



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES VISANDO
O DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICO
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

MARCO ANTONIO ARAUJO SILVANY

**Salvador - Bahia
2001**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

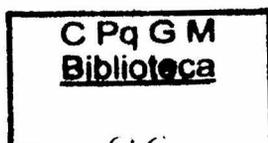
**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES VISANDO
O DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICO
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Marco Antonio Araujo Silvany

Orientador: Lain Carlos Pontes de Carvalho

**Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.**

**Salvador – Bahia – Brasil
2001**



**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – BA**

Silvany, Marco Antonio Araujo

558.52. Avaliação de antígenos recombinantes visando o desenvolvimento de teste imunodiagnóstico para leishmaniose visceral / Marco Antonio Araujo Silvany. - Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, 2001.

139p. : il. tab.

**Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)-
Universidade Federal da Bahia, 2001.**

**1. Imunodiagnóstico. 2. Antígenos recombinantes. 3.
Leishmania chagasi. I. Título.**

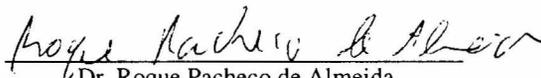
CDU 577.22:616.993.161-07

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE TESTE
IMUNODIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

MARCO ANTONIO ARAUJO SILVANY

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Médico Pesquisador
Serviço de Imunologia - HUPES



Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO:

- **BIOMANGUINHOS**
- **CAPES**

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), FIOCRUZ-BA, onde este trabalho foi realizado, pela disponibilização de recursos e infra-estrutura.

Em especial, ao Dr. Lain Pontes de Carvalho não apenas por sua orientação segura, mas principalmente pela oportunidade, dedicação, entusiasmo e incentivo em todas as etapas deste curso e desta pesquisa.

Ao Dr. Geraldo Gileno e Dr. Washington Luís Conrado dos Santos pela colaboração e sugestões dadas durante todo o trabalho e pela preparação das bibliotecas genéticas de *Leishmania*.

A Dra. Aldina Barral, Dra. Selma Jerônimo e Dra. Neci Soares pelo fornecimento de soros de pacientes para a realização deste trabalho.

A doutoranda Márcia Teixeira pela amizade e dedicação com que auxiliou em diversas etapas.

A Dra. Solange Peixinho e Dra. Solange Andrade Pereira, primeiras orientadoras de iniciação científica.

A Dra. Iracema Andrade Nascimento por sua competente orientação na iniciação científica, e ao apoio incondicional em momentos difíceis.

À Christina Campos pela valorosa contribuição na normatização da dissertação e das referências bibliográficas e as bibliotecárias do CPqGM pelo auxílio na busca de referências bibliográficas.

A Rosália Meire de Oliveira da Silva por sua inestimável ajuda e competência em todos os momentos do curso de Mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LIMC): Ana, Adriana, Antonedson, as Cláudias, Daniela, Juliana, Lenita, Manoel, Marcelo, Márcio, Marcos, Ricardo, Ruth, Paola, Pedro, Márcia Teixeira, Moacir Paranhos, Paulo Aguiar, Dra. Neci, Dra. Neuza, Livia, Sérgio e Djalma Carvalhal pelo companheirismo e agradável convívio durante todo o período em que estive no laboratório e também aos Laboratórios de Patologia e Biologia Celular (LPBC) e de Patologia e Biologia Molecular (LPBM).

Às pessoas que, apesar de não citadas nominalmente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL. MARCO ANTONIO ARAUJO SILVANY. [INTRODUÇÃO] Como a leishmaniose visceral (LV) ocorre principalmente em áreas onde os serviços de saúde são pouco desenvolvidos, o seu diagnóstico baseia-se principalmente no exame clínico, podendo ela ser confundida com outras doenças. Este estudo tem como objetivo a avaliação de antígenos recombinantes (rAg) visando o desenvolvimento e a validação de um "kit" para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral, que seja simples, barato e possa ser aplicado em condições precárias. O sistema a ser desenvolvido baseia-se no uso concomitante de múltiplas proteínas recombinantes. **[MATERIAL E MÉTODOS]** Vários rAg foram clonados e alguns deles foram analisados para o uso em sorodiagnóstico em 93 soros de pacientes com leishmaniose visceral, selecionados clinicamente e com diagnóstico confirmado parasitologicamente. **[RESULTADOS]** Um total de oito rAgs foi avaliado. Todos os soros de LV reconheceram pelo menos um dos rAgs, sendo portanto a sensibilidade do teste para o conjunto de antígenos, testados isoladamente, de 100%. A especificidade do teste para o conjunto de antígenos, avaliada bem preliminarmente em um total de 36 soros controle (de indivíduos sem leishmaniose), foi também de 100%. Nesta dissertação é descrita também uma maneira simples de identificar em bibliotecas de DNA exatamente rAgs que vão aumentar a sensibilidade de um ensaio imunodiagnóstico. **[PALAVRAS-CHAVE]** imunodiagnóstico; antígenos recombinantes; *Leishmania chagasi*.

ABSTRACT

RECOMBINANT ANTIGENS EVALUATION TO AIM THE DEVELOPMENT OF IMMUNODIAGNOSTIC ASSAY FOR VISCERAL LEISHMANIASIS. MARCO ANTONIO ARAUJO SILVANY. [INTRODUCTION] Since visceral leishmaniasis (VL) occurs in areas where health services are scarce, its diagnosis is based mainly on clinical examination, making possible it to be confounded with other diseases. The objective of this study is to evaluate recombinant antigens (rAg) aiming at developing and validating a kit for immunodiagnosis of the visceral leishmaniasis that were simple, cheap and could be put into practice under precarious conditions. The system to be developed is based on the concomitant use of multiple recombinant proteins. **[MATERIAL AND METHODS]** Several recombinant antigens have been cloned and analysed in order to be used in serodiagnosis with reference to the antibody detection in 93 sera of patients with visceral leishmaniasis, clinically selected and with diagnosis parasitologically confirmed. **[RESULTS]** A total of eight rAgs were evaluated. All sera of VL were recognized at least by one rAg, so that the sensitivity for the group of antigens, isolated tested, was 100%. The specificity, preliminarily evaluated in a total of 36 control sera (of individuals without leishmaniasis) was also 100%. This dissertation describes also a simple way to identify, in genetic libraries, exactly the rAgs that will increase immunoassay sensibility.

Key words: 1. Immunodiagnostic; 2. Recombinant antigens; 3. *Leishmania chagasi*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. LEISHMANIOSE: UM BREVE HISTÓRICO DA DOENÇA.....	16
1.2. LEISHMANIOSE: ALGUNS ASPECTOS GERAIS.....	17
1.3. ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA).....	20
1.4. ALGUNS ASPECTOS DA IMUNOLOGIA E DA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.....	26
1.5. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	29
1.5.1. Diagnóstico clínico.....	30
1.5.2. Diagnóstico parasitológico.....	31
1.5.2.1. Biópsia de baço e fígado.....	32
1.5.2.2. Punção de medula óssea e linfonodo.....	32
1.5.2.3. Cultura de células sangüíneas.....	33
1.5.3. Diagnóstico sorológico.....	33
1.5.3.1. Métodos de detecção de anticorpos.....	35
1.5.3.1.1. Teste do formol-gel.....	35
1.5.3.1.2. Reação de fixação do complemento (RFC).....	36
1.5.3.1.3. Teste da gel difusão (TGD).....	36
1.5.3.1.4. Reação de imunoeletroforese em contra-corrente (IECC).....	36
1.5.3.1.5. Teste de hemoaglutinação indireta (HI).....	37
1.5.3.1.6. Teste de imunofluorescência indireta (IFI).....	38
1.5.3.1.7. Teste de aglutinação direta (DAT).....	39
1.5.3.1.8. Teste de aglutinação de látex.....	41
1.5.3.1.9. Ensaio de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA).....	42
1.5.3.1.10. FAST-ELISA.....	43

2.5.3.1.11. <i>Western blot, dot blot e dot ELISA</i>	44
2.5.3.1.12. <i>Radioimunoensaio (RIA)</i>	47
2.5.3.1.13. <i>Imuno-ensaio "dipstick" (DIA)</i>	47
2.5.3.2. O uso de antígenos recombinantes (rAg) no diagnóstico sorológico.....	49
2.5.3.3. Métodos de detecção de antígenos.....	53
2.5.4. <u>Ensaio para detecção de DNA ou RNA parasitário</u>	55
2.5.5. <u>Outros métodos diagnósticos</u>	57
II. <u>OBJETIVOS</u>	63
3.1. OBJETIVO GERAL.....	63
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
III. <u>JUSTIFICATIVA</u>	64
IV. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	65
1.1. SOROS.....	65
1.2. LISADO DE <i>Leishmania</i>	65
1.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	66
1.4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>L. chagasi</i>	67
1.5. DESENVOLVIMENTO DO TESTE MULTISTICK-LEISH COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>Leishmania chagasi</i>	68
5.1. <u>Sensibilização das tiras com antígenos e construção dos "sticks"</u>	68
5.2. <u>Detecção de anticorpos</u>	69
5.3. <u>Resumo do teste</u>	70
5.4. <u>Leitura do ensaio</u>	72
6. UM ATALHO METODOLÓGICO PARA AUMENTO DE SENSIBILIDADE: AMPLIANDO O NÚMERO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	73
7. CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	74
8. PROTOCOLOS DE ABSORÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Escherichia coli</i> DO SORO.....	74
9. SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. chagasi</i>	75
10. DOT-ELISA.....	76
11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E "WESTERN BLOT".....	77

12. AVALIAÇÃO DOS AGENTES DE BLOQUEIO DE REAÇÕES INESPECÍFICAS.....	78
13. COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MATRIZES DE MEMBRANAS QUANTO À PRODUÇÃO DE SINAL NO ENSAIO.....	78
14. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	79
V. <u>RESULTADOS</u>	80
1. ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. chagasi</i>	80
2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. chagasi</i> ATRAVÉS DE DOT-ELISA....	82
3. RECONHECIMENTO DE POLIPEPTÍDEOS DE <i>L. chagasi</i> POR SOROS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.....	83
4. AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES NO TESTE MULTISTICK...	86
5. TENTATIVAS DE OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO.....	91
5.1. <u>Absorção de anticorpos anti-<i>Escherichia coli</i> do soro</u>	91
5.2. <u>A ampliação da sensibilidade do Multistick</u>	91
5.3. <u>Avaliação dos agentes de bloqueio de reações inespecíficas</u>	94
5.4. <u>Avaliação de diferentes matrizes sólidas de nitrocelulose</u>	95
5.5. <u>Avaliação da ligação de proteínas a papel de celulose</u>	95
VI. <u>DISCUSSÃO</u>	97
VII. <u>NOVAS POSSIBILIDADES E PROPOSTAS FUTURAS DO PRESENTE ESTUDO</u>	110
VIII. <u>CONCLUSÃO / SUMÁRIO DE RESULTADOS</u>	111
IX. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do teste de <i>Multistick</i> para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	70
FIGURA 2. Padrão de positividade do teste de <i>Multistick</i>	71
FIGURA 3. O uso dos soros falso-negativos para obter antígenos recombinantes relevantes.....	72
FIGURA 4. Semi-quantificação de anticorpos anti- <i>L. chagasi</i> por ELISA.....	81
FIGURA 5. Exemplo de "Western blot" de soros de pacientes com leishmaniose visceral contra lisado de promastigota de <i>Leishmania chagasi</i>	85
FIGURA 6. Exemplo de soros de pacientes com leishmaniose visceral no teste de <i>Multistick</i>	89
FIGURA 7. Reação de soros de 23 pacientes com leishmaniose visceral a um grupo de seis antígenos recombinantes (rAgs).....	93
FIGURA 8. Modificação do número de antígenos recombinantes (rAgs) reconhecidos por 23 soros de pacientes com leishmaniose visceral pela adição de um quinto e um sexto rAg ao painel de rAgs.....	94
FIGURA 9. Sensibilização de diferentes papéis com antígeno.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sumário de dados da literatura sobre diagnóstico laboratorial da LV.....	58
TABELA 2. Positividade de soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios em dot-ELISA contra lisado de promastigotas de <i>L. chagasi</i>	82
TABELA 3. Número de antígenos de <i>L. chagasi</i> reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios em "Western blot" contra lisado de promastigotas de <i>L. chagasi</i>	84
TABELA 4. Frequência de reconhecimento em "Western blot" dos principais antígenos lisado de promastigotas de <i>L. chagasi</i> por soros de pacientes com leishmaniose visceral e de outras leishmanioses.....	85
TABELA 5. Número de soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios, positivos para antígenos recombinantes individuais no teste de Multistick.....	87
TABELA 6. Número de antígenos de <i>L. chagasi</i> reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios.....	88
TABELA 7. Padrão de reconhecimento de soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD), lupus eritematoso sistêmico (SLE) e indivíduos sadios, em relação ao painel total de antígenos recómbinantes (rAg).....	90
TABELA 8. "Dot-blot" em papel de nitrocelulose com antígenos recombinantes de <i>L. chagasi</i> utilizando "pool" de soros diluídos ou não em tampão com 10 % de lisado de bactéria XL 1-Blue.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DAB	3,3 diaminobenzidina
DMSO	Óxido dimetil sulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino-tetracético
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
NP40	Nonidet P40 (óxido octil-fenol-etilênico); detergente não iônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenileno-diamino
PBS	Solução salina fosfatada a 150 mM, pH 7,4
PBS-SBF	Solução de PBS contendo 20% de soro bovino fetal
PBS-T20	Solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfônico; inibidor enzimático
rAg	Antígenos recombinantes
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SMF	Sistema fagocítico mononuclear
T20	Tween 20
Th1	Linfócitos T helper do tipo 1
Th2	Linfócitos T helper do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

I. INTRODUÇÃO

1. LEISHMANIOSE: UM BREVE HISTÓRICO DA DOENÇA

Com o advento da teoria microbiana no final do século XIX e no início do século XX, inúmeras conquistas científicas foram alcançadas, fomentando o desenvolvimento de vários campos da pesquisa biomédica. Com a abertura desse novo cenário, a protozoologia ganha importância com a descoberta de protozoários como agentes de doenças de enorme significado médico-social.

A descrição de protozoários conhecidos com o nome de *Leishmania* data de 1903 (AKTHAR, 2001). Contudo, o registro de doenças semelhantes à leishmaniose é muito mais antigo, remontando ao século I d.C., sendo conhecidas nas Américas desde o ano 400 d.C. (PANDOLPHO, 2001).

Notas de representações de lesões na pele e deformidades faciais têm sido encontradas na cerâmica pré-colombiana do Peru e Equador e datam do primeiro século depois de Cristo (LAINSON, 1983). Elas são evidências que as formas cutâneas e mucocutânea da leishmaniose prevaleciam no Novo Mundo nesse período.

Em 1901, Leishman identificou certos organismos em esfregaços tomados do baço de um paciente que havia morrido de "febre dum-dum" (WORLD..., 1998). Ao mesmo tempo, "Dum-Dum", uma cidade não muito distante de Calcutá, foi considerada como "prejudicial à saúde" (WORLD..., 1998). A doença era caracterizada por debilidade geral, febres com episódios repetitivos e irregulares, anemia severa, atrofia muscular e comprometimento visceral com inchaço excessivo do baço. Inicialmente esses organismos foram considerados como tripanossomos, mas em 1903 Donovan os descreveu como novos seres (AKHTAR, 2001). A ligação entre esses organismos e o *kala azar* foi descoberta eventualmente por Ross, que os chamou de *Leishmania donovani*, sendo então descrito o gênero *Leishmania* (GENARO, 1991).

Na América do Sul, a primeira descrição dessa doença foi feita por Migone e data de 1911 no Paraguai (CANESE et al., 1998). No Brasil, ela foi registrada pela primeira vez em 1913 (SÃO PAULO, 2001), mas somente em

1934, após a identificação de 41 casos, essa doença passou a despertar interesse científico no país (MONTEIRO et al., 1994; HINRICHSEN et al., 2001), sendo que em 1942 já chegava a um total de 165 casos (ALENCAR, 1956), e desde então tem progredido.

2. LEISHMANIOSE: ALGUNS ASPECTOS GERAIS

Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e estão provavelmente em segundo lugar em importância entre as enfermidades causadas por protozoários, ficando atrás apenas da malária (LAINSON; SHAW, 1978). A *Leishmania* é um microorganismo digenético (TANNER, 1996), isto significa que ela pode exibir duas formas a depender do estágio de diferenciação durante o seu ciclo evolutivo: a forma amastigota é intracelular e encontrada no hospedeiro vertebrado parasitando macrófagos e a outra, conhecida como promastigota, é predominantemente encontrada no inseto vetor dos gêneros *Lutzomyia* (LAINSON et al., 1983) e *Phlebotomus* (GEBRE-MICHAEL et al., 1993), albergada no seu trato digestório.

A infecção ocorre quando as fêmeas do inseto vetor, exercendo a hematofagia, inoculam as formas promastigotas metacíclicas infectantes no tecido subcutâneo dos hospedeiros mamíferos, onde são fagocitadas por macrófagos. Dentro dessas células, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas, que passam a proliferar no interior de fagolisossomos. Assim, a característica de todas as infecções de mamíferos por *Leishmania* é o parasitismo intracelular de macrófagos pelas formas amastigotas, sendo estas as responsáveis pela patogenia das infecções (TAYLOR; WILLIAMS, 1992; LUCENA et al., 1996).

De evolução crônica, as leishmanioses apresentam um grande polimorfismo clínico, variando de formas cutâneas frustas até formas viscerais graves, a depender da espécie e cepa do parasito envolvido e da resistência inata e resposta imune dos hospedeiros (CHANG, 1980). As diferentes espécies de *Leishmania* estão associadas a diferentes formas de doença.

Existem cinco principais doenças humanas coletivamente conhecidas como leishmanioses, representando um grupo de patologias variando em gravidade. Encontram-se manifestações cutâneas (leishmaniose cutânea ou botão do oriente, provocada por *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*; leishmaniose mucocutânea ou mucosa, geralmente causada por *L. braziliensis*; leishmaniose cutânea difusa, causada por *L. amazonensis*; e leishmaniose dérmica pós-calazar, causada por *Leishmania donovani* seguindo-se a cura de uma leishmaniose visceral inicial) e viscerais (leishmaniose visceral ou calazar) (ASHFORD, 2000).

A leishmaniose visceral (LV) é mais comumente causada pela *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, mas ocasionalmente outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. amazonensis* na América Latina (BARRAL et al., 1991), *L. tropica* no Oriente Médio (MAGILL et al., 1993), África (MEBRAHTU et al., 1989) ou Ásia (SACKS et al., 1995), são isoladas de pacientes com LV típica.

Na Ásia, a forma visceral da leishmaniose é conhecida sob várias denominações. Na Índia, onde a enfermidade é causada pela *L. donovani*, médicos indianos aplicaram o termo sânscrito *kala-azar*, que significa "pele negra" (referência a uma hiperpigmentação que pode ocorrer no curso da doença) para uma antiga doença definida depois como leishmaniose visceral (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001), ou *kala-jwar*, que quer dizer "febre negra" (PRASAD, 1999). Naquele país, a doença afeta principalmente adultos jovens e, diferentemente da leishmaniose visceral americana, pode ser seguida por leishmaniose dérmica pós-calazar (TANNER, 1996). Na China é denominada *pinkwai* ou *ta-tu-tse-pi* que significa aumento de abdômen (ALENCAR, 1978).

Na Europa é conhecida como anemia esplênica infantil, leishmaniose esplênica infantil, "kalazar infantil" e outras denominações de ordem etiopatogênica. No Brasil, adota-se a expressão de origem indiana, traduzida para a língua portuguesa como "calazar" ou "calazar americano" (ALENCAR, 1978).

Lainson e colaboradores (1987) esclarecem que, apesar de todos esses termos serem usados para descrever a leishmaniose visceral, como também

doença de Sikari, febre de Burdwan e doença de Shabib, o termo usado mais comumente é calazar.

Na leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), a face pode ser gravemente desfigurada (RAMESH; MUKHERLEE, 1995). Essa condição é rara no Mediterrâneo e América Latina, mas pode ocorrer em 10-20% dos casos na Índia (KAR, 1995; SALOTRA et al., 1999b) e em cerca de 50% dos casos de pacientes tratados no Sudão (ISMAIL et al., 1999; GASIM et al., 2000).

Casos de infecção por *Leishmania* têm sido registrados por todos os continentes, exceto na Austrália. De acordo com Williams (1995), as regiões endêmicas da doença cobrem uma vasta área do planeta, envolvendo a maior parte da África, Índia, China, Ásia, os países europeus e africanos da bacia do Mediterrâneo e a maioria dos países latino-americanos. Dessa forma, as leishmanioses ocorrem em mais 100 países tropicais e subtropicais (ASHFORD, 2000) e contabilizam 100.000 mortes por ano (HOMMEL, 1999). Com o aumento das viagens internacionais, casos importados de leishmaniose na população humana e canina têm sido regularmente diagnosticados em regiões onde a doença não é endêmica (MATHIS; DEPLAZES, 1995), por exemplo, em militares norte-americanos que retornaram do Golfo Pérsico (MAGILL et al., 1993).

Por muitos anos, o impacto das leishmanioses na Saúde Pública foi subestimado, principalmente devido à falta de conhecimento dos seus efeitos sobre a saúde, da sua alta prevalência e potencial de disseminação. A incidência anual global da doença está estimada em 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, sendo 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral (DESJEUX, 1992), cuja esmagadora maioria, cerca de 90%, ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (DESJEUX, 1996; BOELAERT et al., 1999b; HOMMEL, 1999). A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de se infectarem por *Leishmania* e que 12-13 milhões já estão infectadas (WORLD..., 1990; GHEDIN et al., 1997).

Nas Américas, atualmente, a infecção por *Leishmania* pode ser encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (CANESE et al, 1998).

O controle da leishmaniose no Novo Mundo é complicado pela variedade de diferentes espécies de *Leishmania* e suas diversas manifestações clínicas e pelo fato que cada parasito tem um único padrão epidemiológico. Além disso, em muitas regiões de endemicidade nas Américas, duas ou mais espécies do parasito são simpátricas (GRIMALDI; TESH, 1993).

3. ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA)

A LVA é causada pela *Leishmania chagasi* Cunha e Chagas, 1937 (MONTEIRO et al., 1994), que muito provavelmente é a própria *L. infantum* (MAURICIO et al., 1999).

A LVA é primariamente uma doença zoonótica em que animais domésticos ou silvestres, tais como raposa, chacal, roedores e lobos, servem como hospedeiros reservatórios. Outros animais nas áreas próximas podem tornar-se infectados e eles são chamados de hospedeiros secundários ou incidentais. De todos hospedeiros animais potenciais, acredita-se que os cães domésticos têm um papel de maior importância na manutenção e transmissão da doença para os seres humanos devido à íntima relação entre homens e cães como animais de estimação (ARIAS, 1996) e a alta prevalência da infecção canina (DIETZE et al., 1997). O papel de marsupiais (TRAVI et al., 1998), burros, camelos e cabras (MUKHTAR et al., 2000) também têm sido investigado na transmissão e manutenção da LV. Leishmaniose felina provocada por *L. infantum* foi descrita (OZON et al., 1998), mas o papel de gatos como reservatórios do parasito é inconsistente.

A leishmaniose visceral na América é semelhante à encontrada no Mediterrâneo (ARIAS et al., 1996). De acordo com o seu modelo epidemiológico, é primariamente uma doença de crianças (JERÔNIMO et al., 1994), condição que já havia sido identificada por Alencar (1956), demonstrando que 66% dos casos acontecem dentro dos primeiros quatro anos de idade e 83 % dentro dos 10 anos de idade. Tal padrão também foi confirmado para a Arábia Saudita (AL-ORAINY et al., 1994), Somália (SHIDDO

et al., 1995a e 1996), Índia e Paquistão, cuja incidência da doença aumentou, nesse último país, 10 vezes na última década (RAB; EVANS, 1995). Crianças com menos de cinco anos representam a maioria dos casos estudados no Mediterrâneo e nas Américas (BADARÓ et al. 1986b; EVANS et al., 1992), na África (SHIDDO et al., 1995b) e na Ásia (RAB; EVANS, 1995).

A doença é de ampla distribuição geográfica e endêmica em várias regiões das Américas, sendo que mais de 90% dos casos de LVA descritos são oriundos do Brasil (GRIMALDI; TESH, 1993; MARZOCHI et al., 1994). Nas Américas do Sul e Central, além do Brasil, está presente em pelo menos 11 países e vem sendo registrada no México (CÓRDOVA-USCANGA et al., 1993; MONROY-OSTRIA et al., 2000), Nicarágua (DUARTE et al., 1994), Honduras (NOYES, 1997), Colômbia (CORREDOR et al., 1999) e Venezuela (CASTRO; CHACÍN-BONILLA, 2000), com casos apontados também na Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru, Guatemala e El Salvador (DESJEUX, 1991; AGUILAR et al., 1998; CANESE et al., 1998; MONTOYA-LERMA et al., 1998). Nos Estados Unidos da América do Norte até o momento só foram registrados focos caninos (SWENSON et al., 1988; EDDLESTONE, 2000).

O endemismo da doença está associado a precárias condições econômicas e sociais das comunidades afetadas, situações precárias de moradia e baixos níveis nutricionais (VIEIRA; COELHO, 1998; THAKUR, 2000). Má-nutrição é um importante fator de risco da leishmaniose visceral (BOELAERT et al., 1999b).

Dados atuais da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA (2000) confirmam que, no Brasil, as leishmanioses ocorrem em praticamente todos os estados, e em 17 deles assinala-se a leishmaniose visceral, nos quais são registrados cerca de 3.500 novos casos no país por ano, com uma letalidade em torno de 10%, índice anteriormente encontrado por Jerônimo e colaboradores (1994), e desnecessariamente alto para uma enfermidade que tem tratamento seguro. Marzochi e Marzochi (1994) registraram um aumento da incidência das leishmanioses em todas as regiões geográficas do país nos últimos anos.

Atualmente no Brasil, a LVA apresenta-se em franca expansão, com o desenvolvimento de novos focos urbanos e peri-urbanos tendo a doença já alcançado a periferia de Belo Horizonte (MG), Corumbá (MS), Natal (RN), Rio de

Janeiro (RJ), Salvador (BA), São Luís (MA) e Teresina (PI), entre outras (COSTA et al., 1990; GENARO et al., 1990; GRIMALDI; TESH, 1993; DOS SANTOS et al. 1993; JERÔNIMO et al., 1994; MARZOCHI et al., 1994; MONTEIRO et al., 1994; VEXENAT et al., 1994; CUNHA et al., 1995; NASCIMENTO et al., 1996; VIEIRA; COELHO, 1998). Casos também têm sido detectados em São Paulo (SÃO PAULO, 2000). Contudo, a distribuição da LV nestas áreas não é uniforme, estando na maioria das vezes associada a áreas de aridez, escassez de alimentos e a localidades densamente povoadas com má condição sanitária (AKHTAR, 2001).

Destaca-se a região Nordeste com 90% dos casos, seguida pela região sudeste e centro-oeste e outros poucos estados (MONTEIRO et al., 1994; ARIAS et al, 1996). Até 1989, 15.000 casos de LVA haviam sido registrados nos estados de Alagoas, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, incluindo Bahia e Ceará (WORLD..., 1998). A doença é altamente endêmica nos estados da Bahia e Ceará, que eram responsáveis por 70% do total de casos de LVA no Brasil em 1991 (WORLD..., 1998). No início da década de 90, o Estado da Bahia apresentou maioria dos casos, com uma média de 500 a 600 casos por ano, principalmente na região interiorana semi-árida. Surtos foram descritos também na região litorânea (EVANS et al., 1992; CUNHA et al., 1995).

Mais recentemente, as cidades de Teresina e São Luís juntas contabilizaram entre 40-50% do número total de casos de LV no Brasil (durante os anos de 1993 e 1994), o que correspondia a aproximadamente 3.000 casos por ano (ARIAS, 1996).

Recentemente os focos de LV têm mudado de localidades rurais para as grandes cidades (JERÔNIMO et al., 1984), provavelmente como um resultado da migração de trabalhadores rurais de seus lugarejos para esses centros urbanos, criando favelas densamente povoadas, vivendo em habitações inadequadas, e possuindo, amiúde, animais de criação em seus quintais, os quais podem ser reservatórios do parasito e/ou servirem como foco de atração para o inseto vetor (MUTINGA et al., 1989; XIMENES et al., 1999). As secas que periodicamente atingem o semi-árido brasileiro ocasionam uma deterioração ainda maior das condições nutricionais e invariavelmente implicam em aumentos expressivos dos casos humanos de LV (VIEIRA; COELHO, 1998).

Em um estudo realizado no interior da Bahia em 1993, Oliveira dos Santos e colaboradores relataram que 83% dos casos de leishmaniose visceral do município de Jequié, encontram-se em áreas urbanas.

Apesar dos esforços da FUNASA no controle da LVA, a doença vem aumentando nos últimos anos, com uma nova e ameaçadora tendência à urbanização. Entre os casos notificados anualmente há razões para acreditar em um percentual importante de subnotificação, principalmente nos casos que não exibem a forma clássica da doença. Estima-se que as infecções assintomáticas sejam 5-20 vezes mais frequentes do que as formas clínicas (HOMMEL, 1999).

A leishmaniose visceral constitui-se, portanto, em um crescente problema de saúde pública, cuja transmissão, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais (LAINSON, 1983; LAINSON et al., 1983), adquiriu perigosas feições urbanas e já ocorre em cidades de médio e grande porte, em área domiciliar ou peri-domiciliar.

A imunossupressão, causada tanto por medicamentos, como esteróides (DAVIDSON, 1999), por exemplo, e por outras doenças (PEARSON; SOUZA, 1996), tem sido relacionada como fator desencadeante da LV.

Na literatura, os dados sobre o período de incubação da leishmaniose visceral são controversos. Para Lesho (1991), Pearson e Sousa (1996), Vecsei e colaboradores (2001), ele é longo, variando de seis a oito meses. Contudo, esse tempo de incubação pode ser tão curto como 24 horas (THAKUR et al., 1981) ou 10 dias (ABÍNZANO et al., 1997), ser de dois anos (DAVIDSON, 1999) ou durar até quatro anos (NETO, 1978), mas o período normal parece ser de dois a seis meses (ALVAR et al., 1997). Se não houver tratamento, a doença será fatal (WILSON; STREIT, 1996). Os sintomas e sinais clínicos na LV variam individualmente e de acordo com a região geográfica e representam um espectro da doença que tem muitas manifestações (GRIMALDI; TESH, 1993). Em uma extremidade estão os pacientes com a leishmaniose visceral clássica, que apresentam febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hipergamaglobulinemia e que têm uma doença com evolução prolongada, com sinais de desnutrição protéico-calórica, abdômen protuso, alterações de pele, cabelos quebradiços e cílios alongados (SÃO PAULO, 2000). A doença começa de forma insidiosa e tem um curso crônico (KAR,

1995). Essas manifestações clínicas da leishmaniose visceral refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear e a resposta imunitária do indivíduo, e as alterações degenerativas desse processo (FUNDAÇÃO..., 2000).

