

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose  
visceral humana**

**Tália Santana Machado de Assis**

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro/2008**

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose  
visceral humana**

**Tália Santana Machado de Assis**

**Dissertação apresentada ao programa de pós-  
graduação em Ciências da Saúde do Centro de  
Pesquisas René Rachou com vistas à obtenção  
do Título de Mestre em Ciências da Saúde na  
área de concentração de Doenças Infecciosas e  
Parasitárias**

**Orientação: Dra. Ana Rabello**

**Co-orientação: Dr. Gustavo Romero**

**Belo Horizonte**

**Fevereiro/2008**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Validação de teste rápido para o diagnóstico da leishmaniose  
visceral humana**

**Tália Santana Machado de Assis**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Dra. Ana Rabello (Presidente)**

**Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho - CPqRR**

**Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz**

**Suplente: Roberta Maia de Castro Romanelli – Universidade Federal de Minas Gerais**

**Dissertação defendida e aprovada em: 29/02/2008.**

*À minha mãe, com amor.*



## AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua infinita bondade e amor incomparável.

À Dra. Ana Rabello, pela acolhida em seu laboratório, orientação, agradável convivência, paciência, compreensão e oportunidade.

Ao Dr. Gustavo Romero, pela orientação, pela presença e ricas contribuições no decorrer deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, de forma especial a Zélia, Fernanda, Luciana Gouvêa, Mariana, Rachel, Nádia, Edward, Luciana, Alexandre Rotondo e Alexandre Braga, pelo tempo que passamos juntos, apoio e troca de experiências.

À amiga Eliane pelo apoio incondicional, dividindo momentos difíceis e também de descontração.

À Dra. Isabela Penna Cerávolo, pelo exemplo, força, incentivo e amizade.

À minha mãe, Norma, meu exemplo de vida e luta, pela força, incentivo e amor. Esta vitória é nossa!

Às minhas irmãs, Amanda e Andressa, sempre tão amáveis, motivos para continuar lutando e sorrindo.

Ao meu marido, Fabiano, meu refúgio e descanso, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

Ao meu pai, Darlan, pelo apoio e incentivo.

Às amigas e companheiras Carmen e Taís pelo apoio e agradável convivência, dividindo comigo grande parte desta caminhada.

Aos pacientes e seus acompanhantes pela cooperação e contribuição essenciais.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade.

À todos que, de alguma forma e em algum momento, contribuíram para concretização desta realização profissional.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses .....	1
1.2 A leishmaniose visceral .....	2
1.3 Diagnóstico da leishmaniose visceral .....	5
1.3.1 Exames parasitológicos .....	6
1.3.2 Exames moleculares .....	7
1.3.3 Exames imunológicos .....	8
1.3.3.1 Testes sorológicos .....	8
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Desenho do estudo .....	20
3.2 Definição de caso e não-caso de leishmaniose visceral .....	20
3.3 Cálculo da amostra .....	20
3.4 Critérios de inclusão .....	21
3.5 Critérios de exclusão .....	21
3.6 Aspectos éticos .....	22
3.7 Locais de estudo .....	22
3.8 Avaliação clínica .....	24
3.9 Avaliação laboratorial .....	24
3.9.1 Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. em aspirado de medula óssea .....	24
3.9.2 Cultura de aspirado de medula óssea .....	25
3.9.3 Reação de Imunofluorescência Indireta .....	25
3.9.4 Enzima-imuno-ensaio .....	25
3.9.5 Teste imunocromatográfico IT-LEISH .....	26
3.10 Análise dos resultados .....	27
4. RESULTADOS .....	30
4.1 Casos de leishmaniose visceral com confirmação parasitológica (grupo 1) e pacientes portadores de outras etiologias (grupo 2) .....	30

4.2 Casos de leishmaniose visceral sem confirmação parasitológica (grupo 3) .....	37
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÃO .....	42
7. ANEXO .....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Resumo dos estudos realizados até o momento avaliando testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico da LV humana .....	16
<b>Tabela 2.</b>	Número de <i>casos</i> e <i>não-casos</i> de LV incluídos no estudo por cada centro de pesquisa .....	30
<b>Tabela 3.</b>	Média de idade e distribuição por sexo dos participantes em cada centro de pesquisa .....	31
<b>Tabela 4.</b>	Média do tempo de sintomas dos <i>casos</i> e <i>não-casos</i> de LV em cada centro de pesquisa .....	31
<b>Tabela 5.</b>	Porcentagem de sintomas apresentados pelos <i>casos</i> e <i>não-casos</i> de leishmaniose visceral .....	32
<b>Tabela 6.</b>	Estimativa da sensibilidade e especificidade do teste IT-LEISH <sup>®</sup> para o diagnóstico da LV em cada centro de pesquisa .....	32
<b>Tabela 7.</b>	Valores de sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral avaliados nos quatro centros de pesquisa e seus respectivos intervalos de confiança de 95% .....	33
<b>Tabela 8.</b>	Magnitude das diferenças observadas na sensibilidade e especificidade entre os diferentes métodos sorológicos avaliados com a respectiva significância estatística .....	34
<b>Tabela 9.</b>	Valores preditivos positivos e negativos do teste IT-LEISH <sup>®</sup> e seus respectivos intervalos de confiança, utilizando-se como referência a probabilidade pré-teste definida pelo padrão-ouro em cada centro de pesquisa e para a casuística total .....	35
<b>Tabela 10.</b>	Valores preditivos positivos e negativos do teste IT-LEISH <sup>®</sup> utilizando-se a sensibilidade e especificidade geral obtida no estudo, simulando-se diferentes prevalências .....	36
<b>Tabela 11.</b>	Índice Kappa entre o teste IT-LEISH <sup>®</sup> e os demais métodos sorológicos avaliados nos centros de pesquisa .....	36
<b>Tabela 12.</b>	Concordância da leitura do teste IT-LEISH <sup>®</sup> entre três observadores ..	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetros
DNA	Àcido Desoxiribonucleico
mm	Milímetros
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
LIT	Liver infusion tryptose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
kDNA	Àcido Desoxiribonucleico do cinetoplasto
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
DAT	Teste de aglutinação direta
r	Recombinante
ELISA	Reação imunoenzimática
Gp63	Glicoproteína 63
°C	Graus célsios
%	Porcento
TFG	Teste de formol gel
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
PIEJ	Centro de Referências em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
IgG	Imunoglobulina
µL	Microlitros
rpm	Rotações por minuto
µg	Microgramas
ng	Nanogramas
TCB	Tampão carbonato bicarbonato
pH	Potencial hidrogeniônico
T20	Tween 20
ABTS	<i>2, 2' azino bis 3-ethylbenzothiazolie sulphonic acid</i>

DP	Desvio-padrão
IC	Intervalo de confiança
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

## RESUMO

O teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH<sup>®</sup> (DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup>) foi validado para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) em quatro áreas endêmicas do Brasil. O desempenho do IT-LEISH<sup>®</sup> foi comparado ao da reação de imunofluorescência indireta e da reação imunoenzimática utilizando os antígenos solúveis de *Leishmania chagasi* e o recombinante K39. Foram incluídos no estudo 332 pacientes com quadro clínico sugestivo de LV, sendo 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 não-casos com confirmação de outra etiologia. O teste IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. As técnicas RIFI, ELISA *L. chagasi* e ELISA rK39 apresentaram sensibilidade de 88%, 92% e 97% e especificidades de 81%, 77% e 84%, respectivamente. Os resultados confirmam a validade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> para o diagnóstico da LV no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE:** IT-LEISH<sup>®</sup>, Leishmaniose visceral, Diagnóstico, *Leishmania chagasi*, antígeno rK39.

## ABSTRACT

The rapid immunochromatographic test IT-LEISH<sup>®</sup> (DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup>) was validated for the diagnosis of visceral leishmaniasis (LV) in four endemic areas of Brazil. The performance of IT-LEISH<sup>®</sup> was compared with that of the indirect fluorescent antibody test of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble antigen of *Leishmania chagasi* e the recombinant K39. The study group was composed by 332 patients with clinical suspicion of VL, 213 confirmed cases confirmed by parasitological tests and 119 with confirmation of another etiology. The sensitivity of test IT-LEISH<sup>®</sup> was of 93% and the specificity 97%. The tests RIFI, ELISA *L. chagasi* and ELISA rK39 showed sensitivity of 88%, 92% and 97% and specificity of 81%, 77% and 84%, respectively. The results confirm the validity of test IT-LEISH<sup>®</sup> for the diagnosis of the LV in Brazil.

**KEY WORDS:** IT-LEISH<sup>®</sup>, Visceral leishmaniasis, Diagnosis, *Leishmania chagasi*, rK39 antigen.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por várias espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Este gênero agrupa espécies de protozoários digenéticos, encontrados em seus hospedeiros sob duas formas evolutivas principais, uma denominada promastigota, encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e outra denominada amastigota, encontrada no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados.

A forma promastigota é alongada, medindo de 15 a 35  $\mu\text{m}$  e apresenta um flagelo livre, enquanto a forma amastigota apresenta-se como um organismo oval ou esférico, com dimensões variando de 2 a 5  $\mu\text{m}$  e possui um flagelo que não se exterioriza. No citoplasma da *Leishmania* são encontrados um núcleo e um cinetoplasto, sendo esta última uma organela rica em DNA, característica de parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida.

As leishmânias que infectam o homem são agrupadas em dois subgêneros, cada um englobando várias espécies. No subgênero *Viannia* os parasitos apresentam desenvolvimento pobre em meio de cultivo Novy-Nicolle-McNeal (NNN) e lento em hamsters experimentalmente infectados, alojando-se no intestino posterior do vetor, aderidos à parede, na região do piloro e no subgênero *Leishmania*, os protozoários crescem facilmente em cultura, provocam grandes lesões nodulares em hamster e se desenvolvem no intestino médio e anterior do vetor (Lainson & Shaw, 1987).

Os vetores das leishmanioses são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Apresentam pequeno porte, medindo de 2 a 4 mm de comprimento, corpo com intensa pilosidade e desenvolvimento holometabólico. Os flebotomíneos se infectam quando a fêmea pica o hospedeiro vertebrado para exercer o repasto sanguíneo e juntamente com o sangue ingere formas amastigotas do parasito. Dentro do inseto, estas formas transformam-se por meio de

divisão binária em promastigotas, multiplicando-se ativamente. Ao picar um hospedeiro suscetível, o inseto inocula, por regurgitação, as formas promastigotas metacíclicas, tais formas invadem ou são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário e iniciam sua fase de parasitismo no hospedeiro vertebrado.

As leishmanioses são divididas clinicamente em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) e estão presentes em cinco continentes e 88 países. Mais de 90% dos casos de LT ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão e são responsáveis por 70.000 mortes por ano em todo o mundo. Estima-se incidência anual de 600.000 casos e que 350 milhões de pessoas encontram-se sob risco de contrair a infecção (Desjeux, 2001).

