



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

MEIRIELLY LIMA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE NOVO TESTE
IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

**ARACAJU,
2015**

MEIRIELLY LIMA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE NOVO TESTE
IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roque Paccheco de Almeida

**ARACAJU,
2015**

MEIRIELLY LIMA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE NOVO TESTE
IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

1º Examinador: Patrícia Sampaio Tavares Veras

2º Examinador: Prof. Drº.Enaldo Vieira de Melo

PARECER

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pela oportunidade de vivenciar tantas experiências nesse grande aprendizado chamado vida.

Ao meu pai, José Wilson, que sempre enfatizou a importância dos estudos, ao meu esposo, Alan, pelo incentivo e apoio em todas as fases anteriores e durante o mestrado.

Ao Dr. Roque Pacheco de Almeida, meu orientador. Sempre paciente e generoso. Obrigada por ter me acolhido na sua equipe e por confiar no meu trabalho.

À Dr.^a Tatiana Rodrigues de Moura, por ter me dado a oportunidade de fazer mestrado e ter me acolhido de braços abertos.

Ao professor Enaldo pela paciência e importante contribuição estatística

À Dr.^a Amélia Ribeiro de Jesus, pelas preciosas sugestões durante todas as etapas.

Ao Dr. Paulo Leopoldo, pelas conversas e ensinamentos.

À Samille pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos/irmãos do LBM, que fazem deste, um ambiente familiar e agradável de se trabalhar. Obrigada: Aline Barreto, Fabrícia, Juciene, Luana, Rodrigo, Marcio, Roseane, Mônica, Priscila, Micheli, Ricardo, Alyne Karene Thais, vocês são mais que especiais.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, especialmente a Dr.^a Patrícia Veras e sua equipe, parceiros dessa pesquisa, que doaram os kits para o desenvolvimento do trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento deste trabalho, o meu agradecimento.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE NOVO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA, Meirielly Lima Almeida, Aracaju – Sergipe, 2015.

Introdução: A leishmaniose visceral humana (LVH) é um importante problema de saúde pública no Brasil com mais de 3.500 novos casos anuais e pode ser fatal quando não tratada. O padrão-ouro para diagnóstico é o teste parasitológico, porém é uma técnica invasiva, dispendiosa, além de não apresentar sensibilidade ideal. No Sistema público de Saúde é disponibilizado o teste sorológico Imunofluorescência Indireta, entretanto, é uma técnica que demanda tempo, equipamentos, pessoal treinado e também apresenta sensibilidade limitada. Os testes imunocromatográficos rápidos, apresentam boa sensibilidade, especificidade, além de práticos, rápidos e econômicos. O mais utilizado é o rK39 (produto importado). Portanto, é de grande valia ter outro teste equivalente com produção nacional, a fim de ter outra alternativa com igual eficiência e com menor custo. **Metodologia:** no estudo atual foram avaliados três testes imunocromatográficos rápidos (TRs) para o diagnóstico da LVH. Os testes foram produzidos pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz) e identificados como teste 1, constituído pelo antígeno recombinante Lci1A; teste 2, formado pelo antígeno recombinante Lci2B e teste 3 composto pelo conjugado dos antígenos citados. O grupo de “casos” foi composto por 79 soros de pacientes com diagnóstico de LV, a partir de clínica compatível (febre associada a esplenomegalia e hepatomegalia), mielocultura e/ou rK39 positivos, pancitopenia e sucesso terapêutico. O grupo de “não-casos” foi formado por 90 soros de pacientes com outra patologia e pessoas sadias. **Resultados:** os valores de sensibilidade foram bons para os três testes (acima de 90%), porém a especificidade do teste 1 foi muito baixa (10,0%), já para os testes 2 e 3, as especificidades foram 90,0% e 83,3%, respectivamente. **Conclusão:** Os resultados mostram que o teste 2 apresenta potencial para utilização como triagem diagnóstica da LVH.

Descritores: Teste rápido; Leishmaniose visceral humana; Antígeno recombinante.

ABSTRACT

EVALUATION OF A NOVEL RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR DIAGNOSIS OF HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS, Meirielly Lima Almeida, Aracaju - Sergipe, 2015.

Introduction: Human Visceral Leishmaniasis (HVL) is a major public health problem in Brazil with more than 3,500 new cases per year and can lead to death if not treated. The gold standard for diagnosis is the parasitological test, but it is an invasive, expensive technique, and does not present ideal sensitivity. The serologic Indirect Immunofluorescence test is available in the public health system, however, this low sensitive that technique that requires time, equipment. Currently, there has been an investment in the development of rapid immunochromatographic tests that show good sensitivity and specificity, in addition to being faster, practical and economical. The rK39 is the immunoassay currently used for the diagnosis of HVL and has international production. **Methodology:** This study evaluated three new rapid immunochromatic tests (TRs) for screening of HVL, these tests were produced by Gonçalo Moniz Research Center (Fiocruz). The three tests were identified as: Test 1, comprising the recombinant antigen Lci1A; Test 2, formed by the recombinant antigen Lci2B; and Test 3, comprising the conjugate of the two antigens. A total of 159 sera from different individuals were used. The group "cases" consisted of 79 sera from patients diagnosed with VL, it considered compatible clinical symptoms (fever associated with splenomegaly and hepatomegaly), bone marrow culture and / or rK39 positive test, pancytopenia and therapeutic success. The group of "non-cases" consisted of 90 sera from patients with other diseases and healthy people. **Results:** The sensitivity values were good for the three tests (over 90%), but the specificity of test 1 was very low (10,0%). As for tests 2 and 3, the specificities were 90.0% and 83.3%, respectively. **Conclusion:** The results indicate that both test 2 has potential for use as diagnostic screening for VL in humans.

Keywords: rapid test; human visceral leishmaniasis; recombinant antigen.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura1A. Imagem da forma promastigota da leishmania.....	pg17
Figura 1B. Imagem da forma amastigota da leishmania.....	pg17
Figura 2. Ciclo de vida da leishmânia, ocorre em dois momentos: no vetor, onde as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo se transformam na forma promastigota infectante e no hospedeiro vertebrado que pode ser infectado durante o repasto sanguíneo do vetor infectado.	pg 18
Figura 3. Material recebido pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Salvador, Bahia, Brasil).....	pg 30
Figura 4. Testes indicando resultados válidos.....	pg 30
Figura 5. Área sob a curva ROC para cada teste.....	pg 35
Figura 6. Análise geral das sensibilidades e especificidades dos testes.....	pg36
Tabela 1. Características demográficas para os grupos segundo idade e sexo.....	pg 32
Tabela 2. Análise de reação cruzada no grupo de não – casos para estimativa da especificidade dos testes.....	pg 33
Tabela 3. Estimativa da sensibilidade e especificidade dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para diagnóstico da LV.....	pg 34
Tabela 4. Estimativa da área sob a curva ROC dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para diagnóstico da LV.....	pg 34
Tabela 5. Estimativa dos valores preditivos positivos e negativos dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para o diagnóstico da LV.....	pg 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA- DNA complementar

ELISA- Ensaio Imunoenzimático

Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz

HEMOSE- Centro de Hemoterapia de Sergipe

NNN- Meio Novy-MacNeal-Nicolle

PCR- Polymerase chain reaction

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39- Proteína recombinante K39

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DTH+- Hipersensibilidade Tardia

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HTLV –Vírus Linfotrópicos de células T Humanas (Human T cellLymphotropicVirus)

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

IgM- Imunoglobulina M

IL- Interleucina

INF- γ - Interferon gama

LV- Leishmaniose Visceral

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

MS - Ministério da Saúde

NAT – Testes de Amplificação e Detecção de Ácidos Nucléicos

ROC – Receiver Operator Characteristic curve

SLA- Antígeno Solúvel de Leishmania

Th - Células T (T helper)

VPP –Valor Preditivo Positivo

VPN –Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	pg 11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	pg 14
2.1 Leishmaniose	pg 14
2.2 Leishmaniose visceral	pg 14
2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral.....	pg 16
2.4 Agente Causal.....	pg 17
2.5 Diagnóstico Laboratorial.....	pg 18
2.5.1 Diagnóstico Parasitológico.....	pg 18
2.5.2 diagnóstico Molecular.....	pg 19
2.5.3 Diagnóstico Sorológico.....	pg 20
2.5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	pg 20
2.5.3.2 ELISA (Ensaio Imunoenzimático).....	pg 21
2.5.3.3 Testes Imunocromatográficos.....	pg 22
2.5.3.4 Antígenos Recombinantes.....	pg 23
3OBJETIVOS	pg 26
3.1 Objetivo Geral.....	pg 26
3.2 Objetivos Específicos.....	pg 26
4 METODOLOGIA.....	pg 27
5 RESULTADOS	pg 32

6 DISCUSSÃO	pg 37
7 CONCLUSÃO	pg 42
8 REFERÊNCIAS	pg 43
ANEXO A.....	pg 52

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das doenças parasitárias de maior impacto sobre a saúde pública mundial, com uma incidência anual de aproximadamente 2 milhões de novos casos no mundo (WHO, 2010). No Brasil a média anual é de 3.500 casos e a doença, apesar de amplamente distribuída pelo país, apresenta maior número de casos na região nordeste (SINAN, 2011).

A LV é uma doença causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* – *Leishmania infantum*. A *L. donovani* é o agente etiológico no leste da África e no subcontinente indiano e a *L. infantum* na Europa, norte da África e na América Latina (DESJEUX, 2004). Como a apresentação clínica é comum a diversas patologias, o diagnóstico da doença é baseado na combinação de sinais clínicos com algum outro teste laboratorial. Quando não tratada adequadamente, é uma enfermidade potencialmente fatal, sendo responsável por cerca 277 óbitos por ano entre os brasileiros. A realização de um diagnóstico rápido e formulação de um plano de tratamento são, desse modo, imprescindíveis (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Dentre os métodos de diagnóstico laboratorial para leishmaniose, há os testes parasitológicos, exames moleculares, ensaios de imunidade celular e exames sorológicos, com exceção deste último, os testes citados não são usados na rotina do diagnóstico, mas sim em centros de pesquisas (MAIA, 2008; SRISVASTAVA *et al.*, 2011). O teste parasitológico consiste na visualização direta do parasita em esfregaço ou cultura de tecido esplênico, do linfonodo ou da medula óssea do paciente acometido pela leishmaniose. Apesar de ser considerado o padrão-ouro, esse teste não é ideal por demandar um longo período para obtenção do resultado e mão-de-obra especializada, além de apresentar baixa sensibilidade, elevado custo para reprodução e ser altamente invasivo (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os testes sorológicos destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a qual é disponibilizada pelo Ministério da Saúde (MS) para os laboratórios de referência em diagnóstico de leishmaniose visceral, e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos possuem a vantagem de demandar menos tempo que o teste parasitológico, porém ainda demandam tempo e pessoal treinado. O ELISA deixa a desejar no que se refere a especificidade, enquanto o RIFI apresenta limitação quanto à sensibilidade (TÁVORA *et al.*, 2007).

