WHO/TDR, 2008).

Existem poucos trabalhos avaliando a sensibilidade dos testes rápidos em indivíduos coinfectados com LV e HIV. Embora os trabalhos presentes sugiram que a infecção com HIV diminua a sensibilidade dos testes rápidos (COTA *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2013), o método diagnóstico de referência utilizado nos diferentes trabalhos causam problemas na interpretação dos resultados (COTA *et al.*, 2012). Aparentemente, a PCR de aspirado de medula é o melhor método para diagnóstico de LV em indivíduos coinfectados (COTA *et al.*, 2012). Portanto, neste trabalho foi avaliada a sensibilidade de dois diferentes testes rápidos baseados no antígeno rK39 usando como teste de referência o diagnóstico pela PCR de aspirado de medula óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Os pacientes atendidos de Janeiro de 2011 a Maio de 2012, no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela - IDTNP, Teresina, Piauí, Brasil, cujo exame clínico foi sugestivo de LV, foram convidados a participar do estudo. As amostras dos controles de área não endêmica foram obtidas de doadores sadios adultos do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. O estudo e os formulários de consentimento informados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Piauí e pela Comissão Interna de Pesquisa do IDTNP.

Foram incluídos todos os pacientes que aceitaram participar do estudo e que fizeram a coleta de sangue periférico e do aspirado de medula óssea. Foram excluídos pacientes que estavam fazendo tratamento para leishmaniose antes da coleta das amostras e aqueles que não fizeram o aspirado de medula óssea. O soro foi obtido a partir de 5 mL de sangue periférico coletado em tubos Vacutainer[®] sem anticoagulante, aliquotado e armazenado a -70°C. Amostras da medula óssea foram utilizadas para confecção do esfregaço, cultura ou acondicionada a -70°C para posterior análise na

PCR. A suspeita clínica de LV foi definida como uma história de mais de 14 dias de febre, seguido por esplenomegalia, hepatomegalia, anemia ou citopenia. O diagnóstico diferencial para HIV e para Doença de Chagas foi realizado no Laboratório Central (LACEN) do Piauí utilizando os testes Genscreen ultra HIV ab-Ag test (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*) e ELISA Chagas III (Grupo-Bios, Santiago, Chile) respectivamente.

Exames Parasitológicos

Os exames parasitológicos foram feitos a partir de amostras de medula óssea obtidas do íleo ou esterno. Para pesquisa de *Leishmania spp.* utilizou-se a coloração Panótico (Ranylab, Barbacena, Brazil). A leitura das lâminas coradas foi realizada em microscopia de luz com objetiva de imersão em aumento de 1000x. Para realização da cultura foram utilizados 3 mL de meio NNN (McNeal, Novy & Nicolle) e 500 µL de meio Schneider a 26°C. A pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania spp.* foi realizada a cada sete dias em lâmina – lamínula em microscopia de luz.

Teste IC rK39

Os testes IC rK39 (Orangelife, Rio de Janeiro, Brasil) e o Kala-azar Detect[®] (Inbios, Seattle, WA, EUA), foram realizados no IDTNP de acordo com as instruções do fabricante. À temperatura ambiente, 20 µL de sangue capilar foram adicionados à plataforma seguida de duas gotas de tampão. Os resultados foram lidos após 5-10 minutos. O teste foi considerado positivo quando a linha controle e a linha teste apareceram na cor preta.

PCR-RFLP

O DNA foi extraído a partir de aspirado de medula óssea de acordo com as instruções do protocolo do Kit QIAamp DNA Mini[®] (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha). A PCR foi realizada utilizando os iniciadores 150 : 5' GGG (G / T) AGGGGCGTTCT (C / L) CGAA 3' e 152 : 5' (C / G) (C / G) (C / L) (A / T) CTAT (A / T) TTACACCAACCCC 3' (Volpini *et al.*, 2004). As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 2 µL do DNA extraído, tampão (10 mM Tris - HCl pH 8,6, KCl 50 mM) MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1 pmol de cada iniciador e 0,8 U de Taq polimerase ADN (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA). As condições de amplificação do PCR foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de: desnaturação a

94°C durante 45 segundos, emparelhamento a 59°C durante 45 segundos, extensão a 72°C durante 30 segundos, e extensão final a 72°C durante 7 min. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e para a identificação do produto PCR foi corado com prata.

A PCR-RFLP do mkDNA foi realizada de acordo com de Andrade *et al.* (2006). Resumidamente, 5 µL de produtos de PCR foram digeridos por uma enzima (Invitrogen) L HaeIII e incubados durante 3 h a 37°C no tampão do fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 15% e corado com prata. Os fragmentos gerados foram comparados com aqueles do DNA de isolados de referência de *Leishmania*.

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A presença IgG no soro foi analisada por ELISA sanduíche utilizando anticorpos (Bethyl laboratories Inc., Montgomery, TX, USA); formas promastigotas foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (Costar) a partir de 2×10^5 promastigotas por mL em meio de Grace (Sigma) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Cripion, Andradina, SP, Brazil) inativado, 2 mM de L - glutamina, 100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina (Sigma). Os parasitos foram colhidos aos 5 dias após o início das culturas e lavados três vezes em PBS antes do uso, após este procedimento, foram estocados em uma solução de paraformaldeído a 1% na concentração de 1×10^8 *Leishmania* / mL a 4°C até a utilização. A suspensão de parasito foi diluída em tampão de carbonato / bicarbonato para 1×10^6 promastigotas em 50 µL, os quais foram incubados em placas de ELISA de 96 poços (Costar) por 18 h a 37°C. Os poços foram lavados em PBS contendo 0,05 % de Tween 20 e depois bloqueados com solução de bloqueio (PBS contendo SBF a 3%) durante 1 h à temperatura ambiente (TA). Em seguida, os poços foram lavados novamente e as amostras de soro submetidas a uma diluição sucessiva (1:10) de 1:200 a 1:20.000 foram incubadas por duas horas TA. Novamente os poços foram lavados com PBS - Tween e 80 µL de uma solução anti - IgG humano conjugado a peroxidase (Bethyl, 1:5000 em solução de bloqueio) foram adicionados e incubados durante 20 min TA, seguido por lavagem da placa com PBS - Tween. O substrato (50 µL de TMB, Invitrogen) foi então adicionado durante 10 min à TA e a reação foi parada com 20 µL de H₂SO₄ a 1 N. A leitura da densidade óptica (DO) foi feita à 450 nm em leitora de microplacas (Thermo Labsystems, Multiskan) com densidade óptica de 450.