No outro extremo da doença estão as pessoas com infecções assintomáticas, ou de resolução espontânea, por *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi*. A proporção de infecções de resolução espontânea em relação às que resultaram em LV clássica varia geograficamente e com a idade do indivíduo; existem registros a partir de 6,5:1 até 18:1 no nordeste do Brasil (BADARÓ et al., 1986b; EVANS et al., 1992); em Israel ela é muito maior (EPHROS et al., 1994). Embora muitos indivíduos infectados não exibam manifestações clínicas da doença, ou mesmo apresentem quadros atípicos (HERNÁNDEZ et al., 1999), alguns experimentam sintomas brandos antes de progredirem para a forma clássica da doença ou para cura espontânea (BADARÓ et al., 1986a; ABRAMSON et al., 1995).

Desse modo, observa-se que muitos dos indivíduos infectados apresentam forma inaparente ou oligossintomática da infecção, e que o número de casos graves ou com o cortejo de sintomatologia manifesta é relativamente pequeno em relação ao de infectados.

A LV pode ser complicada por sérias infecções bacterianas secundárias tais como a pneumonia, disenteria ou tuberculose pulmonar, que na maioria das vezes contribuem para a alta taxa de mortalidade dos pacientes com LV. Outras complicações, apesar de raras, são a anemia hemolítica, danos renais agudos e severa hemorragia de mucosas (WORLD..., 1998).

Embora lesões na pele não ocorram normalmente, foi recentemente demonstrado que infecções cutâneas com espécies tradicionalmente associadas com doença visceral são possíveis (REED, 1996) e muitos destes casos têm sido associados com a co-infecção por HIV (WILLIAMS, 1995).

A partir da década de 80, a literatura tem apresentado registros, no Ocidente, do aumento da incidência de LV em adultos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (BADARÓ et al., 1986c). Essa infecção concomitante por HIV também aumenta a probabilidade do desenvolvimento de uma LV progressiva em crianças (ALVAR et al., 1997).

A LV emergiu como uma importante infecção oportunista em pessoas contaminadas por HIV principalmente no sudoeste europeu (JIMÉNEZ et al., 1995; MURRAY, 1999), em países como Portugal, Espanha, França e Itália (DESJEUX, 1999), mas também em outros continentes, como na Ásia, África e América do Sul (inclusive no Brasil) (BORGES et al., 1999; DESJEUX, 1999; SÃO PAULO, 2000). Essa co-infecção tem surgido como resultado da sobreposição geográfica de regiões endêmicas para leishmaniose visceral e para AIDS (MURRAY, 1999), seja pela disseminação da AIDS em áreas rurais e da leishmaniose visceral em áreas urbanas (SÃO PAULO, 2001), ou ainda pela sua extensão para as camadas mais pobres da população (SÃO PAULO, 2000), o que nos faz supor que a prevalência da co-infecção LV-HIV venha a aumentar nos próximos anos (ALVAR et al., 1997; BORGES et al., 1999).

A LV pode manifestar-se em uma forma atípica em pessoas com infecção por HIV (FORMIGA-RAMOS et al., 1994; VICANDI et al., 2000). Contudo, nem todos os indivíduos concomitantemente infectados por HIV e *Leishmania* são sintomáticos (MURRAY, 1999). Grande número de casos de LV tem sido registrados em pessoas imunocomprometidas por reativação de doença pregressa (PEARSON; SOUZA, 1996; SÃO PAULO, 2000), ou depois de transplantes de órgãos (BERENQUER et al., 1998; FRAPIER et al., 2001). A depleção de células CD4⁺ induzida pelo HIV pode modificar alguns aspectos clínicos da LV, incluindo a resposta ao tratamento e a propensão à recidiva (ALVAR et al., 1997). Assim, discutem-se as possibilidades de que os casos de leishmaniose em co-infecção com HIV sejam decorrentes de infecções primárias que se disseminaram em consequência da imunossupressão induzida pelo HIV, ou resultem de reativações de infecções latentes (ALVAR et al., 1997; BORGES et al., 1999).

A predominância dos casos de co-infecção em grupos de usuários de drogas (WORLD..., 1998), levou Alvar e Jimenez (1994) a postular uma relação de transmissão direta inter-humana através de troca de seringas. Essa hipótese foi fundamentada por pelo menos dois outros argumentos: (1), Alvar e colaboradores (1997) relatam que parasitos podem ser isolados do sangue periférico de pacientes no diagnóstico inicial, portanto pacientes co-infectados abrigam *Leishmania* circulantes no sangue; (2) Campino e colaboradores (1994) encontraram *Leishmania donovani* MON-18 infectando paciente com HIV

que havia partilhado agulha ou seringa com outros usuários de drogas, em região onde apenas *L. infantum* era presente. Resultados similares também foram descritos por Dedet e Pratlong (2000), ou seja, espécies particulares ou zimodemas de *Leishmania* foram referidas fora da região onde elas são habitualmente endêmicas.

Também tem sido apresentados casos na Índia de co-infecção entre leishmaniose visceral e malária (BHATTACHARYYA; HATI, 1995; NANDY et al., 1995), contudo a importância dessa relação ainda não foi esclarecida.

4. ALGUNS ASPECTOS DA IMUNOLOGIA E DA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

No hospedeiro com LV, a *Leishmania* não está confinada aos macrófagos do sítio da infecção. A doença resulta de uma infecção sistêmica do sistema retículo-endotelial (SRE) e o parasito pode ser encontrado em macrófagos na maior parte desse sistema (PINELLI et al., 1994; WILLIAMS, 1995). As conseqüências, evolução e severidade da infecção por *Leishmania* em mamíferos dependem amplamente da resposta imune do hospedeiro, particularmente do microambiente pré-existente de citocinas (MOSMANN; COFFMAN, 1989; BARRAL-NETTO, 1992; BARRAL-NETTO et al., 1998), que por sua vez pode depender da constituição genética, de fatores do parasito (virulência da cepa e tamanho do inóculo) e do vetor (CHANG, 1980; GRIMALDI; TESH, 1993; KHARAZMI et al., 1999; VICANDI et al., 2000).

Quando o hospedeiro é infectado por um parasito, segue-se o estabelecimento de uma íntima relação entre os dois, os quais passam a funcionar como um novo organismo complexo (TANNER, 1996). Como parasito intracelular obrigatório (GRIMALDI, 1982; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994), a *Leishmania* dispõe de estratégias complexas para evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro postos em ação em diferentes momentos da infecção da célula do hospedeiro. Esses mecanismos de defesa ocorrem:

- a. antes da penetração na célula — processos mediados pelo complemento (McCOY et al., 1998; BRITTINGHAM et al., 2001);

- b. durante e logo após a penetração na célula — efeito tóxico dos metabólitos de oxigênio produzidos durante a explosão respiratória induzida pelo macrófago (EREL et al., 1999);
- c. após a penetração na célula — efeitos não-oxidativos das hidrolases lisossomais ou do óxido nítrico (MAÜEL; RANSIJN, 1997; EREL et al., 1999).

O lipofosfoglicano (LPG) é o principal glicoconjugado de superfície de *Leishmania*, está envolvido na entrada e ancoramento do parasito ao macrófago e atua promovendo efeitos inibitórios diretos sobre enzimas lisossomais e enzimas hidrolíticas dessa célula hospedeira (PRASAD, 1999). Importante papel também tem sido atribuído a moléculas excretadas-secretadas pelo parasito, que facilitam a sua penetração no macrófago como também sua sobrevivência intracelular (CIBRELUS et al., 1999). Barral-Netto e colaboradores (1992) relataram que macrófagos infectados pela *Leishmania amazonensis* produzem grandes quantidades de fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), que inibe a fagocitose do parasito. Resultado semelhante ocorre também como consequência da ligação de anticorpos do hospedeiro à superfície da *Leishmania*, induzindo a produção de interleucina 10 (IL-10) pelos macrófagos, o que inibe a ativação dos mesmos e diminui a sua produção de IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KANE; MOSSER, 2001).

O sistema fagocítico mononuclear (SFM) responde à invasão dos parasitos com intensa proliferação celular, resultando no aumento do volume dos órgãos ricos em células do SFM (hepatoesplenomegalia) (MICHEL et al., 1988). No fígado, células de Kupffer e ocasionalmente hepatócitos são parasitados e no baço ocorre uma maciça hiperplasia do SRE; exames histológicos mostram graus variáveis de formação de granulomas, e a inflamação intersticial pode conduzir à fibrose (SHAHI et al., 1998).

Ocorre elevação da fração globulina no plasma (GRIMALDI; TESH, 1993). As imunoglobulinas resultantes da diferenciação plasmocitária não são todas específicas contra o parasito, algumas são autoanticorpos (ARGOV et al, 1989), especialmente fator reumatóide (SHAHI et al., 1998), podendo ser o resultado de uma ativação policlonal (GALVÃO-CASTRO et al., 1984). O

sistema complemento é ativado e imunocomplexos, comumente contendo IgM, circulam em títulos altos (CARVALHO et al., 1983; GALVÃO-CASTRO et al., 1984; SHAHI et al., 1998). A medula óssea sofre atrofia dos elementos hemoformadores (CORTÉS et al., 1997), já que as células são desviadas para combater o parasitismo através de sua função macrofágica. Surge então um quadro hematológico representado por pancitopenia, mais especificamente leucopenia, anemia e tendência hemorrágica, devida à baixa das plaquetas (PRASAD, 1999). A destruição celular acarretada pelos parasitos provoca febre com comprometimento do estado geral do indivíduo infectado (SÃO PAULO, 2000). Durante o período ativo da doença observa-se a negatividade do teste de Montenegro (hipersensibilidade do tipo retardado), que se torna positivo dentro de alguns meses após o tratamento eficaz, enquanto declinam os níveis de anticorpos séricos (GENARO, 1991).

A progressão da LV está relacionada com uma pequena proliferação de linfócitos e reduzida produção de IL-2, IFN- α e IL-12 por linfócitos periféricos quando estimulados *in vitro* por antígeno de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1985; CARVALHO et al., 1992; BACELLAR et al., 2000). Esses dados, obtidos a partir de pacientes brasileiros com LV, foram também encontrados em casos indianos de LV (HALDAR et al., 1983).

Resumidamente, a resistência do hospedeiro está associada com a ativação de células do tipo T helper (Th) CD4⁺ do grupo 1, que se caracterizam pela secreção de um padrão muito distinto de citocinas, como por exemplo, a IL-2 e o IFN- γ . Células Th1, além de estimular a produção de anticorpos da classe IgG2a, que são efetivos na ativação do complemento e na opsonização de células para fagocitose, podem promover uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) e ativarem macrófagos para destruir *Leishmania*. Por outro lado, as infecções progressivas e fatais estão correlacionadas com a ativação da resposta de células CD4⁺ Th2, que mediam a resposta humoral, inibem a ativação de macrófagos, produzindo IL-4 (que estimula a produção dos anticorpos IgE e IgG1), IL-5 (um fator de ativação de eosinófilos), IL-6, IL-10 e IL-13, entre outras citocinas (ROMAGNANI, 1991), e TGF- β , responsável por atividades antiinflamatórias, como a inibição de macrófagos e outros leucócitos (BARRAL-NETTO et al., 1992). Essa dicotomia Th1/Th2 na resposta

de células T aos antígenos de *Leishmania* existe tanto na leishmaniose humana (KHARAZMI et al., 1999) quanto no modelo murino da leishmaniose cutânea (NOORMOHAMMADI et al., 2001).

Basicamente, o sucesso da infecção dependerá da resposta desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado, pois a exarcebação de uma resposta do tipo Th2 em detrimento de um padrão Th1, a presença de uma imunossupressão antígeno-específica durante a fase aguda (CARVALHO et al., 1989), a desativação de macrófagos por ação de citocinas (BARRAL-NETTO et al., 1992), e o aumento de IL-10 mesmo em presença de IFN- γ (KARP et al., 1993; GHALIB et al., 1993), levam o hospedeiro ao fracasso no controle da infecção.

Contudo, a produção diferencial de citocinas derivadas de células Th1 ou Th2 não influencia a taxa de cura induzida por vacina na leishmaniose visceral murina (KAYE et al., 1991). Mensagem para IL-4 também foi detectada em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV (CARVALHO et al., 1994), e essa citocina foi encontrada no soro desses pacientes (KEMP et al., 1993). Além disso, células T de pacientes recuperados de LV mostram um padrão misto de produção de IFN- γ e IL-4 (KHARAZMI et al., 1999), e de IFN- γ com IL-10 durante a fase ativa da doença (GHALIB et al., 1993; KARP et al., 1993; CILLARI et al., 1995). Esse último registro confronta os dados obtidos por Carvalho e colaboradores (1985 e 1992) e Bacellar e colaboradores (1991 e 2000), que descreveram a ausência ou níveis significativamente baixos de IFN- γ e IL-2 durante a fase ativa da doença, condição revertida após quimioterapia. A existência deste conflito reforça a opinião que o papel atual da rede de citocinas na leishmaniose humana necessita ser mais bem definido (BARRAL-NETTO et al., 1998).

5. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Métodos que permitam que as infecções sejam corretamente diagnosticadas são pré-requisitos para um controle efetivo da doença, assim a necessidade de boas ferramentas diagnósticas é grande. E isto não se justifica

apenas para uso em áreas endêmicas, mas também para um correto diagnóstico em pessoas com passagem por essas regiões.

A grande incidência anual da LV parece motivar a busca de estratégias que permitam, com segurança, determinar a ocorrência de infecção provocada pela *Leishmania chagasi*.

Os métodos diagnósticos para a leishmaniose podem ser classificados em:

- a. Diagnóstico clínico.
- b. Diagnóstico parasitológico pela demonstração dos parasitos.
- c. Métodos sorológicos e imunológicos, através da detecção de anticorpos ou antígenos.
- d. Técnicas usando DNA de cinetoplasto (kDNA) ou DNA complementar (cDNA).

Por limitações econômicas, o diagnóstico da LVA muitas vezes baseia-se exclusivamente em critérios clínicos e sorológicos (COSTA et al., 1990; AZAZY et al., 1997).

A discussão seguinte irá tentar sublinhar alguns problemas com o diagnóstico da leishmaniose visceral e focalizará os pontos que parecem ser mais promissores na direção do desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, baratos, sensíveis e específicos. Detalhes aprofundados das técnicas fogem dos objetivos desta revisão.

Como a LV é encontrada principalmente em comunidades carentes e em áreas rurais de países subdesenvolvidos, é imperativa a disponibilidade de testes diagnósticos baratos e confiáveis.

5.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico preliminar é baseado nos sintomas e sinais cardinais da LV, tais como esplenomegalia, hepatomegalia e febre alta irregular. Contudo esses sintomas considerados isoladamente não são adequados para diferenciar LV de outras condições similares tais como a malária, febre recorrente, abscesso hepático e tripanossomíase. De acordo com a FUNASA

(2000) somam-se a essas entidades outras patologias: brucelose, febre tifóide, esquistossomose hepatoesplênica, linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme, etc. Assim, o diagnóstico clínico da LV é complicado pelo fato de que seus sinais e sintomas confundem-se com aqueles de um grande número de outras doenças infecciosas.

Mesmo que o paciente apresente o quadro clássico da doença, o diagnóstico clínico deve estar amparado em outros testes adequados. Reed (1996) relata a ocorrência de caso em criança de área endêmica que foi diagnosticada de forma errada, baseado na detecção microscópica de organismos intramacrofágicos, que quando tratada com antimoniais, morreu de infecção fúngica.

5.2. Diagnóstico parasitológico

Muitas pessoas preferem os métodos parasitológicos em relação aos métodos sorológicos, especialmente em indivíduos de áreas endêmicas, onde as populações estão potencialmente expostas às diversas espécies do gênero *Leishmania*, assim como a outros patógenos tais como *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Plasmodium sp*, *Brucella abortus* e ao *Mycobacterium tuberculosis*, cujos antígenos mostram reatividade cruzada com antígenos das espécies de *Leishmania* visceralizantes (JAFFE et al., 1984; SCOTT et al., 1991; TEIXEIRA; VEXENAT, 1996). Desta forma, considera-se que o diagnóstico só é conclusivo com a evidência do parasito (GRIMALDI; TESH, 1993; SUNDAR et al., 1998; ASHFORD, 2000). Contudo, o diagnóstico parasitológico requer a realização de procedimentos invasivos – punções de baço ou de medula óssea. Estes procedimentos implicam em altas taxas de risco e/ou em dor para o paciente, e exigem (no caso da punção de baço) a existência de uma equipe cirúrgica de plantão, pois em muitos pacientes com LV existe um risco aumentado de hemorragia (OREN et al, 1991). Além disso, na maioria das vezes, quando o parasitismo é raro, fazem-se necessárias técnicas demoradas de cultivo celular (SIDDIG et al., 1988).

Por outro lado, além das dificuldades técnicas que experimentam os modestos hospitais rurais para a realização desses procedimentos, a escassez de amastigotas no aspirado de medula de muitos pacientes complica a confirmação parasitológica nos casos em que o indivíduo se encontra na fase inicial da doença (EL-MASUM et al., 1995), o que torna a sensibilidade dessa abordagem bastante baixa e, portanto, inadequada para estudos epidemiológicos.

5.2.1. Biópsia de baço e fígado

A observação de parasitos no baço e fígado é o mais exato método disponível para determinar infecções por *Leishmania*, contudo ele é controverso por causa dos riscos e complicações (WILLIAMS, 1995). Noventa e cinco por cento dos casos ativos mostram parasitos nos aspirados esplênicos ou de fígado (SHAHI et al., 1998). Parte do aspirado esplênico pode ser usado para fazer esfregaços para exame direto ao microscópio e o restante deve ser cultivado, por exemplo, em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) ou meio de Schneider suplementado com 10 % v/v de soro bovino fetal. Contudo, apesar da cultura de parasitos certamente ter valor em mãos qualificadas, este método leva uma semana ou mais para produzir resultados.

O material da biópsia do fígado é menos apropriado do que o de baço para a demonstração de parasitos ao exame direto ou em cultura, sendo os amastigotas observados nas células de Kupffer no sistema porta. Siddig e colaboradores (1988) encontraram que o aspirado esplênico é mais adequado do que as punções de medula óssea ou de linfonodo, que apresentaram sensibilidade variando entre 54% a 86% para a detecção de amastigotas em esfregaço de tecido corado ou de promastigotas em cultura (SIDDIG et al., 1988).

5.2.2. Punção de medula óssea e linfonodo

Punção do esterno ou cristas ilíacas é um método de obtenção de medula infectada, porém doloroso. Essa técnica também é menos capaz de evidenciar parasitos em exame direto do que a punção no baço (WILLIAMS, 1995).

Contudo, a cultura de medula fornece resultados positivos em até 80% dos casos. A punção de linfonodo apresenta resultados positivos em 60% dos casos. Ela é realizada em qualquer linfonodo aumentado e o material obtido é submetido tanto a exame direto quanto a cultivo, para melhorar as chances do diagnóstico.

5.2.3. Cultura de células sanguíneas

Encontrar *Leishmania* no sangue é possível algumas vezes, em pacientes com LV na Índia (SARAN et al., 1997), em metade dos pacientes usuários de drogas injetáveis co-infectados com *Leishmania* e HIV (ALVAR et al., 1997), e em casos de severo imunocomprometimento (SHAHI et al., 1998). O sangue com anticoagulante é centrifugado a 2.000 g por 10 min e a camada de células brancas é removida e usada para preparar esfregaços e inocular culturas. Os amastigotas podem ser encontrados dentro e ao redor dos macrófagos. O volume usado para inocular a cultura é importante, uma a três gotas da papa de leucócitos sobre meios NNN ou de Schneider dão bons resultados (WILLIAMS, 1995). Considera-se que o diagnóstico definitivo por este método só pode ser feito se tanto o núcleo quanto o cinetoplasto são vistos no parasito, pois podem aparecer muitos outros corpos, como artefatos e outros microorganismos, que tem superficialmente aspecto de amastigotas, o que acaba diminuindo a viabilidade desse procedimento diagnóstico.

5.3. Diagnóstico sorológico

O único recurso disponível para confirmar o diagnóstico clínico da LV nos hospitais da rede pública costuma ser o exame parasitológico, onde se pode detectar o parasito no aspirado de medula óssea, baço ou fígado.

As dificuldades descritas na seção anterior quanto ao diagnóstico parasitológico levaram ao desenvolvimento de ensaios sorológicos.

O diagnóstico sorológico, no caso da LV, é baseado na presença de anticorpos séricos específicos. Existem vários métodos sorológicos

disponíveis para o diagnóstico da LV, variando em sensibilidade e especificidade. Com o avanço do conhecimento científico, novos e melhores métodos estão continuamente tornando-se disponíveis.

Alerta Williams (1995) que problemas que afetam todos os testes sorológicos são: (1) a produção do antígeno, que não é disponível comercialmente; (2) mais importante, a padronização do antígeno preparado. Essa é a principal razão pela qual todos os testes sempre devem ser realizados com padrões de soro negativos e positivos de títulos conhecidos.

Estima-se que em apenas um de cada cinco ou 10 pessoas imunocompetentes infectadas por *Leishmania*, a doença evoluirá para a forma clínica (DESJEUX, 1991; HOMMEL, 1999), o que traz uma significativa desvantagem para o uso de testes sorológicos em áreas endêmicas, já que a soroconversão não indica necessariamente a instalação da LV (ATTAR et al., 2001).

Uma das críticas mais freqüentes levantadas contra o diagnóstico pela detecção de anticorpos é de que a evidência conseguida é apenas indireta e o resultado pode não ser indicativo de infecção ativa, pois pode refletir uma infecção anterior (LANOTTE et al., 1979; POZIO et al., 1981; ABRANCHES et al., 1991; CABRAL et al., 1992; GENARO et al., 1992; KASHIWAZAKI et al., 1994). Assim, os resultados dos métodos de detecção de anticorpos podem ser considerados potencialmente falhos quando comparados com evidências mais diretas do parasito ou de seus antígenos no sangue ou urina. Outra crítica comum sobre a detecção de anticorpos é que os títulos não se correlacionam bem com a intensidade da infecção.

Uma vantagem dos testes de detecção de anticorpos reside na própria natureza da enfermidade, haja vista que na leishmaniose visceral anticorpos específicos podem ser facilmente detectados durante a doença (CHATTERJEE et al., 1999). Conseqüência disso é que respostas de anticorpos podem ser detectadas precocemente na infecção como também depois de seis a nove meses após o paciente estar curado (WILLIAMS, 1995). Essa característica permite que uma única diluição do soro seja utilizada, em que apenas os soros de pacientes com leishmaniose visceral sejam reativos. Está demonstrado no trabalho para diversas enfermidades infecciosas de Kashiwazaki e

colaboradores (2000), que o uso de diluições minimiza o efeito das reações cruzadas com outras doenças.

Além disso, enquanto ensaios de detecção de anticorpos podem ser rotineiramente executados em amostras de sangue que foram coletadas em papel de filtro, papel de filtro convencional provoca perda de sensibilidade na detecção de antígeno e teias de fibras de polipropileno especialmente formuladas são necessárias. Também, amostras de sangue ou urina para detecção de antígenos geralmente tem que ser pré-tratadas com ácido tricloroacético ou álcalis antes que eles possam ser usados no ensaio, e a detecção de antígenos necessita da produção e aplicação de um reagente adicional na forma de um anticorpo (monoclonal) que capture o antígeno.

Atualmente os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral são o ELISA, a imunofluorescência indireta e o DAT (REED, 1996). Esses exames demonstram facilmente altos títulos de anticorpos específicos para *Leishmania* na maioria dos pacientes.

5.3.1. Métodos de detecção de anticorpos

5.3.1.1. Teste do formol-gel

Essa técnica, ou antes, a formol-gelificação, foi usada por Gaté e Papacostas na sífilis e por Mackie e Napier, em 1924, na leishmaniose humana (SILVA LEITÃO, s.d.). É um dos mais antigos testes ainda em uso para a LV (SHAHI et al., 1998).

O teste do formol-gel tem a vantagem de ser barato, de simples execução e adequado para trabalhos de campo. O soro obtido do sangue é misturado com uma gota de formaldeído a 30%. A reação positiva é mostrada se a mistura solidifica e forma um precipitado branco opaco dentro de 20 minutos. Um teste positivo pode não ser detectado até três meses depois da infecção e tornar-se negativo apenas seis meses depois da cura (KAR, 1995).

O teste não é específico, pois é baseado na detecção de níveis elevados de IgG e IgM (GENARO, 1991), que também podem ser resultado de outras doenças como lupus eritematoso sistêmico (GUPTA, 1969), tripanossomíase, malária e esquistossomíase (WORLD..., 1998). Ele pode apresentar ainda

resultados positivos na cirrose infantil, e apenas uma reação muito intensa pode diferenciar essa condição da LV (PRASAD, 1999). Seu uso não se justifica hoje em dia à luz da moderna tecnologia imunológica. Apesar disso, de acordo com Bern e colaboradores (2000), essa técnica, aliada ao diagnóstico clínico, ainda é de uso corrente no Nepal.

5.3.1.2. Reação de fixação do complemento (RFC)

Trata-se de um método muito utilizado no diagnóstico da LV humana ou canina (GENARO, 1991). Apresenta uma sensibilidade muito boa, apesar da observação de reações cruzadas, em títulos baixos, com a doença de Chagas, sífilis (SHAHI et al., 1998), tuberculose e hanseníase (SINGH, 1999). Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro (geralmente superiores a 1:80). Títulos menores necessitam de confirmação por outras metodologias. Para Kar (1995), o teste é considerado muito útil no diagnóstico precoce e no monitoramento dos efeitos do tratamento, embora já se tenha afirmado que o RFC possui valor limitado no diagnóstico de rotina do laboratório (GUPTA, 1969).

5.3.1.3. Teste da gel difusão (TGD)

O TGD é um teste simples e seu uso tem sido bem sucedido para o estudo da LV em soros de seres humanos, cães e hamsters e na procura por reservatórios caninos (KAR, 1995). Ele detecta anticorpos usando antígenos congelados ou liofilizados, mas podem ser utilizados apenas em áreas onde não existem outros patógenos com reatividade cruzada com *Leishmania*, o que limita bastante a especificidade do método.

5.3.1.4. Reação de imunoeletroforese em contra-corrente (IECC)

O IECC é mais sensível do que o TGD, e é executado em menor tempo (REZAI et al., 1977). O princípio geral desse teste é que o movimento da maioria das proteínas do soro dá-se em direção ao anodo, exceto as

gamaglobulinas, que se dirigem ao cátodo quando submetidas a um potencial elétrico em uma solução com pH 7,2. Essa propriedade é usada no teste de reação de imunoeletroforese. O anticorpo move-se em direção ao cátodo sob um fluxo eletro-osmótico e antígenos carregados negativamente movem-se para o anodo e se precipitam em contato com o antissoro. O teste de IECC é um teste diagnóstico confiável na LV e pode apresentar melhores resultados do que o ELISA na detecção de casos precoces da infecção (KAR, 1995), sendo por isso indicado para detecção de infecções assintomáticas em análises de campo, em associação com o teste de Montenegro para avaliar exposição prévia ao antígeno. Contudo, esse teste pode apresentar resultados falso-positivos em população sadia em áreas endêmicas (SINGH, 1999).

5.3.1.5. Teste de hemoaglutinação indireta (HI)

No teste de HI, hemácias de carneiro lavadas são incubadas com ácido tânico e então sensibilizadas com antígeno solúvel de *Leishmania* e depois ressuspensas em tampão com soro de coelho sadio. O teste é executado com diluições seriadas da amostra de soro, pré-inativado a 56° C, em placas de microtitulação. A HI é uma reação de fácil execução, com boa sensibilidade, e foi introduzida por Cascio e colaboradores em 1963 (KAR, 1995), porém com menor especificidade do que os outros testes descritos abaixo. Contudo, a queda do título de anticorpos para valores abaixo do considerado positivo pode ser usada como um marcador de cura clínica da LV.

Sharma e colaboradores (1998) desenvolveram um ensaio de hemoaglutinação rápido, exato, barato e não invasivo para o diagnóstico da LV na Índia. Este HI é baseado na ligação seletiva e altamente específica da lectina achatinina H, ao ácido siálico 9-O-acetilado (9-O-AcSA), que aparece exclusivamente nos eritrócitos de pacientes com LV. O ensaio mostrou 100% de sensibilidade e especificidade com nenhuma reação cruzada com malária, tuberculose ou controles saudáveis de áreas endêmicas e não endêmicas, sendo razoável propor então o 9-O-AcSA, ausente em hemácias normais, como um importante biomarcador, e que adicionalmente, também reflete indiretamente a presença do parasito. Por suas altas especificidade e

sensibilidade, e por detectar casos ativos, esse ensaio merece consideração clínica.

5.3.1.6. Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

Em 1964, Duxbury e Sadun mostraram que o IFI é bastante confiável para o diagnóstico de pacientes com LV (SHAHI et al., 1998), e permite uma boa discriminação entre a fase aguda e de remissão da doença (MILLESIMO et al., 1996).

Para a realização do IFI utiliza-se o parasito íntegro fixado em lâmina. A reação antígeno-anticorpo é visualizada pelo uso de um anticorpo anti-imunoglobulina conjugado a fluoresceína. Títulos abaixo de 1/20 não são significativos, e acima de 1/128 são diagnósticos (WILLIAMS, 1995). Em áreas livres da doença de Chagas, o IFI é completamente seguro para o diagnóstico de LV. Entretanto, a aquisição e a manutenção de um microscópio de fluorescência pelos hospitais da rede pública, além da obrigatoriedade da existência de pessoal treinado para operar o microscópio, são aspectos que comprometem o seu emprego no diagnóstico sorológico.

Não obstante tal dificuldade, o diagnóstico da LV no Brasil, em especial da leishmaniose visceral canina, é feito empregando quase sempre o método de IFI (BRAGA et al., 1998). A opção por essa técnica parece ter sido baseada em critérios econômicos e técnicos na época de sua escolha. Embora apresente menor sensibilidade que o ELISA (PARANHOS-SILVA et al., 1996), o IFI é uma técnica familiar no Brasil para o diagnóstico de outras enfermidades, e pode apresentar especificidade superior à encontrada no ELISA (MANCIANTI et al., 1995). Além disso, o custo do método é bastante reduzido, principalmente quando diluições únicas do soro são empregadas para o diagnóstico. Essa era a técnica adotada pela FUNASA em sua campanha para o controle da LV. Para cães, por exemplo, sangue periférico colhido em papel de filtro da orelha de cães domiciliados era levado pelo agente da FUNASA para um laboratório central, onde era processado. Após análise, o agente da FUNASA voltava ao local e sacrificava os cães cuja sorologia tinha sido

positiva (CABRERA et al., 1999). Para esse fim, o uso de um método mais sensível que o IFI seria mais indicado.

IFI é amplamente utilizado devido à facilidade de sua execução, embora algumas reações cruzadas tenham sido documentadas em indivíduos infectados por *T. cruzi*. Embora amastigotas de secções congeladas, ou de esfregaços de órgãos infectados possam ser usados como antígenos, promastigotas obtidos *in vitro* representam a fonte mais comum de antígenos. O uso de amastigotas como antígeno no IFI torna o método mais sensível quando comparado com o uso de promastigotas (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 1999).