Na tentativa de melhorar a especificidade, tem-se investido muito em estudos de proteínas produzidas de forma recombinante. Essas proteínas são derivadas de proteínas com diferentes funções na *Leishmania*, como: proteínas similares à cinesina, proteínas do choque térmico, enzimas e de função desconhecida (Srivastava *et al.*, 2011). Dentre estas proteínas, a rK39 (sequência de 39 aminoácidos de uma proteína relacionada a cinesina de cinetoplasto de leishmania) tem sido a mais amplamente avaliada. Quando essa proteína passou a ser utilizada em métodos baseados em ELISA, elevou significativamente a sensibilidade e especificidade do teste (BURNS, 1993).

A necessidade de testes mais rápidos para o diagnóstico de diferentes doenças, sobretudo para a utilização em campo, tem estimulado o desenvolvimento dos testes imunocromatográficos rápidos. Estes testes vêm sendo empregados como rotina laboratorial para detecção de doenças como a leishmaniose. Um exemplo é o teste rápido que utiliza a proteína recombinante K39, o qual contém uma repetição de 39 aminoácidos que faz parte de uma proteína predominante de 230-kDa em amastigotas de *L. chagasi*. Esse teste tem sido sugerido como teste de triagem pelo MS e é fabricado pela InBios Internacional (KalazarDetec, EUA) e pela DiaMed (It-Leish, suíça), revelando uma boa sensibilidade nos diferentes trabalhos e uma especificidade variável (CHAPPUIS, 2006).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de identificar novas proteínas recombinantes para uso em métodos diagnósticos, vacinas e terapia para leishmaniose. Muitos antígenos recombinantes têm sido aplicados em ELISA e mostraram bons resultados, quando posteriormente analisados na forma de testes rápidos (TEIXEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os vários antígenos recombinantes estudados, existem dois (Lci1A e Lci2B) que apresentaram potencial diagnóstico, por terem demonstrado excelentes sensibilidade e especificidade quando aplicadas em ELISA em soros de cães e humanos com leishmaniose visceral. Estes resultados apontam uma possibilidade de utilização desses antígenos para compor um teste imunocromatográfico rápido (TEIXEIRA, 2007; De SOUZA, 2012; OLIVEIRA, 2011).

Considerando que a leishmaniose visceral é uma doença fatal, se não tratada, justifica-se a busca por métodos diagnósticos mais efetivos, que sejam de fácil execução, simples, acessíveis, menos invasivos e rápidos, capazes de diminuir o tempo para obtenção dos resultados. O presente estudo avaliou três testes imunocromatográficos rápidos produzidos no Brasil, com antígenos recombinantes previamente estudados e com alto potencial para aplicação no diagnóstico da LV, o que poderá resultar em uma nova alternativa na detecção

de leishmaniose visceral humana e com eficiência semelhante ao do teste imunocromatográfico rK39 (teste atualmente utilizado).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

Leishmaniose é um grupo de doenças transmitidas por vetores, conhecidos como flebotomíneos, aos seres humanos e outros mamíferos. É uma doença infecciosa, porém não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania*. É considerada a segunda doença tropical mais negligenciada e pode ser causada por cerca de 20 espécies de Leishmanias. No homem, a infecção pode evoluir e apresentar diversificadas formas de manifestações clínicas. As duas principais formas são a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV)(Murray *et al*, 2005).

A leishmaniose cutânea, normalmente, se apresenta como nódulos cutâneos ou lesões no local da picada (leishmaniose cutânea localizada). Esta forma resolve-se espontaneamente e geralmente responde bem ao tratamento. Porém, em alguns casos os parasitos difundem-se através da pele e promove a presença de múltiplos nódulos não ulcerativos compondo a manifestação clínica conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LCD). Ou, ainda, o parasito pode se propagar através do sistema linfático, resultando na destruição do tecido bucal e da mucosa nasobronquial desenvolvendo a forma clínica conhecida como leishmaniose mucosa (LM). Estas duas últimas formas são mais complicadas e podem levar muito mais tempo para resolver. A leishmaniose visceral (manifestação clínica mais grave da doença) geralmente afeta os tecidos do baço, fígado ou linfóide, e, se não tratada, é fatal. Ainda assim, uma fração de casos com história de sucesso no tratamento pode resultar na Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL), a qual é caracterizada pela presença de manchas, máculas ou nódulos em pele da face, tronco ou membros e pode ser confundida com lesões de hanseníase ou com lesões de vitiligo. A apresentação clínica vai depender da espécie do parasito envolvida, da cepa, da resposta imune e do estado nutricional do indivíduo acometido (BERN *et al.*, 2008; OMS, 2010).

2.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral pode apresentar-se de três formas clínicas, são elas: forma assintomática, oligossintomática e sintomática clássica. A forma assintomática ocorre bastante em pacientes de áreas endêmicas (principalmente adultos) e o diagnóstico só é

possível através da detecção de uma sorologia caracterizada por sorologia positiva ou da reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva para o antígeno solúvel de leishmania (SLA).

A segunda forma é a oligossintomática (forma subclínica), que também ocorre em indivíduos de área endêmica, geralmente crianças e é caracterizada por sorologia positiva, presença de sinais e/ou sintomas de uma infecção sistêmica generalizada, com febre, fadiga, perda de apetite, fraqueza, perda de peso e em alguns casos, hepatomegalia e/ou esplenomegalia de pequeno grau.

A terceira forma é a sintomática clássica, caracterizada por elevados níveis séricos de anticorpos anti-leishmania, linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e desordens hematológicas como anemia, leucopenia e plaquetopenia (BACELLAR, 2005; WHO, 2010). Nesta forma ocorre um período inicial, em que os sintomas instalam-se de forma abrupta ou insidiosa. A febre é a manifestação mais frequente no início do quadro e dificilmente está ausente. Na forma abrupta ela pode ser elevada (39-40°). Este modo de apresentação ocorre mais em adultos ou crianças maiores. Quando o início é insidioso, o doente não sabe precisar o começo dos sintomas, o que é mais encontrado em crianças menores. No geral, a forma clássica possui período de incubação variável de 10 dias até mais de um ano e é caracterizada por esplenomegalia (manifestação mais importante depois da febre), hepatomegalia, febre, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, acometimento de linfonodos, substancial perda de peso, distúrbios bioquímicos como hipoalbuminemia, e ainda pode ocorrer acometimento da medula óssea, podendo levar à morte, se não diagnosticada e tratada rapidamente (PRATA, 2005).

A leishmaniose visceral vem se destacando como uma importante infecção oportunista em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), na maioria das vezes a doença representa reativação de infecção subclínica anterior e a apresentação clínica pode ser típica ou não, sendo comum sintomas gastrointestinais (ALVAR, *et al.*, 2005).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), uma forma cutânea crônica que ocorre após a recuperação da leishmaniose visceral, tem sido relatada na Índia em aproximadamente 10% dos casos após o tratamento (DESJEUX, 2004). As lesões, que apresentam caráter difuso, nodular e não ulcerativo na face, tronco e extremidades, contêm parasitas e podem desenvolver-se tão tardiamente quanto 1 a 2 anos após a doença original, podendo também persistir por tempo prolongado (aproximadamente 20 anos) (KAFETZIS, 1998).

Formas hemorrágicas, com púrpura trombocitopênica e hemorragias digestivas, podem ocorrer no calazar. Sampaio *et al.*, 2010 descreveram uma quarta forma da LV, que é

o agravamento da forma clássica, onde há severa diminuição de neutrófilos, favorecendo infecções bacterianas e severa baixa de plaquetas, levando a quadros hemorrágicos até o óbito.

2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é endêmica em 65 países, com um total de 200 milhões de pessoas em risco. Há uma estimativa anual de 500.000 novos casos da doença e mais de 50.000 mortes a cada ano. O número de mortes, dentre as doenças parasitárias, só é inferior ao da malária (WHO, 2002; DESJEUX, 2004; ALVAR *et al.*, 2012).

Cerca de 90% dos casos ocorre em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil.

No Brasil, era considerada uma doença de caráter rural. Entretanto, nos últimos anos, houve uma expansão da LV e as causas são várias, dentre as quais está o desmatamento, presença de grande quantidade de cães domésticos (principal reservatório urbano) em áreas endêmicas, migração de populações não imunizadas de outras regiões, falta de medidas de controle, co-infecção com HIV, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e, finalmente, a difusão entre os profissionais médicos e paramédicos sobre a importância do diagnóstico da LV em indivíduos febris, principalmente crianças, procedentes de áreas endêmicas (LAINSON, 1988; LAINSON, 1989; BOELAERT *et al.*, 2000), portanto é uma endemia em franca expansão geográfica e um crescente problema de saúde pública (BRASIL, 2010).

De 2000 a 2009 foram registrados 34.583 casos de LV no Brasil, com média anual de 3.458 casos confirmados. Nesses mesmo período, ocorreram 1.771 óbitos por LV, representados por uma letalidade de 5,1% (BRASIL, 2010). No ano de 2013 foram registrados 3253 casos. (SVS, MS, 2014).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. Na medida em que a doença expandiu para outras regiões, essa situação vem se modificando e, recentemente, a região nordeste representa 53,6% dos casos do país (BRASIL, 2010; SVS, MS; ELKHOURY, 2006; ALVAR *et al.*, 2012). Em 2010, foram confirmados no nordeste 1.662 casos de leishmaniose visceral. O Ceará lidera com 485 casos, seguido do Maranhão e da Bahia com cerca de 360 e em seguida Piauí com 237 casos (SINAN, 2011). Desde 1934, casos humanos de leishmaniose visceral (LV) vêm sendo

registrados no Estado de Sergipe (CHAGAS,1936). De 2008 a 2013 foram notificados 369 casos, situando Sergipe em quinto lugar da região nordeste (SINAN, 2014).

2.4 Agente causal

O parasito pertence a ordem *Kinetoplastida*, a família *Trypanosomatidae* e é um parasito protozoário de grande importância médica e veterinária, o qual é transmitido para os hospedeiros susceptíveis através picada das fêmeas dos flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*) dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (no novo mundo). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros que causam infecções em mamíferos, *Leishmaniae* *Viannia*, baseado no padrão de desenvolvimento do parasito no intestino do inseto. Mais de 30 espécies de *Leishmania* são conhecidas até o momento e aproximadamente 20 espécies são patogênicas para os humanos. (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004; DANTAS –TORRES, 2006).

A *Leishmania* é um parasito unicelular e digenético, apresenta-se de duas formas: promastigota, a qual é caracterizada pela presença de flagelo e habita o tubo digestivo do flebotomíneo (figura 1A) e a forma amastigota, que não possui flagelo e é intracelular obrigatória de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (figura 1B). O parasito possui ciclo heteroxênico, alternando estágios de vida entre hospedeiros invertebrados (flebotomíneos) e mamíferos (roedores, marsupiais, canídeos e primatas)

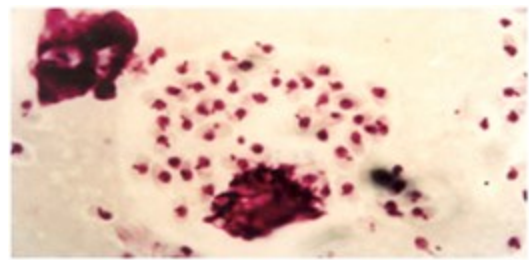
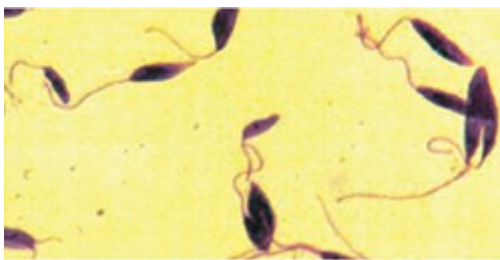


Figura 1A.Imagemda forma promastigota da leishmania **Figura 1B.**Imagem da forma amastigota da leishmania
Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2014

O ciclo de vida da *leishmania* (figura 2) tem dois momentos: o vetor infectado, durante o repasto sanguíneo, regurgita parte do conteúdo do seu tubo digestivo (1) e assim, transmite as promastigotas infectantes (metacíclicas) ao hospedeiro vertebrado (2). Uma vez presente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, especialmente macrófagos e, dentro destes,

transformam-se em amastigotas (3). Estas se dividem por divisão binária e infectam outros macrófagos, ocorrendo, assim, uma disseminação hematogênica (4).