A análise de IgG Total foi realizada como descrito acima, exceto pelo fato de as placas de ELISA terem sido revestidas com anti - IgG humana em tampão carbonato / bicarbonato, em vez de formas promastigotas do parasito. Para quantificação das imunoglobulinas, os valores da DO foram comparados com curvas padrão de IgG total usando um soro padrão com uma quantidade conhecida de imunoglobulina.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm DP e foram comparados quanto à significância por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O intervalo de confiança (IC 95%) foi calculado como descrito anteriormente (AGRESTI & COULL, 1988). Para as análises, foi utilizado o programa Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, EUA). $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Entre Janeiro de 2011 e Maio de 2012, 139 pacientes com suspeita de LV foram atendidos no ambulatório do IDTNP. Destes, apenas 94 coletaram medula óssea e foram incluídos neste estudo (Figura 1). Oitenta e um pacientes foram confirmados como casos de LV por PCR e 5 foram confirmados pela presença de parasitos em cultura e/ou esfregaço de aspirado de medula óssea. Oito pacientes foram confirmados como negativos para LV em todos os testes realizados, sendo estes os controles de área endêmica (CT-AE). Foram incluídos também 20 doadores sadios de área não endêmica neste estudo (CT), os quais foram negativos para os testes sorológicos comerciais para LV e HIV. Por motivos éticos, não foram realizados os testes parasitológicos nos indivíduos do grupo CT. Dos 86 pacientes com LV, 33 possuíam sorologia positiva para HIV, outros cinco apresentaram sorologia negativa, porém, eram portadores do vírus e estavam em tratamento, totalizando 37 indivíduos infectados.

Como não existe um teste padrão ouro de consenso para o diagnóstico da LV, foi analisada, em um primeiro momento, a sensibilidade dos diferentes testes utilizados neste estudo, considerando a associação entre a PCR e o esfregaço de aspirado de medula óssea como padrão ouro (Tabela 1A). Dessa forma, todos os pacientes que apresentaram positividade na PCR foram considerados casos de LV e a sensibilidade da PCR para o diagnóstico foi de 100% (Tabela 1A). Todos os demais testes apresentaram uma sensibilidade similar, variando de 48,71% (análise de esfregaço de aspirado

medular) até 57,14% (cultura de aspirado medular) (Tabela 1A). Como o teste de diagnóstico para LV indicado pelo Ministério da Saúde do Brasil é a análise do esfregaço de aspirado medular, foi feita outra análise da sensibilidade para os testes IC considerando-se como casos de LV apenas os pacientes que apresentaram positividade nos testes de análise de esfregaço de aspirado medular e/ou cultura do aspirado medular (Tabela 1). Nessa situação, os testes IC apresentaram uma sensibilidade maior que 82%.

Ainda não está bem esclarecido se a infecção pelo HIV é capaz de interferir nos testes sorológicos, portanto, foi investigada a sensibilidade dos diferentes testes para diagnóstico da LV em pacientes coinfectados ou não com HIV. Na tabela 2 pode ser observado que a sensibilidade de todos os testes dos pacientes infectados com HIV foi inferior à sensibilidade dos mesmos testes em pacientes não infectados, exceto para a PCR cuja sensibilidade foi de 100% para ambos os grupos.

Neste estudo, foi observada uma baixa sensibilidade dos testes IC para o diagnóstico da LV. Para esclarecer se essa baixa sensibilidade estava relacionada com uma menor quantidade de anticorpos totais ou específicos presentes nas amostras, os soros de pacientes confirmados com LV foram divididos em dois grupos: a) teste IC Orangelife positivo (OL-Pos) e b) teste Orangelife negativo (OL-Neg). Foram incluídos nas análises soros de doadores de área não endêmica (CT) e de pacientes do IDTNP que possuíram o diagnóstico negativo para LV como controles de área endêmica (CT-AE). Os grupos foram compostos principalmente por indivíduos do sexo masculino provenientes de áreas urbanas (Tabela 2). A faixa etária dos indivíduos variou de 15 a 81 anos, sendo que o grupo OL-Neg apresentou uma idade média estatisticamente superior ao do grupo CT, porém, sem diferença estatística para os demais grupos. Além disso, o grupo OL-Neg foi composto por um maior número de indivíduos HIV+ e o grupo OL-Pos apresentou uma maior reatividade aos antígenos do *T. cruzi* (Tabela 2).

A quantidade de IgG total foi maior no grupo OL-Pos quando comparada ao grupo OL-Neg e ao grupo CT (Figura 2A). Além disso, o grupo OL-Pos apresentou uma quantidade de IgG específica para *Leishmania* estatisticamente superior aos demais grupos que possuíam uma quantidade de IgG específica semelhante (Figura 2B).

Como os indivíduos infectados com HIV apresentaram uma sensibilidade dos testes IC menor que os não infectados, foi analisada a quantidade de IgG total e específica no soro dos pacientes com LV e coinfectados ou não com HIV. A quantidade de IgG total foi semelhante em todos os grupos (Figura 2C), porém, a quantidade de

IgG específica para LV foi maior em pacientes sem HIV comparados aos controles de área endêmica ($p < 0,05$) (Figura 2D).

Os dois testes IC utilizados neste estudo apresentaram uma sensibilidade semelhante, porém, foi observado que 13 pacientes foram positivos em um dos testes e negativos no outro. Para avaliar se a discrepância nos testes está associada a uma baixa quantidade de anticorpos presente no soro, foi comparada a quantidade de IgG total e específica nos soros dos pacientes que apresentaram resultados discordantes (Figura 3). Embora não tenha sido possível observar diferença entre os grupos, a quantidade de IgG específica de todos os pacientes é inferior a 250 $\mu\text{g/mL}$, que é semelhante à quantidade de IgG específica dos grupos CT e CT-AE (Figura 3 e Figura 2 B), mostrando que os resultados discordantes ocorreram em pacientes com quantidade baixa de anticorpos específicos para *Leishmania*.

DISCUSSÃO

O teste rápido utilizando o antígeno rK39 foi validado no Brasil para o diagnóstico da LV “a beira do leito” em pacientes que apresentavam quadro clínico sugestivo de LV sem infecção concomitante com HIV (DE ASSIS *et al.*, 2008). Estudos realizados por De Assis e cols demonstraram uma sensibilidade de 93% para os indivíduos confirmados com LV por testes parasitológicos (DE ASSIS *et al.*, 2008; DE ASSIS *et al.*, 2011).

