

UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ

Evanio Celestino de Brito

Walquiria de Araújo de Oliveira

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

BRASÍLIA

2009

Evanio Celestino de Brito
Walquiria de Araújo de Oliveira

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Análises Clínicas e
Toxicológicas da Faculdade de Ciências da
Universidade de Tuiuti do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do título de Especialista.

Orientador: César O. Carranza Tamayo

BRASÍLIA

2009

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Evanio Celestino de Brito

Walquiria de Araújo de Oliveira

RESUMO: A leishmaniose visceral é uma infecção parasitária de grande repercussão nos países tropicais. Nas áreas endêmicas, esta doença afeta e leva a óbito um bom número de pessoas, principalmente crianças e adultos com outras co-morbidades. As análises clínicas desenvolvidas para o diagnóstico deste agravo ainda não conseguiram estabelecer um ensaio suficientemente eficaz para confirmar ou descartar esta doença. Descrevem-se nesta revisão as distintas análises que podem ser utilizadas para o diagnóstico desta infecção, abrangendo exames diretos, sorologia, detecção de antígenos e exames de biologia molecular. Ainda não é possível recomendar uma única análise como novo padrão ouro para o diagnóstico desta infecção. Porém, os métodos de imunocromatografia –chamados também de testes rápidos– parecem ser os mais promissores na busca de um novo padrão de diagnóstico de alta acurácia.

Palavras - chave: leishmaniose visceral diagnóstico

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Evanio Celestino de Brito

Walquiria de Araújo de Oliveira

ABSTRACT: Visceral leishmaniasis is a parasitic infection of great impact in tropical countries. In endemic areas, this disease leads to death and affects a large number of people, mainly children and adults with other comorbidities. The analysis developed for the clinical diagnosis of this disease have not been able to establish a sufficiently reliable test to confirm or rule out this disease. In this review we describe the different tests that can be used for diagnosing the infection, including direct examination, serology, detection of antigens and molecular biology tests. Although, it is not possible to recommend a single analysis as a new gold standard for diagnosis of this infection. However, the methods of immunochromatography -called rapid tests- seem to be the most promising in the search for a new standard of high diagnostic accuracy.

Key words: visceral leishmaniasis diagnosis

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença de grande expansão geográfica no mundo e ocorre em regiões tropicais e subtropicais. A doença é causada por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* que possui três espécies no complexo donovani: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani*. A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. O agente etiológico da LV no Brasil é a *L. chagasi* e a principal espécie transmissora é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Sundar S et al., 2002a). A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A possibilidade de que humanos, principalmente crianças desnutridas, sejam fontes de infecção pode levar a um aumento da complexidade da transmissão da LV (Gontijo CMF e Melo MN, 2004).

No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Em alguns focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (Silva ES et al., 2001). Entretanto, há evidências de que muitas pessoas na área endêmica que contraem a infecção nunca desenvolvem sintomas da doença ou se recuperam espontaneamente, desenvolvendo uma infecção assintomática, que só é possível de ser determinada mediante o uso de técnicas

sorológicas ou mediante o teste de intradermoreação de Montenegro (*Moreno E, et al., 2002*).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose apresenta-se ainda como um desafio em nosso tempo, mesmo com o grande desenvolvimento da biotecnologia. Nem mesmo a técnica de biologia molecular tem conseguido alcançar 100% de sensibilidade e especificidade. Na atualidade, a pesquisa se encaminha não só nesta área, mas também ao desenvolvimento de testes imunocromatográficos para o diagnóstico, e dependendo dos antígenos utilizados poderá no futuro distinguir entre infecção ativa de outras condições. Para o diagnóstico da leishmaniose humana dispomos de vários métodos, porém nenhum apresenta 100% de acurácia. Por esta razão não temos um teste que seja considerado como padrão ouro. Vale ressaltar que a clínica do paciente, a epidemiologia e a presença do parasita por métodos parasitológicos obtidos em material de biopsia ou punção de baço ou medula óssea são de suma importância para confirmar o diagnóstico (*Sundar S, et al., 2002b*).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Não existe clínica característica da leishmaniose visceral. Esta doença pode ser confundida com outras condições similares como malária, esplenomegalia tropical, esquistossomose, linfomas, leucemias, tripanossomíase africana, tuberculose miliar, brucelose, febre tifóide, histoplasmose, e até má nutrição ou cirrose hepática com hipertensão porta (*Ministério 2006*). Assim, quando há suspeita da doença, geralmente é o laboratório que pode dar a resposta final. Existem muitos métodos de diagnóstico parasitológico do calazar, o que inclui métodos parasitológicos, imunológicos, moleculares e mediante o uso de animais de experimentação.