## 1.2 A leishmaniose visceral

A LV, também conhecida como calazar é causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo Donovan, que inclui: *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Desde que Cunha (1938) concluiu que o agente etiológico da LV nas Américas era a *L. infantum*, várias discussões se iniciaram a respeito da origem e da taxonomia da *L. chagasi*. Em trabalho realizado por Maurício et al. (1999) utilizando diversas abordagens moleculares, não foi possível distinguir a *L. chagasi* da *L. infantum*. Vários autores têm sugerido a reclassificação da *Leishmania (L.) chagasi* como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, entretanto, apesar dos debates sobre a questão, o termo *L. chagasi* permanece em uso (Lainson & Rangel, 2005).

Na América Latina a *L. chagasi* é transmitida pela picada de insetos do gênero *Lutzomyia*, sendo as espécies transmissoras da doença no Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzii* (Deane & Deane, 1954; Santos et al., 1998).

No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas são encontradas parasitando principalmente macrófagos. No homem, localizam-se em órgãos linfóides como a medula óssea, baço, fígado e linfonodos, causando grande variedade de sinais e sintomas, podendo permanecer como infecção assintomática, sub-clínica ou evoluir para doença clinicamente manifesta (Ministério da Saúde, 2006).

A doença é caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, com período de incubação variando de três a oito meses. Em pacientes não tratados, a doença é marcada por emagrecimento, palidez e enfraquecimento. Leucopenia e trombocitopenia estão associadas com aumento da susceptibilidade a infecções secundárias e hemorragias, causas mais frequentes de óbito (Ministério da Saúde, 2006).

Nos últimos anos um aumento expressivo e descontrolado tem sido observado no número de casos de LV em todo o mundo. Além disto, um novo tipo de transmissão tem sido descrito na Europa, onde a LV é causada pela *L. infantum* e está relacionado ao compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas injetáveis. Esta categoria de exposição, denominada de “antropométrica epidêmica artificial” ocorre em associação com a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tem aumentado a frequência de indivíduos co-infectados com o HIV e a *Leishmania* spp. (Alvar et al., 1997; Guerin et al., 2002).

Segundo estudos realizados em países mediterrâneos, considera-se que a prevalência da LV entre pacientes com AIDS é de 100 a 2.320 vezes maior do que na população geral (Desjeux & Alvar, 2003). A interação destes parasitos tem conseqüências desastrosas, com letalidade até cinco vezes maior entre os co-infectados, maior dificuldade de diagnóstico e progressão acelerada da infecção pelo HIV para AIDS (Pintado et al., 2001; Lyons et al., 2003). Casos de co-infecção *Leishmania*/HIV têm sido descritos no Brasil desde 1987. A avaliação de 100 casos relatados no país, registrados em 12 estados, revelou que 97,3% apresentavam LV (Rabello et al., 1998; Rabello et al., 2003).

No Brasil, também se tem observado o aumento na expansão geográfica da LV. Em 1992 foram registrados casos em 22 unidades federativas e em 2002, todos os estados apresentavam autoctonia da doença. Atualmente a LV atinge 17 unidades federativas, principalmente as da região nordeste, onde se encontram 87% dos casos. Somente em 2006 foram notificados 4.526 casos da doença em todo o país (Ministério da Saúde, 2006).

Transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, porque a LV, originalmente uma doença restrita às áreas rurais, passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica em grandes cidades brasileiras. Este processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e destruição ambiental, fatores que também podem ter influenciado a emergência da doença no meio urbano (Luz et al., 2001; Werneck et al., 2002).

O programa brasileiro de controle da LV baseia sua estratégia em três grupos de medidas: diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle dos reservatórios domésticos e controle de vetores (Ministério da Saúde, 2006). Tais medidas porém, apresentam diversos obstáculos para sua implantação. Em relação ao controle vetorial, que é baseado na aplicação de inseticidas em residências, existem problemas relacionados à complexa logística e ao alto custo. E em relação ao controle dos reservatórios animais, particularmente o cão, observa-se difícil implementação e sustentabilidade, sendo uma medida de eficácia controversa (Ministério da Saúde, 2006; Costa et al., 2007).

No diagnóstico da doença, destaca-se a dificuldade de disponibilização das técnicas existentes para centros de atenção primária à saúde, mantendo-as restritas em laboratórios públicos ou serviços de referência, geralmente em cidades de médio e grande porte. Para o tratamento, são disponíveis drogas com elevada toxicidade. No Brasil, a droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente, cujo esquema terapêutico é longo (20 a 40 dias), com administração por via intramuscular ou intravenosa. A alternativa terapêutica é a anfotericina B, medicamento que deve ser administrado por via venosa e também apresenta elevada

toxicidade. As formulações lipídicas da anfotericina B menos tóxicas, têm custo elevado, que não permite sua larga utilização em saúde pública. Outros obstáculos envolvidos no controle da doença são a ausência de políticas e financiamentos específicos nos países onde a doença é endêmica e sua estreita relação com a pobreza (Ministério da Saúde, 2006).

### **1.3 Diagnóstico da leishmaniose visceral**

Embora o avanço tecnológico ocorrido no século XX tenha nos legado uma variedade de técnicas laboratoriais que significaram importante contribuição ao diagnóstico de doenças em geral e das infecciosas em particular, o diagnóstico da LV avançou pouco nas últimas décadas, provavelmente por duas razões principais: por se tratar de doença negligenciada, que prevê pequeno retorno comercial ao investimento em pesquisa e desenvolvimento e pela complexidade biológica própria da infecção.

O diagnóstico clínico da LV é realizado com base nas características clínicas, principalmente: febre baixa e hepato-esplenomegalia, combinadas com exposição recente ao vetor, no próprio local da residência ou durante visitas a áreas endêmicas. No entanto, o quadro clínico pode ser confundido com outras doenças que se manifestam por hepato-esplenomegalia e febre, tais como malária, esquistossomose, linfomas e leucemias.

O diagnóstico laboratorial consiste fundamentalmente de três grupos de exames: parasitológicos (demonstração direta do parasito e cultivo), moleculares (pesquisa de DNA do parasita) e testes imunológicos (testes sorológicos).

O diagnóstico precoce e preciso da LV, possibilitando a instituição da terapêutica adequada, permite a cura clínica da maioria dos pacientes. O diagnóstico da doença é um problema importante ainda sem solução. A maioria das técnicas disponíveis necessita de infra-estrutura laboratorial e profissionais especializados para sua realização, demandam tempo, apresentam alto custo e ainda assim deixam a desejar em sensibilidade e especificidade.

### 1.3.1 Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos são considerados métodos definitivos para o diagnóstico da LV. Através destes, formas evolutivas do protozoário podem ser visualizadas pela demonstração direta ou cultivo de tecidos parasitados. Após coloração pelo método de Giemsa ou Leishman, formas amastigotas do parasito podem ser observadas em lâminas contendo esfregaços de aspirado de medula óssea, linfonodos, baço, fígado e sangue periférico (Singh & Sivakumar, 2003). Devido ao risco de sangramento, a Organização Mundial da Saúde desaconselha a realização da punção esplênica e no Brasil, recomenda-se a punção de medula óssea para a realização de exames parasitológicos (Ministério da Saúde, 2003).

A sensibilidade da pesquisa do parasito varia de 95 a 98% para o aspirado de baço, 76 a 91% para o aspirado de fígado, 52 a 89% para o aspirado de medula óssea e 52 a 69% para o aspirado de linfonodos (Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992). Em pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV, que têm elevado parasitismo, o aspirado de medula óssea apresenta sensibilidade de 62 a 94% (Montalban et al., 1990; Molina et al., 1994; Pintado et al., 2001). Amastigotas podem ser encontradas em sangue periférico de aproximadamente 50% dos portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV (Medrano et al., 1993).

O material do aspirado de medula óssea, baço ou outros tecidos pode ser inoculado em meios de cultura axênicos, onde posteriormente podem ser visualizadas formas promastigotas do parasito. Nos aspirados de baço e medula óssea, a positividade do cultivo é bastante elevada (acima de 80%) (Guerin et al., 2002; Sundar & Rai, 2002).

O cultivo dos parasitos aumenta a sensibilidade da pesquisa, mas pode retardar em semanas o diagnóstico. Na prática clínica, raramente é necessária a cultura da *Leishmania* spp., entretanto, esta metodologia encontra-se indicada na complementação da abordagem diagnóstica, diante de falhas nas metodologias convencionais ou para permitir o isolamento e a caracterização da espécie. O isolamento de parasitos em hamsters apresenta sensibilidade

acima de 90%, mas pode levar meses para definir o diagnóstico e requer infra-estrutura complexa (Bryceson, 1996; Sundar & Rai, 2002).

### 1.3.2 Exames moleculares

Entre os exames moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais usada e vem sendo avaliada nas últimas décadas para diagnóstico da LV, com diferentes objetivos, incluindo o diagnóstico da infecção, o diagnóstico da doença e o controle de cura (Adhya et al., 1995; Osman et al., 1997; Disch et al., 2004).

A técnica de PCR possibilita a amplificação do DNA do parasito presente em diferentes amostras biológicas, tais como sangue periférico, soro, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos. Entre os alvos de amplificação do DNA, um dos mais usados o DNA do cinetoplasto ou kDNA, estrutura que contém uma região com grande homologia entre as espécies de *Leishmania* spp., a região conservada do kDNA. Considera-se que os iniciadores dirigidos contra as regiões mais conservadas do kDNA são mais sensíveis, enquanto os empregados para a amplificação de regiões variáveis, utilizados para a identificação de espécies, são menos sensíveis (Schallig & Oskam, 2002).

Utilizando-se sangue periférico, esta técnica apresentou sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 87 a 100% (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005) e utilizando-se aspirado de linfonodos, de 87 a 100% (Andresen et al., 1997; Osman et al., 1997). Em pacientes imunocomprometidos mostrou sensibilidade de 82 a 100% em aspirado medular (Piarroux et al., 1994; Lachaud et al., 2000; Antinori et al., 2007).

No Brasil, Disch et al. (2004) avaliaram a utilidade da pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. em sangue periférico no controle de cura da LV. Foram avaliadas 17 amostras procedentes de pacientes tratados e clinicamente curados e, em 94,1% dos casos, a PCR tornou-se negativa 37 dias após o início do tratamento. Os autores concluíram que o clareamento do DNA do parasito do sangue de pacientes com LV ocorre durante ou logo após

o término do tratamento. Maurya et al. (2005) também avaliaram a PCR no controle de cura de 60 pacientes com LV na Índia. Esses autores observaram que logo após o término do tratamento, 85% dos pacientes tornaram-se negativos e três meses após 96,7% tornaram-se negativos pela PCR.

Em outros dois estudos, foi relatada a possibilidade de detecção de DNA de *Leishmania* spp. em soro de pacientes infectados. Fissore et al. (2004) avaliaram 33 pacientes com LV na região do Mediterrâneo, sendo 21 imunocompetentes e 12 imunocomprometidos, observando sensibilidade de 97% e especificidade de 95%. Assis et al. (2007) avaliaram 65 pacientes com LV no Brasil e 34 controles observando sensibilidade de 84% e especificidade de 100% (manuscrito em preparação).

Métodos baseados na detecção de DNA do parasito podem superar as limitações de sensibilidade e especificidade das técnicas atualmente disponíveis, mas estão longe de alcançar as características do método ideal devido à sua complexidade operacional e alto custo.