5.3.1.7. Teste de aglutinação direta (DAT)

O DAT foi descrito primeiramente por Allian e Kagan em 1975 (KAR, 1995), é um teste específico, sensível e confiável, sua execução é barata e simples e títulos de soros positivos alcançam até 1:3200 (EL-MASUM et al., 1995). O antígeno é preparado a partir de promastigotas e o teste pode ser executado com plasma, soro, ou sangue total (WILLIAMS, 1995). A leitura do teste é realizada a olho nu contra um fundo branco e as reações positivas são indicadas por uma nítida mancha de cor e margem azul. Contudo, a decisão de considerar um ponto azul ampliado é subjetiva (MEREDITH et al., 1995).

O teste foi modificado, por Harith e colaboradores (1986), para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, e é considerado altamente adequado para amplos trabalhos epidemiológicos e ecológicos de campo e para o diagnóstico da LV, possuindo nas mãos de Harith e colaboradores (1986 e 1987) 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade. No relato de Joshi e colaboradores (1999) foi encontrada alta especificidade com valores preditivos positivos e negativos de respectivamente, 100% e 99,2 %.

Zijlstra e colaboradores (1991), na busca de um teste diagnóstico simples para emprego em áreas rurais endêmicas e durante epidemias, realizaram um estudo prospectivo para avaliar o desempenho do DAT contra outros exames diagnósticos diretos e encontraram também alta sensibilidade, mas não conseguiram diferenciar entre infecções passadas, assintomáticas ou ativas.

Recentemente, tem existido uma forte corrente, principalmente asiática, para aplicação do DAT no sorodiagnóstico da LV, tanto em seres humanos quanto em cães. Os trabalhos de Shiddo e colaboradores (1995a e 1995b), Rab e Evans (1995), Schaefer e colaboradores (1995), Edrissian e colaboradores (1996) e Mukhtar e colaboradores (2000) são alguns exemplos dessa afirmação. A razão desse movimento parece residir na simplicidade do DAT, que não requer nenhum equipamento sofisticado ou habilidades especiais. Os reagentes são considerados estáveis e baratos, o que favorece as aplicações em campo e em laboratórios que realizam apenas poucos testes por ano, mas Boelaert e colaboradores (1999c) alertam que o DAT pode perder sensibilidade no campo como consequência de manejo e armazenamento errado.

Meredith e colaboradores (1995), preocupados com a estabilidade do antígeno utilizado no DAT, desenvolveram um preparado antigênico que se mostrou estável em temperatura ambiente por um período prolongado de tempo. Entretanto, esse antígeno congelado e liofilizado, formado para constituir a base de um kit sorodiagnóstico para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, batizado como *Leish-KIT*TM, apenas diferiu da sua forma aquosa, como comumente utilizada em ensaios do DAT, em condições de laboratório, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre os títulos dos DATs com um outro antígeno quando utilizados em condições de campo, onde não existe nenhuma sofisticação tecnológica.

Boelaert e colaboradores (1999c) procuraram validar operacionalmente o DAT para a LV em pessoas com sintomas clínicos e em indivíduos sadios (sem sinais ou sintomas). Aspirado de medula óssea foi realizado em todos pacientes suspeitos e nas pessoas sadias com resultado do DAT positivo. O estudo apresenta resultados que merecem ser considerados: (1) as altas sensibilidade e especificidade são vistas de modo duvidoso devido a problemas no estabelecimento do padrão-ouro; (2) pessoas com outras doenças que promovem reação cruzada com LV podem ser mais comuns (freqüentes) em um grupo de pacientes com sintomas clínicos do que em um grupo saudável; e finalmente (3) a exatidão do diagnóstico é criticamente dependente da escolha do ponto de cut-off. Acrescentam ainda os autores em razão das questões levantadas que se um paciente clinicamente suspeito

produzir um DAT positivo, o tratamento não deve ser realizado baseado apenas neste resultado.

Outra grande desvantagem do DAT é que ele não tem valor prognóstico para avaliar a progressão da doença (RAJ et al., 1999). Kar (1995) acrescenta que o teste é incapaz de distinguir entre infecção precoce e depois da cura, ainda que ele possa demonstrar a transformação de casos assintomáticos em clínicos na LV (JOSHI et al., 1999).

O incansável grupo de Boelaert, que publicou no mesmo ano pelo menos quatro trabalhos sobre o mesmo tema, explorou métodos para estabelecer a especificidade do DAT em uma amostra de pacientes clínicos para LV (BOELAERT et al, 1999d). O objetivo era avaliar se a análise potencial de classe (*latent class analysis* - LCA) poderia solucionar os problemas associados com o padrão-ouro corrente e então diminuir a incerteza observada na especificidade do DAT no cenário clínico, e dessa forma estabeleceram uma especificidade de 85%, que era menor do que a apresentada em outros trabalhos do mesmo grupo (BOELAERT et al., 1999a), mas que era mais consistente e confiável. O grupo estabeleceu que o LCA é um modelo matemático que fornece uma ferramenta útil para validação desse tipo de investigação.

5.3.1.8. *Teste de aglutinação de látex*

Cummins e colaboradores (1994) desenvolveram um teste de aglutinação de látex, que de acordo com as vantagens atribuídas a ele, poderia ser utilizado como ferramenta de triagem para estudos da LV em campo. Mas apesar da sensibilidade do teste ser superior a de outros métodos, como IFI e IECC, ele não superou o DAT.

Attar e colaboradores (2001) descreveram um novo teste de aglutinação de látex, o "KATEX" (*kala azar latex agglutination*), para detecção de antígenos de *Leishmania* na urina de pacientes com LV. O teste mostrou 100% de especificidade, não existindo reação cruzada com amostras de urina de controles de área endêmica, desde que a amostra fosse fervida, pois urina fresca produziu cerca de 24,0% de resultados falso-positivos. Contudo, a sensibilidade desse teste variou entre 68 e 100%, estando fortemente

relacionada à localidade geográfica dos doadores da urina. Baixa sensibilidade e elevada especificidade também foram relacionadas por Singh (1999) para testes de aglutinação de látex.

5.3.1.9. Ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA)

O ELISA indireto tem se tornado um método muito difundido para quantificação de anticorpos. Ele é aplicável a muitos antígenos e é simples e rápido de executar (LEHTONEN; VILJANEN, 1980).

No ELISA indireto normalmente utilizado no diagnóstico da LV, o antígeno preparado a partir de promastigotas é fixado em um suporte sólido. O anticorpo específico liga-se ao antígeno e é detectado por um segundo anticorpo ligado à enzima. O ELISA indireto foi introduzido por Hommel (1978) na leishmaniose humana e canina. Pode ser executado com soro, plasma e eluatos de sangue coletado em papel de filtro (WILLIAMS, 1995).

Badaró e colaboradores (1986d) avaliaram um ELISA indireto para diagnóstico da LV em soros de pacientes com manifestações agudas de LV, de pacientes hospitalizados por outras patologias endêmicas ou de pacientes com leishmaniose mucocutânea. Eles registraram 98 % de sensibilidade e 96 % de especificidade no ensaio, estabelecendo que o ELISA é um teste sensível e específico para o diagnóstico da LV, preferencialmente quando o antígeno utilizado é proveniente de parasitos da mesma área onde o soro foi coletado. Paranhos-Silva e colaboradores (1996), em estudo sorológico canino, apontaram o ELISA como sendo mais sensível que o IFI. O uso do ELISA demonstrou ser mais confiável do que a imunofluorescência indireta para estudos de campo devido à menor possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Badaró e colaboradores (1986d) e Rachamin e colaboradores (1991), compararam as técnicas de imunofluorescência indireta, ELISA indireto e um ELISA competitivo usando anticorpos monoclonais anti-*L. donovani* espécie-específicos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, encontrando valores levemente maiores de detecção pelo ELISA indireto e

ELISA-competitivo. Estes autores sugerem que ensaios imunoenzimáticos podem ser utilizados para o diagnóstico da doença no lugar da imunofluorescência, por possuírem alta sensibilidade e serem mais simples e rápidos, além de, como apontado por Kar (1995), permitirem a triagem de um grande número de amostras.

Apesar da alta especificidade, resultados falso-positivos podem ocorrer (WILLIAMS, 1995), principalmente em baixas diluições do soro (KAR, 1995). A utilização do ELISA nos hospitais da rede pública é dificultada pelas faltas de equipamento apropriado para leitura dos ensaios e de antígenos comerciais.

Variações no ELISA têm sido propostas, desenvolvidas e testadas, principalmente no que se refere ao tipo do antígeno usado e também para produzir um formato de fácil leitura em campo (SNOWDEN; HOMMEL, 1991). Antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais também têm sido utilizados no ELISA de forma bem sucedida (JAFFE; MCMAHON-PRATT, 1987; SINHA et al., 1992; PASSOS et al., 1997; ZIJLSTRA et al., 1998; CHATTERJEE et al., 1999; JENSEN et al., 1999; RAJ et al., 1999).

O FML (ligante da fucose-manose) é formado por um conjunto de frações de glicoproteínas isoladas de promastigotas e amastigotas do complexo da *L. donovani* que interferem nas interações parasito-macrófagos *in vitro* (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1993). Essas glicoproteínas são usadas como antígeno no FML-ELISA, que tem uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 96% no diagnóstico da LV humana em pacientes brasileiros infectados com *L. chagasi* e identifica também infecções assintomáticas (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1995). A glicoproteína GP36, principal componente imunógeno do FML, é reconhecida de modo específico pelos soros desses pacientes (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1996). O FML-ELISA mostrou ainda 100% de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LV em soros de cães naturalmente infectados (CABRERA et al., 1999).

5.3.1.10. FAST-ELISA

O FAST-ELISA™ ("Falcon assay screening test"-ELISA) é uma versão modificada do ELISA que utiliza, na placa de microtitulação, "beads" de poliestireno recobertos com antígenos em lugar dos poços recobertos por

antígenos. Sua adaptação para uso em programas de controle em leishmaniose canina serviu de base para um trabalho de Ashford e colaboradores (1993). Os resultados obtidos indicaram que esse sistema fornece um teste indireto válido para o diagnóstico em campo da leishmaniose canina.

5.3.1.11. *Western blot, dot blot e dot-ELISA*

"Western blot" e "dot blot" ou "dot-ELISA" são métodos qualitativos que estão tornando-se amplamente utilizados, em que uma enzima conjugada a anticorpos anti-imunoglobulina é usada para detectar a presença da ligação do anticorpo primário a antígenos do parasito adsorvidos a uma matriz de nitrocelulose, através do desenvolvimento de um precipitado colorido insolúvel sobre papel de nitrocelulose, facilmente visualizado.

A membrana de nitrocelulose (NC) oferece um substrato com várias vantagens técnicas sobre fases sólidas convencionais. As membranas têm uma maior capacidade de ligação a proteínas devido à sua porosidade e conseqüente grande área de superfície. Com as fases sólidas convencionais, a cinética das reações entre os reagentes imobilizados e solúveis é limitada pela difusão dos elementos solúveis, fazendo-os entrar em contato com os componentes insolúveis. Devido a sua capacidade de fluxo, as membranas permitem que o componente líquido seja atraído ativamente através dos poros. Isto traz o reagente solúvel rapidamente para um contato íntimo com os sítios reativos na superfície. Como conseqüência, o tempo de reação pode ser significativamente reduzido. Contudo, nem todos os problemas associados a fases sólidas convencionais (p.ex., a ligação inespecífica de proteínas) inexistem em membranas de nitrocelulose. As proteínas ligam-se às membranas através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou iônicas. Essa ligação é indiscriminada e reversível. Há registros na literatura que a sensibilidade e reprodutibilidade de um suporte sólido de imunoensaio é limitado pela capacidade dos anticorpos em permanecer ligados à matriz sob as condições do ensaio. Além disso, a adsorção passiva de uma proteína nas superfícies hidrofóbicas pode causar sua inativação. Membranas hidrofílicas

modificadas suportam a ligação de proteínas covalentemente, oferecendo uma solução importante para esses problemas. As proteínas que se ligam a tais membranas são retidas em suas conformações nativas. As membranas de nylon podem ter uma superfície modificada com grupos ativos para ligação de proteínas covalentemente, e outras membranas possuem grupos amino, que também podem ser utilizados para a ligação covalente de proteínas (DE SAEGER; VAN PETEGHEM, 1996).

O dot-ELISA e o ELISA têm uma boa correlação entre si (KAR, 1995), sendo que o dot-ELISA não necessita de equipamentos caros ou sofisticados, tais como leitor de ELISA, placas de ELISA, etc.

Também se tem utilizado reagentes e técnicas para melhorar a sensibilidade do diagnóstico tal como proteína A ou G e ouro coloidal (REED et al, 1990; DIETZE et al, 1995). O dot-ELISA foi simplificado e modificado por Scott e colaboradores (1991), que desenvolveram um ensaio de imunomarcção simples para sorodiagnóstico da doença visceral ativa, utilizando um conjugado de ouro coloidal com proteína A, em substituição ao conjugado anti-imuglobulina-enzima e ao substrato para a enzima, bem sucedido em estudos de campo. A simplicidade desse imunodot o torna um bom candidato para triagem como teste diagnóstico de campo, já que não requer tubos, placas de titulação ou instrumentos caros.

Vercammen e colaboradores (1998) desenvolveram um teste rápido, de alta sensibilidade, especificidade e praticidade para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães utilizados o modelo do dot-ELISA, que apontava os resultados dentro de 30 minutos.

O "Western blot" é altamente sensível e específico, e oferece grandes detalhes sobre o perfil de antígenos envolvidos porque ele permite uma análise detalhada da resposta imune humoral para distinguir proteínas do parasito (SALOTRA et al, 1999a). A presença de bandas de massa molecular de 14 kDa e/ou 16 kDa tem sido usada como critério de positividade de infecção por *L. infantum* (MARY et al., 1992). Vexenat e colaboradores (1996) encontraram pelo menos 29 bandas, variando entre oito e 250 kDa, de antígeno solúvel de *L. chagasi* reconhecidas por soros de pacientes com LV em "Western blot". Em relação a *L. donovani*, Shiddo e colaboradores (1996) mostraram o reconhecimento de bandas de 74 e 88 kDa por anticorpos dos

soros de todos os pacientes com LV testados, enquanto no estudo de Salotra e colaboradores (1999a) os antígenos de 40, 55, 65, 70 e 82 kDa foram reconhecidos mais freqüentemente. O antígeno de 70 kDa foi reconhecido pela maioria dos pacientes com LV com uma sensibilidade de 94% e especificidade de 90%, podendo ser útil para o imunodiagnóstico (SALOTRA et al., 1999a). Antígenos de 32 a 35 kDa parecem ser específicos para soros de pessoas com infecção por *L. chagasi* e não reagem cruzado com soros de pessoas com infecção por *L. amazonensis*, já antígenos de 62 a 68 kDa foram reconhecidos por todos os indivíduos com *L. chagasi* e *L. amazonensis* (REED et al., 1987), indicando que eles não são espécie-específico, mas não reagiram cruzado com o soro de pessoas infectadas com *T. cruzi*. A maioria dos soros de pacientes com LV reconhece antígenos de 65 a 66 kDa de amastigotas de *L. donovani* (ARORA; SEHGAL, 1989). Uma resposta de anticorpo positiva contra a fração antigênica de 200 kDa de amastigotas foi descrita em 96,6 % de pacientes confirmados com LV (KAUL et al., 2000). Maior reatividade de anticorpos do soro de pacientes com infecções ativas por *Leishmania* foi encontrada contra um antígeno de 38 kDa expresso por promastigotas cultivados a 37° C do que contra o expresso por promastigotas cultivados a 25° C (FEHNIGER et al., 1990).

Entretanto, algumas condições podem afetar o desempenho do "Western blot" no reconhecimento de casos de LV. De acordo com Salotra e colaboradores (1999a), atividade de anticorpos em pessoas com AIDS podem ser 50 vezes menores do que os encontrados em pacientes com imunidade normal. O trabalho de Santos-Gomes e colaboradores (2000), utilizando a técnica de "Western blot" para detectar anticorpos anti-*Leishmania*, encontraram 100% de especificidade e sensibilidade em pacientes imunocompetentes, taxa reduzida para 73,2% e 70,6%, respectivamente, quando a análise era conduzida em pacientes HIV positivos co-infectados com *Leishmania*. Nesse último grupo, poucos foram os antígenos reconhecidos e as bandas mostraram baixa intensidade, sendo freqüentes as de 63 a 66 kDa (55,9%), que parecem corresponder ao antígeno de superfície do parasito gp63. Esse antígeno tem sido indicado como um potencial antígeno diagnóstico (REED et al., 1990).

O reconhecimento de diferentes bandas de antígenos de espécies envolvidas com a forma visceral da leishmaniose por soros de pacientes com as várias formas tegumentares da doença tem sido extensamente documentado. Essas bandas sugerem a presença de determinantes antigênicos comuns e explicam as reações sorológicas cruzadas (TEIXEIRA; VEXENAT, 1996). Proteínas solúveis de *L. chagasi* formaram quatro bandas de reconhecimento com soros de pacientes com leishmaniose mucosa e pelo menos 15 bandas do antígeno solúvel de *L. braziliensis* foram reconhecidas por soros de pacientes com LV (VEXENAT et al., 1996). Proteínas de 20 kDa (antígeno insolúvel) e de 19, 36 e 70 kDa (antígenos solúveis) tem sido implicadas nessas reatividades cruzadas (BRITO et al., 2000).

O "Western blot" tem sido utilizado também no imunodiagnóstico de outras doenças parasitárias como a esquistossomose, diferenciando infecções recentes e crônicas (VALLI et al., 1999).

Apesar dos potenciais desta técnica, sua aplicação em laboratórios de diagnóstico de rotina ainda carece de mais análises.

5.3.1.12. *Radioimunoensaio (RIA)*

Este teste apresenta resultados similares aos encontrados no ELISA. Ele é sensível ao nível de 2 µl de soro e 1 a 2 µg de antígeno (ROSEN et al., 1986). Contudo, por utilizar substâncias radioativas, ele entrou em desuso. O trabalho de Jaffe e McMahon-Pratt (1987) é um dos poucos que existem que utilizaram essa técnica no diagnóstico da LV.

5.3.1.13. *Imuno-ensaio "dipstick" (DIA)*

O nome "dipstick" tem origem industrial, correspondendo a uma haste graduada para medir a altura do nível de conteúdo de tanques de combustível. Sua aplicação serviu de inspiração para sistemas de testes imuno-sorológicos resultando em um formato (papel marcado com vários "dots"), que pode ser utilizado para detecção de antígenos do parasito ou de anticorpos específicos, através de procedimentos de "dot blot", que têm se mostrado adequados e muito eficientes no diagnóstico e em estudos epidemiológicos.

O DIA é um teste barato, simples e robusto que pode ser usado para detecção de múltiplos antígenos ou anticorpos (SNOWDEN; HOMMEL, 1991).

Mistrello e colaboradores (1995) desenvolveram um ensaio de "dot" para detecção de anticorpos específicos para antígeno de cisto hidático. Esse método é uma modificação do sistema previamente descrito por Snowden e Hommel (1991), que combinava procedimentos "dot blotting" e uso de partícula de corante coloidal ligada a anticorpo para produção de um teste "dipstick" para detecção de antígenos.

O uso de partículas coloidais inorgânicas (p. ex., ouro e a prata) como marcadores em imunoenaios já era descrita desde o início dos anos 80 (LEUVERING et al., 1980), principalmente como alternativa ao radioimunoensaio.

Gribnau e colaboradores (1982 e 1983) utilizaram com sucesso partículas coloidais de corantes hidrofóbicos como marcadores em imunoenaios. Por tratar-se de marcadores não radioativos, sintetizados quimicamente, consistindo em uma ampla faixa de corantes comercialmente disponíveis e, principalmente, baratos, esperava-se o desenvolvimento de um grande número de técnicas que utilizassem essa metodologia. Contudo, somente em 1991 um primeiro trabalho relevante foi produzido por Snowden e Hommel, e só mais recentemente, nos últimos anos, os trabalhos de Gribnau foram redescobertos, principalmente com o uso de corantes coloidais têxteis (NATARAJU et al., 1994; RABELLO et al., 1995).

A vantagem do uso de partículas de corante é que a cor pode ser visualizada diretamente, ou seja, os pontos formados no dipstick podem ser observados sem necessidade de qualquer reação adicional. Essa característica possibilita a aplicação no campo desse imunensaio utilizando corante coloidal (SNOWDEN; HOMMEL, 1991).

Bührer e colaboradores (1998), comparando um método "dipstick" com o ELISA para detectar anticorpos contra *Mycobacterium leprae*, chegaram à conclusão de que o primeiro era a melhor escolha para a realização de um mapeamento epidemiológico da hanseníase, sendo adequado para uso em países tropicais e suportando diferentes condições, não dependendo de nenhum equipamento especializado. Snowden e Hommel (1991) relataram ter encontrado um grau de concordância entre o ELISA e o DIA de 100%.

Gussenhoven e colaboradores (1997) também encontraram alto grau de concordância entre os resultados de um ensaio ELISA e um tipo de "dipstick" para *Leptospira*, sendo que esse último foi mais fácil de ser executado e mais rápido, não necessitando de eletricidade ou equipamento especial, e todos os componentes do teste, o "dipstick" e seus reagentes, puderam ser armazenados por longo período sem perder reatividade, mesmo em temperaturas elevadas.

ParaSight™ (Becton Dickinson), ICT Malaria Pf™ (ICT Diagnostics) e OptiMAL™ (Flow Inc.) são os primeiros testes imunocromatográficos, patenteados que usam o modelo "dipstick" para o diagnóstico da malária.

O OptiMAL™, que usa anticorpos policlonais e monoclonais, marcados com ouro para detecção de infecções por *Plasmodium*, é capaz inclusive de discriminar as infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax*, com sensibilidade média de 91,3% em áreas onde ambos parasitos estavam presentes, e de 98,2% onde não há infecção mista, mostrando assim sua eficiência como teste diagnóstico (JOHN et al., 1998). Lee e colaboradores (1999), comparando ainda métodos de PCR com o exame microscópico do esfregaço sanguíneo e o OptiMAL™ para diagnóstico de malária, encontraram nos resultados do OptiMAL™, considerando os resultados de PCR como padrão, uma especificidade de 100% e 98,6% e uma sensibilidade de 92,8% e 92,6%, respectivamente, para *P. vivax* e *P. falciparum*, concluindo que esse teste de "dipstick" é adequado para o diagnóstico rápido e seguro da malária.

Outras vantagens do teste "dipstick" com corante coloidal, comparado ao ELISA, residem nos fatos de que a incubação do cromógeno enzima/substrato pode ser omitida, portanto diminuindo o tempo de execução do ensaio, e de que não existe necessidade de refrigeração. Além disso, os reagentes utilizados no "dipstick" com corante coloidal não são cancerígenos ou perigosos, como alguns utilizados no ELISA.

Bern e colaboradores (2000) avaliaram o desempenho de um "dipstick" com antígenos recombinantes para diagnóstico da LV no Nepal, obtendo 100% de especificidade e sensibilidade. Este modelo além de mais barato do que os métodos tradicionais, também fornece o resultado em pouco tempo.

5.3.2. O uso de antígenos recombinantes (rAg) no diagnóstico sorológico

A sensibilidade e especificidade da maioria dos testes sorológicos discutidos anteriormente dependem do antígeno usado, que é na maioria das vezes, formado por promastigotas íntegros ou por seu lisado. Isto limita a especificidade do teste e também levanta sérios problemas com a produção de antígenos padronizados. Esses problemas afetam, por exemplo, o ELISA indireto que utiliza lisado parasitário, o DAT, o IFI e o "Western blot".

Estudos recentes tem procurado o desenvolvimento de antígenos recombinantes que são mais específicos, isto é, que não produzam reações falso-positivas com soros de pacientes com outras doenças.

A clonagem e expressão de material genético de *Leishmania* utilizando-se DNA complementar (cDNA) ou genômico foi realizada pela primeira vez em 1986 por Sheppard e Dwyer, que selecionaram 90 clones que produziam antígenos de *L. donovani*, alguns dos quais se mostravam específicos para anticorpos presentes no soro de pacientes com LV. Depois disso, grande número de genes nucleares e de superfície tem sido clonado e identificado. Esses genes têm sido alvos do desenvolvimento de drogas ou vacinas para controle da *Leishmania*, pois eles podem ser responsáveis pela virulência do parasito ou pela adaptação deste ao hospedeiro vertebrado (RYAN et al., 1993; BERBERICH et al., 1997; ALCE et al., 1999; ALLEN et al., 1999; LARRETA et al., 2000; BRITTINGHAM et al., 2001). Esses fatos, aliados à existência de genoma relativamente pequeno com cerca de 10^7 - 10^8 pares de base (REQUENA et al., 1997), têm estimulado o estudo do material genético da *Leishmania* com novos métodos de abordagem.

A partir de então, diversos antígenos protéicos e peptídicos provenientes dos genes de *L. chagasi* têm sido descritos na literatura. Os antígenos recombinantes de *L. chagasi* são, na maior parte, expressão de fragmentos de genes, contra os quais evidenciam-se intensidades variáveis de atividade de anticorpos nos pacientes (SALOTRA et al., 1999a).

O rK39, um potente antígeno de amastigota comum aos membros do complexo de *L. donovani* (BURNS et al., 1993), tornou-se disponível comercialmente em vários formatos de teste — FAST-ELISA e dipstick de nitrocelulose (HOMMEL, 1999). O rK39 também teve desempenho superior a

outros dois antígenos purificados de *Leishmania*, uma proteína citossólica (p36) e uma proteína de membrana (gp63), para o imunodiagnóstico da LV (QU et al., 1994).

Presente em muitos trabalhos pela alta sensibilidade e especificidade (BADARÓ et al., 1993; HOUGHTON et al., 1998; IBRAHIM et al., 1999), o K39 foi visto como antígeno de *L. donovani* definitivo e um ensaio batizado com o nome de TRALd (teste rápido de anticorpo contra *Leishmania donovani*) foi desenvolvido para permitir a sua aplicação prática no imunodiagnóstico da LV (REED et al., 1990). O TRALd passou a ser visto também como um instrumento promissor em programas de controle da LV (MONTEIRO et al., 1994). Entretanto, recentemente seu status de método perfeito começou a ser questionado. O próprio grupo que descreveu o K39 apressou-se em somar ao TRALd um outro antígeno, o K26, como forma de corrigir a sensibilidade do seu ensaio, haja vista que o K39 apenas identifica casos de LV ativa (BADARÓ et al., 1996), deixando de reconhecer as formas assintomáticas da doença (BHATIA et al., 1999).

O estudo conduzido por Sundar e colaboradores (1998) avaliou a utilidade do K39 por meio de tiras de nitrocelulose impregnadas com o antígeno. O teste envolvia passos simples e os autores estabeleceram a sensibilidade e a especificidade como sendo de 100% e 98% respectivamente, razão pela qual ele foi considerado adequado. Contudo duas questões não respondidas pelo trabalho ainda permaneciam - quão rapidamente o teste do K39 torna-se negativo em paciente com tratamento bem sucedido e se esse teste pode diagnosticar corretamente pacientes positivos também para HIV. Essas questões já estavam sendo investigadas por Houghton e colaboradores (1998), que analisaram o desempenho do K39-ELISA em pacientes com o vírus HIV e afirmaram que ele é efetivo também no diagnóstico de pessoas imunocomprometidas, podendo ter valor prognóstico no monitoramento do tratamento e em prever recidivas clínicas, apesar da constatação de Gari-Toussaint e colaboradores (1994) de que um considerável número de pacientes infectados com HIV carece de níveis detectáveis de anticorpos.

Zijlstra e colaboradores (1998) testaram um ELISA com o K39, e encontraram uma sensibilidade de 93 %, mas também neste trabalho, títulos de anticorpos permaneceram altos por até 24 meses após tratamento bem

sucedido. Estes dados mostram que formato do teste em que o antígeno recombinante é empregado parece interferir em sua sensibilidade.

Para dirimir dúvidas, Zijlstra e colaboradores (2001) apresentaram sua experiência com as tiras de nitrocelulose (como utilizado por Sundar e colaboradores em 1998) e compararam seu desempenho com o K39-ELISA e o DAT em pacientes com LV ativa, que foram acompanhados mesmo depois de findo o tratamento e determinaram que o seu "strip test" é o formato ideal para uso em campo, porém com importantes limitações, pois em geral, como o resultado positivo do teste irá sustentar o diagnóstico clínico naqueles pacientes que apresentam os sintomas clássicos da LV e como esse resultado positivo pode ser o resultado de infecções passadas e não ser relevante para doença atual, esse teste deve ser usado com cautela.

Zijlstra e colaboradores (2001) comentam ainda sobre discrepâncias entre trabalhos que, utilizando o K39 no mesmo formato em diferentes países do mundo, mostraram resultados marcadamente diferentes. As razões sobre essas divergências na resposta de anticorpos não foram esclarecidas, mas talvez estejam associadas com idade, constituição genética do grupo étnico dos indivíduos testados, gravidade da doença, tempo de infecção, etc.

Jelinek e colaboradores (1999) avaliaram um teste imunocromatográfico do tipo "dipstick" para o diagnóstico de LV usando o K39, e mostraram que embora a especificidade do ensaio fosse de 100%, a sensibilidade era de que 71,4%. Outros pesquisadores também têm encontrado sensibilidade e especificidade inadequadas do teste "dipstick" com K39, quando ele foi usado no Sudão (HOMMEL, 1999). O TRALd deixou de confirmar também 14,2 % de cães com infecção comprovada por *L. chagasi* (CABRERA et al., 1999).

Outros antígenos recombinantes também têm sido propostos. Jensen e colaboradores (1999) usaram proteínas hidrofílicas recombinantes da superfície da *Leishmania* em um ELISA para o imunodiagnóstico da leishmaniose e afirmaram que o teste desenvolvido por eles não diferiu de um ELISA com o K39. Apesar disto, a repercussão do seu trabalho foi menor, talvez pelo formato do teste ter sido inadequado. Indubitavelmente, o TRALd é mais adequado para trabalhos em campo do que o ELISA.

Ghosh e colaboradores (1999) apresentaram o antígeno recombinante ORFF. Raj e colaboradores (1999) mostraram, baseado em resultados obtidos

por ELISA, o potencial desse antígeno para o sorodiagnóstico de infecção por *L. donovani*, sendo inclusive cerca de 10 vezes mais sensível do que o antígeno total solúvel de promastigotas. Embora esse estudo demonstre grande sensibilidade do método utilizando o antígeno em ensaios de laboratório, são necessários ainda testes em campo que atestem sua utilidade.

Proteínas ribossomais ácidas recombinantes de *L. infantum*, conhecidas como P2, foram utilizadas por Soto e colaboradores (1996) para avaliar o uso potencial destes antígenos no sorodiagnóstico da LV e da leishmaniose cutâneo-mucosa humanas. Apesar dessas proteínas serem indicadas no diagnóstico da LV canina, o uso das mesmas no diagnóstico da leishmaniose humana pode ser comprometido pela existência de reatividade cruzada contra essas proteínas no soro de pacientes com doença de Chagas e lupus eritematoso sistêmico (SLE).