No presente estudo, o teste de referência utilizado foi a PCR em amostras de aspirado de medula, para a qual considerou-se uma sensibilidade de 100%. Ressalta-se que todos os outros testes para diagnóstico da LV utilizados no presente estudo apresentaram uma sensibilidade menor, isso está relacionado com a melhor capacidade da técnica de discriminar os pacientes infectados (COTA *et al.*, 2012). Ressalta-se que neste trabalho, a técnica foi repetida em todas as amostras que foram negativas em um primeiro ensaio. Nessa repetição, a quantidade de DNA utilizada foi aumentada ou diminuída 10 vezes, portanto, em uma primeira análise, apenas 65,85% das amostras de indivíduos com LV foram positivas. Após a repetição da técnica com a alteração da quantidade de DNA, a sensibilidade aumentou significativamente alcançando os 100% das amostras positivas.

As sensibilidades das técnicas parasitológicas podem variar muito de laboratório para laboratório. A análise do esfregaço depende da qualidade da confecção das

lâminas, expertise do microscopista e do tempo de análise das lâminas (SILVA *et al.*, 2005). A observação de parasitos em cultura depende de uma boa coleta de material para evitar contaminação e da qualidade dos meios de cultura. Sabe-se que diferentes lotes dos constituintes do meio de cultura podem não favorecer o crescimento de todas as cepas de parasitos presentes em uma região (CELESTE *et al.*, 1988; VISVESVARA & GARCIA, 2002). Assim, sensibilidades diferentes podem ser observadas em um mesmo laboratório quando se varia os constituintes de um meio de cultura.

Os testes rápidos foram descritos inicialmente como testes com alta sensibilidade (DE ASSIS *et al.*, 2008), entretanto, essa alta sensibilidade foi alcançada quando foram utilizados testes parasitológicos como testes de referência. No presente trabalho, a sensibilidade dos testes rápidos foi maior do que 82% quando os testes parasitológicos foram utilizados como referência (Tabela 2), um valor um pouco abaixo do descrito inicialmente para validar o teste rápido no Brasil (DE ASSIS *et al.*, 2008; DE ASSIS *et al.*, 2011). Ressalta-se que estudos mais recentes estão relatando uma sensibilidade para os testes rápidos no Brasil abaixo dos valores iniciais, sendo de 61,5-92% (CUNNINGHAM *et al.*, 2012), 72,4% (MOURA *et al.*, 2013) e 45,6% (COTA *et al.*, 2013). Uma das justificativas para a diminuição na sensibilidade dos testes é o fato da perda da validade do teste ser mais rápida em algumas regiões (CUNNINGHAM *et al.*, 2012). Dessa forma, os resultados apresentados aqui confirmam que os testes rápidos baseados no antígeno rK39 podem ter uma sensibilidade menor do que a prevista inicialmente e novos estudos devem ser feitos para explicar a causa da diminuição dessa sensibilidade.

Embora os resultados apresentados neste estudo tenham demonstrado uma baixa sensibilidade de todos os testes quando a PCR de medula óssea foi utilizada como referência, a coinfeção com HIV provocou uma diminuição ainda menor na sensibilidade de todos os testes. Estes dados estão de acordo com a ideia de que a infecção com HIV diminui a sensibilidade dos testes sorológicos para LV (COTA *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2013). Esta diminuição da sensibilidade poderia ser explicada por uma menor produção de anticorpos específicos para LV em indivíduos coinfectados. Entretanto, embora tenha sido observado neste trabalho que indivíduos portando HIV e LV possuíam uma menor quantidade de IgG específica do que indivíduos com LV, as médias da quantidade de IgG específica não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,15$).

Em conclusão este trabalho demonstra uma sensibilidade excelente da PCR de aspirado de medula para o diagnóstico da LV. Além disso, demonstra que os testes rápidos baseados no rK39 possuem baixa sensibilidade para o diagnóstico de LV em pacientes com LV ou coinfectados HIV-LV.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Dr. Marco Collovati de OrangeLife, Rio de Janeiro, Brasil, pela doação de kits de teste rK39 IC. Este trabalho foi financiado pelo CNPq e CAPES. MRBS foi bolsista da CAPES e CHNC é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Agresti, A & Coull, B. A: Approximate is Better than "exact" for interval estimation of binomial proportions, *The American Statistician*, 52: 119-126, 1988.
- Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 758-761, 1996.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). 2006.
- Cunningham, J., Hasker, E., Das, P., El Safi, S., Goto, H., Mondal, D., Mbuchi, M., Mukhtar, M., Rabello, A., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Adams, E., Menten, J., Peeling, R.Boelaert, M., 2012. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 55, 1312-1319.
- Celeste BJ, Guimaraes MC 1988. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's *Drosophila* medium as assessed by anti-*Leishmania* human sera. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 30, 63-67.
- De Assis, T.S.M., Braga, A.S.C., Pedras, M.J. *et al.* Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH[®] for the diagnosis of human visceral

- leishmaniasis. *Epidemiol. Serv. Saúde*, June 2008, vol.17, no. 2, p.107-116. ISSN 1679-4974.
- 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* [serial on the Internet]. 2012 Nov [cited 2014 Sep 23]; 107(7): 951-952. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000700019&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000700019>.
- Silva, M.R.B.; Stewart, J. M; Costa, C.H.N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Los Angeles, Califórnia, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.
- Silva, Joyce M.; Zacarias, Danielle A.; Figueiredo, Lívio C. de *et al.* Bone Marrow Parasite Burden among Patients with New World Kala-Azar Is Associated with Disease Severity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v 90, n 6, p. 621–626, 2014.
- Singh, Dharmendra P; Sundar, Shyam; Mohapatra, Tribhuban M. The rK39 strip test is non-predictor of clinical status for kala-azar. *BMC Research Notes* 2009, 2:187. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-2-187.pdf>>. Acesso em: outubro de 2010.
- Vaish M., Singh O.P., Chakravarty J. & Sundar S. (2012). rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(4): 598-600.
- Visvesvara GS, Garcia LS 2002. Culture of protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews*, 15, 327-328.
- Volpini, A.C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 90, n. 1, p. 31-7, Mar 2004. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739020>>.
- WHO. Leishmaniasis and HIV coinfection. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html>. Acesso em: outubro de 2010.