O vetor ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, ingere uma pequena quantidade de sangue com macrófagos contendo amastigotas (5 e 6). No tubo digestivo do vetor as amastigotas se transformam em promastigotas (7) e, após aderir ao epitélio intestinal, diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, completando o ciclo (8) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; SACKS, 2001).

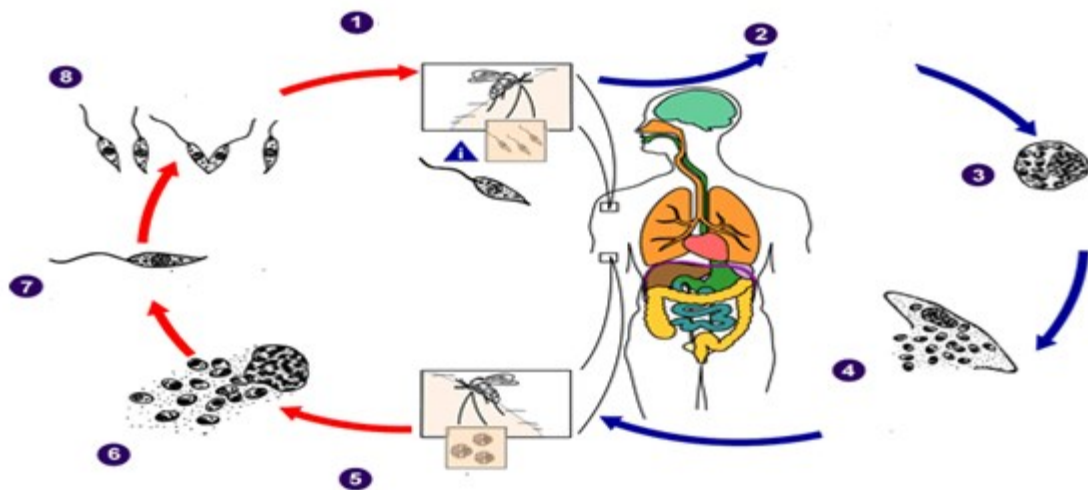


Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania*

Fonte: Adaptado de <<http://www.dpd.cdc.gov>>

2.5 Diagnóstico Laboratorial

2.5.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é feito por meio da demonstração das formas amastigotas do parasito a partir de aspirado do baço, da medula óssea ou dos nódulos linfáticos. A observação direta do parasito fornece prova definitiva da infecção, pois uma vez que o parasito é visualizado, a infecção é confirmada sem qualquer dúvida. Com o material obtido é feito esfregaço ou impressão sobre lâmina de vidro, sendo então fixado e corado pela técnica de Giemsa, Leishman ou Wright. As lâminas são examinadas em microscópio, procurando amastigotas que podem estar dentro ou fora dos macrófagos (BRASIL, 2011). As amastigotas do parasito são reconhecidas por seu formato, que varia de esférico a ovóide, medindo cerca de 2 a 6 micrômetros de diâmetro, contendo núcleo arredondado e cinetoplasto ligeiramente arredondado (IKEDA – GARCIA, 2006).

Esse método exige ambientes apropriados e profissional treinado, é um procedimento invasivo e com baixa sensibilidade, aproximadamente 50% no caso de esfregaços de medula óssea, diminuindo para 30% em esfregaços de linfonodos, pois é muito difícil observar esses parasitos, principalmente na fase inicial da doença, sendo comum a ocorrência de resultados falso negativos (FAYET, 1999).

Quando os parasitos não são visíveis, utiliza-se métodos parasitológicos indiretos, como cultura a partir de aspirados de medula óssea e de linfonodos, através da utilização de meios específicos, como o Novy-MacNeal-Nicole (NNN) ou o RPMI-1640 (TROTZ-WILLIAMS, 2003). As culturas são incubadas a uma temperatura de 24 – 26°C e observadas em microscópio invertido por cinco dias ou mais, para observar se ocorreu o crescimento de promastigotas. A cultura do material das punções aspirativas aumenta a sensibilidade da pesquisa (>80%), porém, pode retardar o resultado em semanas (DIETZE, 2005).

2.5.2 Diagnóstico Molecular

Métodos diagnósticos têm sido aprimorados nos últimos anos para a identificação de sequências de ácidos nucleicos específicas para determinados patógenos, isso abriu novas oportunidades para a identificação e caracterização de agentes infecciosos como os causadores das leishmanioses. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a que mais vem sendo utilizada (BRITTO, 2005).

A PCR é um teste que imita, *in vitro*, o processo de replicação do DNA realizado *in vivo* pelos organismos na natureza. Esse processo possibilita a síntese de milhões de cópias de uma única sequência de DNA em poucas horas. *In vivo*, a enzima DNA polimerase utiliza apenas uma das fitas do DNA como “molde” para reproduzir outra fita, portanto as fitas duplas são separadas, para que a partir de uma delas, denominada “fita template”, seja produzida uma fita complementar (CUPOLILLO, E., 2005).

Esta técnica é bastante sensível e específica para detectar DNA de *Leishmania spp.* em ampla variedade de amostras clínicas (GOMES *et al.*, 2008). Em casos fortemente suspeitos, mas em que as técnicas sorológicas ou a observação direta do parasito são inconclusivas, indica-se a PCR. Os estudos têm demonstrado resultados mais vantajosos com amostras de pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos, com menos sensibilidade e especificidade quando o sangue periférico é utilizado como amostra, provavelmente devido ao número de parasitos presentes nesse tecido (SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). Estudos mostraram que a PCR para *Leishmania* apresenta

alta sensibilidade, em geral acima de 90% e alta especificidade, podendo chegar a 100%. Porém, por ser uma técnica de alto custo e complexidade, sua utilização na rotina laboratorial é limitada (LACHAUD *et al*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

2.5.3 Diagnóstico sorológico

Nos locais onde a coleta de aspirados de tecidos não pode ser realizada, a pesquisa de anticorpos séricos em títulos elevados é o diagnóstico padrão. No Brasil, os principais métodos sorológicos empregados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (GONTIJO, C. M. F., 2004). O diagnóstico sorológico é baseado na presença de resposta humoral específica. Estão disponíveis vários métodos sorológicos que variam em sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LV (LINDOSO, J. A. L., 2006). São métodos indiretos de detecção do parasito e devido à sua praticidade, devem preceder sempre que possível os métodos parasitológicos, podendo até, em algumas situações, substituí-los. Na presença de dados clínicos e laboratoriais uma sorologia reagente pode confirmar o diagnóstico de LV. Entretanto, um teste reagente na ausência de manifestações clínicas sugestivas, não autoriza o início do tratamento (DIETZE, 2005; BRASIL, 2006).

As principais limitações dos testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral são as possibilidades de reações cruzadas com outros microorganismos, como os causadores de leishmaniose tegumentar, doenças de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar, além da ocorrência de resultados positivos em indivíduos que entraram em contato com o parasito mas não têm a doença e a falta de resposta humoral em pacientes imunocomprometidos (ALVAR, 1997; KAR, 1995).

2.5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A imunofluorescência indireta (RIFI) é considerado o padrão-ouro dentre os testes sorológicos. É utilizada desde a década de 60, este teste é baseado na detecção de anticorpos, que são demonstrados nos primeiros estágios da infecção e são indetectáveis por seis a nove meses após a cura. Se os anticorpos persistirem em títulos baixos é uma indicação de recaída. Diluições a partir de 1:80 são consideradas positivas. É também um dos testes disponíveis mais sensíveis, detectando anticorpos em estágios precoces da infecção, que se tornam indetectáveis 6 a 9 meses após a cura (GUERIN, 2002).

A identificação de anticorpos utilizando RIFI é feita pela incubação dos soros testes com antígenos fixados em uma lâmina de vidro. A reação é revelada por anticorpo anti-imunoglobulinas marcado com fluorocromos e a fluorescência emitida é captada em um microscópio de fluorescência. A RIFI para diagnóstico da leishmaniose é um teste que apresenta sensibilidade que varia de 82% à 95% e especificidade de 78% a 92%. A RIFI é considerado um método diagnóstico de baixa sensibilidade e alta especificidade. Uma das principais limitações da RIFI é a ocorrência de reações cruzadas, principalmente com a doença de Chagas. A RIFI é o método mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas por meio do Programa de Leishmanioses do Ministério da Saúde (CAHIL, 1970; SENGUPTA, 1969).

2.5.3.2 ELISA

O ELISA surgiu a partir da década de 70 e muitos estudos aprimoraram o ELISA-padrão e suas diversas variações. É um teste útil e sensível que permite a análise rápida de um grande número de amostras. Vários antígenos podem ser empregados na reação, sendo sua sensibilidade e especificidade influenciadas pelo antígeno utilizado (SINGH, 2006).

No ensaio ELISA, os anticorpos são revelados por anticorpos anti-imunoglobulinas marcados com uma enzima, como por exemplo a peroxidase, que catalisa a oxidação de um cromógeno incolor que adquire cor na presença do substrato H_2O_2 . A conversão do substrato é quantificada em um leitor de placas, por medida utilizando um comprimento de onda específico. A maior parte dos ELISAs para diagnóstico da leishmaniose utiliza como antígenos o lisado bruto de *Leishmania* spp. O uso destes antígenos ou extratos solúveis das formas promastigotas ou amastigotas, limita a especificidade por apresentar reações cruzadas (ZANETTE, 2006).

Atualmente novos ensaios de ELISA foram estabelecidos utilizando novos antígenos, como por exemplo, os antígenos recombinantes rK39, rK9 e rK26 ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72 e gp70, específicas do gênero *Leishmania* spp. A sensibilidade e especificidade desse ensaio aumentam de forma significativa ao usar como antígeno proteínas recombinantes, quando comparado ao antígeno bruto. A proteína rK39 é uma prova da melhora, tanto da sensibilidade quanto da especificidade do ELISA no diagnóstico da LV ao utilizar antígenos recombinantes. Trabalhos mostram que o uso desta proteína apresenta resultados com sensibilidade variando entre 93 a 100% e especificidade

entre 84 a 100% (ROSÁRIO *et al.*, 2005; ZIJLSTRA *et al.*, 1998; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; MOHAPATRA *et al.*, 2010).

2.5.3.3 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

Nos últimos anos vários testes imunocromatográficos rápidos comerciais foram desenvolvidos, utilizando como antígenos as proteínas recombinantes. A imunocromatografia é um método simples, preciso, específico e fornece resultados qualitativos, rápidos e econômicos, além de fácil interpretação, pois a leitura é feita a olho nu, dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura óptica. A maioria desses testes emprega anticorpos monoclonais anti-IgG e antígenos de *Leishmania* de diferentes fontes adsorvidos em membranas de nitrocelulose. Os antígenos formam a linha teste e o anticorpo anti-IgG constitui a linha controle (GRADONI, 2002).

