

Avaliação do Teste Rápido Utilizando o Antígeno Recombinante k39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral no Brasil

Elenice Moreira Lemos, Silvio F. Guimarães Carvalho, Ralph Corey and Reynaldo Dietze

RESUMO

Este estudo avaliou o desempenho teste rápido de imunocromatografia utilizando o antígeno rK39 (Kalazar Detect® InBios International, Seattle, WA, USA) e um teste de ELISA utilizando antígeno total, para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) em 128 pacientes com diagnóstico parasitológico da doença. Como controle foram incluídos soros de 10 indivíduos saudáveis e de 50 pacientes portadores de outras infecções como: malária (10), hanseníase (9), doença de Chagas (10), tuberculose (10) e leishmaniose cutânea (11). A sensibilidade do teste rápido com antígeno rK39 e ELISA foram 90% e 89% respectivamente, enquanto a especificidade foi 100% e 98% respectivamente. Nossos dados portanto, confirmam a eficiência do teste rápido com rK39 no diagnóstico da LV.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose compreende um grupo de infecções da pele, mucosa e vísceras, causada por um protozoário intracelular e transmitida por flebotomíneos. A leishmaniose visceral (LV, calazar) é mundialmente distribuída afetando cerca de meio milhão de crianças e adultos.¹ Apresentando-se com febre, perda de peso gradual, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, esta doença é fatal se não diagnosticada e tratada.² Portanto, um método simples de diagnóstico é essencial. De mesma importância é a validade do diagnóstico, uma vez que, a terapia anti-leishmania frequentemente resulta em significativa mortalidade e morbidade.³

O diagnóstico definitivo da LV requer demonstração do parasita em esfregaços ou cultura de tecido, principalmente de medula óssea ou baço. Entretanto, esses procedimentos são invasivos necessitando de pessoal especializado para prevenir a dor e hemorragia. Além disso, a sensibilidade destes testes é baixa, variando entre 70% para os aspirados de medula óssea a 90% para aspirados de baço.⁴

Muito esforço tem sido feito no sentido de desenvolver testes menos invasivos para o diagnóstico da LV.⁵⁻⁸ O teste de fixação de complemento, o teste de imunofluorescência indireta, o ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) e os testes baseados em PCR para amplificação de DNA de leishmania são alguns dos

exemplos destes esforços. Infelizmente, todos estes testes apresentam um dos dois inconvenientes: significativa reatividade cruzada e dificuldade para ser realizado em laboratório com poucos recursos.

Uma recente descoberta, tem sido a identificação do antígeno K39 de leishmania, membro da família das kinesinas. A detecção de anticorpos IgG anti-K39 tem se mostrado bastante sensível e específica para VL. A clonagem do antígeno K39 tem resultado na produção do antígeno recombinante K39 (rK39), o qual foi adsorvido em fitas de nitrocelulose para serem usadas no diagnóstico de leishmaniose visceral. Neste estudo nós comparamos os resultados do rK39 (Kalazar Detect) com ELISA usando antígeno solúvel total do parasita, em 128 pacientes portadores de LV residentes nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

MATERIAIS AND MÉTODOS

Pacientes. As amostras de soro foram coletadas de 128 pacientes com aspirado de medula óssea positivo para amastigotas. Os pacientes foram avaliados no Hospital Universitário de Montes Claros, Minas Gerais e em Vitória, Espírito Santo. Todos os pacientes foram submetidos a exame físico completo e obtida a história clínica dos mesmos. Como controle foram utilizadas amostras de soro de 60 pacientes portadores de malária (10), lepra (9), Doença de Chagas (10), tuberculose (10), leishmaniose cutânea (11) e de 10 indivíduos saudáveis. O consentimento para a realização do estudo foi obtido através do Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo e da Universidade Estadual de Montes Claros. Consentimento para a participação no estudo foi obtido de todos os pacientes, parentes ou representante legal.

Teste imunocromatográfico Kalazar Detect. O Kalazar Detect é um teste rápido de imunocromatografia fabricado pela InBios International, Seattle, WA, USA, destinado a determinação qualitativa de anticorpos no soro, contra o antígeno recombinante K39 *L. (L.) chagasi*. Vinte microlitros de soro foram adicionados à parte inferior do fita e incubados durante 10 minutos em um tubo contendo 2 gotas de tampão de corrida. De acordo com as instruções do fabricante, o teste é considerado positivo quando duas bandas, uma controle e uma do teste aparecem após 10 minutos de incubação. O teste é considerado negativo se apenas a banda do controle aparecer.