WHO/TDR - World Health Organization/Research and Training in Tropical Diseases
2011. *Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance*, WHO/TDR,
Geneve, 46 pp.

WHO/TDR. The Use of Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Tests. World Health
Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in
Tropical Diseases 2008. Acesso em <<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/vl-rdts/pdf/VL-RDTs.pdf>>. Acesso: outubro de 2010.

Zanette, M.F. Comparison among enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),
indirect immunofluorescence assay and immunochromatography for the
diagnosis of canine leishmaniasis. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência
Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária,
Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

Legenda das figuras

Tabela 1: Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV considerando positivos os pacientes diagnosticados pelo PCR + esfregaço de aspirado de medula óssea ou Cultura + esfregaço de aspirado de medula óssea

Tabela 2: Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV em indivíduos infectados ou não pelo HIV considerando positivos os pacientes diagnosticados pela PCR e/ou esfregaço de aspirado de medula óssea

Tabela 3. Características dos participantes do estudo

Figura 1. Quantidade de IgG total ou IgG específica para leishmania em soro de pacientes com LV e indivíduos controles. A quantidade de IgG total (A e C) ou IgG específica para LV (B e D) foi avaliada por ELISA e os valores da absorbância comparados a uma curva padrão de IgG. Em A e B, CT: controle de área não endêmica, OL-POS: reação positiva no teste Orangelife, OL-Neg: reação negativa no teste Orangelife, CT-AE: controle de área endêmica. Em C e D, HIV-Pos: indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana e HIV-neg: indivíduos não infectados com HIV. Os símbolos representam a quantidade de imunoglobulina para cada indivíduo e as linhas representam a média da quantidade de imunoglobulina em cada grupo.* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$, ANOVA seguida por Tukey).

TABELA 1: Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV considerando positivos os pacientes diagnosticados pelo PCR + esfregaço de aspirado de medula óssea ou Cultura + esfregaço de aspirado de medula óssea.

Pacientes positivos pela PCR e/ou esfregaço de aspirado de medula óssea (n=86)			Pacientes positivos pela cultura e/ou esfregaço de aspirado de medula óssea (n= 41)		
Teste (n)	Sensibilidade	IC 95%	Teste (n)	Sensibilidade	IC 95%
PCR (81)	100	94,57-100%	PCR (36)	100	88,53-100%
OL (86)	55,81	40,19-59,81%	OL (41)	82,92	68,42-91-79
Esfregaço (78)	48,71	37,95-59,61%	Esfregaço (41)	92,68	79,88-98,17
Cultura (49)	57,14	43,26-69,99%	Cultura (28)	100	85,70-100%
KD (85)	56,25	48,19-68.69%	KD (40)	82,5	67,74-91,57%

IC 95%: Intervalo de confiança 95%, calculado pelo método de Wald modificado; PCR: Reação da polimerase em cadeia de aspirado de medula óssea, OL: teste imunocromatográfico para rK39 Orangelife, KD: teste imunocromatográfico para rK39 Kalazar Detect.

TABELA 2: Sensibilidade de diferentes testes para diagnóstico da LV em indivíduos infectados ou não pelo HIV considerando positivos os pacientes diagnosticados pela PCR e/ou esfregação de aspirado de medula óssea

HIV POSITIVOS (n=37)			HIV NEGATIVOS (n=49)		
Teste (n)	Sensibilidade	IC 95%	Teste (n)	Sensibilidade	IC 95%
PCR (35)	100	91,43-100%	PCR (46)	100	90,80-100%
OL (37)	45,94	31,03-61,62%	OL (49)	63,26	49,23-75,37%
Esfregação (33)	45,45	29,84-62,02%	Esfregação (45)	51,11	37,00-65,04%
Cultura (25)	48,00	30,03-66,50%	Cultura (26)	61,53	42,48-77,63%
KD (37)	37,84	24,02-53,94%	KD (48)	75,00	61,08-85,21%

IC 95%: Intervalo de confiança 95%, calculado pelo método de Wald modificado; PCR: Reação da polimerase em cadeia de aspirado de medula óssea, OL: teste imunocromatográfico para rK39 Orangelife, KD: teste imunocromatográfico para rK39 Kalazar Detect.

Tabela 3: Características dos participantes do estudo.

Característica	CT	OL-Pos	OL-Neg	CT-AE.
Média de Idade em anos	31,3 ($\pm 10,2$)	38,17($\pm 14,24$)	44,84($\pm 17,97$)	35,5 ($\pm 12,59$)
Gênero Masculino	14/20 (70%)	39/48 (81,25%)	28/38 (73,68%)	6/8 (75%)
Ocupação Rural	0/20 (0%)	21/48 (43,75%)	12/37 (32,43%)	3/7 (42,86)
Reatividade para HIV	0/20 (0%)	17/48 (35,41%)	20/38 (52,63%)	6/8 (75%)
Reatividade para Doença de Chagas	0/20 (0%)	27/44 (61,36%)	3/37 (8,11%)	0/8 (0%)
Hepatomegalia	0/20 (0%)	27/40 (67,5%)	4/11 (36,36%)	0/8 (0%)

CT: Controle de área não endêmica, OL-POS: Reação positiva no teste Orangelife, OL-Neg: Reação negativa no teste Orangelife, CT-AE: controle de área endêmica, HIV: vírus da imunodeficiência humana.