O uso de antígenos recombinantes tem sido recomendado também no diagnóstico diferencial entre doenças causadas por agentes infecciosos com reatividade antigênica cruzada. Passos e colaboradores (1997) demonstraram a capacidade da proteína recombinante Tc24 em identificar soro de pacientes com doença de Chagas, sem reação cruzada com anticorpos de pacientes com leishmaniose.

5.3.3. Métodos de detecção de antígenos

Desjeux e colaboradores (1980) foram os primeiros a observar que antígenos secretados ou excretados pelos parasitos podem ter um papel potencial para o diagnóstico da infecção. É conhecido que *Leishmania* cultivada libera componentes de sua superfície celular (SCHNUR, 1982) e vários trabalhos na literatura citam a presença de moléculas de natureza glicoprotéica ou carboidratos excretadas ou secretadas pelo parasito no meio de cultivo (PALATNIK, 1989; CIBRELUS et al., 1999), no soro de animais infectados (SINHA et al., 1988; AZAZY et al., 1994; AZAZY et al., 1997), denominadas fator excretório-secretório.

A detecção de moléculas parasitárias circulantes é efetivamente análoga ao diagnóstico parasitológico direto, tendo uma vantagem intrínseca sobre a detecção de anticorpo, já que é sempre indicativa de infecção ativa e poderia

resolver alguns problemas de resultados falso-positivos devido à persistência de anticorpos após a cura clínica. Badaró e colaboradores (1986) mostram que, embora muitos indivíduos infectados com *L. donovani* em áreas endêmicas possam exibir resposta de anticorpos, eles experimentam uma infecção assintomática de resolução própria, e em tais casos a identificação de antígenos circulantes do parasito pode ser indicativa de infecção ativa.

O sistema de detecção de antígenos também pode ser uma alternativa ideal em relação ao sistema de detecção de anticorpos em pacientes imunocomprometidos, particularmente na ocorrência de co-infecção entre *Leishmania* e HIV, e especialmente em casos avançados, onde a resposta imune esteja prejudicada (GORGOLAS; MILES, 1994; ROSENTHAL et al., 1995).

Azazy e colaboradores (1994) descreveram um método diagnóstico alternativo baseado na detecção de antígeno em imunocomplexos circulantes (CIC) preparados a partir do soro. Esse método, denominado polietileno-glicol (PEG)-ELISA, provou ser 100 % sensível no modelo animal utilizado e 88 % na infecção humana.

Outra metodologia para obter ensaios mais específicos detecta moléculas parasitárias com o uso de anticorpos monoclonais (JAFFE et al., 1984; HOMMEL et al., 1997; SENALDI et al., 1996; SINHA et al., 1992). Lainson (1983) também depositava esperanças nesse tipo de metodologia como instrumento de investigações epidemiológicas.

Anticorpos monoclonais vêm sendo utilizados para a detecção de antígenos parasitários (JAFFE et al., 1984; RACHAMIN et al., 1991). Seu uso também aumenta a sensibilidade de métodos usuais de detecção do parasito, como demonstrado por Ismail e colaboradores (1997). Esses autores examinaram secções de lesões de pele e nódulos linfáticos de pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar usando o método da imunoperoxidase e anticorpos monoclonais anti-*L. donovani*. Os parasitos foram detectados em 88% dos cortes imunomarcados contra apenas 20% de detecção em cortes corados com hematoxilina-eosina (HE). Lynch e colaboradores (1986) também descreveram o uso de anticorpos monoclonais na técnica de imunoperoxidase para detecção de amastigotas em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea, encontrando uma sensibilidade muito superior à obtida com coloração convencional por HE. Magill e colaboradores (1993), através de

técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais, examinaram aspirados de medula óssea ou biópsia de linfonodo para detecção de amastigotas de *L. tropica* em soldados americanos que lutaram na península arábica. Amastigotas foram detectados em todos os pacientes, demonstrando a alta sensibilidade do método. Senaldi e colaboradores (1996) desenvolveram um dot-ELISA para detecção de antígenos circulantes de *L. donovani* utilizando anticorpo monoclonal contra promastigotas dessa espécie. A especificidade do ensaio foi de 96,7% e a sensibilidade de 98,5%. Esses resultados foram comparados com um ELISA de captura de antígeno, usado como método de referência, no qual utilizou-se antígeno solúvel do parasito. Esses testes demonstraram a mesma sensibilidade, sendo, porém, a especificidade do ELISA foi maior (98,9%). A estratégia de detecção de antígenos utilizando-se anticorpos monoclonais tem sido usada também no imunodiagnóstico de algumas doenças parasitárias como a angiostrongilíase (CHYE et al., 1997).

A maioria dos métodos para detecção de antígenos, no entanto, são laboriosos e consomem tempo e recursos consideráveis. Nenhum teste satisfatório de detecção de antígenos está atualmente disponível comercialmente e as tentativas de desenvolver tais testes não tem sido bem sucedidas (SENALDI et al., 1996; ATTAR et al., 2001).

Em infecções crônicas como a LV, a presença de altos níveis de anticorpos, CIC, fatores reumatóides e auto-anticorpos, como mostrado anteriormente, complicam a detecção de antígenos no soro (ATTAR et al., 2001), pelo bloqueio de determinantes antigênicos. Isso pode explicar porque nenhum teste de detecção de antígeno é usado na rotina diagnóstica da LV, apesar do grande número de registros que descrevem a existência de antígenos circulantes nessa doença.

5.4. Ensaio para detecção de DNA ou RNA parasitário

O diagnóstico da LV baseado na sorologia contra antígenos do lisado parasitário tem a desvantagem de ser pouco confiável devido a reações

cruzadas da *Leishmania* com outros microorganismos. Pode-se alcançar um diagnóstico específico ao fazer uso de anticorpos monoclonais no ELISA de competição, mas não se pode distinguir entre uma infecção passada ou presente (WILLIAMS, 1995).

Para driblar essas dificuldades, métodos de detecção e caracterização de parasitos baseados na identificação do DNA têm sido propostos. Para Shahi e colaboradores (1998) uma grande vantagem de tais metodologias é a velocidade com que os resultados podem ser obtidos, especialmente quando comparados com os obtidos em culturas. E também, como o DNA é estável por um longo período, as amostras podem ser armazenadas ou enviadas para processamento. Kalter (1994) afirma que reações cruzadas com outros microorganismos não ocorrem.

Recentemente, sondas moleculares usando DNA de cinetoplasto (kDNA), RNA ribossomal (rRNA), mini-exons derivados de RNA (medRNA) e "repeats" genômicos têm sido avaliadas e usadas para alcançar maior especificidade e sensibilidade. As vantagens da hibridização do DNA sobre alguns outros métodos são que um grande número de amostras pode ser analisado rapidamente, e muitos tipos de amostras diferentes podem ser processados, incluindo eluatos de sangue embebido em papel de filtro, amostras de tecido e aspirados de medula óssea e baço (LOPEZ et al., 1993). Os ensaios são mais específicos, já que eles são feitos para regiões do kDNA (SINGH, N., et al., 1999) ou rRNA que são exclusivas para uma espécie particular, isolado ou complexo de espécies de *Leishmania* (WILLIAMS, 1995). Esses ensaios têm sido utilizados para o diagnóstico da infecção em pacientes humanos e no *Phlebotomus martini*, o mosquito vetor de *L. donovani* (WILSON, 1995).

O mais recente desenvolvimento tecnológico no campo do diagnóstico molecular chegou até nós como um resultado direto do advento da reação em cadeia da polimerase (PCR). O PCR é capaz de amplificar pequenas quantidades de DNA para obtenção em grandes quantidades (NUZUM et al., 1995; WILSON, 1995; WILLIAMS, 1995). Embora o PCR seja capaz de detectar uma única cópia do DNA alvo, seqüências repetitivas são usadas para melhorar a sua sensibilidade. Um PCR modificado (PCR-SHELA) foi desenvolvido para melhorar seu resultado no diagnóstico da infecção por *L. donovani* em pacientes na Índia, Quênia e Brasil, com 90 % de sensibilidade e

100 % de especificidade (QIAO et al., 1995). O PCR também tem sido utilizado na América Central para detectar a presença de *L. chagasi* em seres humanos e em estudos epidemiológicos (ZELEDON et al., 1993) e também para o diagnóstico de LV em cães (MATHIS; DEPLAZES, 1995). Schaefer e colaboradores (1995b) determinaram que a técnica de PCR é capaz de registrar DNA de *Leishmania* até 10 meses antes de seu diagnóstico positivo no teste de aglutinação direta (DAT) e pode persistir por mais de três anos após tratamentos aparentemente bem sucedidos, sendo inclusive capaz de detectar DNA circulante do parasito em casos assintomáticos.

Por outro lado, o PCR utilizado para identificar ácidos nucléicos do parasito, embora muito sensível, não é adequado para ser utilizado no diagnóstico de rotina, devido à possibilidade de contaminação com ácidos nucléicos exógenos, ao custo proibitivo e à necessidade de equipamentos e mão de obra qualificada (LOPEZ et al, 1993; MILLESIMO et al., 1996; TEIXEIRA; VEXENAT, 1996; CHATTERJEE et al., 1999; EISENBERG; JAFFE, 1999). Uma etapa do ensaio de PCR necessita da realização de eletroforese em gel para interpretar os resultados, o que demanda tempo e não é adequado para uso em campo (LOPEZ et al., 1993).

5.5. Outros métodos diagnósticos

A quantificação de proteína C-reativa (CRP) no soro de pacientes com LV foi apresentada como forma de se determinar a atividade da doença, incluindo resposta à terapia (SINGH et al., 1999b). Os resultados observados apontaram que a CRP no soro pode ser usada como indicador de um possível desenvolvimento de resistência aos medicamentos durante o curso do tratamento.

Saliva também tem sido aventada em substituição ao soro como fluido corporal alternativo na escolha em imunodiagnóstico da LV (MASUM; EVANS, 1994).

A reação de hipersensibilidade tardia é universalmente conhecida como teste de Montenegro (ou teste da leishmanina). Ela foi originalmente

introduzida por Wagner em 1923 usando extrato de promastigotas de *Leishmania*, e posteriormente modificado em 1926 por Montenegro (KAR, 1995), e examina a reação conferida por linfócitos T (resposta celular). Considera-se que ela representa uma avaliação *in vivo* da imunidade mediada por células (SHIDDO et al., 1995a).

A reação de Montenegro não é utilizada para o diagnóstico da LV. Além de ser gênero-específica, limitando o seu valor nas áreas onde também incidem as leishmanioses cutâneas, a reação é negativa durante a fase ativa da doença, quando o diagnóstico é mais necessário. Esta negatividade é devido à ausência de resposta celular nesta fase. Entretanto, essa reação é valiosa na estimativa da prevalência da infecção por *Leishmania* em estudos epidemiológicos, além de apontar a resposta terapêutica do paciente ao tratamento, uma vez que a reação se positiva após a cura (TEIXEIRA, 1988).

Shiddo e colaboradores (1995a) também demonstraram nos pacientes com LV clínica a falta de reatividade no teste de Montenegro e encontraram também, em área endêmica, ainda que raramente, resposta de anticorpos e hipersensibilidade no mesmo indivíduo, situação que o grupo atribuiu à existência de uma infecção moderada, com cura espontânea ou assintomática, onde há tanto uma resposta do tipo Th1 quanto do tipo Th2. Baseado nesses achados os autores especulam que durante o início da LV humana, o perfil Th2 é predominante (como indicado nos resultados obtidos pela detecção de anticorpos) e que posteriormente existe uma mudança para uma resposta Th1 (como sugerido pelo teste de Montenegro). Dessa forma, consolidam a sua proposta de combinar a determinação de anticorpos com o teste de Montenegro como uma ferramenta útil em testes epidemiológicos, opinião compartilhada por Marty e colaboradores (1994).

Na Tabela 1, encontram-se sumarizados os dados apresentados acima sobre o diagnóstico laboratorial da LV.

TABELA 1. Sumário de dados da literatura sobre diagnóstico laboratorial da LV.

Natureza do teste	Nome do teste	Vantagens	Desvantagens
Testes não imunológicos	Formol gel	<ul style="list-style-type: none"> • simples de executar • conveniente para trabalho em campo 	<ul style="list-style-type: none"> • inespecífico
Detecção de anticorpos	Teste de fixação de complemento (CFT)*	<ul style="list-style-type: none"> • considerado muito útil no diagnóstico precoce e no monitoramento dos efeitos do tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> • reação cruzada com outros parasitos (triplanossomatídeos) e infecções micóticas • uso do parasito
	Teste de hemoaglutinação indireta (HI)*		<ul style="list-style-type: none"> • reação cruzada pode ocorrer com <i>Plasmodium</i>, <i>T. cruzi</i> e <i>Mycobacteria</i> • apresenta menor especificidade • uso do parasito
	Teste de aglutinação direta (DAT)	<ul style="list-style-type: none"> • simples e econômico • tão sensível e específico quanto ELISA ou IFI • pode distinguir entre LV ativa e tripanossomíase 	<ul style="list-style-type: none"> • não distingue entre infecção precoce e depois da cura • uso do parasito
	Teste de imunofluorescência indireta (IFI)	<ul style="list-style-type: none"> • especialmente útil na determinação da presença de infecção latente no período quiescente e como teste de cura 	<ul style="list-style-type: none"> • leitura não é adaptável a estudos soroepidemiológicos em larga escala devido a limitações na leitura • menos sensível que o ELISA • uso do parasito

TABELA 1. Sumário de dados da literatura sobre diagnóstico laboratorial da LV. Continuação.

Natureza do teste	Nome do teste	Vantagens	Desvantagens
	<p>Teste da gel difusão (TGD)*</p>	<ul style="list-style-type: none"> • simples 	<ul style="list-style-type: none"> • antígenos complexos ou extratos crus do parasito podem ser usados apenas em áreas onde não ocorram patógenos que causam reação cruzada com <i>Leishmania</i> • uso do parasito
<p>Deteção de anticorpos</p>	<p>Imunoelectroforese em contra-corrente (IECC)*</p>	<ul style="list-style-type: none"> • mais sensível do que o TGD e necessita de menos tempo para ser realizado (15-60 minutos) • parece ser mais adequado do que outros testes sorológicos para deteção de infecção críptica em ensaios de campo, em associação com teste cutâneo para avaliar exposição prévia ao parasito 	<ul style="list-style-type: none"> • difícil execução • uso do parasito

TABELA 1. Sumário de dados da literatura sobre diagnóstico laboratorial da LV. Continuação.

Natureza do teste	Nome do teste	Vantagens	Desvantagens
Detecção de anticorpos	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)*	<ul style="list-style-type: none"> • tão preciso e sensível quanto RIA e conveniente para triagem de grande número de pessoas 	<ul style="list-style-type: none"> • reações cruzadas com tripanossomíase, doença de Chagas, esquistossomíase, tuberculose, hanseníase, febre tifóide, disenteria, larva migrans, doenças hepáticas, leishmanioses cutâneas e mucocutâneas tem sido observadas • uso do parasito
	Dot-ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • forma modificada e simplificada do ELISA • leitura facilmente visível • pode ser usado com sucesso em campo para análises epidemiológicas • não é caro 	<ul style="list-style-type: none"> • a subjetividade no estabelecimento de leitura positiva, pode provocar casos falso-negativos
	Dipstick	<ul style="list-style-type: none"> • teste barato e simples • a própria tira pode ser anexada à ficha do paciente • pode utilizar rAg • também se presta a detecção de antígenos 	<ul style="list-style-type: none"> • a subjetividade no estabelecimento de leitura positiva, pode provocar casos falso-negativos
Detecção de antígenos circulantes		<ul style="list-style-type: none"> • é sempre indicador de infecção ativa 	<ul style="list-style-type: none"> • sensibilidade relativamente baixa

TABELA 1. Sumário de dados da literatura sobre diagnóstico laboratorial da LV. Continuação.

Natureza do teste	Nome do teste	Vantagens	Desvantagens
Teste para resposta imune celular	Teste de Montenegro	<ul style="list-style-type: none"> • indicado para verificação de presença de hipersensibilidade mediada por célula após tratamento • ideal para as formas tegumentares de leishmaniose 	<ul style="list-style-type: none"> • negativo na fase ativa da LV • não distingue infecção passada ou corrente • reação cruzada com outros patógenos

* - Utilizando como antígeno lisado parasitário ou antígenos hidrossolúveis do lisado parasitário

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo a avaliação de antígenos recombinantes visando o desenvolvimento de um método “dipstick” para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral, que seja simples, rápido, sensível e específico, que não necessite de aparato laboratorial sofisticado e possa ser usado em ambulatórios médicos ou consultórios veterinários e como teste de triagem no campo.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Selecionar antígenos recombinantes de amastigotas de *L. chagasi* reconhecidos por soros de pacientes com LV a partir de bibliotecas de cDNA e de DNA genômico disponíveis em nosso laboratório.

2.2. Definir um grupo de antígenos recombinantes que produza 100% de sensibilidade, em um grupo de pacientes com LV selecionados por critérios clínicos e com diagnóstico parasitologicamente confirmado, em um ensaio de dipstick, e que apresente 100% de especificidade em relação a um pequeno grupo de indivíduos sadios ou com outras doenças crônicas.

III. JUSTIFICATIVA

Durante as últimas duas décadas tornou-se evidente que as leishmanioses são enfermidades muito mais prevalentes do que se suspeitava, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das seis maiores doenças infecto-parasitárias dos países em desenvolvimento (WORLD..., 1990). No Brasil, a leishmaniose visceral americana se apresenta em franca expansão, sendo o Nordeste a região mais atingida (COSTA et al., 1990; NASCIMENTO et al., 1996). Outro fator também agrava essa conjuntura: a *Leishmania chagasi* é hoje reconhecida como um freqüente agente oportunista nas infecções pelo HIV.

Embora a demonstração dos parasitos seja considerada a forma ideal de diagnóstico, os métodos utilizados para essa identificação são invasivos, de baixa sensibilidade e difícil de serem realizados sem apoio laboratorial expressivo. Assim, o diagnóstico parasitológico das infecções por *L. chagasi*, por várias razões, pode ser difícil de ser obtido, e, como a terapia é prolongada, cara e potencialmente tóxica, a confirmação do diagnóstico é altamente desejável.

Como a leishmaniose é bastante encontrada em áreas onde predomina uma população de baixa renda, torna-se importante o acesso a um método diagnóstico de custo reduzido, de alta sensibilidade e especificidade e que não requeira instalações hospitalares. Um diagnóstico preciso e se possível precoce da infecção, poderá contribuir decisivamente para o controle da leishmaniose visceral.

Nos últimos anos, o uso de antígenos recombinantes de *Leishmania* tem mostrado ser útil no diagnóstico imunológico da leishmaniose visceral. Tem-se discutido a importância da identificação e produção de antígenos definidos de *L. chagasi*, com capacidade de serem utilizados em ensaios com alta sensibilidade e especificidade e que possam ser utilizados para discriminar a infecção por *Leishmania* de outras infecções parasitárias.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. SOROS

Foram testados quatro soros de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SLE), diagnosticados de acordo com os critérios propostos pela American Rheumatism Association (ARNETT et al., 1988), gentilmente cedidos pelo Dr. Mitermayer Santiago, da Faculdade Baiana de Medicina e Saúde Pública; 93 soros de pacientes com leishmaniose visceral, identificados por critérios clínicos, com demonstração de parasitos em aspirado de medula óssea ou em cultivo, gentilmente cedidos pelas Dra. Selma Jerônimo, do Departamento de Bioquímica da UFRN e Dra. Aldina Barral, do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqGM, FIOCRUZ; cinco soros de pacientes com hanseníase diagnosticados por critérios clínicos e laboratoriais, incluindo a determinação de carga bacilar; quatro soros de pacientes com leishmaniose cutânea localizada diagnosticada por critérios clínicos e por demonstração de parasitos, dois soros de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa diagnosticada por critérios clínicos e positividade na reação de Montenegro e em sorologia por ELISA e cinco soros de pacientes com leishmaniose cutânea difusa diagnosticada por critérios clínicos e por demonstração de parasitos, gentilmente cedidos pela Dra. Aldina Barral; e 27 soros de indivíduos sadios, de área não endêmica. Essas amostras foram conservadas em alíquotas a - 20° C.

2. LISADO DE *Leishmania*

Leishmania chagasi (MHOM/BR/96/IOC-LC-2455, cepa MERIVALDO) é mantida em nosso laboratório pela passagem em hamsters ou criopreservada em nitrogênio líquido. Suspensão de células de baço e fígado de hamster, contendo amastigotas, foi adicionada a meio Schneider (Schneider's insect

medium, Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA), pH 7,2 (preparado de acordo com instruções do fabricante), suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal inativado pelo calor (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, EUA) e 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Garamicina, Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Nesse meio, os parasitos transformaram-se em promastigotas e foram cultivados em passagens regulares. A avaliação do crescimento parasitário foi realizado através de contagem em hemocitômetro. Todas as formas promastigotas utilizadas para produção de antígeno foram provenientes de cultivos com não mais que 10 passagens *in vitro*. O antígeno para sensibilização de tiras de nitrocelulose e uso em SDS-PAGE foi preparado pela coleta de promastigotas em fase logarítmica por centrifugação (a 1.000 g por 15 min a 4° C), com lavagem duas vezes com solução salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS), a 4°C. Os promastigotas foram ressuspensos em PBS e na presença dos inibidores enzimáticos fluoreto de fenil-metil-sulfônico a 1mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), leupeptina a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), pepstatina A a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), antipaína a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e fenantrolina a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), antes de lise por sonicação em aparelho de ultra-som, com 10 ciclos de 5 segundos sobre gelo. O lisado foi então armazenado a -70° C e a concentração de proteínas nele presente determinada quantitativamente através do método da fluorescamina.

3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O antígeno de promastigota foi submetido à dosagem protéica pelo método de fluorescamina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Para esse ensaio foi feita uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA) em bicarbonato de sódio a 100 mM pH 8,0, contendo NP40 a 1%, sendo as amostras diluídas no mesmo tampão. Aos 90 μl das amostras foram adicionados 10 μl de fluorescamina a 0,1% em acetona. A leitura do ensaio foi

feita imediatamente em um aparelho Titertek Fluoroscan II (Flow Laboratories Inc, McLean, VA, EUA).

4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *L. chagasi*

Para obtenção de proteínas recombinantes, nosso laboratório produziu clones de vetores lambda ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) codificando diferentes antígenos de *Leishmania chagasi*, obtidos através da triagem de uma biblioteca de cDNA de amastigotas e outra de DNA genômico de *L. chagasi* com soros de cão e de seres humanos infectados por *L. chagasi*. Esses clones permitem a expressão de um inserto de gene de *L. chagasi* em *Escherichia coli* XL 1-Blue MRF'.

Resumidamente, a *E. coli* cresceu em meio NZY (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA), preparado conforme instruções do fabricante, pH 7,5, e suplementado com 10 mM de MgSO₄ e 0,2% de maltose. Ao atingir a fase estacionária, as bactérias foram diluídas para uma concentração com leitura ótica a 600 nm de 0,5, sendo então submetidas à infecção pelos fagos contendo genes de *L. chagasi*, por 15 minutos a 37° C. Essa solução foi misturada com solução de 0,8% de agarose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), diluída em meio NZY a 42° C e vertida em placa com meio solidificado de NZY com 1,5% de agarose onde permaneceu por 3 horas a 42° C.

Foram utilizados inicialmente cinco clones codificando antígenos diferentes (LC2, LC9, LC16, LC30 e LC121). Três clones adicionais, LC131, LC132 e LC133, foram identificados por metodologias desenvolvidas em nosso laboratório. O DNA destes clones foi enviado para sequenciamento.

Desta forma, oito antígenos recombinantes (rAg) diferentes foram utilizados nos estudos.

5. DESENVOLVIMENTO DO TESTE MULTISTICK-LEISH COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*

Multistick (dipstick com múltiplos antígenos recombinantes) é o nome fantasia que está sendo proposto para o teste em desenvolvimento. O nome será registrado legalmente.

O teste "Multistick" consiste em um dot-ELISA, utilizando três passos simples: a incubação de uma tira de membrana de nitrocelulose pré-sensibilizada por antígeno com uma diluição de soro, seguida por incubação com uma suspensão de anticorpo anti-imunoglobulina ligado a peroxidase e incubação com um substrato cromogênico.

5.1. Sensibilização das tiras com antígenos e construção dos "sticks"

As proteínas recombinantes (item 4) foram transferidas, durante 16 horas a 37° C, para membrana de nitrocelulose (Osmonics, 0,45 μ m), justaposta às placas de agarose contendo *E. coli* infectadas com os fagos codificando os antígenos. As membranas foram previamente imersas por 20 min em solução contendo isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) a 10 mM (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA), usado para indução de proteínas recombinantes.

As membranas de nitrocelulose, depois de bloqueadas em PBS com leite desnatado em pó a 10% (m/v) e lavadas por três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T20) e uma vez em PBS, foram cortadas com lâmina de bisturi em tiras de aproximadamente 10,0 X 0,2 mm, que foram aderidas, com fita adesiva de dupla face, a uma matriz plástica (com dimensões de 40 X 20 X 0,1 mm), para aumentar sua resistência (Fig. 1A). Outras membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com um lisado total de *L. chagasi* (obtido conforme descrito no item 2) diluído a 200 μ g/ml, através de incubação por 2h, seguindo-se bloqueio por 1h com PBS contendo leite desnatado em pó a 10 % e lavagem como descrito acima. Essa tira serviu para identificação de soros

com anticorpos anti-*Leishmania*. Tiras de nitrocelulose foram sensibilizadas também com imunoglobulina G humana (obtida de indivíduos saudáveis, purificada em coluna de Sepharose 4B e cedida gentilmente pela Dra. Neci Soares, LIMC, CPqGM), da mesma forma descrita acima para o lisado de *Leishmania*. A IgG humana funcionou como um controle positivo para atividade do conjugado e do substrato. Outras tiras foram incubadas apenas com PBS contendo leite desnatado em pó a 10%, para serem usadas como controle; outro controle foi realizado por uma tira sensibilizada com proteínas de bactérias infectadas com um vetor sem o inserto de genes de *Leishmania*. Todas estas incubações foram realizadas a temperatura ambiente.

5.2. Detecção de anticorpos

As tiras preparadas, como apresentado acima, foram incubadas por 2 horas, em agitação constante, com uma diluição de 1:400, em PBS-T20 contendo 10% de leite desnatado em pó, 20 mM de azida de sódio e 10% de lisado de *E. coli* (ver item 7), dos soros dos pacientes e de indivíduos controle, após depleção de anticorpos anti-*E. coli*, a temperatura ambiente (Fig. 1C). Essa diluição, em ensaios preliminares, permitiu uma melhor discriminação entre os soros de pacientes com LV e os soros de indivíduos saudáveis. Após lavagem das tiras, com incubação de 5 min e agitação constante, por três vezes com PBS-T20 e uma vez com PBS, a ligação de anticorpos anti-*Leishmania* foi revelada pela incubação com um conjugado de anticorpos anti-imunoglobulina G humana (Fc específico) com peroxidase (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:2000, por 1 hora a temperatura ambiente (Fig. 1D). A ligação do conjugado foi por sua vez revelada, após nova lavagem como descrito acima, por incubação de 20 min com o cromógeno (solução em água destilada de 3,3 diaminobenzidina a 0,6 mg/ml e 0,1% de peróxido de hidrogênio a 20 volumes), a temperatura ambiente (Fig. 1E). A seguir as tiras foram lavadas em água de torneira.

5.3. Resumo do teste

Resumidamente, o procedimento, parcialmente esquematizado na figura 1, foi o seguinte:

1. membranas de nitrocelulose são revestidas com o lisado total de promastigotas de *L. chagasi*, IgG humana, leite desnatado, proteínas recombinantes ou proteínas da bactéria;
2. os sítios de ligação a proteínas nas membranas de nitrocelulose são bloqueados usando uma solução de 10 % de leite em pó desnatado;
3. as membranas são lavadas por três vezes com PBS-T20 e uma vez com PBS;
4. a membrana é cortada em tiras, que são coladas transversalmente, com fita dupla face, em uma tira de plástico (Fig. 1A);
5. a tira é submetida à amostra de soro potencialmente contendo anticorpos contra *Leishmania* (Fig. 1C) e lavada conforme descrito anteriormente;
6. a tira é incubada com o conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Fig. 1D) e lavada conforme descrito anteriormente;
7. a tira é incubada com uma solução contendo peróxido de hidrogênio e DAB (Fig. 1E), que atua como cromógeno, e após 20 min, a tira é lavada em água de torneira;
8. a tira é deixada a temperatura ambiente para secar, e a presença ou ausência de uma coloração marrom ou castanha (Fig. 1F), indicando a presença de anticorpo no soro, é verificada.

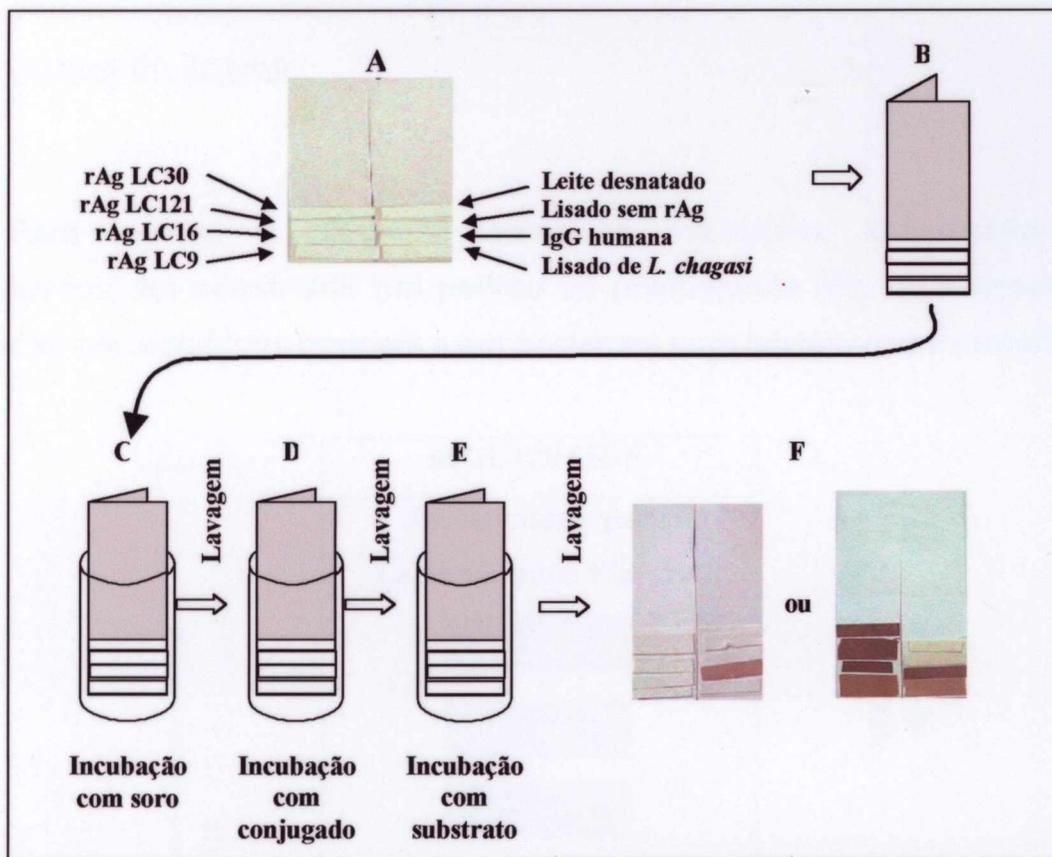


FIGURA 1. Representação esquemática do teste de *Multistick* para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A, foto de tira de plástico com pequenas tiras de papel de nitrocelulose coladas transversalmente. O papel de nitrocelulose foi previamente sensibilizado com quatro antígenos recombinantes de *L. chagasi* (rAg LC121, LC30, LC16 e LC9), leite desnatado, lisado de bactéria sem antígeno recombinante (rAg), IgG humana e lisado de *L. chagasi*, conforme indicado na figura. B, desenho esquemático de tira de plástico dobrada longitudinalmente. C, D e E, desenho esquemático de tira de plástico dobrada e inserida em um tubo de cinco ml de volume, onde são processadas as reações sucessivas com diluições de soro (em um volume total de 1 ml), de um conjugado anti-IgG humana-peroxidase e de um substrato cromogênico por oxidação. F, fotos de tiras de plástico em que foi testado um soro humano normal, mostrando a presença de cor apenas na tira de papel de nitrocelulose pré-sensibilizada com IgG (reação negativa) e foto de tira de plástico em que foi testado um soro de um paciente com leishmaniose visceral, mostrando a presença de cor nas tiras de papel de nitrocelulose sensibilizadas com antígenos recombinantes de *L. chagasi* e também nos controles positivos do ensaio (nitrocelulose sensibilizada com lisado de *L. chagasi* e com IgG humana).