### **1.3.3 Exames imunológicos**

#### **1.3.3.1 Testes sorológicos**

O diagnóstico sorológico da LV é favorecido pela expressiva resposta imune humoral que caracteriza a doença, entretanto, a pesquisa de anticorpos deixa a desejar em especificidade. Além disto, a maioria das técnicas demanda tempo, equipamentos, laboratoristas treinados e não permite a distinção entre infecção ativa, subclínica ou passada. Vários foram os métodos desenvolvidos, mas poucos resistiram às exigências de eficiência e aplicação rotineira. Entre estes, estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação direta (DAT), os ensaios imunoenzimáticos e mais recentemente, os testes imunocromatográficos.



A RIFI tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 (Duxbury & Sadun, 1964) e é o teste atualmente disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde no Brasil, com a desvantagem de requerer microscópio de imunofluorescência e laboratorista experiente. O resultado é usualmente expresso em diluições, sendo a reação considerada positiva quando a fluorescência dos parasitos é visível nas diluições de 1:80 ou superiores.

No Brasil, o kit de Imunofluorescência produzido pela Biomanguinhos-Fiocruz, fornecido para os laboratórios de saúde pública, utiliza formas promastigotas de *Leishmania major*-like. Apesar do cultivo para produção em grande escala ser mais fácil com formas promastigotas e espécies como a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou *Leishmania (Leishmania) major*, esta escolha pode propiciar maior reatividade cruzada com soros de portadores de outras leishmanioses, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (Duxbury & Sadun, 1964; Sengupta et al., 1969; Manson-Bahr, 1987).

A RIFI detecta anticorpos em infecções recentes e pode persistir positiva por anos após a cura (Manson-Bahr, 1987). Sensibilidade de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% têm sido relatadas, dependendo da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizados (Sengupta, 1969; Cahil et al., 1970).

O DAT é um dos testes mais simples já desenvolvidos para o diagnóstico da LV. Sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% têm sido relatadas em diversas áreas endêmicas (Harith et al., 1986; Schallig et al., 2002; Sundar et al., 2006; Pedras et al., 2007). Devido à facilidade de realização é indicado para trabalhos no campo, onde as condições de trabalho são mais restritas (Zijlstra et al., 1992).

Nesse teste, adiciona-se à preparação de antígeno, o azul brilhante de Comassie, que possibilita a visualização da aglutinação dos parasitos na presença de anticorpos específicos no soro teste. Harith et al. (1988) modificaram a técnica de DAT descrita em 1986 (Harith et al., 1986) e relataram sensibilidade de 100% e especificidade 98,8%. A utilização de antígenos líquidos limitava a estabilidade do teste, por isso, Meredith et al. (1995) testaram

um antígeno que é estável a temperatura ambiente por período de tempo prolongado, encontrando 92% de sensibilidade e 99,7% de especificidade.

Desde a sua introdução em 1971, os métodos imunoenzimáticos vêm sendo avaliados na detecção de anticorpos específicos na leishmaniose (Ho et al., 1983). Os antígenos utilizados são de fundamental importância para a definição da especificidade do teste. Dependendo do método utilizado, uma variedade de antígenos, com diferentes sensibilidades e especificidades é obtida. Embora os valores de sensibilidade apresentem maior reprodutibilidade, variando entre 90 a 100%, os valores de especificidade são bastante inconsistentes, variando de 71 a 100% quando se utiliza antígeno solúvel de *L. chagasi*. Parte da baixa especificidade é atribuída à reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de malária, esquistossomose e outras infecções causadas por helmintos, tuberculose e toxoplasmose (Bray, 1985; Choudhry et al., 1990).

A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não-purificados, causada pela reatividade cruzada e pela persistência de anticorpos após a cura. Para tentar contornar este problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados, tais como Gp63 e rK39 (Burns et al., 1993; Maalej et al., 2003). Entre estes, a proteína recombinante K39, uma sequência de 39 aminoácidos clonada e expressada em *Escherichia coli*, isolada da região quinase de *L. chagasi*, complexo donovani-específica tem sido a mais amplamente avaliada (Burns et al., 1993).

Quando a proteína rK39 foi utilizada em métodos baseados em ELISA, resultou em sensibilidades de 93 a 99% e especificidades de 93 a 100% (Braz et al., 2002; Maalej et al., 2003; Kurkjian et al., 2005; Pedras et al., 2007). Há trabalhos que sugerem que anticorpos anti-rK39 possam indicar doença ativa ou em progressão. Por exemplo, Badaró et al. (1996) utilizando ELISA rK39 observaram positividade de 87% em pacientes com apresentação sub-clínica progredindo para doença clássica, enquanto 30 pacientes que evoluíram para cura espontânea não apresentaram anticorpos anti-rK39.

Pedras et al. (2007), em estudo realizado no Brasil avaliaram o desempenho do DAT com antígeno liofilizado comercial, do DAT com antígeno preparado no próprio laboratório, da reação imunoenzimática com antígeno solúvel de *L. chagasi* e antígeno recombinante K39 (rK39) e da RIFI. Foram avaliados 88 pacientes com LV, 20 indivíduos não-infectados e 85 pacientes com outras doenças. A sensibilidade obtida foi de 96,6% pelo DAT com antígeno liofilizado, 95,5% pelo DAT com antígeno produzido pelos autores, 88,6% com ELISA rK39, 90,8% com ELISA *L. chagasi* e 92% com a RIFI. As especificidades dos métodos avaliados variaram de 81 a 98,7%. Os autores concluíram que o DAT e o ELISA rK39 poderiam substituir a RIFI na rotina diagnóstica no Brasil.

Na última década, a proteína rK39 tem sido avaliada como antígeno em plataformas imunocromatográficas, este formato permite execução simples e interpretação visual das reações. Sensibilidade de 67 a 100% e especificidades 59 a 100% têm sido relatadas (Sundar et al., 1998; Jelinek et al., 1999; Bern et al., 2000; Zijlstra et al., 2001; Delgado et al., 2001; Schallig et al., 2002; Singh et al., 2002; Sundar et al., 2002; Brandonísio et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Sarker et al., 2003; Chappuis et al., 2003; Veeken et al., 2003; Chappuis et al., 2005; Sundar et al., 2005; Alborzi et al. 2006; Sundar et al., 2006; Ritmeijer et al., 2006). Estudos de validação de testes imunocromatográficos rápidos têm mostrado resultados variáveis, dependendo da região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada (Ritmeijer et al., 2006). Esse tipo de método possibilita o uso em áreas endêmicas remotas, dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura ótica.

Sundar et al. (1998) avaliaram na Índia pela primeira vez o antígeno rK39 em plataforma imunocromatográfica. Neste estudo, foram avaliados 127 casos de LV confirmados parasitologicamente e 217 controles. Utilizando-se sangue periférico, o teste imunocromatográfico apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98%. Os autores relataram que o teste imunocromatográfico é adequado para o uso em campo, sendo de simples realização e interpretação, necessitando de pequena quantidade de sangue e nenhuma

tecnologia laboratorial para sua realização. Em outro estudo, avaliando pacientes (14 casos de LV e 82 controles) provenientes da Índia e do Yemen, o teste imunocromatográfico apresentou 71,4% de sensibilidade e 100% de especificidade, quando o teste foi realizado utilizando soro. Devido à baixa sensibilidade relatada para o teste avaliado, os autores sugeriram que o método poderia ser utilizado associado a RIFI (Jelinek et al., 1999).

Bern et al. (2000) em estudo realizado no Nepal, compararam o desempenho do teste imunocromatográfico ao do DAT, em sangue de 92 casos de LV confirmados parasitologicamente e 113 controles. Tanto o teste imunocromatográfico quanto o DAT apresentaram 100% de sensibilidade. Em relação à especificidade, o teste imunocromatográfico apresentou 100% e o DAT 93%. Foi relatado que o teste rápido apresentou melhor custo em relação ao DAT e ainda a vantagem de fácil uso e resultado em poucos minutos.

Zijlstra et al. (2002) em estudo realizado no Sudão avaliaram o desempenho do teste imunocromatográfico, do ELISA rK39 e do DAT, em 55 portadores de LV, com confirmação parasitológica. Baixa sensibilidade foi observada para o teste imunocromatográfico (67%) utilizando sangue periférico, enquanto ELISA rK39 e DAT apresentaram sensibilidades de 100% e 91%, respectivamente. Os autores destacaram que em alguns casos a linha teste do método cromatográfico apareceu muito clara em relação à linha controle, o que dificultou a tomada de decisão. Outros fatores que podem ter influenciado o desempenho do teste imunocromatográfico foram as altas temperaturas (acima de 40°C) e a baixa umidade relativa do ar na região (<30%).

O formato de cromatografia também foi avaliado para a detecção de indivíduos assintomáticos na Índia utilizando-se sangue periférico. De 150 contatos assintomáticos, 55 (36,6%) foram positivos tanto no ELISA rK39 quanto no teste imunocromatográfico. Destes, 69% desenvolveram LV no período de três meses a um ano e os demais permaneceram assintomáticos. Neste trabalho, os autores ressaltaram a capacidade da pesquisa de anticorpos

anti-rK39 predizer o desenvolvimento da doença, com 44% de probabilidade em três meses e 56,5% em seis meses (Singh et al., 2002).

Schallig et al. (2002) avaliaram o teste imunocromatográfico rápido utilizando soro de 19 controles e 21 casos de LV confirmados parasitologicamente (10 pacientes provenientes da Etiópia e 11 pacientes brasileiros). Sensibilidade de 85,7% e especificidade de 82% foram relatadas. Os autores ressaltaram que uma limitação do teste imunocromatográfico é a necessidade de estocagem do tampão presente no kit a -4 C°.

Na Venezuela, Delgado et al. (2001) avaliaram o desempenho do teste imunocromatográfico utilizando soro de 46 casos de LV e 76 não-casos. Sensibilidade de 88% e especificidade de 100% foram relatadas. Os autores recomendam o teste para o diagnóstico rápido da LV no país. E na Itália, Brandonísio et al. (2002) compararam o desempenho do teste imunocromatográfico rápido com a RIFI utilizando soro de 11 casos de LV confirmados parasitologicamente e 103 controles. Ambos os testes avaliados apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade.

No Brasil, Carvalho et al. (2003) avaliaram o desempenho do teste imunocromatográfico e do ELISA utilizando antígeno bruto. Foram estudados 128 casos de LV confirmados parasitologicamente e 60 controles (10 voluntários saudáveis e 50 indivíduos com outras doenças). As sensibilidades do teste imunocromatográfico utilizando soro e ELISA foram de 90% e 89%, respectivamente, enquanto as especificidades foram de 100% e 98%, respectivamente. Os autores relataram que uma limitação deste estudo é o número relativamente pequeno de controles avaliados.

Trabalho realizado por Boelaert et al. (2004) comparou a validade da pancitopenia, do Teste de Formol Gel (TFG), da RIFI, do DAT e do teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico da LV humana no Nepal. Foram avaliados soros de 181 casos de LV confirmados parasitologicamente e 126 controles. As sensibilidades da pancitopenia, do TFG, da RIFI, do DAT e do teste imunocromatográfico foram 16,3, 39,9, 28,4, 95,1, 87,4%, respectivamente,

enquanto as especificidades dos mesmos métodos foram 96,8, 95,2, 94,4, 77,8, 77,0%, respectivamente. Os autores concluíram que o DAT e o teste imunocromatográfico podem substituir o método parasitológico no diagnóstico da LV no Nepal.