FIGURA 1 - Quantidade de IgG total ou IgG específica para leishmania em soro de pacientes com LV e indivíduos controles

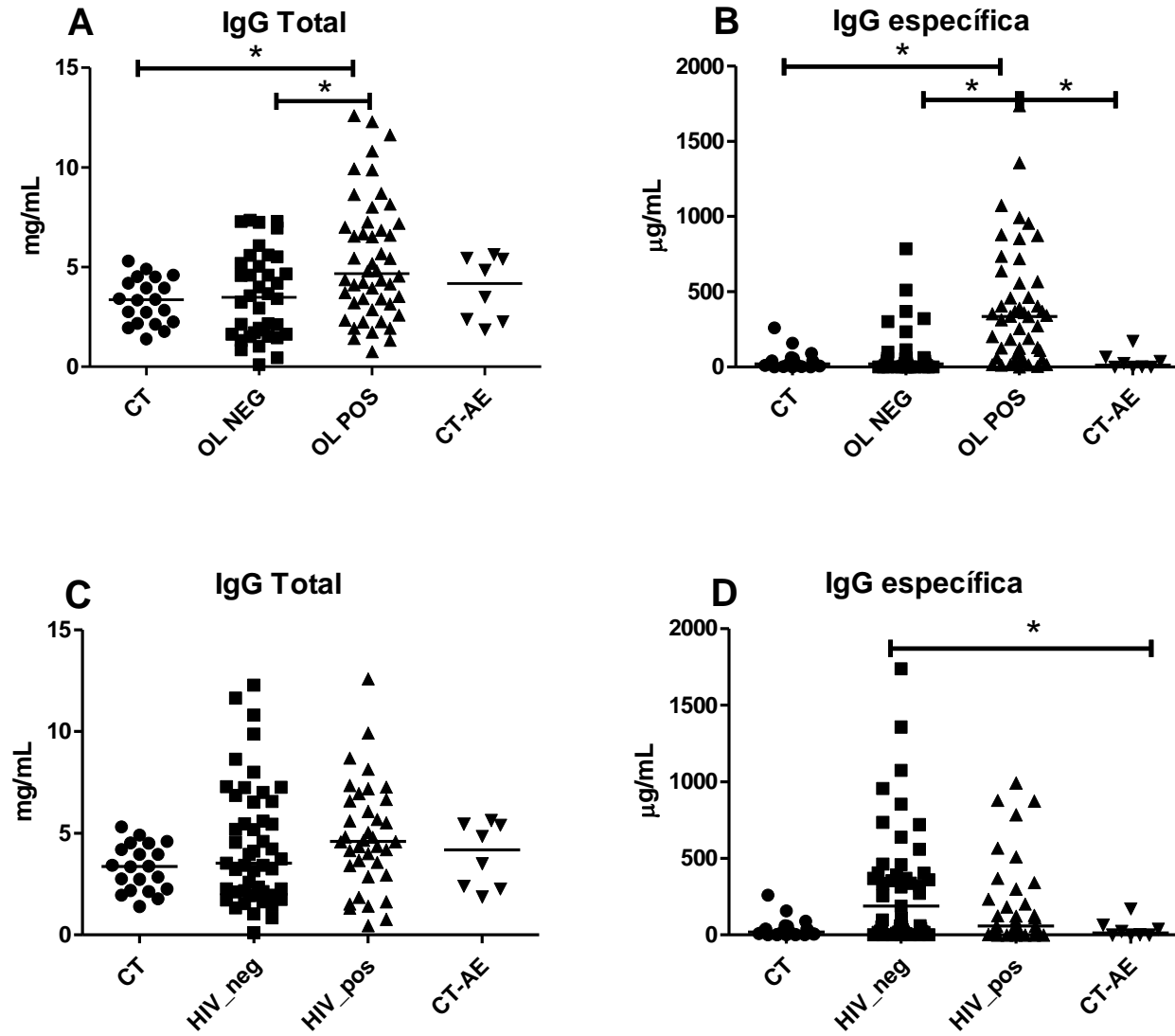
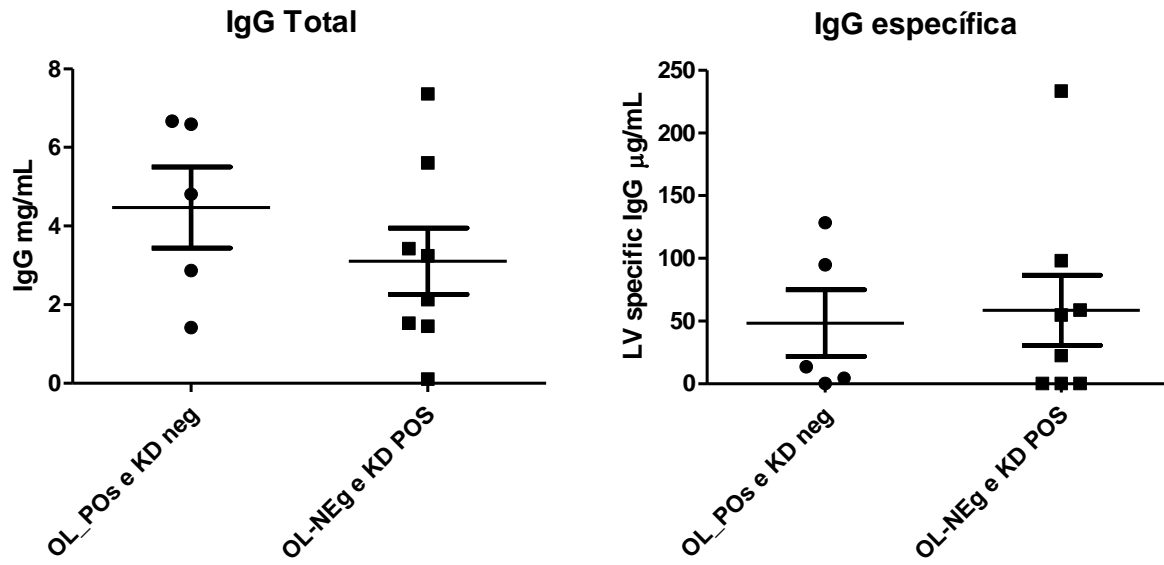


FIGURA 2 - Quantidade de IgG Total ou IgG específica no soro de pacientes com LV com resultados discordantes entre o teste Orangelife (OL) e o teste Kalazar Detect (KD)



6. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliou-se a sensibilidade de testes IC rK39 no diagnóstico da LV em pacientes coinfectados com HIV. Muitos estudos já foram realizados sobre o diagnóstico da LV, mas nestes, sempre se excluiu os pacientes com HIV das análises.

A LV, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2006b). No Brasil um estudo validou o uso do teste IT-LEISH[®] para o diagnóstico da LV a beira do leito, em pacientes que apresentavam quadro clínico sugestivo de LV sem infecção concomitante pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DE ASSIS *et al.*, 2008).

Frente à complexidade do diagnóstico da LV, métodos laboratoriais de fácil realização e interpretação e que forneçam resultado rápido são cada vez mais necessários, os testes de imunocromatografia de fluxo lateral usando-se o antígeno rK39 têm sido avaliados em vários países, com sensibilidade e especificidade variáveis (DE ASSIS *et al.*, 2008).