5.4. Leitura do ensaio

Para facilitar a distinção entre as marcações encontradas nas membranas, foi construído um padrão de positividade (Fig. 2) baseado nos achados em indivíduos normais e em pacientes com leishmaniose visceral.

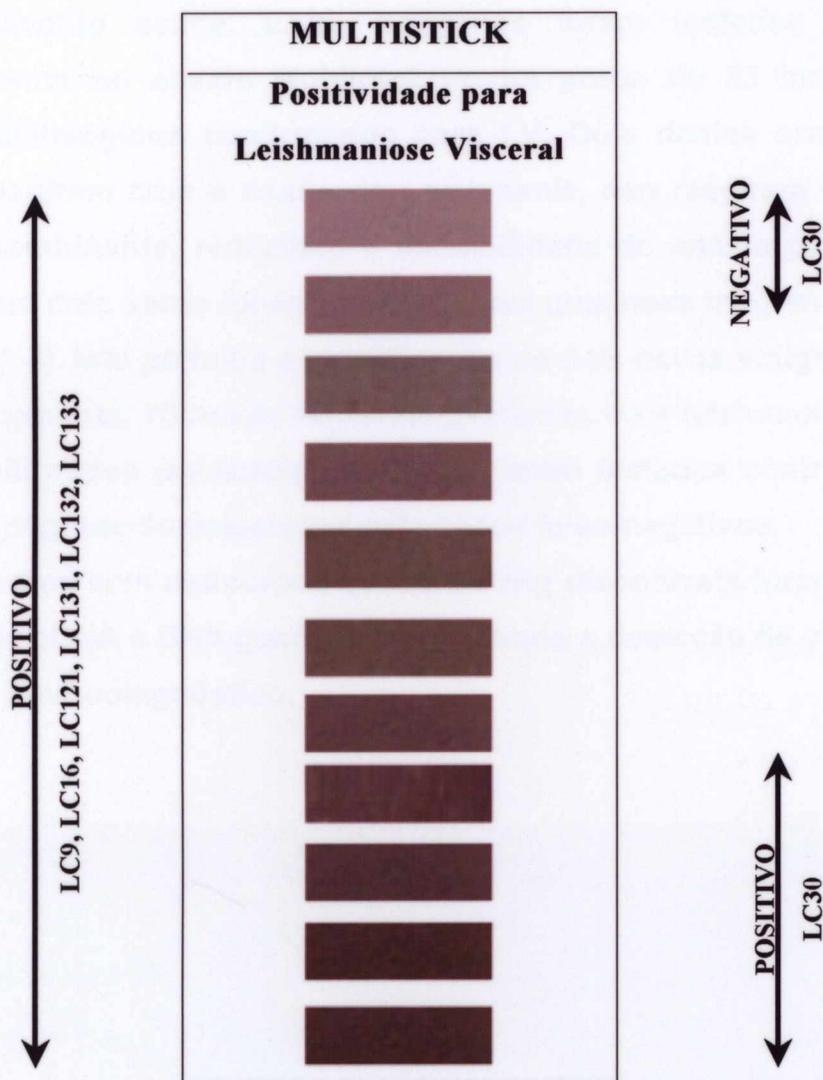


FIGURA 2. Padrão de positividade do teste de *Multistick*. Essa escala foi construída como referência, a partir de resultados possíveis, para avaliação das membranas sensibilizadas com antígenos recombinantes de *Leishmania* frente aos soros testados. As setas indicam as intensidades consideradas positivas ou negativas para anticorpos contra os antígenos nelas assinalados. Soros normais podem apresentar baixa reatividade contra o LC30; apenas soros de pacientes com leishmaniose apresentam forte reatividade.

6. UM ATALHO METODOLÓGICO PARA AUMENTO DE SENSIBILIDADE: AMPLIANDO O NÚMERO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Cinco antígenos recombinantes (LC2, LC9, LC16, LC30 e LC121) foram selecionados de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. chagasi* através de sua reatividade com "pools" de soros de cães e seres humanos infectados conforme descrito acima. Estes antígenos foram testados individual e simultaneamente no ensaio Multistick contra soros de 23 indivíduos com exames parasitológicos confirmados para LV. Dois destes soros, contudo, apesar de reagirem com o lisado de *Leishmania*, não reagiram com nenhum antígeno recombinante, reduzindo a sensibilidade do ensaio para 91%. Uma mistura destes dois soros foi então usada para uma nova triagem da biblioteca de cDNA (Fig. 3). Isto permitiu a identificação de dois novos antígenos.

Posteriormente, 70 novos soros de pacientes com leishmaniose visceral, também confirmados parasitologicamente, foram testados contra este painel ampliado de rAg, sendo detectados seis casos falso-negativos.

Esses soros sem anticorpos contra os rAg disponíveis foram triados nas bibliotecas de cDNA e DNA genômica, permitindo a detecção de outro antígeno relevante no imunodiagnóstico.

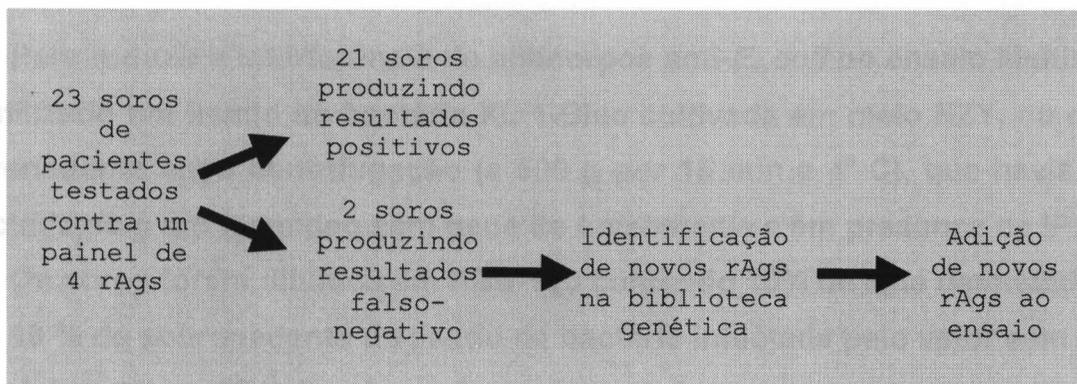


FIGURA 3. O uso de soros falso-negativos para obter antígenos recombinantes (rAgs) relevantes. Esquema do procedimento empregado para melhorar o imunoenensaio para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

7. CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Este cálculo foi feito utilizando-se as seguintes fórmulas:

Número de soros com

$$\text{a. Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{anticorpos reconhecendo pelo menos um rAg}}{\text{Nº total de soros}} \times 100$$

Número de soros sem anticorpos detectáveis
contra os rAgs ou produzindo um padrão
de reconhecimento diferente do produzido

$$\text{b. Especificidade (\%)} = \frac{\text{por anticorpos dos soros de pacientes com LV}}{\text{Número total de soros de indivíduos sem LV testados}} \times 100$$

8. PROTOCOLOS DE ABSORÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Escherichia coli* DO SORO

Para reduzir a interferência de anticorpos anti-*E. coli* no ensaio Multistick, foi utilizado um lisado de bactéria XL 1-Blue cultivada em meio NZY, ou o seu sobrenadante após centrifugação (a 500 g por 15 min e 4° C), que havia sido infectada com um fasmídeo sem gene de *Leishmania* e em presença de IPTG.

Os soros foram diluídos em PBS-T20 contendo 10% de leite desnatado em pó e 10 % de sobrenadante do lisado da bactéria infectada pelo vetor sem gene de *Leishmania* e utilizados dessa forma no ensaio.

9. SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*L. chagasi*

A dosagem de anticorpos anti-*L. chagasi* em todas as amostras de soro foi realizada através de ELISA indireto, em placas de microtitulação (Corning, NY, EUA), no qual foi utilizado como antígeno um lisado de promastigotas de *L. chagasi* obtido de cultura axênica do parasito, na concentração de 25 µg por ml de tampão bicarbonato 0,06 M, pH 9,8. Os poços nas placas foram incubados em câmara úmida durante a noite, a 4° C, com 100 µl da suspensão de antígeno. Depois de sensibilizados, os poços foram lavados e, em seguida, o bloqueio de reações inespecíficas foi feito através de incubação com solução de leite desnatado a 10% (200 µl por poço) em câmara úmida, durante 1 hora a 37 °C. Após lavagens (descritas abaixo), as amostras de soros controle e soros testes foram então adicionadas às placas, em duplicatas, diluídas em PBS com leite desnatado a 10%, contendo 0,05% de Tween 20 e incubadas à 37° C, durante 1 hora em câmara úmida, seguido de lavagem (descrita abaixo). Um anticorpo anti-IgG humana, Fc-específico, conjugado a peroxidase (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado e incubado à 37° C, durante 1 hora, em câmara úmida. Após lavagens (descritas abaixo), 100 µl de uma solução reveladora da atividade enzimática, consistindo em 5 mg do cromógeno OPD (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), 50 µl de peróxido de hidrogênio a 20 volumes, 6 ml de água destilada, 3 ml de tampão de ácido cítrico a 0,1 M, pH 7,6 e 3,2 ml de tampão de fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2, foram adicionados aos poços e incubados por 25 minutos à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 25 µl de H₂SO₄ a 4M e a leitura de absorbância feita em leitor de ELISA, com filtro de 490 nm. A diluição, em PBS com 10% de leite desnatado em pó e 0,05% de Tween 20, do anticorpo anti-IgG humana conjugado a peroxidase a ser utilizada foi determinada em ensaio preliminar onde esse reagente foi titulado por diluição seriada. Optou-se pela diluição de 1:4000. A diluição do soro humano utilizada foi de 1:100. Todas as etapas de lavagem foram realizadas através de três incubações de 5 minutos em PBS-T20 e uma incubação também de 5 minutos somente com PBS. O limite inferior de positividade do

ELISA (valor do "cut-off") foi definido como média das leituras no ELISA do soro de 27 indivíduos sadios de área não endêmica somada a três vezes o desvio padrão da média. Em todos os ensaios realizados foram incluídos em duplicata: soro padrão positivo (alta reatividade no ensaio), em dois poços; soro padrão negativo (baixa reatividade no ensaio), em três poços, e conjugado não lavado, para controle do substrato cromogênico, um poço.

Os dados obtidos foram analisados através da aplicação do teste estatístico ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

10. DOT-ELISA

Para sensibilização da membrana de nitrocelulose, foram filtrados no papel, volumes de 50 μ l de lisado de *L. chagasi*, obtido como descrito anteriormente, em concentração de 200 μ g/ml, colocados sob leve pressão negativa utilizando o aparelho HYBRI-DOT[®] Manifold (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA), por 5 min em temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada com PBS contendo 10% de leite desnatado em pó por 2 h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear sítios de ligação à proteína porventura ainda disponíveis e posteriormente lavada com três ciclos de 5 min com PBS-T20 e uma vez com PBS.

Pedaços da membrana com os pontos sensibilizados assim obtidos foram cortados e colocados separadamente com os soros a serem testados na diluição de 1:400 (em PBS com 10% de leite desnatado em pó, 0,05% de Tween 20 e 20 mM de azida de sódio) por 2 h, sendo posteriormente lavados, como indicado anteriormente, e então incubados com o conjugado anti-IgG humana ligado com a peroxidase, diluído a 1:2000, por 1 h. Após esse período, e novo ciclo de lavagens, a revelação da reação aconteceu através de incubação de 20 min com o cromógeno (solução em água destilada de DAB a 0,6mg/ml com 0,1% de peróxido de hidrogênio a 20 volumes). A seguir os pedaços foram lavados em água de torneira. Todos esse procedimentos foram realizados a

temperatura ambiente, e os ensaios executados com os mesmos controles utilizados no ELISA indireto (item anterior).

1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E "WESTERN BLOT"

Duzentos e cinquenta microgramas de proteína de um lisado total de *L. chagasi* (obtido como descrito no item 2), suspensos em 200 μ l de tampão de amostra (Tris a 0,125 M, SDS a 2,3%, glicerol a 10% e 2- β -mercaptoetanol a 0,01% em água destilada) pH 6,8, foi fervido por 3 min e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguida por "Western blot". Os géis de migração foram preparados na concentração final de 12% de acrilamida, montados em aparelho Mini-protein II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e colocados em tanque de eletroforese contendo tampão de corrida (3,02 g de Tris, 14,43g de glicina, 1 g de SDS e água destilada q.s.p. 1 l, pH 8,3). Após aplicação de 100 μ l da solução do antígeno por gel, a corrida foi realizada em voltagem constante de 100 a 120 V. Foi utilizado para o cálculo do peso molecular aparente das bandas protéicas o padrão de peso molecular BENCHMARK™ Protein Ladder (Gibco Laboratories, Hercules, CA, EUA), que correu ao mesmo tempo e contém 15 proteínas situadas em uma faixa de peso molecular de 10 a 220 kDa. Os polipeptídios do gel foram eletro-transferidos para membrana de nitrocelulose de 0,45 μ m (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em tampão de transferência (Tris a 0,025 M, glicina a 0,93 M e metanol a 20% em água destilada) a 30 V por 16 h, seguindo instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau S, para verificação do sucesso desse último procedimento. Em seguida, após descoloramento da membrana com água destilada para retirada do excesso de Ponceau S, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T20 e uma vez apenas com PBS, após ter sido bloqueada para reações inespecíficas por incubação de 2 h com uma solução de leite desnatado em pó a 10% em PBS.

Para a imunodeteção, tiras de 3 mm de largura foram cortadas da membrana previamente bloqueada e incubadas com os soros (controles negativo, positivo e amostras-testes), diluídos à 1:400, como no item anterior, por 2 h. Depois da incubação com os anticorpos primários, as tiras foram lavadas como descrito e incubadas com um conjugado anti-imunoglobulina humana Fc-específico, ligado a peroxidase (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) diluído a 1:2000, como no item anterior, por 1 h a temperatura ambiente. Depois da lavagem, as ligações dos anticorpos às tiras foram reveladas usando-se a solução do cromógeno como no item anterior. A reação foi interrompida por remoção do substrato com água destilada. As tiras foram secas e armazenadas ao abrigo da luz. Para o cálculo do peso molecular foram medidas as distâncias em centímetros percorridas pelas proteínas do padrão de peso molecular e construído um gráfico de curva-padrão de migração protéica formado pelo logaritmo dos pesos moleculares e a distância linear percorrida pelas proteínas. Através deste gráfico foram determinados os pesos moleculares das proteínas de promastigotas de *L. chagasi* reconhecidas pelos soros.

12. AVALIAÇÃO DOS AGENTES DE BLOQUEIO DE REAÇÕES INESPECÍFICAS

Foram usados como reagentes bloqueadores de ligações inespecíficas no ensaio o leite em pó desnatado, BSA e Tween 20, isoladamente e em conjunto. Foram testadas diluições de 5, 10 e 20% de leite em pó desnatado, de 1 ou 4% de BSA e 0,025% ou 0,05% de T20.

13. COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MATRIZES DE MEMBRANAS QUANTO À PRODUÇÃO DE SINAL NO ENSAIO

No estudo da ligação de antígenos às membranas, as seguintes membranas disponíveis comercialmente, nas quais as proteínas podem ser

imobilizadas, foram investigadas e comparadas: membranas de nitrocelulose (Millipore, 0,45 μ m; BioRad, 0,20 μ m e Schleicher & Schuell, 0,45 μ m; HSI, 0,45 μ m) e membrana de nylon (Nytran, Schleicher & Schuell, 0,45 μ m). Papéis de celulose de diferentes fontes também foram testados quanto à capacidade de adsorção de proteínas.

Essas membranas foram sensibilizadas passivamente pela incubação com uma solução de concentração de 200 μ g/ml IgG humana (obtido como descrito anteriormente), por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com PBS contendo 10% de leite em pó por 2 h a temperatura ambiente, sendo então lavadas 10 vezes por incubação de 5 min com PBS-T20 e uma vez com PBS. Após esse período, discos dessas membranas foram cortados e anti-IgG humana conjugada com a peroxidase, diluída 1:2000 (como acima), foi incubada com esses pedaços por 1 h a temperatura ambiente. Ao final desse tempo e depois de um ciclo de 10 lavagens, como descrito acima, a revelação da reação foi realizada por incubação de 20 min a temperatura ambiente com o cromógeno (descrito acima). A seguir os pedaços foram lavados em água de torneira. Todos os discos foram avaliados do ponto de vista de intensidade de coloração em relação a papel apenas sensibilizado com leite em pó.

14. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras de sangue para preparo do soro foram obtidas, por nossos colaboradores, com aprovação por Comitês de Ética para Pesquisa em Seres Humanos institucionais, para avaliação de novos testes imunodiagnósticos e, principalmente, para fins sorodiagnósticos.

V. RESULTADOS

1. ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*L. chagasi*

A porcentagem de pacientes com LV com anticorpos IgG reativos contra o lisado de promastigotas acima do nível de "cut-off" detectados no ELISA foi de 97,8 % (91/93).

Reatividade cruzada foi observada em um de dois soros de pacientes com leishmaniose mucosa (50%), em três de quatro com leishmaniose cutânea (75%), em todos os cinco com leishmaniose cutânea difusa (100%), e em nenhum com hanseníase, lupus eritematoso sistêmico ou do grupo dos indivíduos sadios (Fig. 4).

Quando os grupos foram avaliados estatisticamente através de teste de análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, a única média que era discordante entre os grupos, em um nível de significância com $p < 0,001$, era a do grupo com leishmaniose visceral confirmada parasitologicamente, cuja média da D.O.₄₉₀ ($2,045 \pm 1,284$) foi quase vinte vezes maior do que a média encontrada nos controles normais sadios ($0,1044 \pm 0,0404$), mesmo que, de acordo com o critério de "cut-off" estabelecido, pelo menos nove soros de outros grupos também tenham sido considerados positivos.

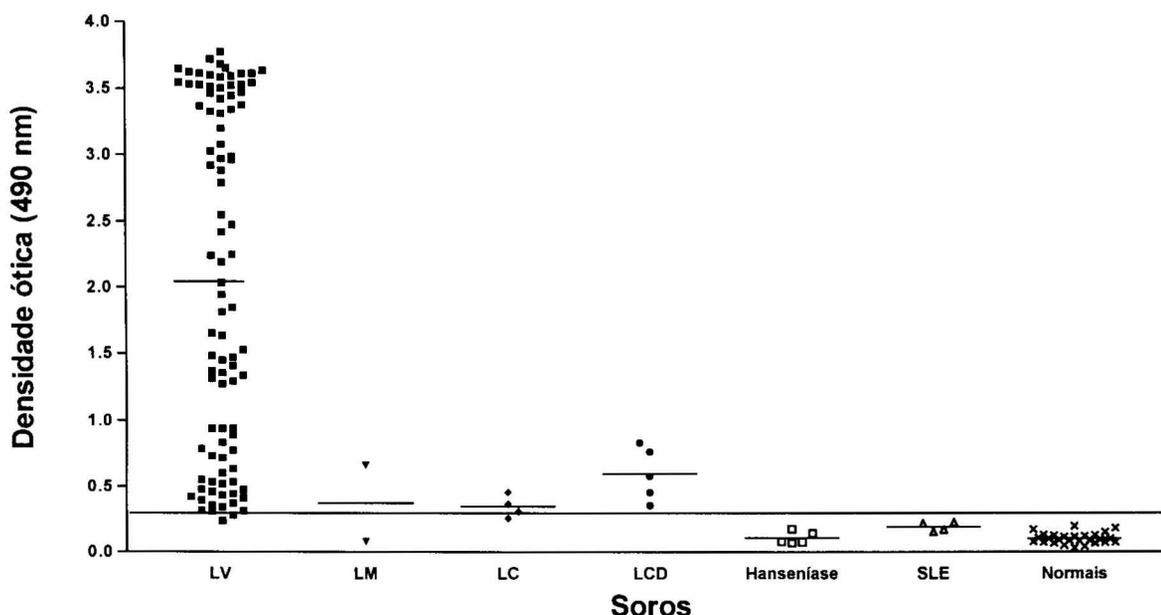


FIGURA 4. Semi-quantificação de anticorpos anti-*L. chagasi* por ELISA. Reação sorológica de 93 pacientes com leishmaniose visceral (LV) confirmada parasitologicamente, 2 com leishmaniose mucosa (LM), 4 com leishmaniose cutânea (LC), 5 com leishmaniose cutânea difusa (LCD), 5 com hanseníase, 4 com lupus eritematoso sistêmico (SLE) e 27 indivíduos saudáveis de região não-endêmica (Normais), com soros diluídos a 1:100. Cada símbolo representa a média dos valores das duplicatas. A linha horizontal (em azul) indica o valor de "cut-off" [média da densidade ótica em 490 nm (O.D. ₄₉₀) dos resultados obtidos de 27 soros de indivíduos normais de área não endêmica mais três vezes o desvio-padrão dessa média] usado para determinar um resultado positivo. As barras horizontais indicam a média dos títulos dos soros de cada grupo. A média que é significativamente diferente do grupo normal (usando o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls) está indicada por # ($p < 0,001$).

2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*L. chagasi* ATRAVÉS DE DOT-ELISA

Conforme descrito na metodologia (item 9), também foi executado um dot-ELISA para detecção de anticorpos anti-*L. chagasi* nos soros anteriormente relacionados. Para diminuir a subjetividade na avaliação de reações positivas e negativas, devido à observação de grande resíduo de fundo nos ensaios realizados, optou-se como critério de negatividade o padrão encontrado na reação com o controle sem soro do ensaio. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2. A sensibilidade desse método alcançou 98,9 %, mas a especificidade em relação aos indivíduos sadios foi de 62,9%.

TABELA 2. Positividade de soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios em dot-ELISA contra lisado de promastigotas de *L. chagasi*.

Dot-ELISA	Nº de pacientes com leishmaniose visceral ¹		Nº de pacientes com outras leishmanioses ²		Nº de pacientes com outras doenças ³		Nº de indivíduos sadios	
		(%)		(%)		(%)		(%)
Positivo	92	98,9	6	54,5	—	—	10	37,1
Negativo	1	1,1	5	45,5	9	100	17	62,9

¹ Pacientes confirmados parasitologicamente.

² Dois pacientes com a forma mucosa, quatro com a cutânea e cinco com a forma cutânea difusa.

³ Cinco pacientes com hanseníase e quatro com lupus eritematoso sistêmico.

Vale ressaltar que na tira do teste Multistick sensibilizada com lisado de *L. chagasi*, conforme mostrado na Figura 1 e referido no item 5.1 da metodologia, que é utilizada como controle do ensaio e representa também um dot-ELISA, a sensibilidade alcançou 100 % e a especificidade chegou a 100 % em relação aos indivíduos sadios (dados não apresentados).

3. RECONHECIMENTO DE POLIPEPTÍDEOS DE *L. chagasi* POR SOROS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Soros de 93 pacientes com leishmaniose visceral (confirmados parasitologicamente) foram testados para verificar reatividade contra polipeptídeos de *L. chagasi* separados por SDS-PAGE e ligados a nitrocelulose. Todos os soros reconheceram numerosos antígenos de peso molecular variando entre 10-220 kDa. A maioria (62,4%) reconheceu até nove antígenos, 26 dos quais (27,9%) reconheceram entre quatro e seis antígenos (Tabela 3). Vinte e um casos (22,5%) mostraram acima de 13 bandas, nenhum dos casos pesquisados deixou de reconhecer pelo menos uma banda.

A análise do "western blot" para anticorpos que produzam reações cruzadas foi executada em soros de pacientes com outras formas de leishmaniose, ou com outras doenças como hanseníase ou lupus eritematoso-sistêmico (SLE) e em indivíduos sadios. Dos indivíduos sadios, nenhum soro reconheceu qualquer dos antígenos de *L. chagasi*, o que aconteceu também com os pacientes com hanseníase ou SLE. As amostras de soros de 11 pacientes com outras leishmanioses (formas cutânea, mucosa e cutânea difusa) foram também testadas. Os soros dos dois pacientes com a forma mucosa da leishmaniose não apresentaram reação, e todos os que apresentavam a forma cutânea detectaram entre uma e três bandas. Dos pacientes com leishmaniose cutânea difusa, um (20 %) reconheceu entre uma e três bandas no "Western blot", e a maioria destes pacientes (40 %) apresentou reação entre quatro e seis bandas, sendo que o soro de um paciente detectou entre sete e nove antígenos e de outro entre 13 e 15 antígenos (Tabela 3).

TABELA 3. Número de antígenos de *L. chagasi* reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios em "Western blot" contra lisado de promastigotas de *L. chagasi*.

Nº de antígenos reconhecidos	Nº de pacientes com leishmaniose visceral ¹		Nº de pacientes com outras leishmanioses ²		Nº de pacientes com outras doenças ³		Nº de indivíduos sadios	
		(%)		(%)		(%)		(%)
0	—	—	2	18,2	9	100	27	100
1-3	18	19,4	5	45,4	—	—	—	—
4-6	26	27,9	2	18,2	—	—	—	—
7-9	14	15,1	1	9,1	—	—	—	—
10-12	14	15,1	—	—	—	—	—	—
13-15	15	16,1	1	9,1	—	—	—	—
>15	6	6,4	—	—	—	—	—	—
Total	93	100	11	100	9	100	27	100

¹ Pacientes confirmados parasitologicamente.

² Dois pacientes com a forma mucosa, quatro com a cutânea e cinco com a forma cutânea difusa.

³ Cinco pacientes com hanseníase e quatro com lupus eritematoso sistêmico.

Os antígenos principais de *L. chagasi* que reagiram com os soros dos pacientes com leishmaniose visceral confirmados parasitologicamente provocaram reações mínimas com os soros de pacientes com outras leishmanioses (Tabela 4). Os antígenos de 27, 30, 54, 86 e 130 kDa foram reconhecidos mais freqüentemente (Fig. 5). Todos os indivíduos com LV reconheceram pelo um desses antígenos e 91,1 % reconheceu todos eles. Outros antígenos que foram reconhecidos apenas por pacientes com LV são os de 46 kDa (24,7 %), 100 kDa (32,3 %) e 117 kDa (68,8 %).

TABELA 4. Frequência de reconhecimento em "Western blot" dos principais antígenos lisado de promastigotas de *L. chagasi* por soros de pacientes com leishmaniose visceral e de outras leishmanioses.

Antígenos de <i>L. chagasi</i> (peso molecular aparente em kDa)	Pacientes com leishmaniose visceral ¹ (%)	Pacientes com outras leishmanioses ² (%)
27	93,5	—
30	91,1	—
54	95,7	9,1
86	100	—
130	100	18,2
Nenhum	0	15,4

¹ 93 pacientes confirmados parasitologicamente.

² Dois pacientes com a forma mucosa, quatro com a cutânea e cinco com a forma cutânea difusa.

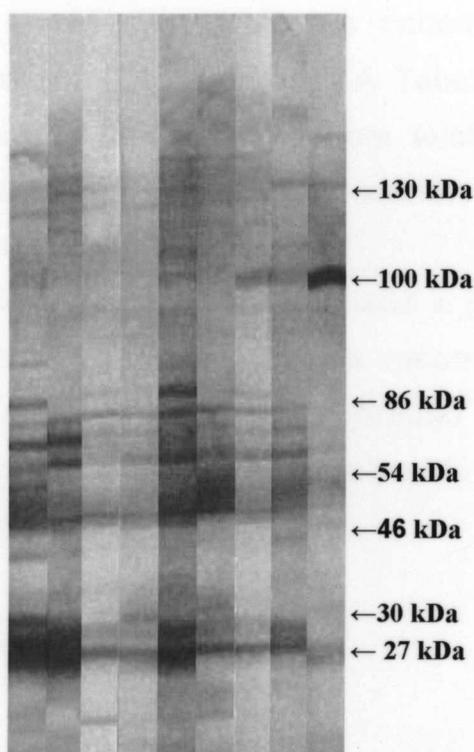


FIGURA 5. Exemplo de "Western blot" de soros de pacientes com leishmaniose visceral contra lisado de promastigota de *Leishmania chagasi*. A figura mostra a variabilidade da resposta imune em seres humanos infectados com *L. chagasi*. Os antígenos mais reconhecidos, ou exclusivamente reconhecidos, pelos diferentes soros de pacientes com LV estão indicados pelas setas.

4. AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES NO TESTE MULTISTICK

Todos os grupos de soros já descritos anteriormente foram utilizados para avaliar o desempenho de antígenos recombinantes no teste Multistick. A concordância entre o ELISA e o Multistick, calculada como uma relação entre o somatório de soros positivos em ambos os testes mais o somatório de soros negativos em ambos os métodos, e o número total de soros testados, foi de 97,7%.

Foram testados inicialmente um painel com cinco antígenos recombinantes. Um dos antígenos (LC2), no entanto, reagiu com 5 de 14 soros controles normais (35,7 %), e foi, portanto, retirado do painel. Posteriormente foram adicionados três outros antígenos restantes, primeiramente LC131 e LC132, e depois, o LC133. Os resultados encontram-se sumarizados nas Tabelas 5 e 6 e ilustrados na Figura 6. A Tabela 7 mostra o padrão de reconhecimento de soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios, em relação ao painel total de antígenos recombinantes.