São vários os relatos da elevada eficácia de testes imunocromatográficos em diferentes regiões do mundo. Gooswami et al. (2003), na Índia, relataram sensibilidade de 100% e especificidade de 98,18% utilizando soro ou sangue para realização do teste e neste mesmo local, Sundar et al. (2002) relataram sensibilidade de 98% e especificidade de 99% utilizando sangue. Sarker et al. (2003) no Bangladesh relataram sensibilidade de 96,6% e especificidade de 98,3% utilizando soro e Alborzi et al. (2006) em Shiraz, relataram sensibilidade de 82,4% e especificidade de 100% utilizando sangue periférico ou soro para realização do teste.

Recentemente, um novo kit imunocromatográfico (IT-LEISH<sup>®</sup>) utilizando o antígeno rK39 foi desenvolvido para o diagnóstico da LV pela empresa DiaMed Latino Americano S.A. A DiaMed é uma empresa Suíça com produção em imuno-hematologia e diagnóstico, representada no Brasil pela DiaMed Latino-America S.A, com sede em Lagoa Santa, Minas Gerais. Os testes são embalados individualmente com o objetivo de evitar a hidratação das tiras reagentes, fator identificado pela empresa como um dos principais responsáveis pela dificuldade de interpretação dos testes anteriormente disponíveis. O preço estimado do kit é de pouco menos de 1 US\$.

Chappuis et al. (2005) em Uganda compararam o TFG com dois testes imunocromatográficos, o IT-LEISH<sup>®</sup> (DiaMed) e o Kalazar detect<sup>®</sup> (Inbios International, USA). Foram avaliados 131 soros de pacientes com LV confirmada através de parasitológico ou DAT positivos e 121 casos de outras doenças. O teste IT-LEISH<sup>®</sup> mostrou-se mais sensível que o Kalazar detect: 97% *versus* 82%. Ambos os testes imunocromatográficos foram altamente específicos, IT-LEISH<sup>®</sup> 99% *versus* Kalazar detect 97%. O TFG apresentou sensibilidade de 66% e especificidade de 90%. Os autores concluíram que os dois testes imunocromatográficos podem ser utilizados para a confirmação de LV em Uganda.

Ritmeijer et al. (2006) em estudo realizado no Sudão compararam o teste IT-LEISH<sup>®</sup> ao DAT. Foram avaliados 201 casos de LV confirmados parasitologicamente e 133 controles endêmicos. A sensibilidade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> foi de 90% enquanto a especificidade nos controles endêmicos foi de 99%, utilizando sangue periférico. A sensibilidade do DAT foi de 97% e a especificidade de 72%. Os autores relataram que o teste imunocromatográfico é de fácil realização e adequado para o diagnóstico da LV no Sudão.

Sundar et al. (2006) em Muzaffarpur, Varanasi e Índia compararam o desempenho de dois testes imunocromatográficos, IT-LEISH<sup>®</sup> e o Kalazar detect (Inbios). Foram avaliados amostras de soro ou sangue de 206 casos de LV confirmados parasitologicamente e 365 controles. O teste IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou sensibilidade variando de 99 a 100 e o Kalazar detect variando de 98-100%, com relação a especificidade, o IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou variação de 95-100%.

A tabela 1 mostra um resumo dos estudos realizados até o momento avaliando testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico da LV humana.

Chappuis et al. (2007) avaliaram, através de meta-análise, o teste imunocromatográfico utilizando rK39 e o DAT. Na análise, foram incluídos 30 trabalhos publicados em que o DAT foi avaliado e 13 estudos com o teste imunocromatográfico. A sensibilidade combinada estimada do teste imunocromatográfico foi de 93,9% e a do DAT, 94,8%. Segundo os autores, a sensibilidade pareceu mais alta e mais homogênea em estudos realizados no sul da África. As estimativas de especificidade foram influenciadas pelo tipo de controle. Em estudos de fase III realizados em pacientes com suspeita clínica da doença, a especificidade do teste imunocromatográfico foi de 90,6% e do DAT 85,9%.

**Tabela 1** - Resumo dos estudos realizados até o momento avaliando testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico da LV humana.

<b>Autores</b>	<b>Local</b>	<b>Companhia</b>	<b>Casos</b>	<b>Não-casos</b>	<b>Material biológico</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>
Sundar et al. 1998	Índia	Arista	127	217	Sangue	100	98
Jelinek et al. 1999	Índia e Yemen	Acon	14	82	Soro	71,4	100
Bern et al. 2000	Nepal	Inbios	92	113	Sangue	100	100
Zijlstra et al. 2001	Sudão	Arista	55	-	Sangue	67	-
Delgado et al. 2001	Venezuela	Inbios	41	76	Soro	88	100
Schallig et al. 2002	Brasil e Etiópia	Inbios	21	19	Soro	85,7	82
Sundar et al. 2002	Índia	Inbios	122	120	Sangue	98	99
Brandonísio et al. 2002	Itália	Intersep	11	103	Soro	100	100
Goswami et al., 2003	Índia	Inbios	200	100	Sangue ou soro	100	90
Carvalho et al. 2003	Brasil	Inbios	128	60	Soro	90	100
Sarker et al. 2003	Bangladesh	Amrad	60	120	Soro	97	98
Chappuis et al. 2003	Nepal	Inbios	139	45	Soro	97	71
Veeken et al. 2003	Sudão	Amrad	50	27	Soro	92	59
Boelaert et al. 2004	Nepal	Inbios	181	126	Soro	87,4	77
Chappuis et al. 2005	Uganda	DiaMed e Inbios	131	121	Soro	97/82	99/97
Sundar et al. 2005	Índia	Inbios	150	358	Soro	99	89
Alborzi et al. 2006	Shiraz	Inbios	47	161	Sangue ou soro	82,4	100
Ritmeijer et al. 2006	Sudão	DiaMed	201	133	Sangue	90	99
Sundar et al., 2006	Índia	DiaMed e Inbios	206	356	Sangue ou soro	99 a 100	95 a 100



Trabalho realizado por Boelaert et al. (2008) comparou o desempenho do DAT, do teste imunocromatográfico e do KAtex através de um estudo multicêntrico realizado no oeste da África e subcontinente indiano. Os métodos diagnósticos estudados foram validados através da análise de classes latentes utilizando-se uma amostra composta de 1143 indivíduos. No subcontinente Indiano o DAT, e o teste imunocromatográfico apresentaram sensibilidades acima de 95% e especificidades acima de 90%, entretanto no oeste da África as sensibilidade e especificidades foram mais baixas, variando de 75,4 a 98,8% e 70,0 a 98,2%, respectivamente. O KAtex apresentou baixa sensibilidade em todos os países avaliados. Os autores recomendam o DAT e o teste imunocromatográfico para o diagnóstico da LV humana no subcontinente Indiano, já no oeste da África o uso destes métodos deve ser cuidadosamente monitorado.

Estudos de validação de métodos diagnósticos, especialmente testes em formato de imunocromatografia têm sido desenvolvidos utilizando diferentes metodologias, mas algumas vezes, pontos importantes para a segurança dos resultados publicados não têm sido observados, por exemplo, tamanho amostral e grupos controles adequados, fatores estes que podem influenciar a avaliação de desempenho dos métodos diagnósticos. Para auxiliar a condução adequada dos estudos de validação de métodos diagnósticos para doenças infecciosas, a Organização Mundial de Saúde lançou uma Iniciativa denominada STARD (The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy), que contém um “check list” que deve ser levado em consideração durante o desenho dos estudos de validação de métodos diagnósticos, para maior sucesso do estudo e segurança dos resultados publicados. (Peeling et al., 2006; Bossuyt et al., 2007).

O uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que não necessitam de infra-estrutura laboratorial e de profissionais especializados poderá trazer benefícios importantes para o diagnóstico preciso e rápido da LV. O maior impacto poderá ser sentido nas localidades onde o acesso aos exames

laboratoriais mais complexos é mais difícil e por este mesmo motivo a possibilidade de atraso de diagnóstico e de tratamento adequados, maior.

O presente estudo propõe a validação do teste IT-LEISH<sup>®</sup>, seguindo padrões de qualidade adequados para a validação de testes levando em consideração as peculiaridades e desafios impostos pela natureza complexa do diagnóstico da LV.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral:**

Validar em estudo multicêntrico o teste IT-LEISH<sup>®</sup> para o diagnóstico “à beira do leito” da leishmaniose visceral humana.

### **2.2 Objetivos específicos:**

Avaliar o desempenho do teste rápido IT-LEISH<sup>®</sup> em sangue capilar para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana;

Comparar sensibilidade e especificidade do IT-LEISH<sup>®</sup> com as dos testes sorológicos convencionais imunofluorescência indireta, ELISA com antígeno solúvel de promastigotas de *L. chagasi* e ELISA com rK39.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

O estudo foi realizado simultaneamente em quatro estados do Brasil: Piauí, Maranhão, Bahia e Minas Gerais, incluindo como sujeitos da pesquisa, pacientes portadores da síndrome clínica sugestiva de LV residentes em áreas endêmicas, submetidos paralelamente ao aspirado de medula óssea, à coleta de sangue periférico para realização de testes sorológicos e à punção capilar digital para realização do teste IT-LEISH®.

Foram considerados três grupos de pacientes: 1) portadores de LV, definida pela presença de *Leishmania* spp. em aspirado de medula óssea; 2) portadores de síndrome clínica sugestiva de LV, mas com confirmação etiológica de outra natureza e 3) portadores de LV, definida pela clínica sugestiva da doença e RIFI positiva.

#### **3.2 Definição de caso e não caso de leishmaniose visceral**

No grupo 1 definiu-se como caso de LV o paciente que apresentou síndrome clínica sugestiva de leishmaniose visceral, com amastigotas de *Leishmania* spp. em esfregaço corado ou promastigotas em cultivo de aspirado de medula óssea.

No grupo 2 definiu-se como não-caso caso de LV o paciente que apresentou síndrome clínica sugestiva de leishmaniose visceral, com pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. negativa no aspirado de medula óssea (esfregaço ou cultivo) e confirmação de outra etiologia.

No grupo 3 definiu-se como caso de LV o paciente que apresentou síndrome clínica sugestiva de LV, RIFI positiva e resposta adequada ao tratamento.

#### **3.3 Cálculo de amostra:**

A amostra foi calculada com base nos dados encontrados na Índia e nos dados de um estudo piloto realizado no Centro de Pesquisas René Rachou. Considerando sensibilidade estimada de 95%, especificidade estimada de 95%, nível de confiança de 95% e precisão de

4%, foram incluídos no estudo 115 pacientes em cada grupo. O estudo começou simultaneamente nos quatro Centros e foi interrompido ao se alcançar a amostra necessária.

### **3.4 Critérios de Inclusão:**

Foram convidados a participar do estudo, pacientes de qualquer idade e sexo residentes em áreas endêmicas para LV que procuraram os centros de pesquisa envolvidos no presente estudo, apresentando as seguintes condições: febre acompanhada de pelo menos uma das seguintes alterações: a) esplenomegalia, b) hepatomegalia, c) anemia d)leucopenia ou e) plaquetopenia.