Esses testes utilizam também um sistema de marcação que utiliza uma proteína extraída da bactéria *Staphylococcus aureus*, que é a proteína A, as quais se complexam com ouro coloidal, que também é adicionado ao teste. A proteína A, além de se ligar com o ouro coloidal, tem afinidade por uma região comum às moléculas das imunoglobulinas (segmento Fc), especialmente a IgG (GRADONI, 2002).

Dentre os testes imunocromatográficos estudados, em leishmaniose, o mais utilizado é o rK39, os valores de sensibilidade e especificidade de testes imunocromatográficos que utilizam este antígeno em humano variam de 89-98% em sensibilidade e de 97-100% na especificidade (CARVALHO *et al.*, 2003; CHAPPUIS *et al.*, 2006). A grande vantagem desses testes imunocromatográficos rápidos (testes rápidos) é que permitem execução simples e interpretação visual das reações, já que o uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que não necessitem de infra-estrutura laboratorial e de profissionais especializados, traz benefício para o diagnóstico acurado e rápido da leishmaniose visceral, principalmente nas localidades onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é limitado. Apesar de suas vantagens operacionais, alguma variabilidade regional no desempenho do teste rápido rK39 é observada, por exemplo, em estudos feitos na Índia e Nepal, os resultados foram corretos e positivos em 97% das pessoas com a doença. Já no leste da África os resultados foram corretos e positivos em apenas 85%. Em um trabalho de metanálise feito por Boelaert (2014), mostrou que há uma grande variabilidade para os valores de especificidade dentre os estudos com o teste rápido rK39, pois dependem do tipo de controle utilizado.

No geral, uma anamnese adequada e uma definição clínica ajudam a evitar falsos positivos. No entanto há uma necessidade de melhores testes para diagnóstico da LV, que sejam específicos na fase aguda. O ideal é que um teste imunocromatográfico rápido seja bastante sensível, já que trata-se de um teste de triagem, pois a LV é potencialmente fatal se não tratada. Também tem que ter boa especificidade, já que os tratamentos são tóxicos, não podendo, assim, fazer um tratamento preventivo. Os testes rápidos foram desenvolvidos especialmente para uso em campo em áreas endêmicas para LV. Se eles forem precisos, podem ser utilizados para o diagnóstico precoce. Um resultado positivo pode confirmar o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica e permitir o início do tratamento (WHO, 2010). Há um número limitado de testes rápidos comercialmente disponíveis para leishmaniose visceral humana, como o IT-LEISH® (DiaMed AG, Suíça - agora Biorad, França), CalazarDetect® (INBIOS International, EUA), Ab Teste Rápido (CTK Biotech, EUA), bem como uma série de protótipos, em diferentes formatos (Cunningham 2012).

2.5.3.4 ANTÍGENOS RECOMBINANTES

São proteínas produzidas artificialmente a partir de genes clonados, ou seja, a partir da técnica de DNA recombinante, a qual pode ser descrita de forma simples, como a transferência de um gene de um organismo para outro. Este processo envolve o isolamento de um gene de um organismo com potencial terapêutico ou diagnóstico e a introdução desse gene dentro de uma linhagem celular animal bacteriana ou de leveduras. Organismos procarióticos crescem rapidamente e atingem densidade relativa alta no meio de crescimento barato, são fáceis para transformar e podem produzir elevadas quantidades de produtos recombinantes solúveis (TERPE, 2006).

Sem a tecnologia de DNA recombinante, a maioria destas proteínas não existe em quantidades suficientes. Os sistemas recombinantes podem ser induzidos, sob condições controladas, a produzir em grandes quantidades, uma proteína altamente purificada para uso clínico. O sistema de expressão em *Escherichia coli* é normalmente o mais usado para a produção industrial de proteínas recombinantes para aplicações farmacêuticas (CANDEIAS, 1991).

Proteínas recombinantes de parasitas apresentam várias aplicações, como o desenvolvimento de métodos para diagnóstico, imunógenos para vacinação, análises de estrutura e função das proteínas de parasitas e triagem e perfil de drogas candidatas ao tratamento (FERNÁNDEZ-ROBLEDO *et al.*, 2010). Para o diagnóstico da leishmaniose

visceral existe em estudo uma variedade de proteínas produzidas de forma recombinante, as quais variam em sensibilidade e especificidade. Essas proteínas são derivadas de proteínas com diferentes funções na leishmaniose, como: proteínas relacionadas à cinesina, proteínas do choque térmico, enzimas e proteínas de função desconhecida.

As cinesinas são proteínas motoras envolvidas no transporte de organelas em células de eucariontes, bem como em mitose, meiose e no transporte das vesículas sinápticas nos axônios. Elas consistem de duas cadeias pesadas idênticas, com aproximadamente 60-70 KD. A cadeia pesada contém 3 domínios: um domínio motor globular N-terminal, que converte a energia química da hidrólise do ATP em energia mecânica ao longo dos microtúbulos em uma direção fixa, um domínio central de alfa-hélices em forma de bastão, que habilita a dimerização das duas cadeias pesadas e um domínio globular C-terminal, que interage com as cadeias leves e é possivelmente um receptor das organelas transportadas por essa proteína.

Já as proteínas chaperonas (proteínas de choque) são classificadas em famílias de acordo com os seus pesos moleculares. As proteínas dessa família são as proteínas imunogênicas mais abundantes presentes em organismos patogênicos. Uma das mais importantes famílias de chaperonas moleculares é a formada pelo sistema HSP70. Tal sistema está envolvido em uma série de importantes funções no metabolismo protéico intracelular envolvendo o enovelamento de proteínas (ALMEIDA, 2003).

Nas duas últimas décadas, tem ocorrido um esforço considerável para produzir antígenos recombinantes para serem utilizados no diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral humana e canina. Alguns desses antígenos foram selecionados e testados (K39, K9, K26, rGP63, pape 22). Entre esses antígenos, a proteína recombinante K39, obtida de um fragmento de cinesina da *Leishmania*, permitiu o desenvolvimento de testes que mostraram bom desempenho no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana na maioria das áreas com doenças endêmicas (CARVALHO, 2003).

Teixeira (2007) com o objetivo de aumentar o painel de antígenos recombinantes que poderiam ser úteis para o diagnóstico sorológico, rastreamento de uma biblioteca genômica e cDNA de amastigotas de *Leishmania infantum* através de soros de cães e de humanos infectados com leishmaniose visceral através do método de soros falso negativos. Assim, os soros que apresentaram resultados falso negativos foram novamente testados frente as proteínas recombinantes produzidas. Foram selecionados e patenteados doze antígenos recombinantes (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12 e Lci13) os quais poderão ser testados em vacinas, diagnóstico e terapia para leishmaniose.

Cinco destas proteínas (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4 e Lci5) foram avaliados por ELISA, todos mostraram resultados promissores para diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, com destaque para os dois primeiros antígenos. Esses dados mostraram uma possibilidade de utilização desses antígenos em um teste diagnóstico (OLIVEIRA *et al*, 2011). De Souza *e colaboradores* (2012) avaliaram através de ELISA as proteínas Lci1A e Lci2B em painel de soros de cães com leishmaniose, as quais apresentaram sensibilidade de 100% e 95% de especificidade com o antígeno Lci2B e sensibilidade de 96% e especificidade de 92% para o antígeno Lci1A.

Em um trabalho desenvolvido por Oliveira (2013), no qual, através do ensaio de MAPIA (*Multi Antigen Print ImmunoAssay*), que consiste em uma plataforma de triagem de antígenos em papel de nitrocelulose, para avaliação do reconhecimento dos 12 antígenos recombinantes (Lci1A, Lci2B, Lci3, Lci4, Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci10, Lci11, Lci12, Lci13) por soros caninos positivos para leishmaniose visceral. O estudo concluiu que dois conjuntos de 5 das doze proteínas analisadas, mostraram potencial para compor futuramente um teste imunodiagnóstico, especialmente um teste imunocromatográfico rápido para leishmaniose visceral canina. Com os dados obtidos nos trabalhos que vêm sendo feitos com esses antígenos (Lci1A e Lci2B), há uma tendência ao investimento desses antígenos em testes imunodiagnósticos.

Neste trabalho avaliamos três testes rápidos contendo os antígenos Lci1A e Lci2B em suas composições, a fim de se obter um novo teste imunocromatográfico rápido com potencial para aplicação no diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Analisar três testes imunocromatográficos rápidos, contendo os antígenos Lci1A e Lci2B para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

3.2 Objetivos Específicos:

- Estimar a sensibilidade e especificidade dos testes;
- Avaliar a reatividade cruzada dos testes;
- Estimar os valores preditivos dos testes;
- Estimar a área sob a curva ROC dos testes.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção das amostras e planejamento geral

O trabalho foi realizado entre abril de 2014 e janeiro de 2015, no Hospital Universitário de Sergipe, que é o local de referência para tratamento de leishmaniose visceral no estado. Foram utilizados:

- 79 soros de pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral, obtidos no Hospital Universitário de Sergipe (HU – SE);
- 10 soros de pacientes com diagnóstico de tuberculose, obtidos no HU - SE;
- 10 soros de pacientes com diagnóstico de doença de chagas, obtidos no Laboratório Central de Sergipe (LACEN – SE);
- 10 soros de pacientes com diagnóstico de esquistossomose, obtidos no HU-SE;
- 10 soros de pacientes com diagnóstico de mononucleose infecciosa, obtidos no LACEN - SE;
- 10 soros controle de banco de sangue, obtidos no Hemocentro de Sergipe (HEMOSE);
- 20 soros DTH positivos, obtidos no HU -SE ;
- 20 soros DTH negativos, obtidos no HU – SE.

Totalizando assim, 169 soros de diferentes pessoas utilizados, sendo 79 casos e 90 não - casos.

Os soros dos pacientes com leishmaniose visceral estavam armazenados em freezer - 80 no laboratório de biologia molecular (LBM) do hospital universitário de Sergipe (HU) e trata-se de pacientes registrados de 2010 à 2014, que tiveram o sangue coletado no momento que deram entrada no hospital com suspeita da doença, ou seja, antes de qualquer tratamento.

Todos os soros foram obtidos em coletas de sangue realizadas nos respectivos locais, quando o paciente deu entrada com suspeita da doença, ou no caso do HEMOSE, quando o doador fez a triagem para doar o sangue. O sangue foi obtido a partir de venopunção e foi acondicionado em tubo com acelerador de coagulação. Foram coletados os dados demográficos referentes a idade e sexo dos pacientes referentes a todos os soros utilizados.

4.1.1 Definição dos grupos com a patologia (casos)

Foram utilizados 79 soros de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral. Os critérios utilizados para esse diagnóstico foram:

- Clínica compatível (febre de longa duração associada à esplenomegalia e/ou hepatomegalia);
- Visualização direta do parasito por mielocultura e/ou rK39 positivo;
- Pancitopenia

A cultura do aspirado de medula óssea foi cultivada em 3mL de meio de cultura NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) com 1mL de Scheneider completo incubada a 24°C. A pesquisa de formas promastigotas do parasito foi realizada a cada três dias durante um mês, em lâmina-lâminula em microscópio.