Visualização do parasito

O diagnóstico de rotina é usualmente baseado em parâmetros clínicos e epidemiológicos, entretanto o diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita através de métodos parasitológicos: esfregaço por aposição, cultura ou inoculação em animais, ou pesquisa do DNA do parasita por métodos moleculares (*Tavares, et al., 2003*). O melhor teste de laboratório para diagnosticar LV é a demonstração do parasita em material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos, sendo que a punção no baço é mais sensível em relação a medula óssea.

Os parasitas na forma de amastigotas são observados no citoplasma de macrófagos e monócitos, em preparações coradas com Giemsa ou Leishman, e observados sob microscópio de imersão. O aspirado esplênico apresenta a maior sensibilidade, de 98% (*Kafetzis DA.*), mas a dificuldade técnica e operacional para realizar com segurança o procedimento limitam sua utilização. Os exames

parasitológicos considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, são métodos invasivos e requerem técnicos experientes não apresentando uma boa sensibilidade. A amostra biológica para pesquisa direta é obtida do baço com sensibilidade 95 a 98%, fígado 76 a 91% , medula óssea 52 a 89% ou linfonodos 52 a 69%. (Zijlstra EE, et al., 2001).

A pesquisa de parasitas no sangue periférico pode ser utilizada, sobretudo em pacientes infectados com HIV. Nestes pacientes devido à elevada carga parasitária, o exame direto de sangue periférico ou sua cultura são úteis no diagnóstico da LV sintomática (Lopes Veles R, et al., 1998). O achado de parasitos no sangue periférico é pouco usual em pacientes sem imunodeficiência e está associado ao risco confirmado de disseminação da doença entre usuários de drogas intravenosas e ao risco potencial de transmissão por meio de vetores tendo como fonte alimentar o reservatório humano.

Diagnóstico sorológico

Os testes mais utilizados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), e a aglutinação direta (DAT). Apresentam especificidade e reprodutibilidade insatisfatórias por serem produzidos a partir de antígenos brutos causando reações cruzadas com espécies da família Trypanosomatidae (especialmente com Trypanosoma spp) e mesmo com organismos filogeneticamente distantes (Tavares, et al., 2003), e com algumas espécies de micobactérias. A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura.

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (*Gontijo, 2004*).

Com o objetivo de obter diagnósticos específicos, existem estudos e pesquisas na captura de antígenos purificados com diferentes pesos moleculares com por exemplos: anti-66KDa com uma especificidade de 100% e sensibilidade de 37%, um complexo antigênico –a fucose-manose ligante (FM-ELISA) descrito para as espécies do complexo *L. donovani* foi testado para diagnóstico e prognóstico da LV humana (*Palatinick, et al., 1995*). O 36KDa com 100% de especificidade e 96% de sensibilidade, antígenos purificados de *L. major-like* mostraram uma especificidade de 100% e sensibilidade de 92% e o mais importante é que esse antígeno não apresentou reação cruzada com outras doenças (*Barbosa De Deus, et al., 2002*) incluindo leishmaniose tegumentar.

Além dos antígenos brutos e antígenos purificados não podemos deixar de citar os antígenos recombinantes para o diagnóstico da LV humana, o antígeno A2 uma família de proteínas expressadas em amastigotas foi reativo em 60% e 82% quando testado com soro de pacientes na Índia e Sudão (*Burns Jm Jr, et al., 1993*). Entretanto no Brasil uma reação de Elisa a partir deste antígeno foi obtida 77% de reatividade em humanos (*Carvalho, et al., 2002*). O antígeno recombinante rK39 empregado no Elisa mostrou 98% de especificidade e 100% de sensibilidade (*Burns Jm Jr, et al., 1993*).