### **3.5 Critérios de exclusão**

- Portadores de imunodeficiência conhecida ou uso de imunossupressores. Pacientes que tiveram a indicação de investigação de HIV de acordo com recomendações do Ministério da Saúde (2004) foram examinados, como conduta de rotina dos Centros. Constituíram indicação: qualquer forma clínica sem exposição recente (durante o último ano) a uma área de transmissão de leishmaniose, uso de drogas injetáveis, forma clássica associada à ausência de anticorpos anti-*Leishmania*, achado de formas amastigotas no sangue periférico, envolvimento de órgãos raramente acometidos na leishmaniose visceral, falha terapêutica ou recidiva após o uso de antimonial pentavalente, desenvolvimento de infecções sugestivas de imunodeficiência durante ou após o tratamento, isolamento de espécies de *Leishmania* dermatrópicas ou não descritas como causadoras de acometimento visceral;
- Pacientes com história pregressa de LV e
- Pacientes com a síndrome suspeita para os quais não se obteve diagnóstico definitivo, até o momento da análise dos resultados.

### **3.6 Aspectos Éticos**

Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram incluídos no estudo. Para a participação de crianças, os pais ou responsáveis foram esclarecidos e os que concordaram, assinaram o Termo. O projeto cumpriu as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos no Brasil –Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este projeto recebeu a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa de todas as instituições participantes do estudo. Todos os pacientes receberam o tratamento específico preconizado pelo Ministério da Saúde para portadores de LV e tiveram o seu acompanhamento clínico garantido em cada um dos centros participantes até a cura. Os pacientes com a síndrome suspeita com outras doenças que foram incluídos para estimar a especificidade do teste também receberam o suporte necessário para o tratamento e acompanhamento específico nos centros que participaram da pesquisa.

### **3.7 Locais de Estudo:**

Belo Horizonte: O Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), em convênio com a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, foi criado em 1989 e realiza atividades de atendimento ambulatorial, diagnóstico e tratamento das leishmanioses tegumentar e visceral. São realizadas 1.200 consultas médicas por ano a pacientes provenientes dos municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Além do atendimento médico, o Centro atua como referência laboratorial para os hospitais e serviços de saúde de Minas Gerais, realizando as técnicas de diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular. Para inclusão de pacientes neste estudo, os pacientes cujo exame foi solicitado foram procurados nos hospitais ou nos ambulatórios e foram convidados a participar do estudo. O corpo clínico dos principais hospitais da região foi contatado e solicitado a comunicar sempre que houvesse um paciente que preenchesse os critérios de inclusão no estudo.

Bahia: O Centro de Referências em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva (PIEJ), localizado em Jequié, região endêmica e que atende os pacientes de dois municípios da região sudeste do Estado da Bahia. O PIEJ mantém convênio com o Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) para estudos da leishmaniose. Além do PIEJ, o CPqGM também é Centro de Referências de Leishmaniose para região metropolitana de Salvador.

Teresina: O Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, hospital estadual afiliado da Universidade Federal do Piauí (UFPI), atende a cerca de 90% dos pacientes com LV de Teresina e a numerosos pacientes dos estados vizinhos do Maranhão e Pará. Teresina-Timon, com cerca de 850.000 habitantes é a área urbana com maior número de casos no Brasil e atualmente vive um novo surto que tem atingido principalmente crianças. A instituição conta com o Laboratório de Leishmanioses, onde são realizados exames parasitológicos direto e cultura na rotina, e o teste de ELISA e PCR para projetos de pesquisa. Trata-se de laboratório de referência para leishmanioses junto ao Ministério da Saúde.

Maranhão: O Hospital Universitário afiliado a Universidade Federal do Maranhão (UFMA) realiza atendimento ambulatorial, internação, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral, principalmente em crianças menores de 5 anos. O referido hospital possui 517 leitos. Destes, 30 leitos são destinados às doenças infecto-parasitárias, atendendo pacientes oriundos de todo o estado do Maranhão. Além do Hospital Universitário - Unidade Materno Infantil e Unidade Presidente Dutra, os portadores ou os pacientes com suspeita de LV são atendidos no Socorrão II, Unidade Mista do São Bernardo, Unidade Mista do Itaqui-Bacanga, Hospital da Criança, Hospital Juvêncio Matos, Santa Casa de Misericórdia e Ambulatório de Doenças Infecto-Parasitárias do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão. A LV é endêmica nos quatro municípios que compõem a Ilha de São Luís (São Luís, São José

de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa) sendo responsável por 75% dos casos da doença do Estado.

### **3.8 Avaliação clínica**

Os pacientes foram submetidos a exame clínico para preenchimento do Prontuário Clínico contendo dados de identificação e dados demográficos, história clínica, sintomas e sinais determinantes da síndrome clínica de suspeição da LV.

### **3.9 Avaliação laboratorial**

Foram realizados os seguintes exames laboratoriais:

Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. e cultivo de aspirado de medula óssea;

Reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose;

Ensaio imunoenzimático com antígeno constituído de promastigotas de *L. chagasi*;

Ensaio imunoenzimático com antígeno recombinante rK39;

Pesquisa de anticorpos anti-rK39 em sangue capilar digital pelo kit IT- LEISH®.

#### **3.9.1 Pesquisa de *Leishmania* spp. em aspirado de medula óssea**

A coloração pelo Giemsa: As lâminas foram fixadas com metanol durante 5 minutos e foram cobertas com solução de Giemsa diluído (2 gotas por ml de água tamponada) por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água corrente e secas a temperatura ambiente. A leitura das lâminas coradas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão, com aumento de 1000x. Este exame foi realizado em cada local de estudo, como rotina dos serviços.



### 3.9.2 Cultura de aspirado de medula óssea

O aspirado de medula óssea foi cultivado em 3 ml de meio NNN e 500ul de LIT a 26°C. A pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania* spp. foi realizada a cada sete dias em lâmina – lamínula em microscópio ótico. Este exame também foi realizado como rotina dos serviços.

### 3.9.3 Reação de Imunofluorescência Indireta

Todos os demais exames sorológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR. As amostras dos demais estados foram mantidas a -20 graus C e transportadas sob refrigeração até Belo Horizonte.

A RIFI foi realizada conforme instruções do fabricante (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ). Na etapa de sensibilização das lâminas, foram dispensados 10µl de solução antigênica em cada orifício e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 12 horas. As amostras de soro foram submetidas à diluição seriada na proporção de 1:40 até 1:640 e 10µl de cada diluição dispensados na lâmina. O soro foi incubado a 37°C durante 30 minutos em cada câmara úmida. Após este período as lâminas foram lavadas por três minutos em PBS; três minutos em água reagente tipo II e secas ao ar. Em seguida, procedeu-se à etapa de incubação da solução de anti-imunoglobulina humana ligada à fluoresceína na proporção de 1:100 em PBS, acrescida de Azul de Evans 1:25. Cada orifício da lâmina recebeu 15µl dessa solução e as etapas de incubação e lavagem anteriormente descritas foram repetidas. Para análise ao microscópio de fluorescência, procedeu-se à montagem das lâminas com lamínula e glicerina. Foram considerados positivos todos os títulos iguais ou acima de 1:80.

### 3.9.4 Enzima-imuno-ensaio

As placas de ELISA de poliestireno com 96 poços e fundo chato (NUNC®) foram sensibilizadas com 3µg/ml de antígeno de *L. chagasi* ou com 50ng/well de antígeno

recombinante rK39 (cedido pela S. G. Reed, Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, US). 100µl de solução de antígeno em tampão carbonato bicarbonato (TCB) (pH = 9,6) foram colocados em cada poço e a placa incubada por 12 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com 150µl por poço de solução de albumina bovina (Sigma®) a 2% em PBS<sub>T20</sub> (pH = 7,2) e a placa incubada por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas como na etapa anterior e 100µl do soro do paciente diluído 1:1000 (antígeno solúvel *L. chagasi*) e 1:100 (antígeno r-K39) em PBS<sub>T20</sub> foram dispensados em cada poço. As placas foram incubadas e lavadas nas mesmas condições. 100µl/poço de conjugado anti – IgG humano ligado à peroxidase (Sigma® A6029 ) na diluição 1:1000 em PBS<sub>T20</sub> foram usados. Novamente as placas foram incubadas e lavadas. 100µl do revelador ABTS (2, 2' *azino bis 3-ethylbenzothiazolie sulphonic acid*) foram colocados por poço. A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad®). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O resultado de cada amostra foi correspondente à média aritmética dos resultados da duplicata. Para o cálculo do ponto de corte, soros de 20 indivíduos sadios proveniente da região metropolitana de Belo Horizonte foram utilizados. O cut-off foi determinado através da média aritmética mais duas vezes o desvio-padrão.

### 3.9.5 Teste imunocromatográfico IT-LEISH®

O IT-LEISH® é um teste imunocromatográfico produzido pela DiaMed AG (Cressier sur Morat, Suíça) e distribuído pela DiaMed Latino-América, (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania* spp. O produto é composto de uma membrana de nitrocelulose acoplada a uma bandeja destacável, uma ampola contendo tampão, uma lanceta, um tubo capilar plástico e álcool. Na membrana de nitrocelulose estão adsorvidos o antígeno rK39, formando a linha teste e anti-IgG humano, constituindo a linha controle. A bandeja destacável possui dois orifícios, sendo que o segundo fica reservado para lavagem da fita-teste.

O teste foi realizado estritamente conforme as instruções do fabricante. Brevemente, cerca de 10 µL de sangue, obtido à beira do leito em cada local de estudo, foram transferidos para o primeiro poço da bandeja destacável e homogeneizados com uma gota de tampão por 1 minuto. Em seguida, a tira-teste foi colocada verticalmente neste poço e o sangue diluído era absorvido pela membrana em fluxo ascendente. Após 10 minutos, a tira teste foi lavada durante 10 minutos em uma solução tampão (quatro gotas), depositada previamente no segundo poço. A leitura foi realizada, imediatamente após o término da reação, visualmente por três pesquisadores diferentes participantes deste estudo. O teste foi considerado positivo quando foi possível visualizar as duas linhas, teste e controle, e negativo quando somente a linha controle foi visualizada na membrana de nitrocelulose. Em ambos os casos, a visualização da linha controle, localizada logo acima da linha-teste, indica que a execução do teste foi adequada (Anexo 1).

Os kits foram doados pela empresa para a realização do estudo, com registro de importação específica na ANVISA. No presente estudo foram utilizados cinco lotes do teste IT-LEISH®.

### **3.10 Análise dos resultados:**

Foi construído um banco de dados no programa SPSS versão 11.0 com todas as características epidemiológicas e clínicas dos pacientes e os resultados. Utilizando-se o Programa Epi info 6.04 (Centers for Disease Control, Atlanta, Estados Unidos da América) foram calculadas taxas de sensibilidade, especificidade e seus respectivos intervalos de 95% confiança para cada um dos testes sorológicos estudados. Para a estimativa de valores preditivos foram tomadas as prevalências individuais de cada local de estudo e da média dos quatro locais.

Foi calculada a concordância entre os testes sorológicos utilizando o índice *Kappa* ShROUT (1998). A reprodutibilidade da leitura do teste por três observadores independentes foi avaliada por meio do índice *Kappa*.