O rAg LC133 até o momento, selecionado a partir de seis soros falso-negativos para todos os outros antígenos recombinantes, foi testado em apenas três desses soros (em virtude do término das alíquotas disponíveis dos outros três soros; novas alíquotas estão sendo enviadas para Salvador) e em outros cinco soros controle normais.

TABELA 5. Número de soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos saudáveis, positivos para antígenos recombinantes individuais no teste de Multistick.

GRUPO (n)	% DE SOROS REAGINDO COM O ANTÍGENO (n)						
	LC9	LC16	LC30	LC121	LC131	LC132	LC133*
Leishmaniose Visceral (87)	74,4 (67)	32,2 (29)	78,9 (72)	77,8 (70)	56,7 (51)	72,2 (65)	NT
Leishmaniose Visceral (3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	100 (3)
Leishmaniose Visceral (3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	NT
Leishmaniose Mucosa (2)	—	—	50,0 (1)	—	—	—	NT
Leishmaniose Cutânea (4)	—	25,0 (1)	—	—	—	—	NT
Leishmaniose Cutânea Difusa (5)	20,0 (1)	100 (5)	60,0 (3)	20,0 (1)	40,0 (2)	—	NT
Hanseníase (5)	—	—	—	—	—	—	NT
SLE (4)	—	—	25,0 (1)	—	—	—	NT
Indivíduos Normais (22)	—	—	—	—	—	—	NT
Indivíduos Normais (5)	—	—	—	—	—	—	—

* O rAg LC133 foi testado apenas em 3 soros falso-negativos para todos os outros antígenos recombinantes e em 5 soros controle normais

NT = não testado

TABELA 6. Número de antígenos de *L. chagasi* reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose visceral, outras leishmanioses, outras doenças e indivíduos sadios.

GRUPO (N)	% DE SOROS REAGINDO COM UM NÚMERO DE ANTÍGENOS IGUAL A (n)							
	0	≥1*	≥2	≥3	≥4	≥5	≥6	7
Leishmaniose Visceral (93)	3,2 (3)	8,6 (8)	12,9 (12)	14,0 (13)	16,1 (15)	29,0 (27)	16,1 (15)	NT
Leishmaniose Mucosa (2)	50,0 (1)	50,0 (1)	—	—	—	—	—	—
Leishmaniose Cutânea (4)	75,0 (3)	25,0 (1)	—	—	—	—	—	—
L. Cutânea Difusa (5)	—	20,0 (1)	40,0 (2)	20,0 (1)	—	20,0 (1)	—	—
Hanseníase (5)	100 (5)	—	—	—	—	—	—	—
SLE (4)	75,0 (3)	25,0 (1)	—	—	—	—	—	—
Indivíduos Normais (27)	100 (27)	—	—	—	—	—	—	—

* O uso do símbolo " ≥ " deve-se ao fato de que a maior parte dos soros ou todos os soros ainda não foram testados contra o antígeno recombinante LC133.

NT = não testado

LC30	Leite
LC121	Lisado sem rAg
LC16	IgG
LC9	Lisado de <i>L.chagasi</i>

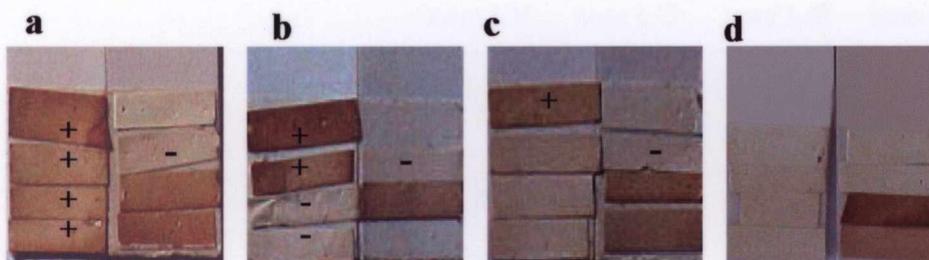


FIGURA 6. Exemplo de soros de pacientes com leishmaniose visceral no teste de Multistick. Cada quadro (a a d) corresponde à foto de um Multistick realizado com um soro individual. Por motivos de economia de espaço nesta figura, os dois terços superiores da tira de plástico foram cortados. Foi utilizado um painel com quatro antígenos recombinantes, dispostos na tira plástica conforme detalhado na Fig. 1. As tiras com antígeno recombinante onde houve reação estão identificadas com o símbolo “+”. A intensidade da cor destas tiras deve ser comparada com a da tira identificada com o símbolo “-”, que foi sensibilizada com um lisado de bactérias produzido por um bacteriófago sem inserto de genes de *Leishmania* (o controle negativo mais adequado). Note que: há uma tendência para uma reação mais intensa com o antígeno recombinante LC30 (conferir esquema de disposição das tiras no topo da figura); e que em d, apesar de não haver ocorrido reação com os antígenos recombinantes, a tira com o lisado de *Leishmania* foi reconhecida, indicando a presença de outros anticorpos no soro. Soros que reagiram com o lisado de *Leishmania* e não reagiram com nenhum antígeno recombinante foram utilizados em um atalho metodológico para reconhecer novos antígenos relevantes (como descrito na metodologia).

TABELA 7. Padrão de reconhecimento de soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD), lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e indivíduos saudáveis, em relação ao painel total de antígenos recombinantes (rAg).

Padrão de Antígenos Recombinantes Reconhecido pelos Soros*	Número de Soros Reconhecendo Cada Padrão(%)				
	Pacientes com LV	Pacientes com LC	Pacientes com LM	Pacientes com LCD	Pacientes com SLE
LC16		1		1	
LC30			1		1
LC132	2				
LC133	3*	NT	NT	NT	NT
LC 16 + LC30				2	
LC 16 + LC121	2				
LC30 + LC121	2				
LC131 + LC132	8				
LC9 + LC30 + LC121	11				
LC 16 + LC30 + LC131				1	
LC30 + LC121 + LC132	1				
LC30 + LC131 + LC132	1				
LC9 + LC 16 + LC30 + LC121	4				
LC9 + LC 16 + LC30 + LC131	1				
LC9 + LC30 + LC121 + LC132	11				
LC9 + LC30 + LC131 + LC132	1				
LC16 + LC30 + LC131 + LC132	1				
LC9 + LC 16 + LC30 + LC121 + LC131				1	
LC9 + LC 16 + LC30 + LC121 + LC132	3				
LC9 + LC30 + LC121 + LC131 + LC132	21				
LC9 + LC16 + LC30 + LC121 + LC131 + LC132	15				

* O rAg LC133 foi testado apenas nos soros falso-negativos para todos os outros antígenos recombinantes.

5. TENTATIVAS DE OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO

5.1. Absorção de anticorpos anti-*Escherichia coli* do soro

A diluição dos soros em tampão contendo lisado de bactéria XL 1-Blue reduziu a ligação de anticorpos dos soros ao lisado de bactéria sem inserto de *L. chagasi* em ensaio de "dot-blot" (Tabela 8).

5.2. A ampliação da sensibilidade do Multistick

Como relatado inicialmente, quatro antígenos recombinantes foram selecionados de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. chagasi* através de sua reatividade com "pools" de soros de cães ou de seres humanos infectados e ausência de reação com 30 soros humanos normais. Estes antígenos foram testados individualmente e simultaneamente no ensaio Multistick contra soros de 23 indivíduos com exames parasitológicos confirmados para LV. Dois destes soros, contudo, apesar de reagirem com o lisado de *Leishmania*, não reagiram com nenhum antígeno recombinante, reduzindo a sensibilidade do ensaio para 91,3 %.

Uma mistura destes dois soros foi então usada para uma nova triagem da biblioteca de cDNA (Fig. 3). Isto permitiu a identificação de um quinto e sexto antígenos, o LC131 e o LC132, que, quando incluídos no painel de rAgs usados no ensaio, aumentou, previsivelmente, a sua sensibilidade para 100% (Fig. 7 e 8), sem comprometer a especificidade (avaliada provisoriamente com um painel de 14 soros controle de indivíduos saudáveis).

A partir deste ponto então, qualquer soro adicional passou a ser testado contra este painel ampliado de rAg, e qualquer outro soro falso-negativo foi usado para uma nova triagem na biblioteca, permitindo a detecção de novos antígenos relevantes.

TABELA 8. "Dot-blot" em papel de nitrocelulose com antígenos recombinantes de *L. chagasi* utilizando "pool" de soros diluídos ou não em tampão com 10 % de lisado de bactéria XL 1-Blue.

ANTÍGENO	SOROS (diluição 1:400)								SEM SORO	
	LV HUMANA ¹		CONTROLE HUMANO ²		LV CANINA ³		CONTROLE CANINO ⁴		A	NA
	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
Sobrenadante de lisado de bactéria não infectada										
Lisado total de bactéria não infectada										
Sobrenadante de lisado de bactéria + rAg LC132										
Lisado total de bactéria + rAg LC132										
Sobrenadante de lisado de bactéria + rAg LC30										
Lisado total de bactéria + rAg LC30										
Sobrenadante de lisado de bactéria infectada com vetor sem inserto de gene de <i>Leishmania</i>										
Lisado total de bactéria infectada com vetor sem inserto de gene de <i>Leishmania</i>										

Onde: LV = leishmaniose visceral; A = absorvido; NA = não-absorvido e rAg = antígeno recombinante

¹ Mistura de quatro soros de pacientes humanos com leishmaniose visceral confirmados parasitologicamente.

² Mistura de dois soros de seres humanos normais.

³ Mistura de quatro soros de cães com leishmaniose visceral confirmados parasitologicamente.

⁴ Mistura de dois soros de cães normais.

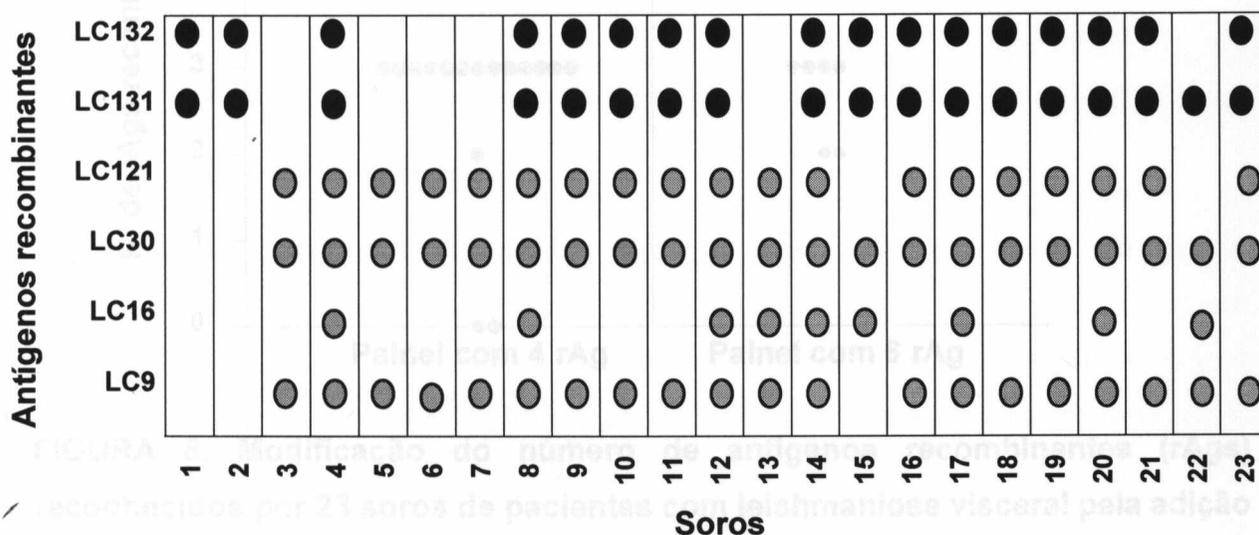


FIGURA 7. Reação de soros de 23 pacientes com leishmaniose visceral a um grupo de seis antígenos recombinantes (rAgs). Cada círculo indica uma reação positiva no ensaio Multistick, usando os rAgs e um conjugado anti-imunoglobulina humana ligada à peroxidase. As colunas de círculos representam o padrão de reatividade do soro individual com os rAgs LC132, LC131, LC121, LC30, LC16 e LC9. Espaços vazios sem círculos indicam ausência de reatividade do soro com o antígeno correspondente. Os antígenos recombinantes LC131 e LC132 foram selecionados por uma mistura de dois soros que produziram resultados negativos quando testados contra os outros quatro rAg (soros #1 & #2). A reatividade com esses antígenos (círculos negros) aumentou a sensibilidade do ensaio, em relação aos 23 soros, para 100 %.

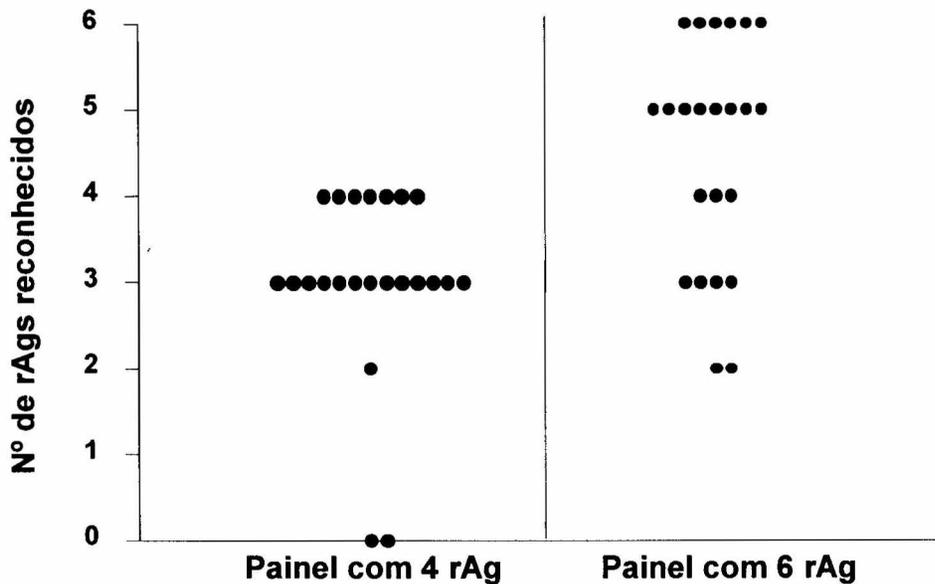


FIGURA 8. Modificação do número de antígenos recombinantes (rAgs) reconhecidos por 23 soros de pacientes com leishmaniose visceral pela adição de um quinto e um sexto rAg ao painel de rAgs. Cada símbolo representa um soro individual reconhecendo o número de rAgs indicado nas ordenadas.

Posteriormente outros 70 soros de pacientes com leishmaniose visceral, também confirmados parasitologicamente, foram utilizados nessa abordagem e, desta vez, seis destes soros não reconheceram nenhum dos cinco rAg do novo painel utilizado.

Uma mistura desses soros falso-negativos foi utilizada para triar bibliotecas de cDNA e DNA genômico.

Através desse processo foi selecionado um antígeno recombinante, o LC133, que está sendo testado. Resultados preliminares obtidos com ele constam das tabelas 5, 6 e 7.

5.3. Avaliação dos agentes de bloqueio de reações inespecíficas

O leite em pó desnatado, além de alternativa barata, apresentou-se eficiente na eliminação de ligações inespecíficas, sendo considerado

adequada uma concentração de 10 % (m/v), por reduzir a coloração basal das tiras a nível semelhante ao das tiras não incubadas com soro. A concentração de 5 % não foi tão efetiva (dados não mostrados).

5.4. Avaliação de diferentes matrizes sólidas de nitrocelulose

Todas as membranas testadas de diferentes marcas tiveram uma fraca coloração de fundo (“background”) depois do bloqueio, mas forneceram superfícies brancas para excelente contraste com a reação positiva. Como esse parâmetro foi igual para todas as membranas, a membrana fornecendo o sinal positivo mais intenso deveria ser a melhor escolha. Contudo a membrana de nylon, com o sinal de marcação ligeiramente superior, não foi selecionada devido à formação de “dots” de aspecto irregular e não circular. A escolha seguinte, com mínimo prejuízo do sinal observado, foi a membrana disponível comercialmente através da BioRad, que resultou no melhor sinal (marcação e padrão estético; dados não apresentados).

5.5. Avaliação da ligação de proteínas a papel de celulose

Como o papel de nitrocelulose é relativamente caro, testamos a possibilidade de que papel comum, de celulose, pudesse ser usado como matriz para insolubilização de antígenos. Papéis de diferentes fontes foram sensibilizados com IgG humana e testados em um “dot-blot” utilizando um conjugado peroxidase anti-IgG. Todos os papéis produziram resultados semelhantes do ponto de vista de intensidade de coloração (Fig. 9).

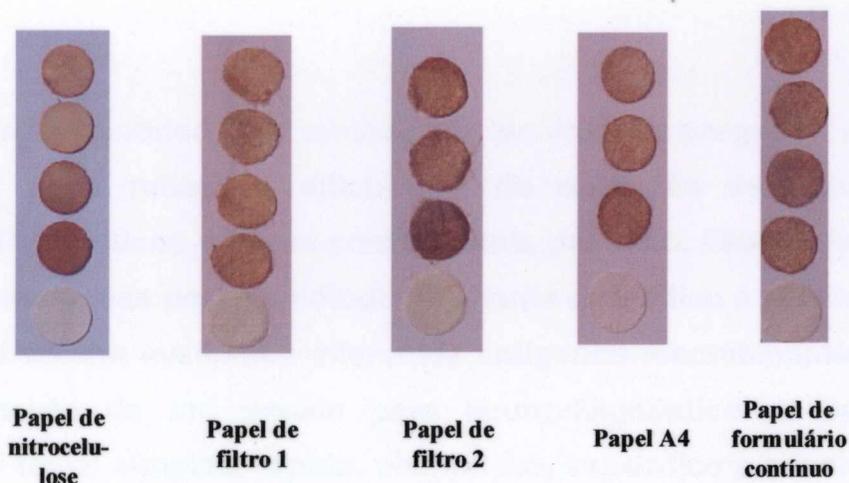


FIGURA 9. Sensibilização de diferentes papéis com antígeno. Pequenos discos de papéis foram sensibilizados com IgG humana (três ou quatro discos superiores) ou apenas com leite desnatado (discos inferiores), exaustivamente lavados (mais de dez vezes), e submetidos a uma reação imunoenzimática com anti-IgG humana conjugada a peroxidase.

Apesar de verificada ausência de diferença visual na ligação de IgG às matrizes de celulose testadas, quando foram utilizados soros de seres humanos contra antígenos recombinantes ligados a estas mesmas membranas, houve formação de coloração de fundo, que não pôde ser bloqueada, o que resultou na manutenção do papel de nitrocelulose como suporte sólido a ser sensibilizado pelos antígenos recombinantes.

VI. DISCUSSÃO

A grande quantidade de métodos e técnicas empregados nos exames sorológicos pode refletir a dificuldade de obtenção de resultados que subsidiem diagnósticos clínicos com absoluta precisão. Esse objetivo poderia ser alcançado apenas por um método altamente específico e sensível.

Nesse trabalho avaliamos diferentes antígenos recombinantes visando o desenvolvimento de um ensaio para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral que fosse simples, rápido, econômico, específico e sensível, além de não necessitar de eletricidade ou equipamento especial.

Um método simples e rápido para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* terá grande importância para a realização de imunodiagnóstico em regiões mais pobres do país, tendo aplicação na prática clínica, tanto humana quanto veterinária, haja vista que, devido à falta de uma ferramenta diagnóstica simples, o diagnóstico da leishmaniose visceral não pode ser realizado em muitos laboratórios. Portanto, há possibilidade da leishmaniose visceral não ser reconhecida ou ser erroneamente confundida com outras doenças com sinais e sintomas similares. Como uma consequência importante, a LV pode não ser tratada ou tratada impropriamente, além de informações quanto à incidência e prevalência serem comprometidas.

Atualmente, embora pesquisas em andamento para testes em campo sejam promissoras, não existe nenhum teste diagnóstico totalmente adequado para uso de rotina pelos laboratórios. O método proposto nesse trabalho poderia ter importância econômica para nosso país, devido à imensidão de nosso mercado e possibilidade de competir-se, de posse de um produto com eficácia comprovada em testes de campo, no mercado internacional.

Para facilitar a interpretação do resultado do ensaio, a tira do teste a ser desenvolvido (chamado antecipadamente de Multistick) contém todos os controles necessários para sua execução: o controle da ligação dos antígenos ao papel e o controle do estado do conjugado e do substrato. Além disso, um "kit" com o ensaio pode conter um gabarito com possíveis situações de reconhecimento dos casos positivos e negativos, com o objetivo de controlar vies e minimizar os erros devidos a possível inexperiência do operador. Outros

ensaios utilizando tiras de papel (ZIJLSTRA et al., 2001) registraram algumas vezes dificuldades quanto à discriminação de resultados positivos e negativos. Como em todo teste sorológico, soros controle positivos e negativos devem ser corridos em paralelo para servirem como referência.

No presente trabalho, em paralelo com os rAgs, foi testada uma tira de papel sensibilizada com lisado de *Leishmania*. Essa tira serviu para identificação de soros com anticorpos anti-*Leishmania* que não reconheciam nenhum dos rAg testados até então. A tira com o lisado não seria utilizada em um "kit" disponibilizado comercialmente.

Um problema comum em ensaios para detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes sintetizadas em *E. coli* é a presença de anticorpos contra proteínas contaminantes da bactéria. Como a *E. coli* está fisiologicamente presente na microbiota intestinal, podendo estimular o sistema imune do hospedeiro, anticorpos anti-*E. coli* podem ser, na maioria das vezes, responsáveis pela coloração de fundo e falsa-positividade no ensaio. Uma alternativa para contornar essa dificuldade seria o uso de proteínas recombinantes purificadas como fonte de antígenos para o ensaio. No entanto, algumas vezes é difícil obter proteínas 100% puras sem a contaminação com outras proteínas de *E. coli* (COVINI et al., 1996). Uma outra alternativa, testada no presente trabalho, seria a diluição dos soros a serem testados com uma solução contendo um lisado bacteriano com o produto de plasmídeos sem o inserto de DNA de *Leishmania*, de modo a bloquear os anticorpos contra os antígenos bacterianos. Este lisado é um reagente relativamente barato.

Nesse estudo, foram avaliados rAgs quanto a sua aplicação para o diagnóstico de LV, e não necessariamente para infecção por *L. chagasi*, ou em triagem epidemiológica. O objetivo final é o desenvolvimento de um método visando distinguir a leishmaniose visceral de outras doenças na prática clínica, de modo a facilitar uma rápida tomada de decisão quanto à instituição de tratamento específico, e principalmente, ser de fácil interpretação. Isso pode trazer repercussões desejáveis sobre a conduta clínica na leishmaniose visceral, pois as drogas usadas para combater a infecção apresentam toxicidade significativa (BRYCESON et al., 1985; BODLEY et al., 1995) e não devem ser aplicadas em casos com diagnóstico duvidoso.

Várias técnicas imunodiagnósticas foram utilizadas em paralelo a avaliação dos rAgs para analisar o desempenho deles de forma comparativa. No entanto, há armadilhas metodológicas quanto à validação de testes sorodiagnósticos (BEGG, 1987; VALENSTEIN, 1990). O fato mais importante parece ser a ausência de um teste de referência (padrão ouro) com grande sensibilidade para a infecção pelo parasito que causa a LV (ZIJLSTRA et al., 1991). Isto prejudica a avaliação da sensibilidade e especificidade de novos testes diagnósticos, haja vista a incerteza da determinação de casos verdadeiramente positivos.

O diagnóstico definitivo da LV depende da demonstração de amastigotas da *Leishmania* na medula óssea ou outros materiais de punção (baço, linfonodo e fígado). Esses procedimentos, além de invasivos, apresentam baixa sensibilidade.

Zijlstra e colaboradores (1992) determinaram uma sensibilidade de 93,1%, 67,8% e 56,3% em aspirados esplênicos, de medula óssea e linfonodo respectivamente, na investigação para LV em seres humanos, usando como padrão ouro o próprio exame parasitológico, ou seja, quando no paciente já havia sido demonstrada a presença da *Leishmania*, procedia-se a outra tentativa de detecção da mesma. Logo, nem sempre foi possível demonstrar, no mesmo paciente, a ocorrência dos parasitos. Isso pode ser devido à distribuição focal da *Leishmania* nos órgãos, o que aumenta a chance do acaso no encontro do protozoário.

Pelo exposto acima e na introdução, ao serem discutidos os diferentes métodos imunodiagnósticos, a resposta sorológica, isoladamente considerada, não é aceitável como padrão ouro para leishmaniose, devido à persistência da resposta sorológica em indivíduos curados e à ausência de anticorpos em infecções recentes. Apesar da baixa sensibilidade, no presente trabalho optou-se pelo diagnóstico parasitológico como padrão ouro.

Um problema que a maioria dos testes de detecção de anticorpos não tem conseguido superar é o de uma falta relativa de especificidade (ZIJLSTRA et al., 2000). Particularmente em estudos epidemiológicos sobre LV, algumas vezes encontram-se anticorpos sem concomitante evidência parasitológica da infecção. Isso, além de ser devido à persistência dos anticorpos após tratamento ou cura própria (ZIJLSTRA et al., 1991), também pode estar

relacionado à ocorrência de reatividade cruzada entre os antígenos de *L. chagasi* e aqueles de outros agentes infecciosos (JAFFE et al., 1984; SCOTT et al., 1991; WILLIAMS, 1995; TEIXEIRA et al., 1996).

Alguns fatos que comprometem a especificidade de um teste sorodiagnóstico da LV são: (1) geralmente algumas amostras de soros de pacientes com outras infecções mostram uma reatividade contra antígenos de *Leishmania*; (2) a especificidade dos métodos de detecção de anticorpos tende a ser menor em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral do que em áreas não endêmicas; e (3) o "padrão-ouro" dos métodos diagnósticos, a confirmação parasitológica, é seriamente desprovida de sensibilidade, isto é, alguns soros considerados falso positivos podem na verdade ser verdadeiramente positivos.

Desafortunadamente, os métodos de detecção de antígenos, que são mais específicos do que os sorológicos, não parecem ter uma sensibilidade que seja superior àquela dos métodos parasitológicos. E mais, em populações com baixa prevalência e baixa intensidade da infecção por *L. chagasi*, a detecção de antígenos parece ser menos sensível do que a detecção de parasitos. A presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, portanto, pode ser um indicador mais sensível da presença da infecção. Isso ocorre devido ao fato de que, em contraste com os métodos parasitológicos e de detecção de antígenos, a detecção de anticorpos explora a amplificação do sinal na resposta imune humoral (KAR, 1995). Por outro lado, a falta de anticorpos não indica a ausência do parasito, como é o caso de uma considerável proporção de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humano, que também são infectados com *L. donovani* e não apresentam resposta humoral detectável ao parasito (LOPEZ et al., 1993). Conforme afirmado por Fletcher e colaboradores (1996), a avaliação da precisão de um teste apóia-se na sua relação com as várias formas de saber se a doença está presente ou não (sondagem da verdade), e isso muitas vezes refere-se a um 'padrão-ouro'. Por sua vez, o padrão-ouro é freqüentemente evasivo.

Na revisão que foi desenvolvida anteriormente, procurou-se demonstrar que existe um grande número de métodos disponíveis para o diagnóstico da infecção por *L. chagasi*. Os problemas encontrados com o diagnóstico

parasitológico foram discutidos, e as vantagens e desvantagens relativas da detecção de antígenos ou de anticorpos foram consideradas. Em todos os métodos analisados existem problemas. Contudo, como a menor especificidade dos métodos de detecção de anticorpos (relativo ao parasitológico, por exemplo) é, na verdade, um reflexo de sua grande sensibilidade, a detecção de anticorpos poderá tornar-se cada vez mais, dependendo do uso de antígenos adequados, mais específicos, o método diagnóstico escolhido.

Por outro lado, se os métodos de IFI, ELISA com lisado total de promastigota e DAT para detecção de anticorpo anti-*Leishmania* são úteis no imunodiagnóstico da LV, porque colocar ênfase no desenvolvimento de novos testes que utilizem antígenos recombinantes? Existem várias razões para tal desenvolvimento.

Uma delas é o desempenho do ensaio, que é, na maioria das vezes, limitado pela confiabilidade da fonte do antígeno. Parasitos inteiros e lisados dificilmente fornecem a reprodutibilidade e a especificidade máxima desejada, pois mesmo que preparados sob as condições disponíveis de controle de qualidade estrito, trazem implícita uma grande variabilidade (UMEZAWA e SILVEIRA, 1999) e, por conterem um número grande (dezenas) de antígenos misturados no lisado ou localizados nos parasitos, apresentam grande chance de reação cruzada com pelo menos um dos igualmente muitos antígenos de outros microorganismos complexos, gerando resultados controversos.

A principal razão para o desenvolvimento de um teste como o proposto nesta dissertação é que nenhum dos testes correntemente em uso garante um máximo de sensibilidade e especificidade.

Conforme descrito nesta dissertação, ensaios empregando ELISA, dot-ELISA e "Western blot", usando lisados de *Leishmania* e soros de pacientes humanos com leishmaniose visceral e com diferentes doenças e de indivíduos normais, apresentaram sensibilidade de 97,7%, 98,9% e 100%, respectivamente, enquanto o teste de Multistick empregando seis rAgs apresentou 93,5 % de sensibilidade e com sete rAgs pelo menos 96,7 % de sensibilidade (100 % de sensibilidade em 90 soros testados). O valor de 96,7 % de sensibilidade é o valor mínimo para o ensaio com sete antígenos recombinantes porque três soros negativos para anticorpos no ensaio com

seis antígenos não puderam ainda ser testados no ensaio de sete antígenos, sendo considerados provisória e talvez erroneamente negativos também neste último ensaio. O "Western blot", que apresentou 100% de sensibilidade do Multistick, tem as seguintes desvantagens em relação a este último: ele depende de uma eletroforese de antígenos parasitários, mais trabalhosa do que a produção de antígenos recombinantes a partir de bactérias transfectadas (após o processo de produção ter sido padronizado), e está sujeito a possíveis variações no lote do lisado parasitário, o que também afeta a reprodutibilidade do dot-ELISA com lisado parasitário.

O ELISA usado neste trabalho, de acordo com o limite de negatividade adotado, exibiu alta porcentagem de reação positiva em pacientes com leishmanioses cutânea localizada, cutâneo-mucosa e cutâneo difusa, não sendo capaz de discriminar pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea, apesar de se mostrar específico para leishmanioses em relação a outras doenças e a controles normais, conforme descrito na literatura.