Outro antígeno recombinante bem estudado é o rK39, específico para as espécies do complexo *L. donovani*-específico (*Burns Jm Jr, et al., 1993*). Quando

utilizada em métodos baseados em ELISA, ela resultou em sensibilidades de 93 a 99% e especificidades de 93 a 100%.(Pedras MJ, et al., 2008). Uma característica importante deste antígeno é que ele pode ser utilizado no diagnóstico de LV em pacientes co-infectados com HIV, nos quais os níveis de anticorpos contra rK39 declinam rapidamente com o sucesso do tratamento (Houghton Rl, et al., 1998).

O método imunoenzimático de Elisa avaliado desde 1971(Ho M, et al., 1983), emprega uma variedade de antígeno. Apresentando uma reprodutibilidade de sensibilidade entre 90 e 100% e uma especificidade inconstante de 71 a 100% (Bray RS, 1985).

A detecção de IgE antileishmania realizado em paralelo com IgG antileishmania pelo diagnóstico de Elisa é considerado um marcador de infecção para leishmania chagasi e não um marcador de doença (Nascimento MDSB et al 2006). Na LV por L. chagasi encontramos altos níveis de anticorpos importantes para diagnosticar casos de LV humana. Sabemos que estes anticorpos não tem função protetora contra a doença e sim associados com reações alérgicas e processos infecciosos como as helmintíases, protozooses e infecções virais (Bryce PJ, 2005), porém estudos (Atta AM, et al., 1998), tem demonstrado a elevação dos níveis de IgE total em pacientes com leishmaniose visceral.

Foram testadas 85 amostras pelo diagnóstico de Elisa para pesquisa de IgE antileishmania, sendo 61 (71,7%) amostras positivas para IgG e 24 (28,2%) amostras negativas para IgG. Diante destes dados existe uma relação entre soro positividade por IgG e IgE antileishmania (Nascimento MDSB et al 2006).

Tabela 1 – Distribuição da sororreatividade pelo Elisa por IgG e IgE antileishmania.

Imunoglobulina E	Imunoglobulina G		Total
	IgG (+)	IgG (-)	
IgE (+)	37	0	37
IgE (-)	24	24	48
Total	61	24	85

Das 85 amostras pesquisadas 37 (43,5%) foram positivas para IgE sendo também positivas para IgG. O diagnóstico em questão pelo método de Elisa mostrou uma sensibilidade de 60,6% e uma especificidade de 100%.

Quanto à avaliação das 85 amostras para o teste de IgE antileishmania como marcador de doença ativa para *L. visceral*, apenas três indivíduos apresentaram forte positividade para IgE (*Nascimento MDSB et al 2006*).

Tabela 2 – Detecção de IgE antileishmania em crianças infectadas por *L. chagasi* com a forma assintomática da infecção e com leishmaniose visceral.

Imunoglobulina E	Formas clínicas		Total
	Lv doença	assintomáticos	
IgE (+)	3	34	37
IgE (-)	0	48	48
Total	3	82	85

O diagnóstico de Elisa por IgG antileishmania utilizado demonstrou sensibilidade em todos os indivíduos que desenvolveram LV clássica, demonstrando a

mesma sensibilidade com marcadores da classe IgE em indivíduos com LV clássica (Anam K, et al., 1999). Em concordância com (Shiddo AS, et al., 1996), que em estudos realizados na Somália também determinaram níveis de IgG e IgE em pacientes com LV doença, considerando IgG um marcador da leishmaniose visceral.

O diagnóstico de Elisa teve sua validação comprovada em estudos feitos por (Ellasad AM, et al., 1994), no Sudão demonstrando altos níveis de IgG 93,4% de sensibilidade e 93,7% de especificidade antes da quimioterapia.

A sensibilidade e especificidade das diferentes classes de imunoglobulina estudadas por (Anam K, et al., 1999) demonstraram que a IgG apresentou 100% de sensibilidade e 85% de especificidade, enquanto que a IgE apresentou 98% de especificidade e 44% de sensibilidade. Estes dados concordam com os obtidos neste estudo, onde a sensibilidade do teste foi evidenciada em todos os casos que evoluíram para LV doença.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é usada como pesquisa de anticorpos para o diagnóstico da LV desde 1964 (Duxbury RE, et al., 1964), é uma metodologia que utiliza formas promastigotas do parasito, limitando-a em termos de especificidade e reprodutibilidade (Sundar S, & Rai M, 2002b). Os antígenos mais utilizados são promastigotas fixados em lâminas e amastigotas provenientes de fígado e baço de hamsters. É disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Como desvantagem temos a necessidade de microscópio de imunofluorescência, deixando a desejar no que concerne a sensibilidade (82 a 95%) e especificidade (78 a 92%) dependendo da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizada (Cahil, 1970). Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com

leishmaniose tegumentar, doença de chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar, dificultando a interpretação dos dados, pois no Brasil ocorre superposição da LV, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de chagas.