4.1.2 Definição do grupo dos não-casos

Foram utilizados soros de pacientes confirmados com outras etiologias que podem dar reação cruzada com LVH e controles normais. As 90 amostras foram compostas por:

- 10 soros de pacientes com tuberculose (confirmados por investigação bacteriológica positiva em escarro). Esses soros estavam armazenados em freezer – 80°C no laboratório de biologia molecular do HU - SE;
- 10 soros de pacientes com esquistossomose, obtidos no HU-SE e confirmados por teste parasitológico;
- 10 soros de pacientes com mononucleose infecciosa, obtidos no Laboratório Central de Sergipe (LACEN) e confirmados através da presença de IgG e IgM pela técnica de imunoensaio por quimioluminescência;
- 10 soros de pacientes com doença de chagas obtidos do LACEN e confirmados por ELISA e RIFI;
- 10 soros controles normais obtido de doadores sadios do HEMOSE;
- 20 soros de controles negativos para leishmaniose visceral, comprovados por reação intradérmica de Montenegro (DTH -);
- 20 Pacientes assintomáticos, também comprovado por reação de Montenegro (DTH +).

Ao aplicar os testes neste grupo (não – casos), juntamente foi realizado o teste rápido rK39 em cada soro analisado. O “kit” utilizado foi o Kalazar Detect Rapid Test – InBiosInc – Seattle (WA-USA).

4.1.3 Testes imunocromatográficos rápidos

Foram utilizados três testes imunocromatográficos rápidos, cada teste possuía 200 kits. Os testes vieram isolados em embalagens individuais. Foram produzidos em Biomaninhos – Fiocruz (RJ) e testados no Hospital Universitário de Sergipe, no Laboratório de Biologia Molecular.

Um kit foi denominado teste 1 (Lci1), composto por um antígeno recombinante Lci1A. Outro kit denominado teste 2 (Lci 2), composto por um antígeno recombinante Lci2B. Por fim, um teste 3 (Lci1 + Lci2), formado pelo conjugado dos dois antígenos citados.

Os testes utilizados eram em forma de fluxo lateral, as quais são constituídas por membranas de nitrocelulose impregnadas com os antígenos correspondentes de cada teste. A técnica do teste foi feita seguindo o manual (anexo A) do teste fornecido pelo fabricante.

4.1.4 Material Fornecido

- Suportes (testes) contendo antígenos de *Leishmania* e o conjugado de ouro coloidal adsorvidos em membranas especiais;
- Tampão de corrida com frascos de 6mL específicos para cada teste;

4.1.5 Material complementar não fornecido

- Cronômetro ou relógio;
- Pipeta calibrada para 5µL;
- Luvas descartáveis;
- Álcool 70%;
- Recipiente seguro para descarte de material biológico;

4.1.6 Conservação e Estocagem do Material

- Os Testes foram armazenados entre 2 – 30°C;
- Os envelopes contendo os suportes de teste permaneceram lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida também ficou armazenado em um local com temperatura entre 10-20°C, em seu recipiente original (frasco conta-gotas).

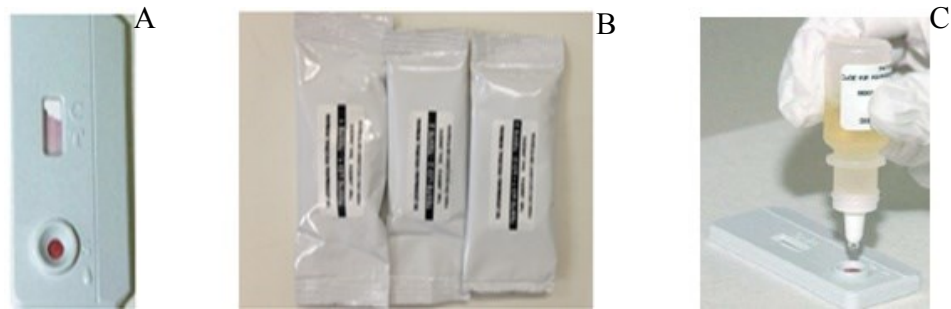


Figura 3. Kits cedidos pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Salvador, Bahia, Brasil)

4.1.7 Princípio do teste

O Teste imunocromatográfico emprega uma combinação de uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de *Leishmania* ligados a uma fase sólida (membrana). A amostra é aplicada ao respectivo poço (S), seguida pela adição de um tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral dos componentes liberados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Os anticorpos presentes (caso existam) se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal. No caso de uma amostra ser positiva o complexo “imuno-conjugado” migra na membrana de nitrocelulose, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do teste (T) e produzindo uma linha na tonalidade roxa/rosa. Na ausência de anticorpos, a linha na tonalidade roxa/rosa não aparece na área do teste. Em todos os casos, a amostra continua a migrar na membrana produzindo uma linha roxa/rosa na área de controle (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

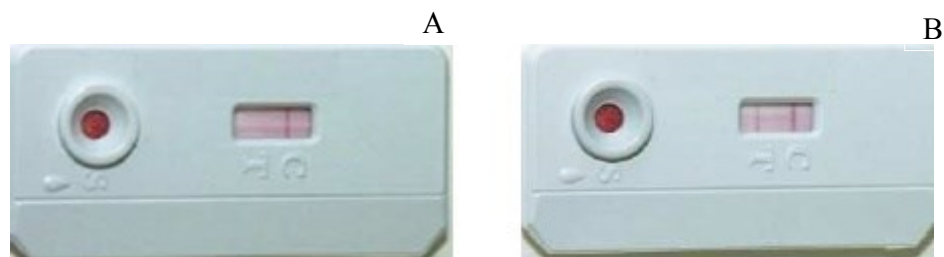


Figura 4. Testes indicando resultados válidos

4.1.8 Procedimento do teste

- Foi certificado que a amostra a ser testada estava à temperatura ambiente;
- O suporte de cada teste foi devidamente identificado;
- Foram pipetados 5 μ L da amostra no poço (S);
- Aplicou-se 3 gotas de tampão no suporte referente a cada teste, manteve-se o frasco do tampão sempre na posição vertical;
- Esperou-se a amostra migrar de 15 a 20 minutos à temperatura ambiente;
- Os resultados foram interpretados.

A leitura visual foi feita por dois pesquisadores diferentes, participantes desse estudo. O teste foi considerado positivo, quando foi possível visualizar as duas linhas (teste e controle) e negativo, quando somente a linha controle foi visualizada na membrana de nitrocelulose.

4.2 Análise dos resultados

Foram feitas análises quanto a sensibilidade, especificidade, valores preditivos e área sob a curva ROC. O banco de dados utilizados foi o Microsoft Office Excel, nos quais continham os dados demográficos referentes a sexo e idade dos pacientes e o resultado de cada teste. As análises dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia com respectivos valores de intervalo de confiança (IC95%) e a comparação entre os testes (teste de Wilcoxon) para análise de significância foram obtidas através do programa Winpepi versão 11.43 e a área sob a curva ROC foi feita através do programa SPSS versão 19.

5 RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo soros de 169 pessoas. Destes, 79 são de pacientes com diagnóstico confirmado por mielocultura e/ou teste imunocromatográfico rápido positivos para leishmaniose visceral (casos) e 90 soros de pessoas com outro diagnóstico e controles normais (não-casos). Também foram obtidos os dados demográficos para os grupos, segundo idade e sexo.

Tabela 1. Características demográficas para os grupos segundo idade e sexo

Grupos	Registros (n)	Idade (anos)*	Sexo feminino	
			(%)	Sexo masculino (%)
LVH	79	16,6± 16,9	36%	64%
Chagas	10	57,8± 14,6	40%	60%
Epstein barr	10	35,1± 19,2	60%	40%
Esquistossomose	10	14,7±10,0	10%	90%
Tuberculose	10	48,7± 26,3	60%	40%
Controles normais	10	32,± 5,5	40%	60%
DTH +	20	25,2± 12,3	55%	45%
DTH -	20	19,7± 15,4	55%	45%

* Idade em anos expressa como média e desvio padrão.

A tabela 1 ilustra as diversas condições clínicas, incluindo pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral, controles assintomáticos (DTH +), controles endêmico negativos (DTH -), controles normais e outras patologias que são mais comuns o aparecimento de reações cruzadas com a LV, segundo o número de pacientes, a média das idades e percentagem de cada gênero.

Os pacientes com diagnóstico de esquistossomose apresentaram uma menor média das idades e com alta frequência de sexo masculino, seguidos dos portadores de LV, também com uma média de idades baixas e com uma predominância do sexo masculino.

Os controles endêmicos positivos (DTH+) e negativos (DTH-) mostraram uma distribuição semelhante, segundo a frequência de masculino e feminino e com média das idades entre 19,7 – 25,2. Já os controles normais e os pacientes com mononucleose infecciosa apresentaram uma distribuição etária mais adulta, com média de idades de 32 à 35 anos, com

maior frequência de sexo masculino para os controles normais e maior frequência de sexo feminino para os pacientes com mononucleose infecciosa.

Os pacientes com doença de chagas e tuberculose foram os que apresentaram uma maior distribuição etária com uma frequência do sexo masculino maior para os pacientes com doença de chagas e uma maior frequência de sexo feminino para pacientes com tuberculose.

A tabela 2 ilustra a frequência de reações cruzadas nos testes, incluindo o rK39. As reações – cruzadas mais frequentes para os testes 2 e 3 ocorreram em soros de pacientes com mononucleose infecciosa e esquistossomose e também nos controles endêmicos DTH (+) e DTH (-). Vale salientar que o teste 1 apresentou uma maior frequência de reações cruzadas para todas as condições clínicas analisadas, enquanto o rK39 apresentou a melhor frequência de reação – cruzada, notadamente em apenas 1 paciente diagnosticado com mononucleose infecciosa. Foi possível observar que o teste 2 apresentou o melhor desempenho ($p < 0,001$) para a frequência do número de reações cruzadas em comparação com o teste 3.

Tabela 02. Análise de reação cruzada no grupo de não – casos para estimativa da especificidade dos testes

Não - casos	N	teste 1	teste 2	teste 3	rK 39
Doença de chagas	10	10 (100%)	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)
Mononucleose	10	9 (90%)	2 (20%)	3 (30%)	1 (10%)
Esquistossomose	10	10 (100%)	1 (10%)	2 (20%)	0 (0%)
Tuberculose	10	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Controle HEMOSE	10	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
DTH positivo	20	18 (90%)	2 (10%)	5 (25%)	0 (0%)
DTH negativo	20	18 (90%)	3 (15%)	3 (15%)	0 (0%)

A tabela 3 mostra a estimativa de sensibilidade e especificidade e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) para os testes 1, 2 e 3. O teste 2 foi o que apresentou melhor desempenho em termos de sensibilidade e especificidade, pois apresentou um melhor equilíbrio entre esses valores, em comparação com os testes 1 e 3. Os valores de sensibilidade e especificidade do teste 2 foram bem próximos ao valor exigido pelo Ministério da saúde para validação de teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico da LV, que é de no mínimo 90% tanto para sensibilidade quanto para especificidade.

O teste 1 apresentou melhor sensibilidade, porém com especificidade muito baixa e o teste 3 apresentou sensibilidade acima de 90%, porém deixou a desejar quanto a especificidade.