Uma ampla revisão de estudos científicos publicados, mostra que o teste IC rK39 é altamente eficaz na detecção de LV, e estima a sua sensibilidade de 93,9% (87,7% - 97,1%) em relação à parasitologia. A sensibilidade pareceu maior e mais homogênea nos estudos realizados no Sudeste da Ásia. Sua especificidade foi de 90,6% (66,8% - 97,9%) em estudos realizados na clínica, utilizando pacientes febris como controles negativos (WHO/TDR, 2008).

O teste IC rK39 é relatado como simples, sensível, específico, não invasivo e econômico. Trata-se de um teste confiável e pode ser facilmente utilizado em inquéritos soro-epidemiológicos (SINGH *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, a sensibilidade dos testes empregados no diagnóstico da LV tiveram desempenhos diferentes, dependendo do padrão ouro escolhido ou da presença da coinfecção com HIV. A sensibilidade do PCR para LV encontrada foi 100%. Nos centros de referência para diagnóstico e tratamento da LV, o teste mais utilizado na rotina é o esfregaço e a cultura de medula óssea, mas quando o PCR mais o aspirado de medula

óssea foram utilizados como padrão ouro, as sensibilidades foram de 48,71% e 57,14, respectivamente. Ao avaliarmos a sensibilidade de dois testes IC rK39, também tomando como padrão ouro a PCR mais o aspirado de medula óssea, as sensibilidades dos testes da marca Orangelife e Kalazar Detect, foram 55,81% e 56,25%, respectivamente. Não podemos afirmar que a sensibilidade dos testes parasitológicos e IC sejam muito baixas, já que não existe um número de estudos significativos que utilizaram a PCR de amostras de medula óssea como padrão ouro. Infelizmente, na nossa realidade, o PCR não é utilizado na rotina, por se tratar de um teste que requer mão de obra qualificada e reagentes caros, se comparado com os outros testes usados na rotina.

Ao simular uma de rotina nos centros de referência brasileiros, ou seja, utilizando como padrão ouro o esfregaço de medula óssea mais a cultura para *Leishmania*, observou-se que a sensibilidade da PCR foi 100%, do OL 82,92%, do esfregaço de medula óssea 92,68%, da cultura para *Leishmania* 100% e do KD 82,5%. Estes resultados estão mais próximos dos encontrados na literatura, onde são relatados que quando o teste IC rK39 é utilizado de acordo com as instruções do fabricante, ele é altamente eficaz na detecção de LV. Uma ampla revisão de estudos científicos publicados estima a sensibilidade do teste IC rK39 para 93,9% (87,7% - 97,1%) em relação à parasitologia (WHO/TDR, 2008).

Numa outra situação, cada vez mais frequente na nossa rotina, ao analisar a sensibilidade destes mesmos testes em pacientes HIV positivos, tomando como padrão ouro o PCR mais o aspirado de medula óssea, a sensibilidade do PCR foi 100%, do OL 45,94%, o esfregaço de medula óssea 45,45%, a cultura para *Leishmania* 48,00% e o KD 37,83%. Quando a sensibilidade destes testes foi avaliada entre pacientes HIV negativos, também tendo como padrão ouro o PCR mais o aspirado de medula óssea, a sensibilidade do PCR foi 100%, o OL 63,26%, o esfregaço de medula óssea 51,11%, a cultura 61,53 e o KD 75,00%. Estes resultados colocam em dúvida a qualidade dos métodos diagnósticos empregados.

Realizou-se um segundo estudo, desta vez avaliou-se a capacidade do teste IC rK39 Orangelife para diagnosticar LV utilizando saliva. Um estudo semelhante realizado na Índia mostrou que o teste ELISA e o teste IC utilizando saliva, foi capaz de detectar, respectivamente, 83,3% e 82,5% dos casos de LV, enquanto ambos os testes detectaram 100% dos casos de LV em soro (VAISH *et al.*, 2012a).

Aqui, selecionaram-se pacientes confirmados para LV que tiveram um teste IC positivo em sangue capilar e detectou-se apenas 58,6% de positividade na saliva. A

quantidade presente de IgG específica e total para LV no soro de indivíduos com “saliva positiva” ou “saliva negativa” foi semelhante e significativamente maior do que os controles saudáveis. O aumento de anticorpos circulantes para LV específicos e não específicos em pacientes LV foi descrito anteriormente e é uma característica da LV (GHOSE *et al.*, 1980).

Adicionalmente, demonstrou-se aqui que IgG específica e total para LV também estava aumentada em saliva de pacientes infectados por LV, mas a quantidade de IgG específica para LV foi semelhante em grupos SalNeg e SalPos. É importante notar que alguns pacientes do grupo salneg apresentaram maior quantidade de IgG específica para LV do que a média de IgG específica para LV observada no grupo SalPos, sugerindo uma baixa especificidade dos anticorpos para o antígeno rK39 presente no teste IC. A menor sensibilidade do teste de IC em nosso estudo em relação ao estudo Vanish pode ser devido a diferenças na área e fabricação ou análise do teste (CUNNINGHAM, *et al.*, 2012). Foi proposto, recentemente, que a variabilidade de resultados entre as marcas de teste e área pode ser devido a um polimorfismo na região K39 dos parasitos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2013). Além disso, uma menor quantidade de anticorpo específico K39 também foi descrita em pacientes infectados por LV na África (CHAPPUIS *et al.*, 2006).

O antígeno rK39 utilizado no teste IC Orangelife baseou-se na sequência de *L. (L.) infantum chagasi* a partir de uma estirpe brasileira MHOM/BR/82/BA que foi isolada em uma área que não está longe da área de estudo. No entanto, o polimorfismo K39 no parasito ou baixa produção de K39 IgG específica pode ser a responsável pela baixa sensibilidade do teste, uma vez que a variabilidade da região K39 em cepas brasileiras ainda não foi estudada (BHATTACHARYYA *et al.*, 2013). O polimorfismo K39 no parasito ou baixa produção de K39 IgG específica por alguns pacientes pode ser a responsável pela baixa sensibilidade do teste em saliva. Porque todo o soro testado neste estudo foi positivo para o teste de IC, acreditamos que a menor sensibilidade do teste IC na saliva foi devido a uma menor quantidade de IgG total na saliva, quando comparado com o soro, como pode ser observado nas figuras 3 e 4, do artigo 1.

7. CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo, conclui-se que:

1. Os testes IC rK39, com utilização de soro, tem uma baixa sensibilidade quando aplicados em pacientes coinfectados com LV-HIV.
2. A sensibilidade da PCR para diagnóstico da LV mostrou-se excelente em pacientes com LV ou em situações em que os mesmos estavam coinfectados com HIV.
3. O uso da saliva mostrou-se muito limitado por conta da baixa sensibilidade quando utilizado testes IC rK39.
4. A presença de hemoglobina na saliva não alterou significativamente no diagnóstico da LV.
5. Muitos pacientes portadores de LV ou LV-HIV tiveram resultados sorológicos positivos para Doença de Chagas, fato que pode gerar interpretações errôneas se o profissional de saúde não estiver atento para a possibilidade de reação cruzada do teste.
6. A IgA na saliva e no soro tem um valor fraco para o diagnóstico da LV.

8. RECOMENDAÇÕES (se pertinentes)

Não se aplica!

REFERÊNCIAS

AGRESTI, A; COULL, B. A. Approximate is Better than "exact" for interval estimation of binomial proportions, *The American Statistician*, 52: 119-126, 1988.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548> >.

AMATO NETO, V. *et al.* False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **Int J Infect Dis**, v. 13, n. 2, p. 182-5, Mar 2009. ISSN 1878-3511 (Electronic) 1201-9712 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786847> >.

BABUADZE, G. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, p. e2725, Mar 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603768> >.

BADARÓ, R. *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 173, n. 3, p. 758-61, Mar 1996. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627048> >.

BHATTACHARYYA, T.; BOELAERT, M.; MILES, M. A. Comparison of visceral leishmaniasis diagnostic antigens in African and Asian *Leishmania donovani* reveals extensive diversity and region-specific polymorphisms. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2057, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469296> >.

BHATTACHARYYA, T. *et al.* Significantly lower anti-*Leishmania* IgG responses in Sudanese versus Indian visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2675, Feb 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587456> >.

BOELAERT, M. *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**, v. 102, n. 1, p. 32-40, Jan 2008. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942129> >.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 42, n. 5, Oct. 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 120 p.

_____. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. Série A Normas e Manuais Técnicos. 2006a. 60 p.

_____. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 78 p

_____. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania-HIV***. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. Série A Normas e Manuais Técnicos. 2011b. 106 p.

_____. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006b. 120 p.

_____. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Piauí / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011c. 35 p.**

_____. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação: Piauí. 2009.**

BRITO, E. C.; OLIVEIRA, W. A. **Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral Humana**. Brasília. 2009. [Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências da Universidade de Tuiuti do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista.].

CAHILL, K. M. Field techniques in the diagnosis of kala-azar. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 64, n. 1, p. 107-10, 1970. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5442024> >.

CARVALHO, S. F. *et al.* Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 3, p. 321-4, Mar 2003. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12685638> >.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>. Acesso em março de 2014.

CELESTE B. J.; GUIMARAES M. C. Growth curves of *Leishmania braziliensis* braziliensis promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to

Schneider's *Drosophila* medium as assessed by anti-*Leishmania* human sera. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 30, 63-67. 1988.

CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 7, p. 1543-51, Jul 2009. ISSN 1678-4464 (Electronic) 0102-311X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578575> >.

CHAPPUIS, F. *et al.* Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 11, n. 1, p. 31-40, Jan 2006. ISSN 1360-2276 (Print) 1360-2276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398753> >.

CHAPPUIS, F. *et al.* Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 8, n. 3, p. 277-85, Mar 2003. ISSN 1360-2276 (Print) 1360-2276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631320> >.

COLOMBA, C. *et al.* Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 199, 2009. ISSN 1471-2334 (Electronic) 1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003257> >.

COTA, G. F. *et al.* The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1665, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666514> >.

COTA, G. F. E. A. Comparison of Parasitological, Serological, and Molecular Tests for Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: A Cross-Sectional Delayed-Type Study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** p. 570–577, 2013.

CUNNINGHAM, J. *et al.* A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 10, p. 1312-9, Nov 15 2012. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22942208> >.

DE ANDRADE, H.M. *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology** **140**(3-4): 231-238. 2006.

DE ALMEIDA, A. S.; MEDRONHO RDE, A.; WERNECK, G. L. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 5, p. 681-7, May 2011. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540375> >.

DE ARAUJO, V. E. *et al.* Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1511, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347514> >.

DE ASSIS, T. S. *et al.* Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 2, p. 81-5, Feb 2011. ISSN 1878-3503 (Electronic) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970152> >.

DE ASSIS, T. S. M. *et al.* **Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.** Belo Horizonte, 2012. [Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas Rene Rachou. Área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias.].

DE ASSIS, T. S. M. *et al.* Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH[®] for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saúde**. [online]. June 2008, vol.17, n. 2.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Rev. patol. trop**; 36(3): 205-214, set.-dez. 2007.

DRUMOND, K.O.; COSTA, F.A.L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 1, Feb. 2011 .

FAUCHER, B; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **Rev Med Interne** (2010), doi:10.1016/j.revmed.2010.08.002.

GHOSE, A. C. *et al.* Serological investigations on Indian kala-azar. **Clin Exp Immunol**, v. 40, n. 2, p. 318-26, May 1980. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7438541> >.

HASKER, E. *et al.* Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2657, 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466361> >.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet** 1999 Out; 354(9185): 1191–9.

INBIOS INTERNATIONAL, Inc. Kalazar Detect™ Rapid Test for the Detection of Visceral Leishmaniasis Antibody in Human Serum. Kalazar Detect Rapid Test, Part No. 900003.9. 2014.

KHAN, M. G. et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasit Vectors**, v. 3, p. 114, 2010. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110875> >.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1484, Jan 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303488> >.

MATLASHEWSKI, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis in Bihar India: comparison of the rK39 rapid diagnostic test on whole blood versus serum. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e 2233, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717700> >.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014. ISSN 1460-2393 (Electronic) 1460-2393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744570> >.

MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J. C.; GHOSH, A. A Comparative Study of Serum, Urine and Saliva Using rk39 Strip for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **J Arthropod-Borne Dis**, Department of Microbiology, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India. 2014.

MOURA, A. S. et al. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 5, p. 589-93, Sep-Oct 2013. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270249> >.