Mesmo com o advento de novas metodologias de diagnóstico mais sensíveis, como o ensaio Imunoenzimático, a RIFI continua sendo utilizada nos principais laboratórios públicos de referência do Brasil para o diagnóstico de LV humana.

O teste de aglutinação direta (DAT) outro diagnóstico da LV é simples, de baixo custo com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (*Pedras MJ, et al., 2008*), com validação em áreas endêmicas. Na última década, o DAT tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno, não tendo valor no prognóstico da doença (*Boelaert M, et al., 1999*). A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura.

Para tentar contornar esse problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados. Entre eles a proteína recombinante K39 (rK39), uma seqüência de 39 aminoácidos clonada da região quinase de *Leishmania chagasi*, complexo donovani-específico, (*Burns JM, et al., 1993*) tem sido a mais amplamente avaliada.

Uma variação da DAT, o FAST (Fast Agglutination Screening Test), vem sendo testada para aplicabilidade em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (*Schoone GJ, et al., 2001*).

Um tipo de Western blot específico para diagnóstico de *Leishmania* spp., mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 73% quando foram avaliados soros de pacientes com HIV, resultados menores do que os observados em pacientes imunocompetentes. Nestes últimos, a especificidade e a sensibilidade mostram-se próximas a 100%. Além disso, este teste não apresenta reações cruzadas com malária, tuberculose, tripanossomíase africana e leishmaniose cutânea (Santos-Gomes G, et al., 1996).

O “Quantitative Buffy Coat” (QBC) é um método direto e rápido de fluorescência, utilizado na identificação de parasitas hemáticos. Em estudos realizados (Liarte, Daniel B, et al 2001), O diagnóstico de QBC foi testado em Leishmaniose visceral americana (LVA), foram analisados medula óssea e sangue periférico de 49 pessoas. O QBC foi positivo na medula óssea de 11/11 pacientes com LVA e em 1/6 com outras doenças. Foram identificadas amastigotas no sangue periférico de 18/22 pacientes com LVA e em nenhum de 10 sem LVA. O QBC é um método promissor para o diagnóstico de LVA humana, e possivelmente para exame do sangue periférico de pacientes com LVA/AIDS, para controle de cura ou para identificação de portadores assintomáticos.

Deteccção de antígenos

A deteção de antígenos do parasita é o método ideal para diagnóstico principalmente quando os títulos de anticorpos são fracos, como nos pacientes imunocoprometidos e a persistência de anticorpos após a cura. Entretanto, a pesquisa de antígenos em soro de pacientes com altos níveis de anticorpos é dificultada pela

presença dos imunocomplexos, fatores reumatóides autoanticorpos. Alguns métodos para detecção de antígenos na urina de pacientes com LV têm mostrado bons resultados em diferentes áreas geográficas, mas a detecção em casos assintomáticos não foi confirmada (*Atta AM, et al., 1998*). Antígenos não foram detectados após três semanas de tratamento, sugerindo um bom valor prognóstico (*De Colmenares M, et al., 1995*).

Deve ser dada ênfase à pesquisa de componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes.

Vários antígenos com diferentes massas moleculares têm sido identificados. O antígeno Anti-66KDa mostra especificidade de 100%, mas sensibilidade de apenas 37% (*Vinayak VK, et al., 1994*).

Diagnóstico na urina

Existem testes que avaliam anticorpos contra *Leishmania* spp., em urina para o diagnóstico da LV. O Elisa em urina mostrou sensibilidade de 93,3% e especificidade de 97,3% nos testes iniciais (*Islam MZ, et al., 2002a*). O mesmo pesquisador desenhou um teste de aglutinação em urina, que mostrou uma sensibilidade de 90,7% e especificidade de 96,4% (*Islam MZ, et al., 2004b*). Estes testes mostraram valores similares aos realizados em soro e têm a vantagem de precisar do uso de uma amostra biológica de mais fácil obtenção do que sangue.