No caso do SLE, apesar de ter sido documentada reatividade cruzada entre anticorpos antinucleares e anticorpos anti-*Leishmania* (GRANEL et al., 2000), ela não foi registrada. Para a hanseníase, reatividade cruzada foi também encontrada por Rab e Evans (1995), mas, no entanto, não foi demonstrada neste trabalho. Os resultados aqui apresentados em relação a esses soros, no entanto são bem preliminares, devido à pequena amostragem.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a obtenção de quantidades apreciáveis de proteínas puras tornou-se disponível com relativa facilidade (CARROLL, 1993; BAYERTZ, 2000), o que trouxe claras repercussões principalmente sobre o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos. Os trabalhos de Yang e colaboradores (1996) com *Plasmodium*, Bughio e colaboradores (1999) com *Leptospira*, Jensen e colaboradores (1999) com *Leishmania*, Dillon e colaboradores (2000) com *Mycobacterium*, Nakajima-Nakano e colaboradores (2000) com *Toxoplasma*, Cloeckert e colaboradores (2001) com *Brucella*, Gomes e colaboradores (2001) com *Trypanosoma cruzi*, Silva e colaboradores (2001) com *Dermatophagoides* e Lee e colaboradores (2000) com *Entamoeba histolytica*, são alguns exemplos de utilização de proteínas recombinantes de diferentes

microorganismos para o imunodiagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

A utilização de antígenos recombinantes (rAg) pode, no entanto, produzir resultados falso-negativos devido à natureza polimórfica da resposta imune contra antígenos complexos. Esse polimorfismo pode estar relacionado a múltiplos fatores, como a constituição genética do indivíduo, sua história imunológica passada (isto é, os antígenos aos quais foi exposto), a seleção, ativação clonal e imunomodulação provocada pelo encontro possivelmente aleatório de diferentes linfócitos com o antígeno (PONTES-DE-CARVALHO et al., enviado para publicação).

A própria história do desenvolvimento do "kit" para o imunodiagnóstico da LV utilizando o rK39 ilustra bem esse problema. Esse "kit" apresentou problemas em detectar casos assintomáticos da doença, reconhecendo apenas casos ativos da infecção e mesmo assim nem todos eles (S. JERÔNIMO, comunicação pessoal). Tanto que, atualmente, sua utilização está condicionada ao uso simultâneo com outro antígeno que promete corrigir esta distorção (BHATIA et al, 1999).

Uma solução óbvia para corrigir esse problema seria através do aumento do número de rAgs no ensaio.

Na literatura, alguns relatos corroboram essa proposta para ampliação do número de antígenos ou anticorpos diferentes para uso em imunodiagnóstico. Kashiwazaki e colaboradores (1994), através de um sistema de detecção de múltiplos antígenos, utilizaram simultaneamente em um "dipstick" dois anticorpos monoclonais e um policlonal, dessa forma ampliando a sensibilidade de um ensaio de captura de antígenos de tripanossomos no gado de Uganda. Esse trabalho mostrou ainda a possibilidade de discriminar infecções causadas por diferentes espécies de *Trypanosoma*, através da observação de cinco padrões distintos, obtidos pela combinação dos resultados gerados pelo reconhecimento individual dos antígenos pelos anticorpos. Marty e colaboradores (1995), utilizando lisado de promastigotas de *L. infantum*, já apontavam em direção ao reconhecimento de pelo menos quatro bandas no "Western blot" pelo soro de pacientes com LV, como medida de aumento da especificidade do diagnóstico, observação compartilhada também por Brito e colaboradores (2000) para leishmaniose cutânea. Salotra e

colaboradores (1999a) observaram que 83% dos casos de LV testados detectavam simultaneamente pelo menos quatro antígenos. Gari-Toussaint e colaboradores (1994) para garantir alta sensibilidade na detecção de anticorpo anti-*Leishmania* em pacientes infectados com HIV, preferiram associar os resultados de pelo menos três testes diagnósticos. Marty e colaboradores (1994) recomendam o uso simultâneo de dois testes como um recurso valioso para conhecer a condição imunológica de populações de áreas endêmicas de LV em estudos prospectivos.

Teixeira e Vexenat (1996) apontam que melhores resultados na tentativa de resolver problemas associados com testes sorológicos poderiam ser obtidos com misturas de antígenos recombinantes, tendo em vista a possibilidade de tornar os testes mais sensíveis. Umezawa e Silveira (1999) citam vários outros autores na indicação de um "cocktail" de antígenos recombinantes como forma de se obter teste diagnóstico mais confiável. Nessas diferentes maneiras de corrigir e melhorar a sensibilidade dos testes, o verbo combinar parece ser a palavra de ordem. Entretanto, ainda que as abordagens descritas acima recomendem o uso de vários antígenos simultaneamente, o que está de acordo com nossa proposta, existe uma diferença marcante entre a nossa proposta e elas, conforme explicado abaixo.

Em termos da mistura de antígenos recombinantes proposta acima, é evidente que, se na mistura existir algum antígeno recombinante que provoque resultado falso-positivo, a especificidade que poderia advir dos outros antígenos estará comprometida (e isto provavelmente é o que acontece na complexa mistura de antígenos que constitui os lisados). Mas se, como proposto nesta dissertação, os antígenos forem testados isoladamente, a especificidade final poderá ser um produto combinado das especificidades individuais, e nesse contexto, como demonstrado a seguir, apenas o padrão exibido será relevante.

Assim, mesmo que, por exemplo, o antígeno recombinante LC16 tenha sido reconhecido por 25 % e 100 % respectivamente, dos soros dos grupos com leishmaniose cutânea e cutâneo difusa, a combinação dele com os outros rAg formou padrões distintos que diferenciou a reação desses grupos de soros, dos soros de pacientes com LV, ampliando deste modo a especificidade, que passou de 87,2 % (utilizando-se o LC16 como único

antígeno) para 100% (padrão combinado de antígenos). Assim, espera-se que, em um ensaio do Multistick, em que os rAgs são estudados isoladamente, não se possa falar de uma única especificidade. Por exemplo, o reconhecimento de pelo menos três antígenos, ou do antígeno LC30 com qualquer outro antígeno, poderia implicar em 100% de especificidade em relação a indivíduos sem leishmaniose. Já o reconhecimento de determinado antígeno isolado poderia implicar, por exemplo, em 89,4% de especificidade.

O benefício da abordagem proposta é claro. O uso de mais de um rAg, testado isoladamente, fornece um efeito "bônus": tanto, a sensibilidade quanto a especificidade podem ser aumentadas, pois um soro que não reconhece um antígeno particular pode reconhecer outro (aumentando a sensibilidade) e soros realmente específicos podem reconhecer mais do que um rAg (aumentando a especificidade de padrões de reconhecimento de mais de um antígeno).

Dados aqui mostrados sugerem que o Multistick talvez se preste a diferenciar a infecção por *L. chagasi* das infecções por outras espécies de *Leishmania*, quando é analisado o padrão de reconhecimento de um grupo de antígenos recombinantes e não o reconhecimento de cada um isoladamente. Para visualização desse efeito deve-se remeter a duas análises: uma que considera reações isoladas com os antígenos (TABELA 5) e outra que considera o padrão de reconhecimento de vários antígenos (TABELA 7).

Deve-se observar, contudo, que um número maior de amostras de soros das formas tegumentares de leishmaniose deve ser obrigatoriamente estudado para que se comprove a existência de padrões de reconhecimento de rAgs específicos para leishmaniose visceral, definindo, portanto, a especificidade do ensaio.

A indisponibilidade de maiores informações sobre o estado clínico dos pacientes nesse trabalho, não permitiu uma correlação sobre o status da infecção com o reconhecimento de algum antígeno em particular.

O número de oito bandas reconhecidas em média pelos soros de pacientes com LV em lisado de promastigotas no "Western blot" foi superior ao número médio de quatro rAgs reconhecidos pelos mesmos soros. Isso indica que novos rAgs poderiam ser obtidos de uma biblioteca genômica, possivelmente aumentando a especificidade de um ensaio imunodiagnóstico

do tipo aqui proposto, já que os valores numéricos obtidos no "Western blot" com antígenos de promastigotas são os valores mínimos, porque não foram avaliados antígenos expressos apenas por amastigotas.

Outra questão pode ser levantada: existe uma maneira fácil de se conseguir novos rAgs? Para realizar isto, utilizamos uma abordagem óbvia, mas, por definição, eficaz. A abordagem consiste em realizar nova triagem nas bibliotecas genéticas com aqueles soros que não reagem com os rAgs já disponíveis, identificando exatamente aqueles antígenos recombinantes que serão reconhecidos pelos soros que produziram resultados falso-negativos, ou seja, que irão aumentar a sensibilidade do imunoenensaio, teoricamente atingindo uma sensibilidade máxima.

Resumidamente, empregando essa metodologia de seleção por soro falso-negativo, processo descrito com detalhes na metodologia, a sensibilidade do ensaio para LV com quatro rAgs foi elevada de 82,8 % para pelo menos 96,7 % com a incorporação de três novos antígenos. Esse método, com sua simplicidade, constitui-se em um rápido processo para "garimpar" antígenos de bibliotecas genéticas de interesse para o imunodiagnóstico.

A sensibilidade máxima referida anteriormente alcançará 100% somente se todos indivíduos infectados produzirem anticorpos contra o agente infeccioso. Isso é improvável que aconteça, particularmente nos primeiros dias da infecção. Contudo, o período de incubação de muitas doenças infecciosas, tais como a LV, pode ser longo (KAR, 1995), chegando a ser de até 14 meses (JERÔNIMO et al., 2000). Assim, quando for chamada a atenção médica, em indivíduos imunocompetentes, a sensibilidade de um ensaio para detecção de anticorpos pode aproximar-se de 100%.

Um fator que poderia interferir diretamente sobre o desempenho de testes imunodiagnósticos, inclusive no Multistick, é o isotipo de imunoglobulina a ser detectado. Na maioria dos soros de pacientes com LV existe um pronunciado aumento de IgG, e em menor extensão de IgM (KAR, 1995). Também está bem estabelecido que, no curso das doenças infecciosas, existe uma cronologia no aparecimento dos isotipos das imunoglobulinas conforme verificado para a doença de Chagas por Umezawa e Silveira (1999), que comentam ainda que anticorpos específicos da classe IgA podem ocorrer precocemente em

doenças infecciosas. Em geral, resumidamente, anticorpos IgM ocorrem mais precocemente e anticorpos IgG mais tardiamente.

Anam e colaboradores (1999a), analisando a distribuição das subclasses de imunoglobulinas durante a fase clínica da LV, demonstraram uma ordem de sensibilidade e especificidade dos diferentes isotipos contra antígenos da membrana de *L. donovani*, que foi a seguinte para a sensibilidade (IgG total = IgG1 = IgG3 = IgG4 > IgG2 > IgM > IgE > IgA) e para a especificidade (IgM = IgG3 > IgE > IgG4 > IgG2 > IgG total > IgG1 > IgA). IgG3 foi o único isotipo estudado que alcançou 100% de especificidade e sensibilidade entre os pacientes com LV. Resultados semelhantes em pacientes após tratamento também são vistos em Anam e colaboradores (1999b). Contudo, em nenhum dos dois trabalhos tem-se uma indicação do perfil de isotipos durante as fases iniciais da doença. Atta e colaboradores (1998) conseguiram 100% de sensibilidade e especificidade para doença ativa em 23 pacientes com LV quantificando anticorpos IgE anti-*Leishmania*.

Para a esquistossomose, Valli e colaboradores (1999) relataram que a identificação do isotipo de anticorpo responsável por reações positivas poderia ajudar a diferenciar entre infecção aguda e crônica por *Schistosoma* e também poderia servir como marcador epidemiológico de transmissão em áreas endêmicas da doença. Tal preocupação também não escapou a Gussenhoven e colaboradores (1997), cujo estudo avaliava o diagnóstico de casos precoces de leptospirose através da detecção de anticorpos IgM em um ensaio do tipo "dipstick", que encontraram maiores títulos de IgM entre os dias 10 e 30 após o início da infecção, declinando após esse período. No entanto, eles também relataram a ocorrência de reatividade cruzada com anticorpos IgM de pacientes com outras doenças e que isto deveria ser levado em consideração na interpretação do teste. Zijlstra e colaboradores (2001), em um ELISA utilizando o antígeno K39 purificado para detecção de anticorpos IgM, encontraram que 56% de todos os pacientes com LV foram positivos, embora não tenham relacionado o perfil cronológico desse isotipo com as diferentes fases da doença.

Os dados obtidos no presente trabalho, com todos os soros com anticorpos IgG reagindo contra um lisado de promastigotas, indicam que uma possível ausência de anticorpos contra os antígenos recombinantes testados

em três deles não é consequência de uma produção diferencial de isotipos de anticorpos durante a doença e sim da necessidade de utilizar-se novo(s) rAg(s) por eles reconhecidos.

Os testes que compõem esta dissertação serviram para identificar rAgs que, por em seu conjunto apresentarem sensibilidade semelhante, ou melhor, que o ELISA, merecem ser analisados quanto a sua especificidade com um número elevado de soros de indivíduos com diferentes doenças. Essas análises devem, no entanto, ser realizadas com tiras de papel de nitrocelulose sensibilizadas com rAg previamente purificados, de maneira a garantir a reprodutibilidade do ensaio. Investigações nas linhas supracitadas serão brevemente iniciadas.

Na verdade, esta dissertação corresponde a uma etapa inicial de desenvolvimento de um ensaio, na qual ênfase está sendo posta na obtenção de 100% de sensibilidade. Em uma segunda etapa desenvolver-se-ão estudos voltados especificamente para testar-se um grande número de soros de pacientes de diferentes patologias e diferentes procedências.

VII. NOVAS POSSIBILIDADES E PROPOSTAS FUTURAS DO PRESENTE

ESTUDO

Vários rAg de *L. chagasi* já foram clonados em nosso laboratório, alguns já foram seqüenciados, ou estão em fase de sequenciamento, e estão sendo analisados para o uso em sorodiagnóstico. Nesse momento, pelo menos dois deles já estão purificados.

O resultado bem sucedido dos rAg de *L. chagasi* no Multistick contra soros de pacientes com LV, em termos de sensibilidade, é encorajador e mostra a possibilidade de substituição dos mesmos no lugar do lisado de *L. chagasi* como substrato para a realização de outros formatos de ensaio como, por exemplo, no ELISA, para que possam ter sua eficiência diagnóstica avaliada.

Enquanto este estudo demonstrou a sensibilidade e, preliminarmente, a especificidade do teste Multistick para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no laboratório, outros trabalhos serão necessários para testar a sua utilidade em campo, quando também deverá ser iniciada uma coorte de indivíduos infectados por *Leishmania chagasi*, para adicionalmente, analisar a natureza e a duração da resposta imune contra os antígenos recombinantes usados no teste, que necessitam ser avaliadas quanto às suas capacidades de distinguir pacientes com LV dos indivíduos com infecção assintomática, bem como com outras doenças e outras formas de leishmanioses.

Novos estudos comparativos realizados a partir do acompanhamento de populações de indivíduos provenientes de áreas endêmicas, com diferentes formas de leishmaniose e outras doenças, por certo definirão a utilidade dos rAg aqui estudados no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral, como também sua relação com as diversas fases clínicas da doença, para dessa forma, definir o valor preditivo positivo em indivíduos com infecção inaparente.

Esses estudos deverão ser realizados com tiras de Multistick, preparadas de modo mais padronizado, com antígenos recombinantes purificados.

VIII. CONCLUSÃO / SUMÁRIO DE RESULTADOS

- 1. Utilizando a tecnologia do DNA recombinante para obtenção de antígenos relevantes, foram selecionados sete rAgs com potencial de serem utilizados em um teste imunodiagnóstico para leishmaniose visceral;**
- 2. As proteínas recombinantes, testadas isoladamente em um teste de "dipstick", conferiu ao teste pelo menos 96,7% de sensibilidade em 93 soros de pacientes selecionados por critérios clínicos e parasitologicamente positivos;**
- 3. A especificidade do teste, em relação a um pequeno grupo de 47 soros, foi também de 100%;**
- 4. Soros que produzem resultados falso-negativos em um ensaio diagnóstico podem ser utilizados para a seleção de novos rAgs em bibliotecas de cDNA ou genômicas, de maneira a aumentar a sensibilidade de um ensaio sorodiagnóstico.**

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍNZANO, M. L.; VELILLA, J. P.; ELEJALDE, I.; PÉREZ, C.; MICHELENA, I.; PRUJÁ, E.; RUBIO, T. Leishmaniasis visceral en paciente inmunocompetente. Ann. Sist. Sanit. Navarra, 20: 1997.

ABRAMSON, M. A.; DIETZE, R.; FRUCHT, D. M.; SCHWANTZ, R.; KENNEY, R. T. Comparison of new and old leishmanins in an endemic region of Brazil. Clin. Infect. Dis., 20: 1292-1297, 1995.

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. J. Parasitol., 77: 557-561, 1991.

AGUILAR, C. M.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R.; CANNOVA, D. C.; FERRER, E.; CABRERA, Z.; SOUZA, W. J. S.; COUTINHO, S. G. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 93: 15-16, 1998.

AKTHAR, M. Visceral leishmaniasis. Disponível em: <<http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/vlhp.htm>>. Acesso em 08 abr., 2001.

ALCE, T. M.; GOKOOL, S.; MCGHIE, D.; STAGER, S.; SMITH, D. F. Expression of hydrophilic surface proteins in infective stages of *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol., 102: 191-196, 1999.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no novo mundo. Publicações Médicas, 196: 1-12, 1956.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. Rev. Med. Univ. Fed. Ceará, 17/18: 129-148, 1978.

ALLEN, T.; HWANG, H. Y.; WILSON, K.; HANSON, S.; JARDIM, A.; ULLMAN, B. Cloning and expression of the adenine phosphoribosyltransferase gene from *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol., 74: 99-103, 1995.

AL-ORAINY, I.; GASIM, I. Y.; SINGH, L. M.; IBRAHIM, B.; UKABAN, S. O.; GONCHIKAR, D.; SHEKHAWAT, B. S. Visceral leishmaniasis in Gizan, Saudi Arabia. Ann. Saudi Med., 14: 396-398, 1994.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 298-319, 1997.

ALVAR, J.; JIMENEZ, M. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoir? *AIDS*, 8: 854, 1994.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; GUPTA, P. N.; SAHA, S. K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in indian kala-azar patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6: 231-235, 1999a.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; SAHA, S. K.; ALI, N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect. Immun.*, 67: 6663-6669, 1999b.

ARGOV, S.; JAFFE, C. L.; KRUPP, M.; SLOR, H.; SHOENFELD, Y. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. *Clin Exp Immunol.*, 76: 190-197, 1989.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infect. Dis.*, 2: 145-146, 1996.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A.; McSHANE, D. J.; FRIES, J. F.; COOPER, N. S.; HEALEY, L. A.; KAPLAN, S. R.; LIANG, M. H.; LUTHRA, H. S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 31: 315, 1988.

ARORA, S. K.; SEHGAL, S. Identification of major antigens of *Leishmania donovani* using kala azar sera. *Med. Microbiol. Immunol.*, 178: 81-88, 1989.

ASHFORD, D. A.; BADARÓ, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M. G.; DAVID, J. R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation on the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA™) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48: 1-8, 1993.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1269-1281, 2000.

ATTA, A. M.; D'OLIVEIRA, A.; CORREA, J.; ATTA, M. L.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59: 426-430, 1998.

ATTAR, Z. J.; CHANCE, M. L.; EL-SAFI, S.; CARNEY, J.; AZAZY, A.; EL-HADI, M.; DOURADO, C.; HOMMEL, M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, 78: 11-16, 2001.

AZAZY, A. A.; CHANCE, M. L.; DEVANEY, E. A time-course study of circulating antigen and parasite-specific antibody in cotton rats infected with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91: 153-162, 1997.

AZAZY, A. A.; DEVANEY, E.; CHANCE, M. L. A PEG-ELISA for the detection of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 62-66, 1994.

BACELLAR, O.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E.M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24: 791-795, 1991.

BACELLAR, O.; D' OLIVEIRA JR, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, 12: 1228-1231, 2000.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 154: 1003, 1986a.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.*, 154: 639-649, 1986b.

BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; QUEIROZ, A. C.; JONES, T. C. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet*, 1: 647-649, 1986c.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35: 72-78, 1986d.

BADARÓ, R.; EULALIO, M. C.; BENSON, D.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BURNS, J. M.; DAVID, J. R.; JOHNSON JR, W. D.; REED, S. G. Sensivity and specificity of a recombinant *Leishmania chagasi* antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 70: 331-332, 1993.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 173: 758-761, 1996.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 536-546, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A. W.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 257: 545-548, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 149-155, 1998.

BAYERTZ, K. Recombinant DNA technology: chances, risks, ethical considerations. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 73: 23-26, 2000.

BEGG, C. B. Biases in the assessment of diagnostic tests. *Stat. Med.*, 6: 411-423, 1987.

BERBERICH, C.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp. Parasitol.*, 85: 105-108, 1997.

BERENQUER, J.; GOMEZ-CAMPDERA, F.; PADILLA, B.; RODRIGUEZ-FERRERO, M.; ANAYA, F.; MORENO, S.; VALDERRABANO, F. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) in transplant recipients: case report and review. *Transplantation*, 65: 1401-1404, 1998.

BERN, C.; JHA, S. N.; JOSHI, A. B.; THAKUR, G. D.; BISTA, M. B. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63: 153-157, 2000.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 102: 249-261, 1999.

- BHATTACHARYYA, J.; HATI, A. K. The adverse affects of kala-azar (visceral leishmaniasis) in women. In: ROBERTS, J.H.; VLASSOFF, C., ed(s), *The female client and the health-care provider*. IDCR, 1995.
- BODLEY, A. L.; MCGARRY, M. W.; SHAPIRO, T. A. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J. Infect. Dis.*, 172: 1157-1159, 1995.
- BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity. *Trop. Med. Int. Health*, 4: 789, 1999a.
- BOELAERT, M.; LYNEN, L.; DESJEUX, P.; VAN DER STUYFT, P. Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. *Bull. World. Health Organ.*, 77: 667-674, 1999b.
- BOELAERT, M.; EL SAFI, S.; JACQUET, D.; MUYNCK, A.; VAN DER STUYFT, P.; LE RAY, D. Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 129-134, 1999c.
- BOELAERT, M.; EL SAFI, S.; GOETGHEBEUR, E.; GOMES-PEREIRA, S.; LE RAY, D.; VAN DER STUYFT, P. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, 4: 395-401, 1999d.
- BORGES, A. S.; MACHADO, A. A.; FERREIRA, M. S.; FIGUEIREDO, J. F. C.; SILVA, G. F.; CIMERMAN, S.; BACHA, H. A.; TEIXEIRA, M.C. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus infection: a study of four cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32: 713-719, 1999.
- BRAGA, M. D. M.; COÊLHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULIFFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. Canine kala-azar control: aftermath comparasion of a fast deletion program of serum-reactive dogs by immuno-enzimatic assay with another of late deletion program of serum-reactive dogs by indirect immunofluorescence of filter paper eluate. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31: 419-424, 1998.
- BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7: 318-321, 2000.
- BRITTINGHAM, A.; MILLER, M. A.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 112: 51-59, 2001.

- BRYCESON, A. D.; CHULAY, J. D.; MUGAMBI, M.; WERE, J. B.; GACHIHI, G.; CHUNGE, C. N.; MUIGAI, R.; BHATT, S. M.; HO, M.; SPENCER, H. C., et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 705-714, 1985.
- BUGHIO, N. I.; LIN, M.; SURUJBALLI, O. P. Use of recombinant flagellin protein as a tracer antigen in a fluorescence polarization assay for diagnosis of leptospirosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6: 599-605, 1999.
- BÜHRER, S. S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN INGEN, C. W.; KLATSER, P. R. A simple dipstick for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58: 133-136, 1998.
- BURNS JR, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARÓ, R.; REED, S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in african and american visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 775-779, 1993.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, S. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.*, 14: 531-539, 1992.
- CABRERA, G. P.; DA SILVA, V. O.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 296-301, 1999.
- CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; PARTLONG, F.; DEDET, J. P.; ABRANCHES, P. HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 394, 1994.
- CANESE, A.; GAROSO, O.; RAMÍREZ, J.; MAIDANA, M.; MONTI, M.; SANTACRUZ, R.; LOUTEIRO, J.; TERRAZAS, E.; GENES, L.; MALDONADO, G.; CÉSPEDES, M.; MEZA, J.; CANESE, J. Focos de leishmaniasis visceral canina en las ciudades de Lambaré y Villa Elisa, Paraguay. *Rev. Paraguaya Microbiol.*, 18:, 1998.
- CARROLL, W. L. Introduction to recombinant-DNA technology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 58: 249-258, 1993.
- CARVALHO, E. M.; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 61-68, 1983.

- CARVALHO, E. M.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON JR., W. D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.*, 76: 2066-2069, 1985.
- CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; JOHNSON JR, W. D. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J. Clin. Invest.*, 83: 860-864, 1989.
- CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON JR., W.D. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *J. Infect. Dis.*, 165: 535-540, 1992.
- CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, 152: 5949-5956, 1994.
- CASTRO, F.; CHACIN-BONILLA, L. Visceral leishmaniasis in Amerindians: an unusual fatal case from western Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 299-300, 2000.
- CHANG, K. P. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science*, 12: 1240-1242, 1980.
- CHATTERJEE, M.; JAFFE, C. L.; SUNDAR, S.; BASU, D.; SEM, S.; MANDAL, C. Diagnostic and prognostic potential of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for leishmaniasis in India. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6: 550-554, 1999.
- CHYE, S. M.; YEN, C. M.; CHEN, E. R. Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of angiostrongyliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56: 408-412, 1997.
- CIBRELUS, P.; PRÉCIGOUT, E.; SERENO, D. S.; CARCY, B.; LEMESTRE, J. L.; GORENFLOT, A. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. *Parasite*, 6: 121-129, 1999.
- CILLARI, E.; VITALE, G.; ARCOLEO, F.; D' AGOSTINO, P.; MOCCIARO, C.; GAMBINO, G.; MALTA, R.; SATASSI, G.; GIORDANO, C.; MILANO, S.; MANSUETO, S. In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine*, 7: 740-745, 1995.

CÓRDOVA-USCANGA, C.; ALBERTOS-ALPUCHE, N. E.; ANDRADE-NARVAEZ, F. J.; CANTO-LARA, S. B. Leishmaniasis: estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del Estado de Tabasco. *Salud Publica Mex.*, 35: 345-350, 1993.

CORREDOR ARJONA, A.; ALVAREZ MORENO, C. A.; AGUDELO, C. A.; BUENO, M.; LÓPEZ, M. C.; CÁCERES, E.; REYES, P.; DUQUE BELTRAN, S.; GÜALDRON, L. E.; SANTACRUZ, M. M. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 41: 229-234, 1999.

CORTÉS, P.; CARDENOSA, N.; MUNOZ, C.; DURAN, I.; LETA, R.; ROCA-CUSACHS, A.; GALLEGO, M. Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis in an immunocompetent patient. *Clin. Microbiol. News.*, 19: 14-16, 1997.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980- 1986. *Rev. Saude Publica*, 24: 361-372, 1990

COVINI, G.; CHAN, E. K. L.; COLOMBO, M.; TAN, E. M. Comparison of protocols for depleting anti-*E. coli* antibody in immunoblotting of recombinant antigens. *J. Immunol. Methods.*, 190: 143-145, 1996.

CUMMINS, A. J.; MOODY, A. H.; LALLOO, K.; CHIODINI, P. L. Development of a rapid latex agglutination tests for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 300, 1994.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTOVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON JR, W. D.; REED, S. G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche a major metropolitan area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 155-158, 1995.

DAVIDSON, R. N. Visceral leishmaniasis in clinical practice. *J. Infect.*, 39: 112-116, 1999.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47: 37-39, 2000.

DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. Washington: WHO, 47 p., 1991.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat. Q.*, 45: 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin. Dermatol., 14: 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV co-infection. Clin. Dermatol., 17: 317-325, 1999.

DESJEUX, P.; SANTARO, F.; AFCHAIM, D.; LOYENS, M.; CAPRON, A. Circulating immune complexes and anti-IgG antibodies in mucocutaneous leishmaniasis. Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg., 29: 195-198, 1980.

DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C.; RODRIQUES, T. P.; BOULOS, M.; COREY, R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg., 53: 40-42, 1995.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETTO, A.; COREY, R. Effects of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin. Infect. Dis., 25: 1240-1242, 1997.

DOS SANTOS, A. J.; NASCIMENTO, E. J.; PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Report on a cutaneous and visceral leishmaniasis focus in the town of Jequié, St. Bahia, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 35: 583-584, 1993.

DUARTE, Z.; MUNGUIA, J.; OROZCO, M.; GANTIER, J. C. First report of visceral leishmaniasis in Nicaragua. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88: 38, 1994.

EDDLESTONE, S. M. Visceral leishmaniasis in a dog from Maryland. J. Am. Vet. Med. Assoc., 217: 1686-1688, 2000.

EDRISSIAN, G. H.; HAJARAN, H.; MOHEBALI, M.; SOLEIMANZADEH, G.; BOHAL, S.; ANVARI, A.; SARKISSIAN, M. T.; KANANI, A.; NADIM, A. Application and evaluation of direct agglutination test in serodiagnosis of visceral leishmaniasis in man and canine reservoirs in Iran. Irn. J. Med. Sci., 21: 120-124, 1996.

EISENBERG, C. L.; JAFFE, C. *Leishmania*: Identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. Exp. Parasitol., 91:70-77, 1999.

EL-MASUM, M. A.; EVANS, D. A.; MINTER, D. M.; EL-HARITH, A. Visceral leishmaniasis in Bangladesh: the value of DAT as a diagnostic tool. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89: 185-186, 1995.

EPHROS, M.; PAZ, A.; JAFFE, C.L. Asymptomatic visceral leishmaniasis in Israel. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88: 651-652, 1994.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; BULUT, V.; GUREL, M. S. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 179-183, 1999.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; McAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA, A. Q.; LIMA, J. W. O.; PEARSON, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J. Infect. Dis.*, 166: 1124-1132, 1992.

FEHNIGER, T. E.; MENGISTU, G.; GESSESSE, A.; GARBE-MARIAN, H.; AKUFFO, H. Changes in the antigenic profile of *Leishmania* parasites following shifts in temperature. *Acta Tropica*, 47: 277, 1990.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MENDEZ, S.; DE LA FUENTE, C.; GOMEZ-MUNOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 652-653, 1999.

FORMIGA-RAMOS, C. C.; SEIXAS DUARTE, M. I.; OLIVEIRA RAMOS, A. M. Leishmaniose visceral associada a síndrome de imunodeficiência adquirida: relato de caso com achados necroscópicos e estudo imuno-histoquímico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27: 245-250, 1994.

FRAPIER, J. M.; ABRAHAM, B.; DEREURE, J.; ALBAT, B. Fatal leishmaniasis in a heart transplant recipient. *J. Heart Lung Transplantation*, 20: 912-913, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA. Guia de vigilância epidemiológica, 4ª ed, 1998. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE00ID.htm>>. Acesso em 16 out., 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA. Publicações técnicas e científicas. boletim epidemiológico, ano 3, nº 4, out/nov/dez, 1998. p.3. disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/BEPI/pdfs/30403.pdf>>. Acesso em 11 dez., 2000.

GALVÃO-CASTRO, B.; SA FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 56: 58-66, 1984.

GARI-TOUSSAINT, M.; LELIÉVRE, A. MARTY, P.; LE FICHOUX, Y. Contribution of serological tests to the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 301-302, 1994.