MUELLER, Y. K. et al. Clinical epidemiology, diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis in the Pokot endemic area of Uganda and Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 1, p. 33-9, Jan 2014. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218406> >.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunol Res**, v. 56, n. 1, p. 163-71, May 2013. ISSN 1559-0755 (Electronic) 0257-277X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504228> >.

OLIVEIRA, Janaina Michelle de et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, Apr. 2010.

PATOLE, S.; BURZA, S.; VARGHESE, G. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in a patient with HIV in India: A treatment challenge. International journal of infectious diseases. **Int J Infect Dis** E-pub ahead of print. 2014.

PEDRAS, M. J.; VIANA, L. G.; OLIVEIRA, E. J.; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 102, 172-78. 2008.

PERUHYPE-MAGALHAES, 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, v. 107, n. 7, Nov. 2012.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**. 2014. [Disease Control Department, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK].

RIERA, C.; FISA, R.; LOPEZ P. *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2004 Dec;23(12):899-904.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis** 4(1): e584. 2010.

SILVA, E. D. *et al.* Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 6, Dec. 2013.

SILVA, G. A. R.; BOECHAT, T. O.; FERRY, F. R. A. *et al.* First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: Case report. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. 56(1):81-84, January-February, 2014. doi: 10.1590/S0036-46652014000100013. 2014a.

SILVA, M. R. B.; STEWART, Jay M; COSTA, Carlos Henrique Nery. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Los Angeles, Califórnia, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.

SINGH, D. P.; SUNDAR, S.; MOHAPATRA, T. M. The rK39 strip test is non-predictor of clinical status for kala-azar. **BMC Research Notes** 2009, 2:187. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-2-187.pdf>>. Acesso em: outubro de 2010. 2009a.

SINGH, D.; PANDEY, K.; DAS, V. N. *et al.* Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Aug. 2009, p. 2684–2685. doi:10.1128/JCM.00988-09. 2009b.

SINGH, D.; PANDEY, K.; RABI DAS, V. N. *et al.* Evaluation of rK-39 Strip Test Using Urine for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Region of India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 88(2), 2013, pp. 222–226.

SOARES, V. Y. R. *et al.* Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 6, Dec. 2008.

SOUSA, Z. F. D. **Diagnóstico da leishmaniose visceral humana em áreas rurais, endêmicas e não endêmicas, utilizando um teste imunocromatográfico** / Zilma Ferreira Dourado e Sousa. – 2007. 121 f. : il., qds., figs., mapas, etc. [Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007].

SOUSA-GOMES, M. L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; PELISSARI, D. M. *et al.* Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 20(4):519-526, out-dez 2011.

SUNDAR, S.; REED, S. G.; SINGH, V. P. *et al.* Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet** 351,563-565. 1998.

SUNDAR, S.; SINGH, R. K.; BHARTI, K. *et al.* Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (DiaMed-IT LEISH) for Indian Visceral Leishmaniasis and PKDL. 2003. [Abstract ASTMH 52nd Annual Meeting, Philadelphia (USA)].

TER, H. R.; TEFERA, T.; ASSEFA, G. *et al.* Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 80,929-934. 2009.

VAISH, M.; SINGH, O. P.; CHAKRAVARTY, J. *et al.* rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva. **Am J Trop Med Hyg** 86, 598-600. 2012a.

VAISH, M; SHARMA, S; CHAKRAVARTY, J. *et al.* Evaluation of two novel rapid rKE16 antigen-based tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in India. **J Clin Microbiol** 50: 3091-3092. 2012b.

VAN ASSCHE, T. *et al.* Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 2, p. 337-51, Jul 15 2011. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620959> >.

VILAPLANA, C. *et al.* Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1853-4, Apr 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15071070> >.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.A. OLIVEIRA, G. C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonenses* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica** 90 (2004) 31–37.

WERNECK, G. L.; PEREIRA, T. J. C. F.; FARIAS, G. C. *et al.* Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 17(2):87-96, abr-jun, 2008.

WHO. Leishmaniasis and HIV coinfection. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html>. Acesso em: outubro de 2010.

WHO. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/en/>. Acesso em julho de 2013.

WHO. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/index.html. Acesso em março de 2014.

WHO/TDR. The Use of Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Tests. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 2008. Acesso em <<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/vl-rdts/pdf/VL-RDTs.pdf>>. Acesso: outubro de 2010.

WHO/TDR. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. Diagnostics Evaluation Series, nº 4. 2011.

ZIJLSTRA, E. E. *et al.* Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Trop Med Int Health**, v. 6, n. 2, p. 108-13, Feb 2001. ISSN 1360-2276 (Print) 1360-2276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251906>>.

ZIJLSTRA, E. E. *et al.* rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 5, p. 717-20, Sep 1998. ISSN 1071-412X (Print) 1071-412X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729541>>.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Olavo Bilac , 2335 Centro - Fone: (86)3221-6658
CEP 64001-280 Teresina-PI

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-UESPI 05/11

Título: “**AVALIAÇÃO DA EFICIENCIA DO TESTE RÁPIDO RÁPIDO ORANGE LIFE NO DIAGNÓSTICO DA LEISHANIOSE VESCERAL AMERICANA EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM HIV/AIDS NA CIDADE DE TERSINA-PI**”.

Pesquisador responsável: **Mauro Roberto Biá da Silva**

Documentos analisados: **Folha de Rosto, Carta de Encaminhamento, Projeto de Pesquisa, Bibliografia Pertinente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Data de entrada: **17 de fevereiro de 2011**

Proposição do(a) Relator(a):

- Aprovação**
 Aprovação com pendências
 Não aprovação


Data da primeira análise pelo CEP-UESPI: 16.03.2011

Data do parecer final do projeto pelo CEP-UESPI: 07.06.2011

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, em **Reunião 06/2011** realizada em 24.05.2011, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Teresina, 08 de junho de 2011


Profª. Luciana Saraiva e Silva
Membro do CEP-UESPI

Anexo 2 – Carta de aceite para publicação de artigo

Prezados,

Gostaria de agradecer a todos pela colaboração e comunicar o aceite do primeiro artigo da tese do Mauro.

Milton

----- Forwarded message -----

From: **msptm editor** <editor@msptm.org>

Date: Mon, Sep 15, 2014 at 7:47 PM

Subject: Re: Fwd: Manuscript

To: Milton Oliveira <miltonoliveira.ufg@gmail.com>

Dear Milton

Your manuscript has been accepted and will appear in June issue of 2015.

Regards

Datin Dr. Indra Vythilingam

Editor

Tropical Biomedicine