O teste do látex (KATEX) é um diagnóstico na urina que detecta antígenos de *Leishmania* spp, mediante anticorpos monoclonais, sua sensibilidade é de 68 e 100% e

especificidade de 100% (*Sundar S, et al., 2002c*). Poderia ser uma alternativa aos testes imunológicos entre pacientes imunossuprimidos, que apresentam resposta de anticorpos fraca (*Singh S, et al., 2003*). Um estudo realizado com 206 pacientes (com dois co-infectados com HIV), mostrou sensibilidade de 95% e especificidade de 100% (*El-Safi SH, et al., 2003*).

Teste imunocromatográfico

Na década de 1990, ocorreu a união das técnicas imunoenzimáticas com a cromatografia, originando assim a imunocromatografia. As técnicas imunoenzimáticas permitem a quantificação de antígenos ou anticorpos que possam ser marcados com enzimas, sendo um procedimento rápido, de custo baixo e extremamente sensível, embora haja reações cruzadas com outras doenças (*Sundar S & Rai 2002b*).

Em regra geral, as técnicas imunocromatográficas apresentam diversos sistemas acopladores e são vistas como métodos vantajosos. Os principais métodos são: imunoblot, ensaios receptores, ensaios enzimáticos inibidores e sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos (*Weller G M. 2000*).

Os sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos, como ouro coloidal, têm sido empregados, nos últimos anos, para a realização de teste por imunocromatografia ou Dot-Elisa em papéis, que podem ser usados para o diagnóstico rápido da LV em áreas endêmicas, dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura óptica (*Scott JM, et al., 1991*).

Um teste imunocromatográfico simples e rápido empregando soro ou sangue do paciente, foi desenvolvido utilizando o rK39 fixado em papel (Teste Rápido Anticorpo

Leishmania donovani- TRALd).O teste mostrou 100% de sensibilidade quando aplicado na Índia e 67% no Sudão (*Zijlstra EE et al, 2001; Nakatani M et al, 2001*). Uma desvantagem é a reação cruzada com malária febre tifóide e tuberculose.

A validação do teste imunocromatográfico IT-LEISH é mais uma opção para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. É considerado um teste rápido para leitos de hospitais, sendo utilizado como antígeno o rK39. Segundo estudo multicêntrico realizado entre maio de 2005 e maio de 2007, conduzido em quatro Estados brasileiros pelas universidades do Maranhão (UFMA), Piauí (UFPI), Bahia pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM), Minas Gerais pelo Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), foram avaliadas 213 casos e 119 não-casos de Leishmaniose visceral humana, para realização da pesquisa de anticorpos anti-rK39 mediante o teste IT-LEISH, foi obtido uma sensibilidade que variou de 90 a 96% entre os diferentes centros de pesquisas participantes, e a especificidade variou de 93 a 100%, não houve diferença significativa em sensibilidade e especificidade observadas pelos centros de pesquisas envolvidos. Portanto o estudo validou o uso do teste IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral em beira de leito e em pacientes que apresentam quadro clínico sugestivo sem infecção concomitante por HIV(*Assis TSM, et al., 2008*).

Os testes rápidos possibilitam a detecção de infecções clínicas ou subclínicas, sendo muito importantes em áreas onde a Leishmaniose visceral é hiperendêmica (*Brandoniso O, et al., 2002*). Esses testes possuem limitações, visto que, por se basearem na pesquisa de anticorpos, podem permanecer positivos após a cura da doença. Apesar de suas limitações, são testes bastante promissores para uso em

programas de saúde pública. Em alguns estudos esses testes não apresentaram reações cruzadas com doença de chagas, malária, esquistossomose, toxoplasmose, tuberculose e febre tifóide (*Brandoniso O et al., 2002. Carvalho SFG, et al.,2003a. Sundar S, et al., 2002b*). A variação de sensibilidade e especificidade provavelmente ocorre por causa das variações regionais de cepas.