ELISA. *Leishmania chagasi* (MHON/BR/74/PP75) foi cultivada em meio Schneider suplementado com 25% de soro fetal bovino a 26°C. As promastigotas foram coletadas por centrifugação, lavada 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS) e lisada por congelamento e descongelamento. A suspensão de parasitas foi homogeneizada usando um triturador de tecidos em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 10,000 g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado como antígeno solúvel total. O conteúdo de proteína foi estimado através do método de Bradford.¹⁰

Brevemente, placas Immulon # 4 (Dynatech, Chantilly, VA, USA) foram sensibilizadas com 2 mg de antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* por poço e incubado a 4°C. As placas foram aspiradas, bloqueadas com PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T) e 2% de leite Molico desnatado durante 1 h at 37°C e lavadas 4 vezes com PBS-T. Soro diluído 1/200 em PBS-T contendo 1% de leite Molico desnatado foi adicionado em cada poço e incubado durante 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas 4 vezes e os anticorpos ligados foram detectados usando anti-IgG marcado com peroxidase, diluído 1/5000 (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). Após incubação durante 45 minutos a 37°C as placas foram lavadas novamente e incubadas com 0.005 g de O-fenilenediamino (OPD) e 3 ul de H₂O₂ em tampão citrato, durante 15 minutos. A densidade ótica foi lida a 492 nm. Soros controles positivos e negativos foram avaliados em cada placa para padronizar as leituras e variações das placas. O ponto de corte entre as leituras dos pacientes positivos e negativos foi calculado através da média das densidades óticas dos negativos mais 3 desvios padrões.

RESULTADOS

Soros de 128 pacientes com IV confirmada por exame parasitológico, foram testados com o teste rápido de imunocromatografia Kalazar Detect e ELISA. Dos 128 pacientes, 123 também apresentaram culturas positivas, cujos parasitas foram identificados como *L. (L.) chagasi* através da análise de isoenzimas e anticorpos monoclonais. Como controle foram avaliados soros de 60 indivíduos (10 indivíduos saudáveis e 50 pacientes com outras doenças endêmicas que não IV). A idade dos pacientes variou entre 2 meses a 48 anos e o tempo de doença antes do diagnóstico variou entre 6 e 365 dias.

A sensibilidade do teste rápido com o rK39 e ELISA foram 90% e 89% respectivamente, enquanto a especificidade foi 100% e 98% respectivamente (Tabela 1).

Dos 13 pacientes com IV que apresentaram resultados negativos no teste com rK39, o tempo de doença variou entre 14 a 300 dias (média 86.5/mediana 30); os níveis de gamaglobulina variou entre 1.0 a 4.8 mg/dl (média 2.3/mediana 2.2) e 31% (4/13) também apresentaram teste de ELISA negativo.

O seguimento dos pacientes durante 12 meses após o tratamento revelou 100% de cura em todos os pacientes. O teste com rK39 foi desenvolvido em uma amostra de 30 pacientes, antes, 2 meses e 6 meses após o tratamento. Dos 30 pacientes estudados, 19 mantiveram o teste positivo (63%)

Tabela 1 - Desempenho do rK39 e ELISA no diagnóstico da IV causada pela *L. (L.) chagasi*.

	IV positivos (n=128)	Saudáveis (n=10)	*Outras infecções (n=50)	*Sen/specif %
Teste rK39				
Positivo	115	0	0	90/100
Negativo	13	10	50	
ELISA				
Positivo	114	0	1	89/98
Negativo	14	10	49	

* malária (10), hanseníase (9), doença de Chagas (10), tuberculose (10), leishmaniose cutânea (11)

*Sen = sensibilidade e especificidade = especificidade

2 meses após o tratamento e 14 (46%) ainda eram positivos 6 meses após o tratamento. Não foi possível avaliar soros de 12 meses de seguimento.

DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam a utilidade do teste rápido com o rK39 no diagnóstico da IV. Com uma especificidade de 100% para pacientes com leishmaniose visceral, este diagnóstico simples pode substituir métodos diagnósticos mais invasivos para a avaliação inicial de pacientes com suspeita de IV. Infelizmente, pacientes com resultados negativos para o teste rápido ainda representam uma fração significativa da IV (10%).

Comparando nossos resultados com os achados de 5 estudos prévios, foi verificada uma grande variação entre eles. A sensibilidade do teste com o rK39 variou entre 67% a 100%. A mais alta sensibilidade (100%) ocorreu em pacientes da Índia and Nepal.⁹⁻¹¹ Pacientes da Venezuela tiveram menor porcentagem de resultados verdadeiros positivos (88%), e o teste com o rK39 foi menos sensíveis em pacientes do Sudão e outras áreas.¹²⁻¹⁴ A Tabela 2 resume os dados da literatura usando soro ou sangue total como amostra para o teste rápido.

Tabela 2 - Desempenho do antígeno rK39 no diagnóstico da IV. Resumo dos dados publicados utilizando soro ou sangue total como amostra.