Detalhamento dos métodos para estimativa de sensibilidade/especificidade e valores preditivos:

Considerando a categorização dos resultados obtidos em um tabela 2 x 2:

Teste	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	a	b
Negativo	c	d

As características do teste foram calculadas utilizando-se as fórmulas:

Sensibilidade =  $a/a+c$  e especificidade =  $d/b+d$

Valor preditivo positivo (VPP) =  $a/a+b$

Valor preditivo negativo (VPN) =  $d/c+d$

$Kappa = (P \text{ observada} - P \text{ esperada}) / (1 - P \text{ esperada})$

Onde:

P observada = concordância bruta e

P esperada =  $[(a+b)(a+c) + [(c+d)(b+d)] / (a+b+c+d)^2$

Foram calculados os respectivos intervalos de confiança para o *Kappa* e o índice foi interpretado segundo a seguinte tabela de valores:

Kappa	Concordância
<0,1	Ausente
0,10- 0,40	Fraca
0,41-0,60	Discreta
0,61-0,80	Moderada
0,81-1,0	Substancial

Estimativa de sensibilidade e especificidade: Utilizou-se a fórmula para estimar o intervalo de confiança para uma proporção considerando um nível de confiança de 95% e o valor de  $Z(\alpha/2) = 1,96$ . A fórmula foi a mais simples onde os limites foram estabelecidos assim:

$$\text{Limite superior} = P + 1,96 [\sqrt{p(1-p)/n}]$$

$$\text{Limite inferior} = P - 1,96 [\sqrt{p(1-p)/n}]$$

Onde P é igual à sensibilidade ou à especificidade e n o número de indivíduos avaliados.

$$\text{Razão de verossimilhança positiva} = [a/a+c] / [b/b+d]$$

$$\text{Razão de verossimilhança negativa} = [c/a+c] / [d/b+d]$$

#### 4. RESULTADOS

Trezentos e noventa e três pacientes preencheram os critérios de inclusão e foram incluídos no estudo. Na análise inicial (4.1.) foram avaliados 213 casos de LV (grupo 1) confirmados parasitologicamente e 119 pacientes portadores de outras patologias (grupo 2). Na análise subsequente (4.2.) foram analisados 61 casos de LV (grupo 3) confirmados através da clínica sugestiva da doença e RIFI positiva.

Ao todo, 11 pacientes não preencheram os critérios de inclusão no estudo. Nove pacientes foram excluídos por não apresentarem diagnóstico definitivo até o momento da análise dos dados e dois pacientes considerados *não-casos* por não terem indicação para realização de exame parasitológico.

##### 4.1. Casos de leishmaniose visceral com confirmação parasitológica (grupo 1) e pacientes portadores de outras etiologias (grupo 2)

Ao todo foram incluídos 332 pacientes nos grupos 1 e 2. Cinquenta e sete pacientes (17,2%) foram provenientes do CPqRR, 119 (35,8%) do CPqGM, 121 (36,4%) da UFPI e 35 (10,5%) da UFMA (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de *casos* e *não-casos* de LV incluídos no estudo por cada centro de pesquisa.

Centros de pesquisa	Grupo 1 (casos)	%	Grupo 2 (não-casos)	%	Total	%
CPqRR	26	12,2	31	26,1	57	17,2
CPqGM	73	34,3	46	38,7	119	35,8
UFPI	92	43,2	29	24,4	121	36,4
UFMA	22	10,3	13	10,9	35	10,5
<b>Total</b>	<b>213</b>	<b>100,0</b>	<b>119</b>	<b>100,0</b>	<b>332</b>	<b>100,0</b>

A média de idade dos 332 pacientes incluídos no grupo 1 (casos) e 2 (não-casos) foi de 12,7 anos, variando de 1 mês a 76,8 anos; 57,7% eram do sexo masculino (Tabela 3). A média

do tempo de sintomas dos pacientes incluídos no grupo 1 (casos) foi de 53 dias, variando de 5 a 360 dias (DP=56,1) e do grupo 2 (não-casos) foi de 71 dias, variando de 3 a 720 dias (DP=135,8) (Tabela 4).

**Tabela 3.** Média de idade e distribuição por sexo dos participantes em cada centro de pesquisa referente aos grupos 1 e 2.

Centros de pesquisa	Idade média (meses)	Idade mínima/máxima (meses)	Sexo feminino	Sexo masculino
			n (%)	n (%)
CPqRR	299	10-890	24 (42,1)	33 (57,9)
CPqGM	67	1-212	58 (48,1)	61 (51,3)
UFPI	191	1-922	45 (37,5)	75 (62,5)
UFMA	76	2-811	11 (31,4)	24 (68,6)
<b>Geral</b>	<b>153</b>	<b>1-922</b>	<b>140 (42,3)</b>	<b>192 (57,7)</b>

**Tabela 4.** Média do tempo de sintomas dos casos (Grupo 1) e não-casos (Grupo 2) de LV em cada centro de pesquisa.

Centros de pesquisa	Média do tempo de sintomas em dias	
	Casos (tempo min-máx)	Não-casos (tempo min-máx)
CPqRR	62 (5-270)	98 (7-720)
CPqRR	59 (7-360)	56 (8-360)
UFPI	49 (13-270)	74 (3-320)
UFMA	40 (12-120)	32 (8-60)
<b>Geral</b>	<b>53 (5-360)</b>	<b>71 (3-720)</b>

Os portadores de LV (Grupo 1) apresentaram em relação aos *não-casos* (Grupo 2) maior porcentagem dos seguintes sintomas e sinais: emagrecimento 83,3 × 66,4%, diarreia 26,9 × 22,2% e dor abdominal 49,6 × 44,8%. Já os *não-casos* (grupo 2) apresentaram em relação aos *casos* (grupo 1) maior porcentagem dos seguintes sintomas e sinais: palidez 86,2 × 72,3%,

tosse 41,7 × 41,1%, icterícia 22,5 × 13,7% e sangramento 23,4 × 15,1%. Todos apresentaram febre conforme critério de inclusão no estudo (Tabela 5).

**Tabela 5.** Porcentagem de sintomas apresentados pelos grupos 1 (casos) e 2 (não-casos) de leishmaniose visceral.

<b>Sintomas</b>	<b>Grupo 1 (Casos %)</b>	<b>Grupo 2 (Não-casos %)</b>
Emagrecimento	83,3	66,4
Palidez	72,3	86,2
Tosse	41,1	41,7
Diarréia	26,9	22,2
Dor abdominal	49,6	44,8
Icterícia	13,7	22,5
Sangramento	15,1	23,4

A sensibilidade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> variou de 90 (81,2-96,0) a 96% (89,2-98,8) entre os diferentes centros de pesquisa participantes, enquanto a especificidade variou de 93 (77,2-99,1) a 100% (75,3-100). Não houve diferença significativa na sensibilidade e especificidade observadas nos centros de pesquisa envolvidos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Estimativa da sensibilidade e especificidade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> para o diagnóstico da LV em cada centro de pesquisa.

<b>Centros de pesquisa</b>	<b>Sensibilidade (%) (IC:95%)</b>	<b>Especificidade (%) (IC:95%)</b>
CPqRR	92 (74,9-99,0)	97 (83,8-99,9)
CPqGM	90 (81,2-96,0)	98 (88,5-99,9)
UFPI	96 (89,2-98,8)	93 (77,2-99,1)
UFMA	95 (77,1-99,8)	100 (75,3-100)



Quando analisada a amostra total (332 indivíduos), o teste IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou sensibilidade de 93% (89,2-96,4) e especificidade de 97% (91,6-99,0). No total, as sensibilidades dos métodos avaliados variaram de 88 (82,6-91,8) a 97% (93,9-98,9) enquanto os valores de especificidade variaram de 77 (68,7-84,4) a 97% (91,6-99,0). As técnicas de ELISA *L. chagasi* e IT-LEISH<sup>®</sup> apresentaram sensibilidades semelhantes: 92% (87,5-95,2) e 93% (89,2-96,4), respectivamente (Tabela 7). Diferença significativa foi observada entre os valores de sensibilidade de IT- LEISH<sup>®</sup> (93%) e ELISA rK39 (97%) (p = 0,04), ELISA rK39 (97%) e ELISA *L. chagasi* (p = 0,01) e ELISA rK39 (97%) e RIFI (88%) (p < 0,001). Com relação à especificidade, observou-se diferença significativa entre IT- LEISH<sup>®</sup> (97%) e ELISA rK39 (84%) (p = 0,001), ELISA *L. chagasi* (77%) (p < 0,001) e RIFI (81%) (p < 0,001) (Tabela 8).

**Tabela 7.** Valores de sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral avaliados nos quatro centros de pesquisa e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Métodos avaliados	Sensibilidade (%) (IC:95%)	Especificidade (%) (IC:95%)
RIFI	88 (82,6 a 91,8)	81 (72,4 a 87,3)
ELISA <i>L. chagasi</i>	92 (87,5 a 95,2)	77 (68,7 a 84,4)
ELISA rK39	97 (93,9 a 98,9)	84 (76,1 a 90,1)
IT-LEISH <sup>®</sup>	93 (89,2 a 96,4)	97 (91,6 a 99,0)

**Tabela 8.** Magnitude das diferenças observadas na sensibilidade e especificidade entre os diferentes métodos sorológicos avaliados com a respectiva significância estatística

Métodos	Diferença de sensibilidade % <sup>a</sup>	Significância estatística (p) da diferença de sensibilidade	Diferença de especificidade % <sup>b</sup>	Significância estatística (p) da diferença de especificidade
IT-LEISH <sup>®</sup> vs RIFI	5	0,07	16	<0,001
IT-LEISH <sup>®</sup> vs ELISA <i>L. chagasi</i>	1	0,71	20	<0,001
IT-LEISH <sup>®</sup> vs ELISA rK39	-4	0,04	13	0,001
ELISA rK39 vs RIFI	9	< 0,001	3	0,49
ELISA rK39 vs ELISA <i>L. chagasi</i>	5	0,01	7	0,19
ELISA <i>L. chagasi</i> vs RIFI	4	0,14	-4	0,52

a. A diferença considera a sensibilidade do primeiro teste menos a sensibilidade do segundo teste de comparação.

b. A diferença considera a especificidade do primeiro teste menos a especificidade do segundo teste de comparação

Quatorze amostras apresentaram reações falso-negativas e quatro amostras apresentaram reações falso-positivas com o teste IT-LEISH<sup>®</sup>. As amostras que apresentaram reações falso-positivas no teste IT-LEISH<sup>®</sup> foram provenientes de pacientes portadores das seguintes doenças: linfoma, lupus eritematoso, insuficiência hepática e mononucleose, sendo que, estas amostras também foram falso-positivas nos demais testes sorológicos avaliados no estudo. Em relação ao ELISA rK39, cinco amostras apresentaram reações falso-negativas e 19 amostras apresentaram reações falso-positivas. As amostras que apresentaram reações falso-positivas ao ELISA rK39 eram provenientes de portadores das seguintes doenças: linfoma (2), dermatite bolhosa, abscesso cervical bacteriano, lupus eritematoso, cirrose hepática, insuficiência hepática, leucemia (2), sepse, mononucleose (3), esquistossomose, febre tifóide (2), hepatite, enteroinfecção em lactente e artrite reumatóide.