Entretanto os valores de sensibilidade (93%) e especificidade (97%) verificados para o teste IT-LEISH® aproximam-se de dados obtidos em outros estudos que, ao avaliarem a detecção de anticorpos anti-rK39, observaram valores de sensibilidade variando de 90 a 100%; e de especificidade, de 93 a 100%(*Ritmeijer K, et al., 2006 . Sundar S, et al.,1998c, Carvalho SFG., et al.,2003a Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil, 2007*). Na literatura, contudo, há relatos de pior desempenho de testes imunocromatográficos, como a sensibilidade de 80% comparada com a de 86% para RIFI em estudo realizado no Kuwait;(*Iqbal J, et al., 2002*) ou a comparação do TRALd® (Teste Rápido Antígeno para *L. donovani*) com o ELISA rK39 e com o DAT em 55 pacientes com LV confirmada no Sudão, com sensibilidades de 67%, 100% e 91%, respectivamente.(*Zijlstra Ee, et al., 2001*) No Brasil, o TRALd® foi comparado ao DAT com antígeno liofilizado, em número pequeno de casos, com sensibilidade de 85,7% e 100% e especificidade de 82% e 100%, respectivamente.(*Schallig HD,et AL., 2002*). Falta ainda identificar um antígeno ou anticorpo altamente sensível e específico para a confirmação ou descarte desta doença.

Diagnóstico molecular

A partir da década de 1980, iniciou-se o estudo de várias metodologias de diagnóstico baseadas na biologia molecular para identificação do gênero *Leishmania*. É um método de hibridização por meio de sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT PCR) para detecção de RNA e a PCR para detecção de DNA. O DNA de *Leishmania chagasi* é encontrado em pequena quantidade nas amostras clínicas obtidas de punção medular, esplênica ou hepática e, em maiores quantidades, nas células mononucleares do sangue periférico (*Genaro O.* 2002), sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos, a PCR é mais utilizada em estudos epidemiológicos do que em diagnóstico de rotina (*Solano-Gallego L, et al.,* 2001).

O diagnóstico molecular detecta o DNA do parasito mediante reação de polimerização em cadeia (PCR), dentre as amostras biológicas utilizadas temos o sangue e o aspirado de medula com sensibilidade maior que 90% e especificidade de 100%, porém apresenta custo elevado e procedimentos complexos (*Wu Z, Disch J, et al* 1997).

Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RTPCR) para detecção de RNA e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita. Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados

esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro, podem ser utilizados como fonte de material para as reações (Tavares, et al., 2003).

A hibridização do DNA foi o primeiro método de biologia molecular desenvolvido para diagnóstico. Sua especificidade é alta, mas sua sensibilidade é baixa(40). Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania* (Schalling, 2002). O melhor alvo para PCR e para as sondas de DNA tem sido o DNA presente nos minicírculos do kDNA da região conservada ou a amplificação do minicírculo completo.

Nos estudos com LV, a PCR tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos. Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente.(Weiss JB. 1995). Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR para o diagnóstico de LV utilizando o sangue periférico, considerando que a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (Lachaud L, et al., 2001). Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina (Solano-Gallego L et al., 2001). Para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo.

Diagnóstico da reação intradérmica de Montenegro

Estudo seccional de 946 indivíduos, ambos os sexos >1 ano de idade, utilizando-se reação intradérmica de Montenegro (RIM) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico da infecção. O referido artigo apresentou resultados sobre uma pesquisa transeccional de prevalência, clínica e imunológica, viabilizando uma nova abordagem sobre a dinâmica e o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* na amazônia brasileira. (*Filho MSR. 2007*).

Foi investigado indivíduos residentes em área endêmica de leishmaniose visceral na localidade Santana do Cafezal, município de Barcarena, norte do Estado do Pará. Com o objetivo de detectar infecção assintomática ou sintomática por *L. (L.) i. chagasi*, os indivíduos foram avaliados com antígeno bruto e homólogo, formas promastigotas para RIM e amastigotas para RIFI. (*Filho MSR. 2007*).