- GASIM, S.; EL-HASSAN, A. M.; KHARAZMI, A.; KHALIL, E. A. G.; ISMAIL, A.; THEANDER, T. G. The development of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) is associated with acquisition of *Leishmania* reactivity by peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin. Exp. Immunol.*, 119: 523-529, 2000.
- GEBRE-MICHAEL, T.; PRATLONG, F.; LANE, R. P. *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* (Diptera: Phlebotominae), naturally infected with *Leishmania major* in southern Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87: 10-11, 1993.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Médica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora, 1991.
- GENARO, O.; COSTA, C. A.; BREYNER, E. T.; REIS, A. B.; SILVA, A. R.; TRÓPIA, M. J. M.; TAFURI, W. L.; DIAS, M.; MAYRINK, W. The course of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 87: 105, 1992.
- GENARO, O.; COSTA, C. A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J. E.; ROCHA, N. M.; LIMA, S. L.; MAYRINK, W. The occurrence of Kalazar in urban Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 23: 121, 1990.
- GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J. Clin. Invest.*, 92: 324-329, 1993.
- GHEDIN, E.; WEIZANG, W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKY, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 530-535, 1997.
- GHOSH, A.; MADHUBALA, R.; MYLER, P. J.; STUART, K. D. *Leishmania donovani*: characterization and expression of ORFF, a gene amplified from the LDI locus. *Experimental Parasitol.*, 93: 225-230, 1999.
- GOMES, Y.M.; PEREIRA, V.R.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D.S.; BARROS, M.D.; FERREIRA, A.G.; SILVA, E.D.; OGATTA, S.F.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 497-501, 2001.
- GORGOLAS, M.; MILES, M.A. Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature*, 372: 734, 1994.
- GRANEL, B.; SERRATRICE, J.; SWIADER, L.; GAMBARELLI, F.; DANIEL, L.; FOSSAT, C.; HESSE-BONERANDI, S.; PACHE, X.; DISDIER, P.; WEILLER, P.J. Crossing of antinuclear antibodies and anti-leishmania antibodies. *Lupus*, 9: 548-550, 2000.

GRIBNAU, T.; ROELES, F.; VAN DER BIEZEN, J.; LEUVERING, J.; SCHUURS, A. The application of colloidal dye particles as label in immunoassays: dispersed dye immunoassay ("DIA"). In: GRIBNAU, T.C.J.; VISSER, J.; NIVARD, R.J.F., ed(s), *Affinity chromatography and related techniques. Analytical Chemistry Symposia Series 9*, Elsevier, Amsterdam, pp. 411-424, 1982.

GRIBNAU, T.; VAN SOMMEREN.; VAN DINTHER.; DIA – Disperse dye immunoassay. In: CHIAKEN, I.M.; WILCHEK, M.; PARIKH, ed(s), *Affinity chromatography and biological recognition*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 375-380, 1983.

GRIMALDI, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77: 195-215, 1982.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 230-250, 1993.

GUPTA, P. C. Immunodiagnosis of kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 146-147, 1969.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A. W. G.; GORIS, M. G. A.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* – specific immunoglobulin M antibodies in the human sera. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 92-97, 1997.

HALDAR, J. P.; GHOSE, S.; SAHA, K. C.; GHOSE, A. C. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Infect Immun.*, 42: 702-707, 1983.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 583-586, 1986.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F. J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 603-606, 1987

HERNÁNDEZ, J. A.; BOSCH, M. A.; SALUCA, G. Atypical clinical presentation of visceral leishmaniasis. *Haematologica*, 84: 750, 1999.

HINRICHSEN, S. L.; TOSCANO, A. C.; OLIVEIRA, B. D. COUTINHO, C. M. P.; CORRÊA, P. M. R. B.; SÁ, V. P. O.; FREIRE, L.; RANGEL FILHO, A. E. O. Calazar: diagnóstico e tratamento. disponível em: <<http://www.lika.ufpe.br/nepai/calazar.html> >. Acesso em 09 abr., 2001.

HOMMEL, M. Enzymoimmunoassay in leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 213, 1978.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J. Infect.*, 39: 101-111, 1999.

HOUGHTON, R.L.; PETRESCU, M.; BENSON, D.R.; SKEIKY, Y.A.W.; SCALONE, A.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; GRADONI, L. A cloned antigen (recombinant k39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.*, 177: 1339-1344, 1998.

IBRAHIM, G.J. Leishmaniasis. *J. Trop. Pediatr.*, 46: 128-130, 2000.

IBRAHIM, M.E.; LAMBSON, B.; YOUSIF, A.O.; DEIFALLA, N.S.; ALNAIEM, D.A.; ISMAIL, A.; YOUSIF, H.; GHALIB, H.W.; KHALIL, E.A.; KADARO, A.; BARKER, D.C.; EL HASSAN, A.M. Kala-azar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 941-944, 1999.

ISMAIL, A.; EL HASSAN, A. M.; KEMP, K.; GASIM, S.; KADARU, A. G. M. Y.; MÖLLER, T.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T. G. Immunopathology of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL): T-cell phenotypes and cytokine profile. *J. Pathol.*, 189: 615-622, 1999.

ISMAIL, A.; KHARAZMI, A.; PERMIN, H.; EL HASSAN, M. Detection and characterization of *Leishmania* in tissues of patients with post kala-azar dermal leishmaniasis using a specific monoclonal antibody . *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91:283-285, 1997.

JAFFE, C. L.; BENNETE, E.; GRIMALDI JR, G.; McMAHON-PRATT. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. *J. Immunol.*, 133: 440-447, 1984.

JAFFE, C. L.; McMAHON-PRATT, D. Serodiagnostic assay for visceral leishmaniasis employing monoclonal antibody. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 587, 1987.

JAFFE, C. L.; ZALIS, M. Use of purified parasite from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Inf. Dis.*, 157: 1212, 1988.

- 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.*, 18: 669-670, 1999.
- JENSEN, A.T.R.; GASIM, S.; MOLER, T.; ISMAIL, A.; GAAFAR, A.; KEMP, M.; EL HASSAN, A.M.; KHARAZMI, A.; ALCE, T.M.; SMITH, D.D.F.; THEANDER, T.G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant *L. donovani* gene B protein (GPB) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93: 157-160, 1999.
- JERÔNIMO, S.M.; HIGGS, E.; VEDVICK, T.; MANN, B.J.; JERNIGAN, J.; PETRI JR, W.A.; PEARSON, R.D. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, 172: 1055-1060, 1995.
- JERÔNIMO, S.M.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA, A.D.; THIELKING, P.; PEARSON, R.D.; EVANS, T.G. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.*, 30: 608-609, 2000.
- JERÔNIMO, S. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDEZ, M. Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 386-388, 1994.
- JIMÉNEZ, M.I.; LAGUNA, F.; de la TORRÉ, F.; SOLÍS, F.; PRATLONG, F.; ALVAR, J. New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 33, 1995.
- JOHN, S. M.; SUDARSANAM, A.; SITARAM, U.; MOODY, A. H. Evaluations of OptiMAL, a dipstick test for the diagnosis of malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 92: 621-622, 1998.
- JOSHI, A. B.; SINGHASIVANON, P.; KHUSMITH, S.; FUNGLADDA, W.; NANDY, A. Evaluation of direct agglutination test (DAT) as an immunodiagnostic tool for diagnosis of visceral leishmaniasis in Nepal. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 30: 583-585, 1999.
- KALTER, D. C. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatol. Clin.*, 12: 37-50, 1994.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.*, 166: 1141-1147, 2001.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit. Rev. Microbiol.*, 21 123-152, 1995.

- KARP, C. L.; EL-SAFI, S. H.; WYNN, T. A.; SATTI, M. M.; KORDOFANI, A. M.; HASHIM, F. A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F. A.; NUTMAN, T. B.; SACKS, D. L. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J. Clin. Invest.*, 91: 1644-1648, 1993.
- KASHIWAZAKI, Y.; SNOWDEN, K.; SMITH, D.H.; HOMMEL, M. A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle. *Vet. Parasitol.*, 55: 57-69, 1994.
- KAUL, P.; MALLA, N.; KAUR, S.; MAHAJAN, R. C.; GANGULY, N. K. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 173-175, 2000.
- KAYE, P. M.; CURRY, A. J.; BLACKWELL, J. M. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, 146: 2763-2770, 1991.
- KEMP, M.; KURTZHALS, J. A.; BENDTZEN, K.; POULSEN, L. K.; HANSEN, M. B.; KOECH, D. K.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T. G. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 61: 1069-1073, 1993.
- KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J.A.L; EL HASSAM, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Letters*, 65: 105-108, 1999.
- LAINSON, R. American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 569-596, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, 273: 595-600, 1978.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajo, Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 323-330, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 517, 1987.
- LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D.C. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitol.*, 94: 12-22, 2000.

- LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 54: 277-295, 1979.
- LARRETA, R.; SOTO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. *Leishmania infantum*: gene cloning of the GRP84 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Experimental Parasitol.*, 96: 108-115, 2000.
- LEE, J.; PARK, S.-J.; YONG, T.-S. Serodiagnosis of amoebiasis using a recombinant protein fragment of the 29 kDa surface antigen. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1487-1491, 2000.
- LEE, M. A.; AW, L. T.; SINGH, M. A comparison of antigen dipstick assays with polymerase chain reaction (PCR) technique and blood film examination in the rapid diagnosis of malaria. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 28: 498-501, 1999.
- LEHTONEN, O. P.; VILJANEN, M. K. Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods*, 34: 61-70, 1980.
- LESHO, E. P. Leishmaniasis. Another threat to Persian Gulf veterans. *Postgrad. Med.*, 90: 213-214, 216-217, 1991.
- LEUVERING, J. H. W.; THAL, P. J. H. M.; VAN DER WAART, M.; SCHUURS, A. H. W. M. Sol particle immunoassay (SPIA). *J. Immunoassay*, 1: 77-91, 1980.
- LOPEZ, M.; INGA, R.; CANGALAYA, M.; ECHEVARRIA, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORREGO, C.; AREVALO, J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49: 348-356, 1993.
- LOVE, D. C.; WILSON, M. E.; MOSSER, D. M. Cloning and characterization of the ribosomal I11 gene from *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71: 261-264, 1995.
- LUCENA, R.; GINEL, P. J.; LOPEZ, R.; NOVALES, M.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J. Antinuclear antibodies in dogs with Leishmaniasis. *J. Vet. Med. Ass.*, 43: 255-259, 1996.
- LYNCH, N. R.; MALAVÉ, C.; IFANTE, R. B.; MODLIN, R. L.; CONVIT, J. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis, using monoclonal antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 6-9, 1986.
- MAGILL, A.; GROGL, M.; GASSER, R. A.; SUN, W.; OSTER, C. N. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation Desert Storm. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1383-1387, 1993.

MAINGON, R.; LeRAY, D.; HOMMEL, M. Leishmaniasis research and the European Union. Parasitol. Today, 11: 357-359, 1995.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol., 59: 13-21, 1995.

MANSON-BAHR, P. E. C. East african kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 53: 123-136, 1959.

MANSON-BAHR, P. E. C. Immunity in kala-azar. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 55: 550-555, 1961.

MARTY, P.; LELIÈVRE, A.; QUARANTA, J. F.; RAHAL, A.; GARI-TOUSSAINT, M.; LE FICHOUX, Y. Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88: 658-659, 1994.

MARTY, P.; LELIÈVRE, A.; QUARANTA, J. F.; SUFFIA, I.; EULALIO, M.; GARI-TOUSSAINT, M.; FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Detection by western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due *Leishmania infantum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89: 690-691, 1995.

MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNCAN, S.; QUILICI, M. Western-blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiological purposes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 47: 764-771, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad. Saúde Pub., 10: 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 30 : S162-164, 1997.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol. Today, 10: 37-40, 1994.

MASUM, M. A.; EVANS, D. A. Agglutinating anti-leishmanial antibodies in the saliva of kala-azar patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 88: 660, 1994.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1145-1149, 1995.

MAÜEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Experimental Parasitol.*, 87: 98-111, 1997.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 119: 237-246, 1999.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, 16: 188-189, 2000.

McCOY, J.J.; BEETHAM, J.K.; OCHS, D.E.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. Regulatory sequences and a novel gene in the *msp* (GP63) gene cluster of a *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 95: 251-265, 1998.

MEBRAHTU, Y.; LAWYER, P.; GITHURE, J.; WERE, J. B.; MUIGAI, R.; HENDRICKS, L.; LEEWENBURG, J.; KOECH, D.; ROBERTS, C. Visceral leishmaniasis unresponsive to Pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41: 289-294, 1989.

MEREDITH, S. E. O.; KROON, N. C. M.; SONDORP, E.; SEAMAN, J.; GORIS, M. G. A.; VAN INGEN C. W.; OOSTING, H.; SCHOONE, G. J.; TERPSTRA, W. J.; OSKAM, L. Leish-kit, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1742-1745, 1995.

MICHEL, G.; SIMONIN, G.; PERRIMOND, H.; COIGNET, J. Syndrome of activation of the mononuclear phagocyte system. Initial manifestation of visceral leishmaniasis. *Arch. Fr. Pediatr.*, 45: 45-46, 1988.

MILLESIMO, M.; ZUCCA, M.; CARAMELLO, P.; SAVOIA, D. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 26: 7-11, 1996.

MISTRELLO, G.; GENTILI, M.; FALAGIANI, P.; RONCAROLO, D.; RIVA, G.; TINELLI, M. Dot immunobinding assay as a new diagnostic teste for human hydatic disease. *Immunol. Letters*, 47: 79-85, 1995.

MONROY-OSTRIA, A.; HERNANDEZ-MONTES, O.; BARKER, D. C. Aetiology of visceral leishmaniasis in Mexico. *Acta Tropica*, 75: 155-161, 2000.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27: 67-72, 1994.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA-PEÑA, H.; JARAMILLO-SALAZAR, C. Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (diptera: psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 263-268, 1998.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-173, 1989.

MUKHTAR, M. M.; SHARIEF, A. H.; EL-SAFFI, S. H.; HARITH, A. E.; HIGAZZI, T. B.; ADAM, A. M.; ABDALLA, H. S. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 33-36, 2000.

MURRAY, H.W. Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS Patient Care STDs*, 13: 459-465, 1999.

MUTINGA, M. J.; KIHARA, S. M.; LOHDING, A.; MUTERO, C. M.; NGATIA, T. A.; KARANU, F. Leishmaniasis in Kenya: description of leishmaniasis of a domestic goat from Transmara, Narok District, Kenya. *Trop. Med. Parasitol.*, 40: 91-96, 1989.

NAKAJIMA-NAKANO, K.; MAKIOKA, A.; YAMASHITA, N.; MATSUO, N.; ASAI, T. Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. *Parasitol. Int.*, 48: 215-222, 2000.

NANDY, A.; ADDY, M.; GUHA, S.K.; MAJI, A.K.; CHAUDHURI, D.; CHATTERJEE, P. Co-existence kala-azar and malaria in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 516, 1995.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; COSTA, J. M. L.; FIOORI, B. I. P.; VIANA, G. M. C.; FILHO, M. S. G.; ALVIM, A. C.; BASTOS, O. C.; NAKATANI, M.; BADARÓ, R.; SILVA, A. R.; BURATTINI, M. N. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão - Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29: 233-240, 1996.

NATARAJU, B.; SIVAPRASAD, V.; DATTA, R. K.; GUPTA, S. K. SHAMIM, M. Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm *Bombyx mori* L. *J. Invertebrate Pathol.*, 63: 135-139, 1994.

NETO, V. A. Visceral leishmaniasis with an incubation period of at least 4 years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 20: 312-314, 1978.

NOYES, H.; CHANCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Experimental Parasitol.*, 85: 264-273, 1997.

NUZUM, E.; WHITE, F.; THAKUR, C.; DIETZE, R.; WAGES, J.; GROGL, M.; BERMAN, J. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. *J. Infect. Dis.*, 171: 751-754, 1995.

OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; NASCIMENTO, E. G.; PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Report on a visceral and cutaneous leishmaniasis focus in the town of Jequie, State of Bahia, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 35: 583-584, 1993.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.; SCHUBACH, A.; GRIMALDI JR, G. An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83: 427-435, 1988.

OMAR, M.S.; MALIK, G.M.; AL-AMARI, O.M.; ABDALLA, S.E.; MOOSA, R.A. The rapid manual *ParaSight*TM-F test for diagnosing *Plasmodium falciparum* malaria in Saudi Arabia. *Ann. Saudi Med.*, 19: 159-162, 1999.

OREN, R.; SCHNUR, L. F.; BEN YEHUDA, D.; MAYNER, V.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Visceral leishmaniasis: a difficult diagnosis and unusual causative agent. *J. Infect. Dis.*, 164: 746-749, 1991.

OSMAN, O.F.; KAGER, P.A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop. Med. Int. Health*, 5: 553-562, 2000.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet. Parasitol.*, 75: 273-277, 1998.

PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect. Immun.*, 57: 754-763, 1989.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DUTRA, H. S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose mannose ligand (FML). *Acta Tropica*, 53: 59-72, 1993.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; PALATNIK, M.; LUZ, K.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 390-393, 1995.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; SANTOS, W. R.; MACEDO, S. R.; MEDEIROS, L. V.; LUZ, K. G. The FML (fucose mannose ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29: 153-163, 1996.

PANDOLPHO, V.C. Leishmanioses. Disponível em: <http://smonline.rio.rj.gov.br/artigos_000627-leish.cfm>. Acesso em 08 abr., 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI JR., G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55: 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; SANTOS W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implication for the disease control. *Acta Tropica*, 69: 75-83, 1998.

PASSOS, V. M. A.; VOLPINI, A. C.; BRAGA, E. M.; LACERDA, P. A. F.; OUAISSI, A.; LIMA-MARTINS, M. V. C.; KRETTLI, A. U. Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 791-793, 1997.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, 22: 1-13, 1996.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, 62: 229-235, 1994.

PONTES-DE-CARVALHO, L.; TEIXEIRA, M. C. A.; SILVANY, M. A.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; JERÔNIMO, S.M.B.; COSTA, C. H.; BARRAL, A. .P.; DOS SANTOS, W. L. C.; EICHINGER, D.; OLIVEIRA, G. G. S. Making good use of bad sera: a rapid method to maximize the sensitivity of recombinant antigen-based diagnostic assays for infectious diseases. *Parasitol. Today*. Enviado para publicação.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, 38: 383-393, 1981.

PRASAD, L. S. N. Kala azar. *Indian J. Pediatr.*, 66: 539-546, 1999.

QIAO, Z.; MILES, M. A.; WILSON, S. M. Detection of parasites of the *Leishmania donovani*-complex by a polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA). *Parasitology*, 110: 269-275, 1995.

QU, J.Q.; ZHONG, L.; MASOOM-YASINZAI, M.; ABDUR-RAB, M.; AKSU, H.S.Z.; REED, S.G.; CHANG, K.P. Serodiagnosis of asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 543-545, 1994.

RAB, M.A.; EVANS, D.A. *Leishmania infantum* in the Himalayas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 27-32, 1995.

RABELLO, A. L. T.; GARCIA, M. M. A.; AMORIM, M. N.; KATZ, N. Dye-immunoassay for the diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease*, 7: 3-6, 1995.

RAJ, V. S.; GHOSH, A.; DOLE, V. S.; MADHUBALA, R.; MYLER, P. J.; STUART, K. D. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 482-487, 1999.

RAMESH, V.; MUKHERLEE, A. Post- kala-azar dermal leishmaniasis. *Int .J. Dermatol.*, 34: 85-91, 1995.

REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, 14: 471-478, 1996.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; CHERI-LOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J. Immunol.*, 138: 1596, 1987.

REED, S. G.; SHREFFLER, W. G.; JR BURNS, J. M.; SCOTT, J. M.; ORGE, M. G.; GHALIB, H. W.; SIDDIG, M.; BADARÓ, R. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43: 632, 1990.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; QUIJADA, L.; ALONSO, C. Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 853-858, 1997.

REZAI, H. R.; BEHFOROZ, N.; AMIRHAKIMI, G. H.; KOHANTEB, J. immunofluorescence and counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 149, 1977.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 143-148, 1998.

ROCHA FILHO, F. D.; FERREIRA, F. V. A.; MENDES, F. O.; FERREIRA, F. N. H.; KARBAGE, A.; ALENCAR, M. L.; COSTA, D. Bone marrow fibrosis (pseudomyelofibrosis) in human kala-azar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33: 363-366, 2000.

ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today*, 12: 256-257, 1991.

ROSEN, G.; LONDNER, M. V.; GREENBLATT, C. L.; MORSY, T. A.; EL-ON, J. *Leishmania major*: solid phase radioimmunoassay for antibody detection in human cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.*, 62: 79, 1986.

ROSENTHAL, E.; MARTY, P.; POIZOT-MARTIN, I.; REYNES, J.; PRATLONG, F.; LAFEUILLADE, A.; JAUBERT, D.; BOULAT, O.; DEREURE, J.; GAMBARELLI, F.; GASTAUT, J. A.; DUJARDIN, P.; DELLAMONICA, P.; CASSUTO, J. P. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 159-162, 1995.

RYAN, K. A. GARRAWAY, L. A.; DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Isolation of virulence genes directing surface glycosylphosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8609-8613, 1993.

SACKS, D. L.; KENNEY, R. T.; KREUTZER, R. D.; JAFFE, C. L.; GUPTA, A. K.; SHARMA, M. C.; SINHA, S. P.; NEVA, F. A.; SARAN, R. Indian kala-azar by *Leishmania tropica*. *Lancet*, 345: 959-961, 1995.

SALOTRA, P.; RAINA, A.; NEGI, N. S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. *Br. J. Biomed. Sci.*, 56: 263-267, 1999a.

SALOTRA, P.; RAINA, A.; RAMESH, V. Western blot analysis of humoral immune response to *Leishmania donovani* antigens in patients with post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93: 98-101, 1999b.

- SANTOS-GOMES, G.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L.; ARAÚJO, M. A., ABRANCHES, P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-*Leishmania* sp-coinfected patients. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 175-178, 2000.
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose visceral americana - informe técnico. São Paulo: 29 p., 2000.
- SARAN, R.; SHARMA, M. C.; GUPTA, A. K.; SINHA, S. P. KAR, S. K. Diurnal periodicity of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood on indian kala-azar patients. *Acta Tropica*, 68: 357-360, 1997.
- SCHAEFER, K. U.; KURTZHALS, J. A. L.; MULLER, A. S.; KAGER, P. A. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 471-475, 1995a.
- SCHAEFER, K. U.; SCHOONE, G. J.; MULLER, A. S.; KAGER, P. A.; MEREDITH, S. E. O. Visceral leishmaniasis: use of the polymerase chain reaction in an epidemiological study in Baringo District, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 492-495, 1995b.
- SCOTT, J. M.; SHREFFLER, W. G.; GHALIB, H. W.; EL ASAD, A.; SIDDIG, M.; BADARÓ, R.; REED, S. G. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 272-277, 1991.
- SEARLE, S.; SMITH, D.F. *Leishmania major*: characterisation and expression of a cytoplasmatic stress-related protein. *Experimental Parasitol.*, 77: 43-52, 1993.
- SENALDI, G.; XIAO-SU, H.; HOESSLI, D. C.; BORDIER, C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. *J. Immunol. Methods*, 193: 9-15, 1996.
- SHAHI, S. K.; RANGA, S.; THAKUR, P.; KHURANA, S. K.; TALIB, V. H. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 41: 361-372, 1998.
- SHARMA, M. C.; GUPTA, A. K.; DAS, V. N.; VERMA, N.; KUMAR, N.; SARAN, R.; KAR, S. K. *Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons. *Acta Trop.*, 76: 195-196, 2000.
- SHARMA, V.; CHATTERJEE, M; MANDAL, C.; SEN, S.; BASU, D. Rapid diagnosis of Indian visceral leishmaniasis using achatanin H, a 9-0-acetylated sialic acid binding lectin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58: 551-554, 1998.

- SHEPPARD, H. W.; DWYER, D. M. Cloning of *Leishmania donovani* genes encoding antigens recognized during human visceral leishmaniasis. Mol. Biochem. Parasitol., 19: 35-43, 1986.**
- SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C. SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JR, G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia - VI - investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 21: 23-27, 1988.**
- SHIDDO, S. A.; AKUFFO, H. O.; MOHAMED, A. A.; NILSSON, L. -A.; OUCHTERLONY, Ö.; THORSTENSSON, R. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of leishmanin-positive and seropositive inhabitants in an endemic area. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89: 21-24, 1995a.**
- SHIDDO, S. A.; MOHAMED, A. A.; AKUFFO, H. O.; MOHAMUD, K. A.; HERZI, A. A.; MOHAMED, H. H.; HULDT, L. -A.; NILSSON, L. -A.; OUCHTERLONY, Ö.; THORSTENSSON, R. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestations in a village in an endemic area. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89: 361-365, 1995b.**
- SHIDDO, S. A.; HULDT, G.; NILSSON, L. A.; OUCHTERLONY, Ö.; THORSTENSSON, R. Visceral leishmaniasis in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. Immunol. Letters, 50: 87-93, 1996.**
- SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, C. D.; PETERSEN, E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82: 66-68, 1988.**
- SILVA LEITÃO, J. S. Parasitologia Veterinária. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, s.d.**
- SILVA, A. R.; VIANA, G. M. C.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M. D. S. D.; COSTA, J. M. L. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 30: 359-368, 1997.**
- SINGH, N.; CURRAN, M. D.; RASTOGIL, A. K.; MIDDLETON, D.; SUNDAR, S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. Trop. Med. Int. Health, 4: 448-453, 1999.**
- SINGH, U. K. Diagnosis and management of kala azar. Indian Pediatr., 36: 231-236, 1999.**
- SINGH, U. K.; PATWARI, A. K.; SINHA, R. K.; KUMAR, R. Prognostic value of serum C-reactive protein in kala-azar. J. Trop. Pediatr., 45: 226-228, 1999.**

SINHA, R.; ARORA, S. K.; DATTA, U.; SEHGAL, S. Detection of *Leishmania* antigen in kala azar patients using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.*, 36: 391-400, 1992.

SNOWDEN, K.; HOMMEL, M. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. *J. Immunol. Methods*, 140: 57-65, 1991.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; ALONSO, C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3: 387-391, 1996.

SOUZA-ATTA, M. L.; ARAUJO, M. I.; D'OLIVEIRA JUNIOR, A.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; ATTA, A. M.; CARVALHO, E. M. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 1101-1105, 1999.

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

SWENSON, C. L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P. C.; JOHNSON, S. E.; WILKIE, D. A.; EATON, K. A.; KOCIBA, G. J. Visceral leishmaniasis in an English foxhound an Ohio research colony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193: 1089-1092, 1988.

TANNER, C. E. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 78: 105-111, 1996.

TAYLOR, D. R.; WILLIAMS, G.T. Differentiation and limited proliferation of isolated *Leishmania mexicana* amastigotes at 27° C. *Acta Tropica*, 50: 141-150, 1992.

TEIXEIRA. Experiencias vividas com a leishmaniose visceral 1954-1980. Aspectos epidemiológicos, sorológicos e evolutivos. 1988. Tese (Doutorado)– Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

TEIXEIRA, A. R. L.; VEXENAT, A. C. The true significance of serological exams in the diagnosis of endemic diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29: 379-382, 1996.

THADEI, C. L. Leishmaniasis - historical review. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.Br/inglês/iart99a.htm> >. Acesso em 25 fev., 2001.

THAKUR, C. P. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 156-157, 2000.

- TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of new world visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitol.*, 88: 73-75, 1998.
- UMEZAWA, E. S.; SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 285-288, 1999.
- VALENSTEIN, P. N. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am. J. Clin. Pathol.*, 93: 252-258, 1990.
- VALLI, L. C. P.; KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; DIETZE, R. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: 302-307, 1999.
- VECSEI, A. K.; KASTNER, U.; TREBO, M.; KORNMULLER, R.; PICHER, O.; SCHRATZBERGER-VECSEI, E.; GADNER, H. Pediatric visceral leishmaniasis in Austria: diagnostic difficulties in a non-endemic region. *Wien Klin. Wochenschr.*, 113: 102-106, 2001.
- VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, W. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in the dog. *Vet. Parasitol.*, 79: 221-228, 1998.
- VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi*, e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 38: 177-185, 1996.
- VEXENAT, J. A.; FONSECA DE CASTRO, J. A.; CAVALCANTE, R.; TAVARES, J. P.; DA SILVA, M. R. B.; BATISTA, W. H.; FURTADO CAMPOS, J. H.; HOWARD, M. K.; FRAME, I.; MCNERNEY, R.; WILSON, S.; MILES, M. A. Visceral leishmaniasis in Teresina, state of Piauí, Brazil: preliminary observation on the detection and transmissibility of canine and sanfly infections. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 89: 131-135, 1994.
- VICANDI, B.; JIMENEZ-HEFFERNAN, J. A.; LOPEZ-FERRER, P.; ORTEGA, L.; VIGUER, J. M. Cytologic diagnosis of leishmaniasis in HIV infection. A report of eight cases. *Acta Cytol.*, 44: 835-839, 2000.
- VIEIRA, J. B.; COELHO, G. E. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31: 85-92, 1998.

WILLIAMS, J. E. *Leishmania* and *Trypanosoma*. In: GILLESPIE, S. H. & HAWKEY, P. M.; eds. *Medical parasitology - a practical approach*. USA: Oxford University Press, 1995.

WILSON, M. E.; STREIT, J. A. Visceral leishmaniasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 25: 535-551, 1996

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Leishmaniasis. 1998. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdat1.html>>. Acesso em 30 maio, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 793: 1-153, 1990.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; GUILHERMO CASTELLÓN, E. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 427-432, 1999.

YANG, J. C.; BLANTON, R. E.; KING, C. L.; FUJIOKA, H.; AIKAWA, M.; SAM-YELLOWE, T. Y. Seroprevalence and specificity of human responses to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein Rhop-3 determined by using a C-terminal recombinant protein. *Infect. Immun.*, 64: 3584-3491, 1996.

YERSIN, C.; BOVET, P.; SMITS, H. L.; PEROLAT, P. Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. *Trop. Med. Int. Health*, 4: 38-45, 1999.

ZELEDON, R.; MAINGON, R.; WARD, R.; ARANA, B.; BELLI, A.; DE CARREIRA, P.; PONCE, C. The characterization of *Leishmania* parasites and their vectors from Central America using molecular techniques. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 70: 325-329, 1993.

ZIJLSTRA, E. E.; DAIFALLA, E.A.; KAGER, P.A.; GHALIB, E. A. G; EL-HASSAN, A. M.; REED, S. G.; GHALIB, H. W. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5: 717-720, 1998.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95: S27-58, 2001

ZIJLSTRA, E. E.; KHALIL, E. A.; KAGER, P. A.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: clinical presentation and differential diagnosis. *Br. J. Dermatol.*, 143: 136-143, 2000.

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

ZIJLSTRA, E. E.; SIDDIG ALI, M.; EL-HASSAN, A. M.; EL-TOUM, I. A.; SATTI, M.; GHALIB, H. W. Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar, in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85: 474-476, 1991.