Utilizando-se a positividade em cada localidade, o VPP variou de 95 (84,5-99,4) a 100% (94,0-100) e o VPN de 86 (73,0-95,0) a 93% (83,0-98,0). O teste IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou VPP de 94% (84,5-98,2) e VPN de 89% (74,0-97,0) quando avaliado para o total de pacientes dos quatro centros (Tabela 9). Utilizando-se a sensibilidade e especificidade geral obtida pelo teste IT-LEISH<sup>®</sup> em diferentes prevalências o VPP variou de 23 a 97% enquanto o VPN variou de 93 a 99% (Tabela 10).

**Tabela 9.** Valores preditivos positivos e negativos do teste IT-LEISH<sup>®</sup> e seus respectivos intervalos de confiança, utilizando-se como referência a probabilidade pré-teste definida pelo padrão-ouro em cada centro de pesquisa e para a casuística total.

Centros de pesquisa	Positividade	VPP de IT-LEISH <sup>®</sup> - % (IC 95%)	VPN de IT-LEISH <sup>®</sup> - % (IC 95%)
CPqRR n=57	46%	95 (84,5-99,4)	93 (83,0-98,0)
CPqGM n=119	61%	98 (90,4-99,9)	86 (73,0-95,0)
UFPI n=121	76%	97 (91,0-100)	88 (69,0-97,4)
UFMA n=35	63%	100 (94,0-100)	92 (80,0-98,4)
Total n=332	64%	94 (84,5-98,2)	89 (74,0-97,0)

**Tabela 10.** Valores preditivos positivos e negativos do teste IT-LEISH<sup>®</sup> utilizando-se a sensibilidade e especificidade geral obtida no estudo, simulando-se diferentes prevalências.

Prevalências (%)	VPP de IT-LEISH <sup>®</sup> (%)	VPN de IT-LEISH <sup>®</sup> (%)
1	23	99
5	62	99
10	77	99
20	89	98
50	97	93

Sensibilidade geral= 93% e especificidade geral= 97%.

O índice Kappa mostrou concordância classificada como “moderada” entre IT-LEISH<sup>®</sup> e os demais métodos sorológicos avaliados (Tabela 11). Concordância “substancial” foi observada na avaliação da leitura do teste IT-LEISH<sup>®</sup> por pares de observadores (Tabela 12).

**Tabela 11.** Índice Kappa entre o teste IT-LEISH<sup>®</sup> e os demais métodos sorológicos avaliados nos centros de pesquisa.

Teste	Testes sorológicos									
	RIFI			ELISA <i>L. chagasi</i>			ELISA rK39			
	P	N	T	P	N	T	P	N	T	
IT-LEISH <sup>®</sup>	P	179	24	203	190	13	203	200	3	203
	N	31	98	129	33	96	129	27	102	129
	T	210	122	332	223	109	332	227	105	332
<i>Kappa</i>	<b>0,65</b>			<b>0,70</b>			<b>0,80</b>			
	<b>(0,60-0,70)</b>			<b>(0,65-0,75)</b>			<b>(0,75-0,85)</b>			

P=Positivo; N=Negativo e T=Total

**Tabela 12.** Concordância da leitura do teste I IT-LEISH<sup>®</sup> entre três observadores.

Teste	Pares de observadores									
	a x b			a x c			b x c			
	P	N	T	P	N	T	P	N	T	
IT-LEISH <sup>®</sup>	P	196	7	203	197	6	203	201	3	204
	N	8	121	129	7	122	129	3	125	128
	T	204	128	332	204	128	332	204	128	332
<i>Kappa</i>		<b>0,90</b>			<b>0,92</b>			<b>0,96</b>		
		<b>(0,85-0,95)</b>			<b>(0,87-100)</b>			<b>(0,91-100)</b>		

a, b e c se referem a cada observador

As razões de verossimilhança positiva da RIFI, ELISA *L. chagasi*, ELISA rK39 e IT-LEISH<sup>®</sup> foram 4.63, 4.2, 6.06 e 8.4, respectivamente e as razões de verossimilhança negativa foram 0.63, 0.10, 0.02, 0.02, respectivamente.

#### 4.2 Casos de leishmaniose visceral sem confirmação parasitológica (grupo 3)

Dos 61 casos de LV com sorologia positiva, 36 (59%) foram provenientes do CPqRR, 2 (3,3%) do CPqGM, 17 (27,9%) da UFPI e 6 (9,8%) da UFMA. A média de idade foi de 13 anos, variando de quatro anos a 64 anos; 59% eram do sexo masculino. A média do tempo de sintomas no grupo foi de 40 dias, variando de 5 a 120 dias (DP=34,3).

A sensibilidade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> foi de 87% (75,8-94,2), do ELISA *L. chagasi* 80% (68,1-89,4) e do ELISA rK39 97% (89,6-99,6). Diferença significativa foi observada entre a sensibilidade de ELISA rK39 (97%) e os demais métodos ( $p < 0,05$ ).

O índice Kappa mostrou concordância classificada como “substancial” entre IT-LEISH<sup>®</sup> e ELISA rK39 (0,88) (IC95%:0,83-0,93) e concordância classificada como moderada entre IT-LEISH<sup>®</sup> e ELISA *L. chagasi* (0,73) (IC95%: 0,68-0,78). Concordância “substancial” foi observada na avaliação da leitura do teste IT-LEISH<sup>®</sup> pelos pares de observadores a + b (0,81) (IC95%: 0,76-0,86) e b + c (0,90) (IC95%: 0,85-0,95) e concordância moderada foi observada na avaliação pelo par de observador a + c (0,70) (IC95%: 0,65-0,75).

## 5. DISCUSSÃO

Testes de imunocromatografia de fluxo lateral para ao diagnóstico da LV utilizando o antígeno rK39, têm sido avaliados em vários países, com sensibilidade e especificidade variáveis e sua validação no Brasil foi definida como pesquisa prioritária pela SVS, que divulgou edital específico para o financiamento que permitiu o presente projeto.

Um ponto favorável do presente estudo é o grupo controle avaliado, formado por pacientes com clínica sugestiva da doença. Na maioria dos estudos desenvolvidos com testes imunocromatográficos rápidos, os grupos controles utilizados são passíveis de críticas, pois foram formados na maioria dos casos por indivíduos sadios de áreas endêmicas para LV ou são compostos de soros de pacientes portadores de doenças que apresentam conhecida reatividade cruzada nos métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da LV. Estes grupos não representam o universo de pacientes que apresentam o quadro clínico sugestivo de LV, que requer o diagnóstico diferencial, na prática médica rotineira. Um ponto desfavorável do estudo é a utilização de cinco lotes do teste IT-LEISH<sup>®</sup>, o ideal era que fosse utilizado o mesmo lote durante todo o período do estudo, entretanto, o estudo teve duração de dois anos e os Kits tem validade de seis meses.

É importante ressaltar que o estudo teve como objetivo inicial avaliar 115 casos de LV e 115 *não-casos*, entretanto, a amostra de casos foi obtida antes da amostra de não casos, fato este que levou ao aumento da amostra de casos até que o número mínimo de não-casos fosse incluído no estudo. A amostra de casos foi obtida mais rapidamente que a de não-casos devido aos centros de pesquisa envolvidos no estudo serem centros de referência para LV humana.

Os dados obtidos demonstraram que a sensibilidade do método ELISA utilizando o antígeno rK39 foi superior à obtida com o teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH<sup>®</sup>, entretanto, a especificidade do teste IT-LEISH<sup>®</sup> foi superior aos demais métodos avaliados, que não apresentaram diferença significativa entre si.

Os valores de sensibilidade (93%) e especificidade (97%) verificados para o teste IT-LEISH<sup>®</sup> se aproximam de dados obtidos em outros estudos que avaliaram a detecção de anticorpos anti-rK9 em outros países, que observaram valores de sensibilidade variando de 90 a 100% e de especificidade de 93 a 100% (Sundar et al., 1998; Bern et al., 2000; Sundar et al., 2006; Ritmeijer et al., 2006). Entretanto, há na literatura relatos de menor acurácia de testes imunocromatográficos, como a sensibilidade de 80% comparada com 86% para a RIFI em estudo realizado no Kuwait (Iqbal et al., 2002), ou a comparação do TRALd<sup>®</sup> (Teste Rápido Antígeno para *L. donovani*) com o ELISA rK39 e com o DAT em 55 pacientes com LV confirmada no Sudão, com sensibilidades de 67%, 100% e 91%, respectivamente (Zijlstra et al., 2001). Alguns autores sugerem que o formato do teste poderia ser a causa da baixa sensibilidade, bem como, diferenças entre sub-espécies do complexo donovani, diferenças genéticas individuais ou raciais e diferenças de regiões geográficas e ecológicas (Ritmeijer et al., 2006).

Dados de dois estudos realizados no Brasil, Schallig et al., 2002 e Carvalho et al., 2003, também corroboram com os resultados do presente trabalho. Estudo realizado por Schallig et al. (2002) e por Carvalho et al. (2003) avaliaram o teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico da LV. No primeiro trabalho, o TRALd<sup>®</sup> foi comparado ao DAT, em número pequeno de casos (n = 21) apresentando sensibilidade de 85,7% e 100%, respectivamente e especificidade de 82% e 100%, respectivamente. No segundo trabalho, o teste imunocromatográfico rápido foi comparado ao ELISA utilizando antígeno bruto, apresentando taxas de sensibilidade de 90 e 89%, respectivamente e taxas de especificidade de 100 e 98%, respectivamente. Neste trabalho os autores chamam atenção que o grupo controle utilizado é pequeno (61 indivíduos), podendo a estimativa de especificidade ter sido influenciada pelo tamanho amostral do grupo controle reduzido.

O teste IT-LEISH<sup>®</sup> apresentou quatro reações falso-positivas, as mesmas amostras também foram positivas ao ELISA rK39, ao ELISA *L. chagasi* e pela RIFI. Estas amostras

foram provenientes de não-casos de áreas endêmicas para LV, portanto estes pacientes poderiam ser portadores assintomáticos da infecção.

Os elevados valores preditivos positivo e negativo relatados na tabela 9 se referem a valores estimados de positividade entre os pacientes que procuraram os serviços especializados com quadro sugestivo de LV e são válidos para estas condições de atenção à saúde. Os valores preditivos variaram de acordo com as sensibilidades e as especificidades observadas em cada centro de pesquisa. Estes dados devem ser interpretados com cautela e não devem ser extrapolados para situações de inquéritos epidemiológicos ou pacientes que não apresentem quadros clínicos compatíveis com a LV ou com prevalências de doença diferentes no serviço.

Na tabela 10 foram calculados valores preditivos positivo e negativo, simulando-se diferentes prevalências. Foi interessante a realização deste cálculo, pois no presente estudo não foi possível determinar a prevalência real da LV nas diferentes áreas estudadas. Muitos pacientes eram provenientes do interior de seu estado de origem, impossibilitando o cálculo de prevalência. Vale ressaltar que não foram incluídos no estudo todos os pacientes que tiveram a doença nas localidades estudadas. Na análise de sensibilidade, é evidente que o desempenho do teste em relação ao VPP melhora quando a prevalência de LV é de 20% no cenário onde o teste seria aplicado. No entanto, o impacto da prevalência sobre a especificidade, como era esperado, foi muito discreto, em parte pela elevada especificidade observada.