Os métodos usados para realização da RIM visando evidenciar a resposta imune de hipersensibilidade contra a infecção humana por *L. (L.) i. chagasi* foram semelhantes aos utilizados em trabalhos prévios sobre a leishmaniose tegumentar americana (LTA), porém, com uma diferença bastante significativa relacionada à especificidade do antígeno, foi necessário a utilização de um antígeno altamente específico para ser reconhecido pela resposta imune de hipersensibilidade induzida pelo agente da LVA, a *L. (L.) i. chagasi*. Por essa razão, visando garantir um alto grau de especificidade da RIM, foi usado um antígeno bruto, de formas promastigotas de fase estacionária de cultivo (meio RPMI 1640) de *L. (L.) i. chagasi*

(MCAO/BR/2004/M22967/Barcarena, Pará), na concentração equivalente a 10×10^6 parasitos/mL. (*Filho MSR. 2007*).

Para avaliação da prevalência, o resultado mostrou que a taxa de prevalência da infecção pela RIM de 11.2% (106/946) foi significativamente maior que a obtida pela RIFI de 3.4% (32/946). Entretanto, quando essas taxas foram estimadas combinando as duas reações, foi observado que entre os 106 indivíduos RIM positivos, 18 (17%) eram também positivos pela RIFI e, que, entre os 32 positivos pela RIFI, os mesmos 18 (56.2%) eram positivos pela RIM. Esta combinação, usando os dois testes juntos, permitiu a identificação de uma taxa atual de prevalência da infecção de 12.6% (120/946) na comunidade (*Filho MSR. 2007*).

4. CONCLUSÃO

Embora o avanço tecnológico ocorrido no século XX tenha resultado em uma variedade de técnicas laboratoriais que significam importante contribuição ao diagnóstico de doenças em geral e das infecciosas em particular, o diagnóstico da LV avançou pouco no desenvolvimento de uma prova diagnóstica útil como padrão ouro nas últimas décadas. Isto provavelmente por duas razões principais: por se tratar de doença negligenciada, que prevê pequeno retorno comercial ao investimento em pesquisa e desenvolvimento; e pela complexidade biológica própria da infecção e do parasito.

Segundo a literatura revisada, em razão das dificuldades encontradas no diagnóstico da LV em áreas endêmicas, é necessário o emprego de técnicas simples, de baixo custo, de fácil execução e que apresentem elevada sensibilidade e especificidade para os casos de pessoas com infecção sintomática. Os métodos imunocromatográficos . apresentam uma boa acurácia para detecção de anticorpos antileishmania, e poderiam converter-se em um excelente método para área de campo pois não requerem equipamentos, manutenção de uma cadeia de frio e pessoal técnico qualificado para a realização dos testes. Estes podem ser utilizados como meio de diagnóstico nos programas nacionais de saúde e aprimorando campanhas de triagem epidemiológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS(em ordem alfabética)

Anam K, Afrim F, Gura SK. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 231-235, 1999.

Assis TSM, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 17:108-110, abr-jun, 2008

Atta AM, Correa J, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:426-430, 1998.

Attar Zj, Chance MI, El-Safi S, Carney J, Azazy A, Elhadi M Et Al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*; 78: 11-6, (2001).

Barbosa De Deus, R, Mares Guia, M. L. Nunes, A.Z et al. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 1361-1366, (2002).

Boelaert M, El Safi S, Mousa H, Githure J, Mbatia P, Gurubacharya V et al. Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 31-7.

Brandoniso O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect* 21 : 461-46, 2002.

Bray RS. Immunodiagnosis of leishmaniasis. In: Cahng KP, Bray RS. *Leishmaniasis*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1985.

Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo SMB. The Sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;67:344-348.

Bryce PJ, Oettgen HC. Antigen-independent effects of immunoglobulin E. *Current Allergy and Asthma Respiratory* 5:186-190, 2005.

Burns Jm Jr, Shreffler Wg, Benson Dr, Ghalib Hw, 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* 1993; 90: 775-779.

Cahil, KM. Field technique in the diagnosis of calazar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1970;83:499.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68: 321-324, (2003).

Carvalho, F.A, Charest H, Tavares Cap, Matlashewski G, Valente Ep, Rabello A, Gazzinelli Rt, Fernandes Ap. Diagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 43: 289- 95,(2002).

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leshmaniasis: new approaches to disease control. *Bmj* 2003;326(7385):377-92

De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa Mj, Torras S, Munoz C. Short report: detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 427-8.

Disch J, Maciel FC, Oliveira MC de, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2003;97:1-5.

Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1964;13:525-529.