Tabela 03. Estimativa da sensibilidade e especificidade dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para diagnóstico da LV

Teste	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)
Teste 1	100% (95,4 – 100,0)	10,0% (5,4 – 17,9)
Teste 2	89,9% (81,3 – 94,8)	90,0% (82,0 – 94,7)
Teste 3	94,9% (87,7 – 98,0)	83,3% (74,3 – 89,6)

Na tabela 4 tem-se a estimativa da área sob a curva ROC dos testes, observa-se que para o teste 2 os valores de sensibilidade (89,9%) e especificidade (90,0%) já representam o valor ótimo indicado pela área sob a curva ROC para esse teste, que é de 89,9%. Já para o teste 3, esse valor ótimo será obtido quando o teste apresentar um equilíbrio entre os valores de sensibilidade e especificidade de 89,1. Para este teste alcançar esse valor será preciso perder em sensibilidade para aumentar sua especificidade. E o teste 1 alcança esse valor ótimo (55,0%) quando houver um equilíbrio entre os valores de sensibilidade e especificidade, para alcançá-lo esse teste precisará perder muito em sensibilidade a fim de aumentar sua especificidade e mesmo alcançando essa valor ótimo, o valor da área sob a curva ROC para esse teste é muito baixo. As curvas ROC descrevem a capacidade de um teste diagnóstico em definir diferentes valores de sensibilidade e especificidade para um determinado número de valores, nos quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade. O ponto numa curva ROC onde esses “valores ótimos” ocorrem, é o mais próximo ao canto superior esquerdo do diagrama. As curvas ROC também permitem quantificar a acurácia dos testes, já que esta é proporcional a área sob a curva ROC e também permitem fazer uma comparação entre os testes, pois quanto maior for a área, maior a exatidão do teste (figura 05).

Tabela 04. Estimativa da área sob a curva ROC dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para diagnóstico da LV

Teste	Área sob a curva ROC (IC95%)
Teste 1	55,0% (51,9 – 58,1)
Teste 2	89,9% (85,4 – 94,5)
Teste 3	89,1% (84,6 – 93,7)

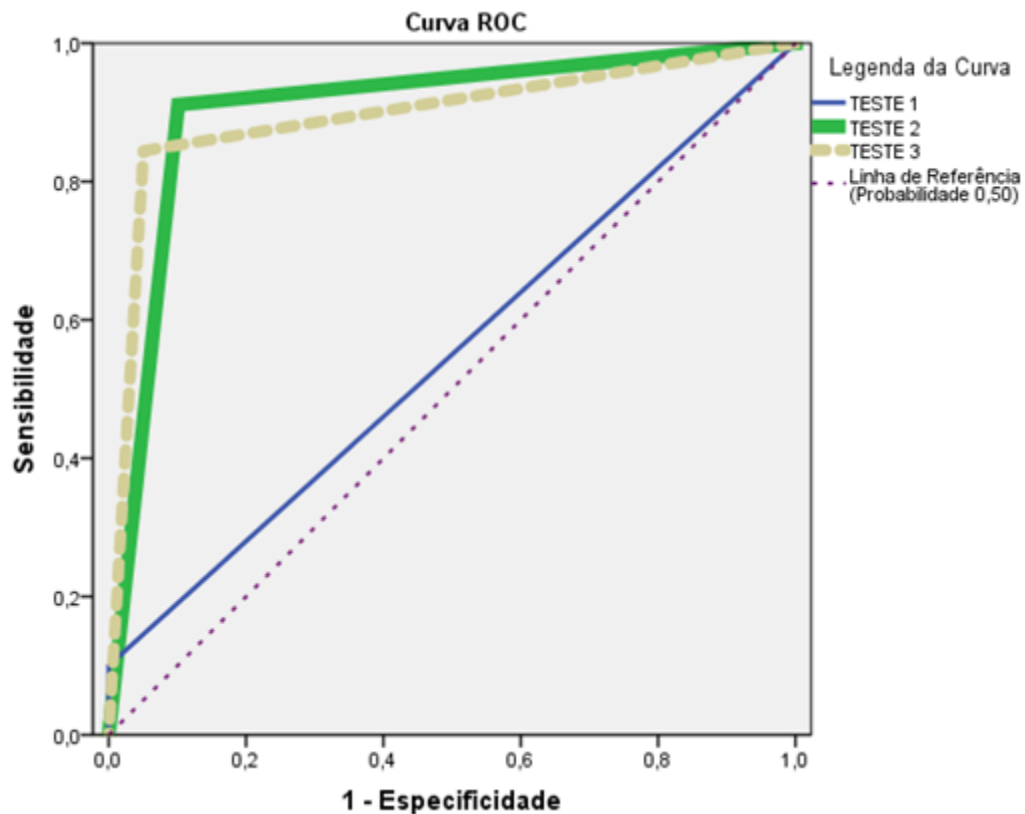


Figura 5. Área sob a curva ROC para cada teste

Na tabela 5 observa-se a estimativa dos valores preditivos positivos e negativos dos testes, com seus respectivos intervalos de confiança. O teste 2 apresentou o melhor desempenho em termos de valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, quando considerado o equilíbrio entre esses parâmetros. O teste 1 apresentou o pior desempenho, notadamente para o valor preditivo positivo e o teste 3 apresentou performance intermediária para esses parâmetros, quando analisado o equilíbrio entre eles. É importante ressaltar que esses valores estão condicionados ao valor da prevalência do estudo, que foi de 49,4%.

Tabela 05. Estimativa dos valores preditivos positivos e negativos dos testes, com respectivos intervalos de confiança de 95%, para o diagnóstico da LV *

Teste	Valor preditivo positivo (IC95%)	Valor preditivo negativo (95%)
Teste 1	49,4% (41,3 – 57,4)	100,0% (94,4 – 100,0)
Teste 2	88,8% (81,1 – 93,6)	91,0% (84,2 – 95,1)
Teste 3	83,3% (76,0 – 88,8)	94,9% (88,3 – 97,9)

*A prevalência para o estudo em questão foi de 49,7%.

Ao fazer uma análise geral das sensibilidades e especificidades dos testes (figura 6), observa-se que o teste 1 não deve ser usado como teste imunocromatográfico rápido em LVH, pois esse teste classificou, erroneamente, a maioria dos “não-casos” como doentes, ou seja, esse teste possui uma especificidade muito baixa. O teste 3, apesar de ter apresentado boa sensibilidade, deixou a desejar em relação a especificidade, provavelmente isso ocorreu devido a presença do antígeno recombinante Lci1A. Já o teste 2, foi o que apresentou melhor desempenho, pois apresentou valores em torno de 90%, para os dois parâmetros.

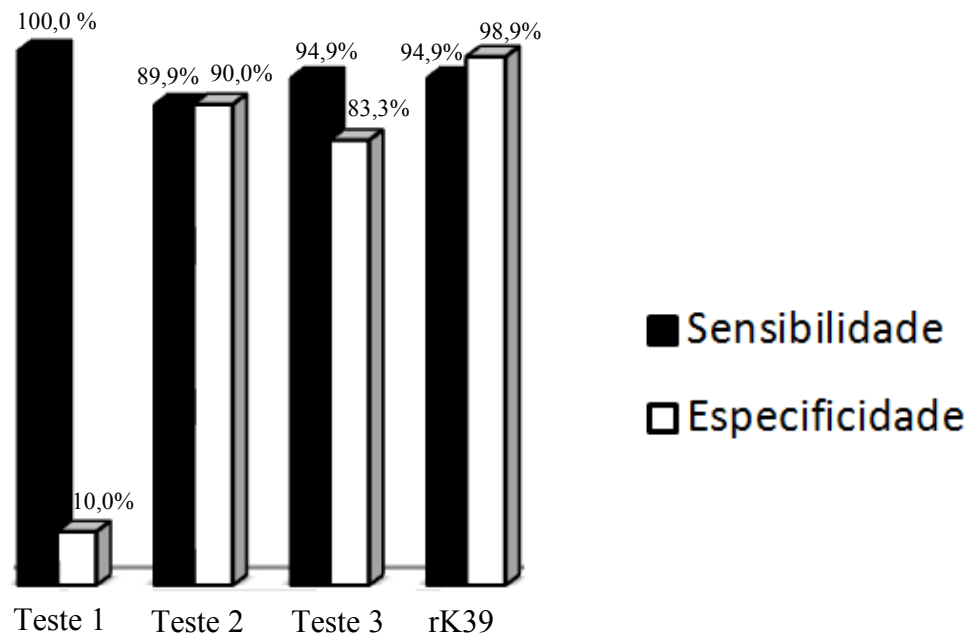


Figura 6. Análise geral das sensibilidades e especificidades dos testes

6 DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços tecnológicos, incluindo as técnicas laboratoriais em geral, o diagnóstico da leishmaniose visceral não tem avançado muito. Os testes parasitológicos ainda são o padrão-ouro para a doença, pois possuem 100% de especificidade, porém, dependem de procedimentos invasivos, laboratoristas experientes, dedicação e não apresentam sensibilidade ideal (MAIA, 2008).

Dentre os testes sorológicos aplicados em leishmaniose visceral humana, destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), pois é o método disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde. Apesar de demandar menos tempo que o parasitológico, necessita de microscópio de imunofluorescência e profissional treinado para sua execução, tornando o diagnóstico demorado e trabalhoso. Apesar de ser considerado padrão-ouro dentre os métodos sorológicos, a RIFI deixa a desejar, principalmente quanto a sensibilidade (GRADONI, 2002).

Há também outros métodos utilizados para diagnóstico da LVH, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o teste imunoenzimático ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay), porém essas técnicas ainda demandam tempo, equipamentos e pessoal treinado. Trabalhos mostram que a PCR possui excelentes sensibilidade e especificidade, mas por ser uma técnica muito cara, é disponibilizada apenas em centros de pesquisa. Já o ELISA possui sensibilidade e especificidade variáveis a depender dos antígenos utilizados (GOMES, 2008; SINGH, 2006).

Devido a essa complexidade diagnóstica e considerando que a leishmaniose visceral é uma doença fatal, se não tratada, a busca por métodos diagnósticos mais efetivos, que sejam de fácil execução, simples, acessíveis, menos invasivos e rápidos, capazes de diminuir o tempo para obtenção dos resultados têm sido cada vez mais necessários. Um destaque ocorreu com o desenvolvimento dos testes imunocromatográficos rápidos, com destaque, no caso da leishmaniose visceral humana, para o teste rápido com antígeno recombinante K39, cujas marcas comercializadas para uso como teste diagnóstico de triagem em LVH são It – Leish (DiaMed AG, Suíça – agora Biorad, França) e Calazar Detect (INBIOS International, EUA). Seria ideal se existisse um teste equivalente com produção nacional, com mesma qualidade, pois além da possibilidade de ter um teste com menor custo, teríamos uma alternativa, caso o atualmente utilizado não seja mais comercializado, por algum motivo.

O presente estudo avaliou o desempenho de três novos testes rápidos para o diagnóstico da LVH, dos quais o teste 1 é composto por uma proteína recombinante daproteína HSP70 (proteínas de choque térmico) de *Leishmania infantum*, cujo protótipo de clone selecionado foi o Lci1A. O teste 2 é composto por uma proteína recombinante da cinesina (proteína motora) de *L. infantum* e o protótipo de clone selecionado foi o Lci2B. Já o teste 3 é composto pelo conjugado dessas duas proteínas recombinantes. Esses testes foram avaliados em casos (soros de pacientes com diagnóstico confirmado para leishmaniose visceral) e não-casos (soros de controles normais e de outras patologias).