A concordância observada entre o teste IT-LEISH<sup>®</sup> e os demais métodos sorológicos avaliados indica que o teste IT-LEISH<sup>®</sup> pode ser utilizado independente dos demais métodos diagnósticos disponíveis, tornando-se uma ferramenta útil no diagnóstico da LV no Brasil. A concordância observada na avaliação da leitura do teste IT-LEISH<sup>®</sup> por pares de observadores, demonstra a adequada reprodutibilidade deste teste.



Quando analisado em 61 de casos de LV com clínica e sorologia positiva o teste IT-LEISH<sup>®</sup> não modificou seu desempenho quando comparado ao grupo de 213 casos de LV que apresentaram confirmação parasitológica. Este é um grupo de pacientes que apresenta relevância prática no contexto do diagnóstico da LV, uma vez que o grupo reflete situações reais que exigem tomadas de decisão para conduta médica. Do ponto de vista de definição metodológica para o estudo, o diagnóstico sorológico não constituiu definição de certeza e por consequência não poderia ser utilizado como referência.

Vale ressaltar que o teste validado é de simples realização, podendo ser feito à beira do leito e não necessita de infra-estrutura laboratorial para sua realização. Este método pode ser realizado por qualquer profissional, desde que devidamente treinado para o tal, cuidado especial deve ser tomado na leitura do teste, visto que uma banda de tonalidade fraca na linha teste é considerada positiva. O teste IT-LEISH<sup>®</sup> poderá ser utilizado em localidades afastadas, onde o acesso a métodos diagnósticos é difícil e auxiliará no diagnóstico final dos pacientes. Outro ponto importante é o que o teste IT-LEISH<sup>®</sup> pode ser realizado utilizando-se como amostra biológica soro ou sangue, apesar de, no presente estudo ter sido utilizado sangue capilar digital, estudos mostram que não existe diferença entre a sensibilidade e especificidade de testes imunocromatográficos utilizando ambas as amostras (Sundar et al., 2006).

Este projeto procurou seguir a lista de obrigatoriedades para desenho e condução de estudos de validação de métodos diagnósticos presente no Manual STARD e, portanto, trata-se do primeiro estudo multicêntrico realizado no Brasil para validação de um teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico de pacientes suspeitos da LV.

Os dados obtidos no presente estudo de validação contribuirão para a realização de avaliações de custo-efetividade de testes diagnósticos para LV, fornecendo estimativas acuradas de sensibilidade e especificidade para inclusão nos modelos, fortalecendo assim a tomada de decisão sobre a implantação do método nos serviços.

## **6. CONCLUSÃO**

O estudo validou a utilização do teste IT-LEISH<sup>®</sup> para o diagnóstico da leishmaniose visceral em beira de leito, em pacientes que apresentavam quadro clínico sugestivo de LV sem infecção concomitante pelo HIV no Brasil. Os resultados obtidos permitem recomendar o teste IT-LEISH<sup>®</sup> para diagnóstico rápido de LV com o devido acompanhamento da implantação nos serviços de saúde para avaliar o seu desempenho em condições de uso rotineiro.

## 7. ANEXO

Seqüência de etapas para a realização do teste rápido IT-LEISH®



### Primeira Etapa

Identificação da tira com nome do paciente e data da realização do teste.



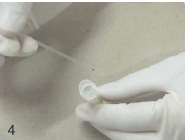
### Segunda Etapa

Pingar 1 gota de tampão no primeiro poço



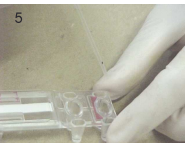
### Terceira Etapa

Pingar 4 gotas de tampão no segundo poço.  
Esperar 1 minuto.



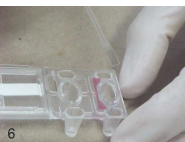
### Quarta Etapa

Coletar sangue em punção digital do paciente.



### Quinta Etapa

Dispensar o material coletado no primeiro poço.



### Sexta Etapa

Com o lado oposto do capilar homogeneizar o sangue (ou soro) com o tampão.  
Esperar 1 minuto.



#### Sétima Etapa

Retirar a tira do suporte e colocá-la no primeiro poço.  
Esperar 10 minutos.



#### Oitava Etapa

Passar a tira para o segundo poço.  
Esperar 10 minutos.



#### Nona Etapa

Leitura: amostras negativas. Apenas a banda controle aparece na tira.



#### Nona Etapa

Leitura: amostras positivas. Aparece uma banda além da banda controle, uma indicando positividade da reação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhya S, Chatterjee M, Hassan MQ, Mukherjee S, Sen S. Detection of *Leishmania* in the blood of early Kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 622-624.
- Alborzi A, Rasouli M, Nademi Z, Kadivar MR, Pourabbas. Evaluation of rK39 strip test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in infants. *La Revue de Santé de la Méditerranée* 2006; 12: 294-299.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol* 1997; 10: 298-319.
- Andresen K, Gasim S, El Hassan AM, Khalil EA, Barker DC, Theander TG, Kharazmi A. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymphnode samples from patients from the Sudan. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 440-444.
- Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Stefano C, Colomba C, Titone L, Parravicini C, Cascio A, Corbellino M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected e HIV uninfected. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1602-1610.
- Assis TSM de, Caligiorne R, Romero GAS, Rabello A. Comparison between serum and peripheral blood as sources of *Leishmania* k-DNA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immunol* 2007. Artigo submetido.
- Badaró R, Benson D, Eulúlio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burn JM, Houghton JR, David JR, Reed SG. rK39: A cloned antigen of *L. chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis (VL). *J Infect Dis* 1996; 173: 758-761.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 153-157.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Balmansingh K, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Stuyft PVD. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Hyg* 2004; 70: 72-77.
- Boelaert M, El-safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, Wasunna, Aseffa A, Mbui J, Menten J, Desjeux P, Peeling RW. 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 Roy Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 32-40.
- Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo S MB. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 344-348.

- Bray RS. Immunodiagnosis of leishmaniasis. P. 177-181, In: K.P. Cahng and R.s. Bray (ed). *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985.
- Bryceson AM. Leishmaniasis. In: *Manson's tropical Diseases*, 20th edition, cook, g.c. (editor). London: W.B. Saunders 1996; 1213-1243.
- Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesis-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 775-779.
- Cahil KM. Field technique in the diagnosis of calazar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 83: 499.
- Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 321-324.
- Costa CHN, Tapety CM, Werneck G. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 415-419.
- Chappuis F, Rijal S, Singh VP, Acharya P, Karki BMS, Das ML, Bovier PA, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Loutan L. 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* 2005; 8: 277-285.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *MJJ* 2007; 10: 1-5.
- Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. Enzyme linked immunosorbent assay in the diagnosis of calazar in Bhadhi (Varanasi), Índia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 363-366.
- Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359: 1124-1125.
- Cunha AM. Experimental infectious in American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1938; 33: 581-616.
- Deane MP & Deane LM. Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar. *O Hospital* 1954; 45: 697-702.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-243.
- Desjeux P & Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97: 3-15.
- Disch J, Maciel MC, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans. R Trop Med Hyg* 2003; 97: 1-5.

- Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 92: 279-283.
- Duxbury RE & Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13: 525-529.
- Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufreuve JP, Le Fichoux, Y, Marty P. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5332-5333.
- Goswami RP, B Bairagi, Kundu Gowsmami. K39 Strip Test - Easy, Reliable and Cost-Effective Field Diagnosis for Visceral Leishmaniasis in India. *JAPI* 2003; 51: 759-761.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 494-501.
- Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 583-587.
- Harith A, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, Laarman J J. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 1321-1325.
- Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 943-946.
- Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 669-670.
- Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, Steurer F, Amann J, Ali M, Chowdhury R, Wagatsuma Y, Williamson J, Crawford S, Breiman RF, Maguire JH, Bern C, Secor WE. Application of an improved method for the recombinant K39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. *Clin Diag Lab Immunol* 2005; 12: 1410-1415.
- Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reyenes J, Mauboussin JM, Oziol E, Dedet JP, Bastien P. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 236-240.
- Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-827.
- Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In Peters W, Killick-Kendrick R (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1987; 1: 1-120, Academic Press, London.

Luz ZMP, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 249-254.

Lyons S, Veeken H, Long J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 733-739.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Salah AB, Bahloul C, Amri F, Dellagi K. Comparative evaluation of Elisas based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 312-320.

Manson-Bahr PEC. The leishmanin test and immunity in Kala-azar. *East. Afr Med J* 1987; 38: 1596-1601.

Maurício IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 1999; 237-246.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assesment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 3038-3041.

Medrano FJ, Jiménez-Mejias E, Calderón E, Regordan C, Leal M. An easy and quick method for the diagnosis of visceral Leishmaniasis in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 1993; 7: 1399.

Meredith SEO, Kroon NCM, Sondorp E, Seaman J, Goris MGA, Ingen CW, Oosting H, Schoone GJ, Terpstra WJ, Oskam L. Leish-Kit, a stable direct agglutination test based on free-ze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microb* 1995; 33: 1742-1745.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS* 1994; 8: 277-91.

Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzamczar D, Cobo S, Mallolas J, Yebra M, Gallego. A Visceral Leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect* 1990; 21: 261-270.

Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2454-2457.

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and indirect fluorescence antibody test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. No prelo 2008.

Piarroux R, Gamberelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for the diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 745-749.



- Pintado V, Martin-Rabadañ P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV) - Infected and Non-HIV Infected Patients. *AIDS* 2001; 80: 54-73.
- Pizzuto M, Piazza M, Sense D, Scalomogna C, Calttini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral Leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type I. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 357-361.
- Rabello A, Andrade MO, Disch J. Co-infecção Leishmania/HIV. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31:81-91.
- Rabello A, Orsini M, Dish J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 17-28.
- Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipnetich S, O'Keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 76-80.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12: 315-317.
- Sarker CB, Momen A, Jamal MF, Siddiqui NI, Siddiqui FM, Chowdhury KS, Rahman S, Talukder SI. Immunochromatographic (rK39) strip test in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Mymensingh Med J* 2003; 12: 93-97.
- Sengupta PC. Immunodiagnosis of calazar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63:46.
- Schallig HDFH & Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Intern Health* 2002; 7: 641-651.
- Schallig HD, Canto-Cavaleiro M, Silva ES da. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 1015-1018.
- Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 66-68.
- Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting calazar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 568-572.
- Singh S & Sivakumar R.. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*, 2003, 49: 55-60.
- Shrout P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statistical Methods in Medical Research* 1998; 7: 301-317.
- Sundar S, Maurya R, Singh RK, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A, Rai M, Kumar K, Murray

W. Rapid noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in india: Comparison of two immunochromatographic tests for detection of anti-K39 antibody. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 251-253.

Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, Ray M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2005; 100: 533-537.

Sundar S & Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-958.

Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998; 351: 563-565.

Werneck G, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The Urban Spread of Visceral Leishmaniasis: Clues from Spatial Analysis. *Epidemiology* 2002; 13: 364-367.

Wu Z, Bao Y, Yu M, Lu L, Zhang Y. An experimental study on application of PCR in detection of Kala-azar. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28: 167-172.

Zijlstra EE, Siddig M, El-Hassan PA, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager M. Calazar: comparative study of parasitological, A methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 505-507.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 6: 108-113.