El-Safi SH, Abdel-Haleem A, Hammad A, El-Basha I, Omer A, Kareem HG, et al. Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. *East Mediterr Health J* 2003;9:844-55.

Ellasad AM, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalb HW. The significance of blood levels os IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese leishmaniasis patients. *Clinical and Experimental Immunology* 95:294-299, 1994.

Filho MSR e Silveira FT. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. *Rev. Para. Med.* v.21 n.3 Belém set. 2007; 1-5

Genaro O. *Parasitologia Humana*. 10ª edição, Atheneu S.A, São Paulo, 2002. p. 56-60.

Gontijo CMF e Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7: 338-349

Hagan P. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunology* 15: 1-4, 1993.

Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1983;32:943-946.

Houghton Rl, Petrescu M, Benson Dr, Skeiky Ya, Scalone A, Badaró R, Reed Sg, Gradoni L. A cloned (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicador for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 1998; 177: 1339-44.

Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:475-479.

Islam MZ, Itoh M, Shamsuzzaman SM, Mirza R, Matin F, Ahmed I, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:789-94.

Islam MZ, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Ekram AR, Sarder AH, et al. Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop* 2001;78:11-6.

Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49:31-8

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 613-7.

Liarte, Daniel B, et al. QBC® para o diagnóstico de leishmaniose visceral americana humana e canina: dados preliminares. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2001, vol.34, n.6, pp. 577-581.

Lopes Veles R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:436-43

Ministério da Saúde. Brasil. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Guia de bolso. Sexta edição. Brasília-DF. 2006.

Moreno E, Melo Mn, Antunes Cmf, Lambertucci Jr, Serufo Jc, Andrade-Ribeiro As, Carneiro, M. Epidemiologia Da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática Em Área Urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. *Informe Epidemiológico Do Sus*; 11: 37-9, (2002).

Nakatani M, Miranda-Badaró R, Meireles A, Trigo J, Netto Em, Badaró R. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com o novo antígeno k26 adicionado ao k39. *Rev Brás Med Trop, Suplemento*: 10 (2001).

Nascimento MD et al. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:39-41, jan-fev, 2006

Palatinick De Souza Cb, Gomes Em, Paraguai De Souza E, Palatinick M, Luz Kg, 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: 390-3 (1995).

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral

leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2008; 102:172-178.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'Keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006;74:76-80.

Santos-Gomes G, Gomes-Pereira S, Campino L, Araujo MD, Abranches P. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in Human immunodeficiency virus-Leishmania sp-coinfected patients. *J Clin Diagn Lab Immunol* 2000;38:175-8.

Schalling HDFH and Oskan L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis as parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 641-51.

Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, Silva ES da. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002;97:1015-1018.

Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schalling HDFH, Oskam L. A fast agglutination screening test (FAST) for detection of anti-Leishmania antibodies. *Trans R S Trop Med Hyg* 2001; 95: 400-1.

Scott JM, Shreffler WG, Ghalib HW et al. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 44: 272-277, 1991.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil, 2007 [monografia na Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006 [acessado 12 jun. 2009]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br>

Sengupta PC. Immunodiagnosis of Kala-zar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1969;63:46.

Shiddo SA, Huldt G, Nilsson LA, Ouchterlony O, Thorstensson R. Visceral leishmaniasis in Somalia Significance of IgG subclasses and of IgE response. *Immunology Letters* 50: 87-93, 1996.

Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988;82:66-80.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 3: 285-91.

Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis *J. Postgrad Med* 2003;4: 55-60.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 560-3.

Sundar S, Pai K, Sahu M. Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*; 96:19-23,(2002).

Sundar S & Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:951-8.

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

Tavares, C. A. P., Fernandes, A. P., Melo, M.N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*, 3: 657-67, (2003).

Vinayak VK, Mahajan D, Sobti RC, Singla N, Sundar S. Anti-66kDa anti leishmanial antibodies as specific immunodiagnosis probe for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 1994; 99: 109-14.

Zijlstra EE, Siddig AM, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct

Zijlstra Ee, Nur Y, Desjeux P, Khalii Ea, El-Hassan Am, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health*; 6:108-113,(2001).

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 113-30.

Weller G M. Immunochromatographic techniques – a critical review. *Fresenius' J Anal Chem* 366: 635-645, 2000.

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