Na avaliação dos resultados obtidos, pode – se observar que os testes possuem ótima capacidade em identificar os verdadeiros positivos dentro do grupo de indivíduos verdadeiramente doentes (casos), ou seja, apresentaram boas sensibilidades, com destaque para o teste 1 que reagiu com anticorpos de todas as amostras dos casos, adquirindo uma sensibilidade de 100%. Quando as especificidades dos testes foram analisadas, o teste 1 alcançou a menor delas com apenas 10,0%, ou seja, este teste possui baixíssima capacidade em identificar os verdadeiros negativos no grupo de indivíduos verdadeiramente sem a doença (não – casos). Os testes 2 e 3 apresentaram boas especificidades, com destaque para o teste 2 que apresentou 90,0% contra 83,3% para o teste 3.

Dentre as patologias que costumam dar reação cruzada com a leishmaniose visceral, foram analisadas a doença de Chagas, que pode ocasionar reação cruzada devido ao agente causal dessa doença pertencer à mesma família (Trypanosomatidae) da leishmaniose e, portanto, compartilham vários antígenos que causam reação cruzada em diagnósticos sorológicos. A mononucleose, causada pelo vírus Epstein-barr que foi a patologia que mais causou reação cruzada entre os testes avaliados, isso provavelmente ocorreu devido a proliferação linfoide generalizada, não só pelo estímulo viral, como também pelo aparecimento de linfócitos TCD8+ citotóxicos, empenhados na destruição dos linfócitos B infectados, que essa doença causa, pois além disso, vírus determina a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e grande produção de anticorpos. A esquistossomose também costuma dar reação cruzada com a LV. E essa reação ocorreu, provavelmente devido aos múltiplos mecanismos que ocorrem nessa infecção devido ao tamanho e diversidade metabólica desses parasitas, que são antigenicamente complexos (MACHADO, 2004). A tuberculose, apesar de não ter uma relação com a leishmaniose, também é citada em alguns estudos como uma patologia em que ocorre essa reação cruzada. Foram escolhidos também controles normais, formados por doadores de sangue, os quais foram negativos para hepatites B e C, HIV, doença de Chagas, sífilis e HTLV, para evitar reações cruzadas e ter, assim, uma

análise dos testes para controles comprovadamente sadios. Foram também analisados pacientes assintomáticos (DTH+) para avaliar a capacidade dos testes em diferenciar os doentes de pessoas que tiveram contato com a *Leishmania*, mas não desenvolveram a doença. E controles normais (DTH-), com confirmação apenas que eram negativos para leishmaniose visceral.

Na análise da reação cruzada (tabela 03), foi possível observar que, o teste 1 reagiu com anticorpos da maioria das amostras, até mesmo dos controles normais de doadores de sangue. Essa baixa especificidade pode ter ocorrido devido esse teste ser composto por proteínas recombinantes da família das HSP70s, que são proteínas citoplasmáticas altamente conservadas em eucariontes e há uma semelhança de aproximadamente 70% entre as HSP70s de humanos e de *L. infantum*. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2011), o qual observou que a proteína recombinante Lci1A usada em ELISA reagiu fortemente com anticorpos da maioria dos cães naturalmente infectados com *leishmania* e também reagiu de forma cruzada com anticorpos de cães com outras doenças infecciosas em uma proporção considerável.

Em alguns trabalhos que testaram esses mesmos antígenos em leishmaniose visceral canina (LVC), foram obtidos resultados diferentes dos encontrados neste estudo com LVH. Foi observado que o antígeno recombinante Lci2B foi mais sensível e específico que o antígeno Lci1A. Oliveira (2013) fez a triagem desses antígenos em soros de cães utilizando MAPIA (Multi-Antigen Print Immunoassay) e o antígeno Lci2B apresentou sensibilidade de 74% e especificidade de 93%, já o antígeno Lci1A apresentou uma sensibilidade de 69% e especificidade de 90%. No trabalho de De Souza (2012) o antígeno recombinante Lci2B apresentou ligeira superioridade para os valores de sensibilidade e especificidade do antígeno Lci2B (100% e 95%) contra 96% e 92% para rLci1A.

Já no trabalho de Oliveira (2011) esses antígenos foram testados em ELISA, utilizando tanto soros de cães quanto soros de humanos. Na análise feita em soros de cães, os resultados obtidos se assemelham aos nossos, pois o antígeno Lci1A apresentou maior sensibilidade (93%) e menor especificidade (76,1%) quando comparado ao Lci2B, que obteve sensibilidade de 83% e especificidade de 84,8%. Em contrapartida, os valores obtidos em soros de humanos, foram diferentes dos nossos. Os valores de sensibilidade para o antígeno rLci2B foram maiores (97,2%) que os do antígeno rLci1A (72,2%) e os valores de especificidade foram elevados para os dois antígenos, 97,3% e 93,8%, respectivamente. Essas diferenças de sensibilidade e especificidade para os mesmos antígenos em diferentes populações podem ser explicadas devido a diferenças genéticas e imunológicas entre os indivíduos estudados e

também devido as patologias escolhidas para análise de reações cruzadas, além das diferentes técnicas diagnósticas utilizadas.

A sensibilidade e especificidade são características difíceis de conciliar, ou seja, é difícil aumentar essas variáveis ao mesmo tempo. Para encontrar a melhor relação entre esses parâmetros, utilizam-se as curvas ROC (Receiver Operator Characteristic curve). Os valores da área sob a curva ROC para os testes 2 e 3 foram 89,9% e 89,0% respectivamente. Como a sensibilidade e especificidade do teste 2 foram de aproximadamente 90%, esse teste já alcançou o valor ótimo indicado pela área sob a curva ROC, o qual, deixa esse teste dentro de um valor adequado para uso como teste diagnóstico. Já o teste 3 precisaria aumentar a especificidade para manter um equilíbrio com a sensibilidade e assim, adquirir um valor ótimo entre esses parâmetros.

As curvas ROC também permitem quantificar a acurácia de um teste diagnóstico, pois esta é proporcional à área sob a curva ROC, isto é, quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo no diagrama, maior a acurácia do teste. Então, a curva permite fazer uma comparação entre os testes, pois quanto maior a área sob a curva maior é a exatidão do teste. Observando as curvas ROC para cada teste (figura 05), percebe-se que a área sob a curva é semelhante para os testes 2 e 3. Com uma tendência a maior exatidão para o teste 2, pois os valores da sensibilidade (89,9%) e especificidade (90,0%) obtidos por esse teste já representam o valor ótimo entre esses parâmetros.

Os valores preditivos dos testes indicam a capacidade dos mesmos em prever a doença ou a ausência dela, a partir de seus resultados positivos e negativos, respectivamente. Ou seja, o teste 2 com um valor preditivo positivo (VPP) de 88,8% indica, que dos resultados positivos que esse teste obter, 88,8% serão indivíduos verdadeiramente doentes. Assim como, para o teste 3 a taxa de indivíduos verdadeiramente doentes obtidas quando esse teste for verdadeiro é de 83,3%. Já os valores preditivos negativos para os dois testes (2 e 3) foram acima de 90%, indicando assim, que uma vez que esses testes forem negativos, a proporção de indivíduos verdadeiramente não – doentes é de 91,0% e 94,9%, respectivamente.

Fazendo uma análise do teste 3 (conjugado dos dois antígenos) em nosso trabalho, observa-se que os resultados desse teste mantiveram um equilíbrio entre os resultados dos testes 1 (rLci1A) e do teste 2 (rLci2B), pois obteve sensibilidades maiores que as obtidas pelo teste 2, provavelmente devido a presença do antígeno recombinante Lci1A e especificidades melhores que as do teste 1, provavelmente devido a presença do antígeno recombinante Lci2B. A vantagem na combinação de antígenos em relação a um antígeno isolado é enfatizada em alguns trabalhos, Teixeira e colaboradores (2007) mostraram que antígenos

recombinantes utilizados conjuntamente podem levar ao aumento tanto da sensibilidade, quanto da especificidade de um teste diagnóstico. Isso pode ser explicado porque diferentes indivíduos, quando infectados por um mesmo parasito, podem produzir anticorpos distintos contra um mesmo conjunto de antígenos. Essa vantagem também foi enfatizada por Fraga (2014), Oliveira (2013) e Oliveira (2011). Entretanto, no nosso trabalho, essa sensibilidade um pouco maior do teste 3 em relação ao teste 2, deve ser analisada com cautela, pois, isso pode ter ocorrido apenas devido a presença do antígeno recombinante Lc1A que, como já foi comentado, é uma proteína recombinante de uma classe de proteínas altamente imunogênicas e bastante conservada durante a evolução.

Para um teste imunocromatográfico rápido ser validado para uso diagnóstico em LV, o Ministério da Saúde (MS) exige que tanto a sensibilidade quanto a especificidade sejam de, no mínimo, 90%. A péssima especificidade obtida pelo teste 1 neste trabalho, permite classificá-lo como um teste inviável para uso diagnóstico em questão. Já o teste 2 foi o que manteve melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, com valores bem próximos ao exigido pelo MS. Sendo, portanto o teste que apresentou melhor potencial para diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

7 CONCLUSÃO

O teste 2 (rLci2B) apresentou o melhor desempenho em função do equilíbrio dos valores de sensibilidade (89,9%) e especificidade (90,0%), pois obteve valores bem próximos aos exigidos pelo Ministério da Saúde para validação de testes imunocromatográficos rápidos para leishmaniose visceral. E também, foi o teste que apresentou menor frequência de reações cruzadas.

8 REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, M.C; VILHENA, V; BARRAL, A; BARRALNETO, M. Leishmania infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2003; 98:8670-1.
2. ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. **Plos.one**, v.7, n.5, p.e35671, 2012.
3. ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. *Et al.* *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Ver.** 10(2):298-319. 1997.
4. ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. *et al.* Leishmaniose and human immunodeficiency virus toxicité. **M. mal. Infect.** 35(1): 42-5. 2005.
5. ASHFORD, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** 30, 1269-1281. 2000.
6. BACELLAR, O.; CARVALHO, M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, 2005.
7. BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **P. Lo. S. Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.
8. BOELAERT, M.; CRIEL, B.; LEEUWENBURG, J.; DAMME VAN, W., LE RAY, D., *etal.* Visceral leishmaniasis control: A public health perspective. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. 465–471, 2000.

9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Brasília / DF, 2010.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2006.
11. BRITTO, C.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura Jr. Editor. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.195-23.
12. BURNS, JM;SCHREFFLER, WG;BENSON, DR, GHALIB, HW; BADARÓ, R; REED, SG. Molecular characterization of aKinesis-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **National Academy of Sciences of the United States of America**. 1993;90:775-779.
13. CAHIL, K.M. Field technique in the diagnosis of kalazar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.83:499.1970.
14. CANDEIAS, J. A. N. A Engenharia Genética.**Rev. Saúde Pública**. São Paulo, vol. 25, n. 1,Fev. 1991.
15. CARVALHO, S.F.; LEMOS, E.M.; COREY R; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**2003;68:321-324.
16. CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v. 50, p. 221-222,1936.
17. CHAPPUIS, F. *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **B.M.J.**, v. 333, n. 7571, p. 723, Oct 7 2006.

18. CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.5, n.11, p.873-82, Nov 2007. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938629>>. Acesso em: __ novembro de 2007.

19. CUPOLILLO, E. **Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil**. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. [online]. Brasília, Brasil, 2005. Disponível em: <bvs.panaftosa.org.br/textoc/LEANES_Inf_final_leish_2005.pdf>. Acesso em: 11 de agosto de 2006.

20. DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as transmission-blocking vaccine. **Vet. Parasitol.** 141, 1-8. 2006.

21. DE SOUZA, C. M. *et al.* Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2012.

22. DESJEUX, P. The Increase in Risk Factors for the Leishmaniasis Worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, p. 95239-43, 2001.

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

24. ELKHOURY, A.N.S.M. Informe final de la reunión de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. **PANAFTOSA**, Rio de Janeiro. p.24-26, 2006.

25. FAYET, G. Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, **Merial Biological Technical Bulletin**, 1999.

26. FEMANDEZ-ROBLEDO, J.A. and VASTA, G.R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, vol. 26, no. 5. 2010.
27. FERREIRA, S.A.; ITUASSU, L.T.; MELO, M.N.; ANDRADE, A.S. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257–263, 2008.
28. FRAGA, D. B. M.; Da SILVA, E. D.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; OLIVEIRA, I. Q.; COURA-VITAL, W.; MONTEIRO, G.R.; De SÁ OLIVEIRA, G. G.; JERÔNIMO, S. M. B.; BARBOSA, A.; VERAS, P. S. T. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen – based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, 7:136, 2014.
29. GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.
30. GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Ver. Bras. Epidemiol.** 7:338-49. 2004.
31. GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.** v.7, p.338-349, 2004.
32. Gradoni, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Intervet International bv, Sevilha, Spain, pp. 7-14. 2002.
33. GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELART, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and a proposed research and development agenda. **Lancet. Infect. Dis.** 2(8):494-501. 2002.

34. IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 32-38, 2006.
35. KAFETZIS, D.A. **Overview of pediatric leishmaniasis drugs**. 56(6):1009-18. 1998.
36. KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.** 21(2):123-52. 1995.
37. LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 210-5, Jan 2002.
38. LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: **M. Service, Demographic and Vector Borne Disease, CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 85-106, 1989.
39. LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: **M Service, Demographic and Vector Borne Disease, CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 85-106, 1989.
40. LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 321, p. 389-404, 1988.
41. LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 321, p. 389-404, 1988.
42. LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Leishmaniose Visceral: situação atual e perspectivas futuras. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**. Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública Fevereiro, 2006. Ano 3. Número 26. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lva.htm>. Acesso em: 22 de agosto de 2006.
43. MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

44. MACHADO DE ASSIS, T.S.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C.; COSTA, C.H.N. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Jun; 17(2): 105-116. 2008.
45. MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 20 2008.
46. MARTINS-MELO, F.R.; LIMA, M.S.; RAMOS, A.N.Jr.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. **Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns**, 2014.
47. MOHAPATRA, T.M.; SINGH, D.P.; RANJAN, M.S.; BHARTI, K. AND SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**; 4(2):114-117. 2010.
48. MOREIRA, M.; LUVIZOTTO, M.; GARCIA, J.; CORBETT, C.; LAURENTI, M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245–252, 2007.
49. MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala – azar): a decade of progress and future approaches. **Int. J. Infect. Dis.** 4: 158-77. 2000.
50. NUNES, C. M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; DE PAULA, H.B.; AZEVEDO, M. A.A.; LIMA, V.M.F.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
51. OLIVEIRA, G. G.; MAGALHAES, F. B.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; PINHEIRO, C.G.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, M. B.; BEDOR, C. N.; ALBUQUERQUE, A. L.; DOSSANTOS, W. L.; GOMES, Y. M.; MOREIRA, E. D.,

- JR.; BRITO, M. E.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; DE MELO NETO, O. P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. med. Hyg.**, v. 85, n.6, p. 1025-1034, Dec. 2011.
52. OLIVEIRA, I. Q. **Triagem dos antígenos recombinantes de *Leishmania Infantum* utilizando a técnica de multi-antígenos impressos (MAPIA) no desenvolvimento de imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina.** Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. 88. Dissertação, Curso de pós-graduação em biotecnologia em saúde e medicina investigativa. Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2013.
53. PRATA, A.; SILVA, L.A. Calazar. In: Coura Jr. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.713-737.
54. ROSÁRIO, E; GENARO, O; FRANÇA-SILVA, J; COSTA, R; MAYRINK, W; REIS, A; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 100, 197-203. 2005.
55. SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell** **529 Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001.
56. SAMPAIO, M. J. *et al.* Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **P. Lo. S. Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 11, p. e877, 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935 -2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985126>>. Acesso em: __ setembro de 2012.
57. SENGUPTA, P.C. Immunodiagnosis of Kalazar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 63:46. 1969.
58. SINAN. **Ministério de Saúde**
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf> Acesso em: 06 de outubro de 2011.

59. SOLANO-GALLEG0, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.
60. SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 1, p. 1-6, Jan 2011.
61. TÁVORA, M.P.; PEREIRA, M.A.; SILVA, V.L.; VITA, G.F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar Leishmaniasp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.40 no.4 Uberaba July/Aug. 2007.
62. TEIXEIRA, M. C. *et al.* A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51-4, Mar 2007.
63. TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72, 211-222. 2006.
64. TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis. **In Practice**, v. 25, n. 4, p. 190-197, 2003.
65. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO, **Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. p. 202, 2010.
66. WHO. **The World Health Report** [online] Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf> (WHO, Geneva, Switzerland, 2002). Acesso em: __ dezembro de 2011.

67. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, Switzerland: WHO, 2010.
68. ZANETTE, M.F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação de mestrado]**. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária da Unesp; 2006.
69. ZIJLSTRA, E.E.; DAIFALLA, N.S.; KAGER, P.A.; KHALIL, E.A.; EL-HASSAN, A.M.; REED, S.G.; GHALIB, H.W. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** Sep; 5(5):717-20. 1998.

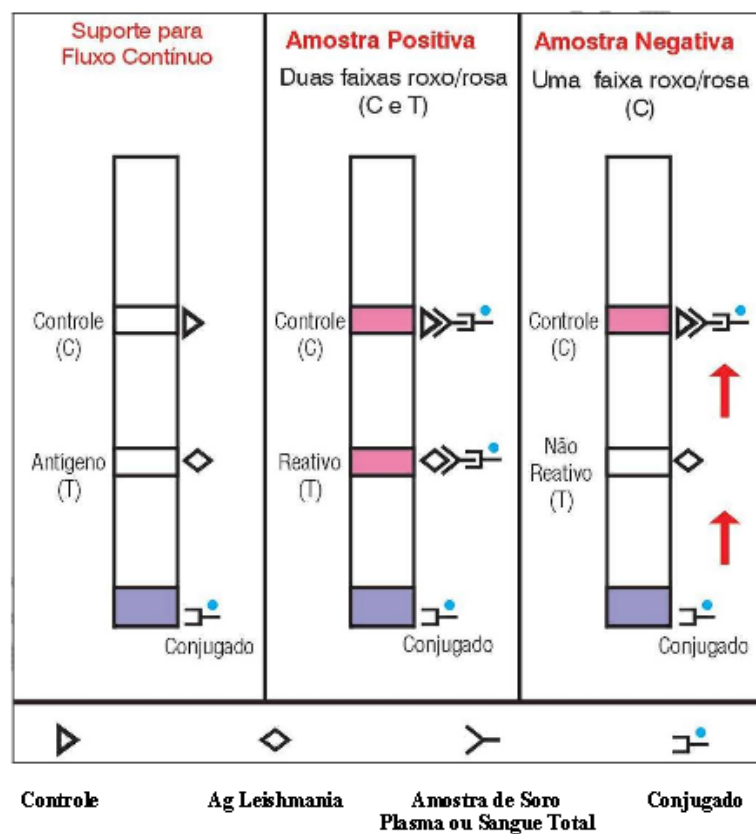
ANEXO A

Teste Imunocromatográfico para Leishmania

Princípio do Teste:

O Teste imunocromatográfico emprega uma combinação de uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de *Leishmania* ligados a uma fase sólida (membrana). A AMOSTRA é aplicada ao respectivo poço (S), seguida pela adição de um tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral dos componentes liberados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Os anticorpos presentes (caso existam) se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal. No caso de uma amostra ser positiva o complexo “imuno-conjugado” migra na membrana de nitrocelulose, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do TESTE (T) e produzindo uma linha roxa/rosa. Na ausência de anticorpos, a linha roxa/rosa não aparece na área do teste. Em todos os casos, a amostra continua a migrar na membrana produzindo uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

Esquema do teste:



Material Fornecido

- Suportes contendo antígenos de *Leishmania* e o conjugado de ouro coloidal adsorvidos em membranas especiais;
- Tampão de Corrida frs. 6 mL;

Material Complementar Não Fornecido

- Cronômetro ou relógio;
- Micro-pipetador calibrado para 5µL (como alternativa à alça coletora);
- Luvas descartáveis;
- Álcool 70%;
- Recipiente seguro para descarte de material biológico.

Conservação e Estocagem do Material:

-Os Testes devem ser mantido/armazenado entre 2 e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente seja inferior 2°C ou ultrapasse 30°C. Não congele o kit ou seus componentes. Os envelopes contendo os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida também deve ser mantido entre 8 e 30°C, em seu recipiente original (frasco conta-gotas).

Procedimento do Teste:

1. Certificar-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra esteja refrigerada ou congelada, permitir que esta alcance a temperatura ambiente antes de ser testada;
2. Identifique o suporte do teste com o nome do indivíduo ou seu número de registro;
3. Pipete 5µL da amostra no poço (S);
4. Aplicar 3 gotas de tampão no suporte de teste. Manter o frasco na posição vertical para garantir que o volume adequado de tampão seja aplicado ao suporte como mostrado na figura abaixo.



5. Deixar a amostra migrar de 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 minutos, descartar o teste.



6. Ler os resultados do teste ao final da migração da amostra (15 a 20 minutos após a adição do tampão no poço S). Em seguida, descartar o suporte em um recipiente apropriado para materiais de risco biológico.

Leitura e Interpretação:

Resultados Não Reagentes

-Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C), e nenhuma linha na área de TESTE (T). Um resultado não reagente em 10 minutos indica a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra.



Resultados Reagentes

-A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T) indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escura conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste.

Nota: mesmo uma linha muito clara na área de TESTE (T) deve ser considerada um resultado reagente.



Resultados Inválidos

-Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), não importando se a LINHA TESTE (T) aparece ou não na área devida. Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE(C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido ou não pode ser interpretado. Descartar o material e repetir o procedimento com novo suporte de teste e nova amostra.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE:

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO:

- Teste Rápido para *Leishmania* deve ser utilizado apenas com amostras de sangue total, soro ou plasma. Outros tipos de amostra ou amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados.
- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização;
- No caso de um resultado reagente, a intensidade da linha de teste não está - necessariamente - relacionada ao título de anticorpos na amostra.