Região	Total de Pacientes	IV	rK39 positivos	Sens	Spec
Nepal ¹¹	127	14	14	100%	100%
Sudão ¹³	116	55	37	67%	98%
Venezuela ¹²	117	41	36	88%	100%
Vários* ¹⁴	96	14	10	71%	100%
Índia# ⁹	348	127	12	100%	98%
Estudo atual	188	128	115	90%	100%

* Países do Mediterrâneo e Índia.

Sangue total ao invés de soro foi utilizado neste estudo.

Há várias hipóteses que poderiam contribuir na explicação desta variação geográfica do teste rápido. Primeiro, poderá existir diferenças entre sub-espécies do complexo *Leishmania donovani*, resultando na variação do antígeno rK39 ou diferenças genéticas individuais entre os pacientes ou entre sub-grupos raciais.

Finalmente, outros fatores capazes de afetar o nível de resposta do hospedeiro poderiam explicar as diferenças

regionais. Zijlstra *et al* mostraram que pacientes com teste positivos para rK39 tinham significativamente maior nível de anticorpos IgG anti-rK39 determinado pelo teste de ELISA do que pacientes com testes negativos ($p < 0.0001$).⁸ Isto poderia ser devido a fatores epidemiológicos tais como, a duração e severidade da doença. Entretanto, em nosso estudo não houve diferença no tempo de duração entre os 13 pacientes com resultados negativo e os 115 com resultados positivos. Em nenhum dos 6 estudos houve quantificação da severidade da doença ou grau de desnutrição.

Embora tenha ocorrido variações na sensibilidade de região para região, o teste rápido com rK39 apresentou alta especificidade. Na verdade, dos 379 pacientes com LV dos 6 estudos, apenas 6 pacientes com teste rK39 positivo não apresentaram confirmação diagnóstica e todos os 6 podem ter tido doença ativa ou assintomática.

Avaliando a utilização do teste rápido rK39 em pacientes que completaram o tratamento, nós observamos que um número significativo permaneceu positivo (46%) até 6 meses após o tratamento. Estes resultados foram semelhantes aos dados obtidos por Zijlstra que avaliou os pacientes durante 12 meses e não encontrou queda significativa na positividade do teste.⁸ Ao contrário, os títulos de ELISA com o antígeno rK39 tenderam a seguir o curso clínico que os pacientes apresentaram durante e após tratamento para LV.

Para avaliar a validade do teste com o antígeno rK39 na população em estudo, foi também avaliada a validade do teste ELISA nos mesmos 188 pacientes. A sensibilidade e especificidade da ELISA foi semelhante a do teste rK39, sendo 89% e 98% respectivamente. Devido ao fato de 13 pacientes com resultados negativos para rK39 apresentarem ELISA positiva, a combinação dos dois testes aumentou a sensibilidade média para 96%, acompanhada de uma leve variação na especificidade (98%).

Em conclusão, o presente estudo confirma a validade do teste rápido com o antígeno rK39 para o diagnóstico de pacientes apresentando LV, HIV negativos em uma população com alta prevalência da doença. Mais estudos são necessárias para confirmar os valores preditivos negativos e positivos em populações mais relevantes. Somente após estes estudos, será possível aplicar estes testes com confiabilidade.

REFERÊNCIAS

1. Desjeux P, 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 14(5):417-423
2. Pearson RD, de Queiroz SA, 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 22: 1-13.
3. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW, 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India. Report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31(4): 1104-1107.
4. Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Gjalib HW, Kager PA, 1992. Kala-zar: A comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 505-507.
5. Scott JM, Shreffler WG, Ghalib HW, Asad A, Siddig M, Badaro R, Reed SG, 1991. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 44: 272-277.
6. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 32: 746-749.
7. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David, JR, Reed SG, 1996. A cloned antigen of *L. chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis (VL). *J Infect Dis* 173: 758-761.
8. Zijlstra E, Daifalla N, Kager P, Khalil E, El-Hassan, Reed S, Ghalib H, 1998. K39 Enzyme-Linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 5 (2): 717-720.
9. Sundar S, Reed S, Singh V, Kumar P, Murray H. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, Vol 351, Feb 21, 1998.
10. S. Sundar, K. Pai, M Sahu, V. Kumar and H. W. Murray, 2002. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96 (1): 19-23.
11. Bern C, Nathjha S, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB, 2000. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a stting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 63 (2): 153-157.
12. Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J, 2001. Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8 (4): 355-357.
13. Zijlstra E, Nur Y, Desjeux P, Khalil E, El-Hassan A, Groen J, 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 6(2): 108-113.
14. Jelinek T, Eichenlaub S, Loshner T, 1999. Sensitivity and Specificity of a Rapid Immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect Dis* 18: 669-670.