



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LUCAS PORTELA SILVA

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA ESTIMAR A PREVALÊNCIA DE  
INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *LEISHMANIA INFANTUM* EM DOADORES DE  
SANGUE**

Recife

2022

LUCAS PORTELA SILVA

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA ESTIMAR A PREVALÊNCIA DE  
INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *LEISHMANIA INFANTUM* EM DOADORES DE  
SANGUE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica.

**Área de concentração:** Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

**Orientadora:** Dra. Valéria Pereira Hernandes (IAM/FIOCRUZ/PE)

**Coorientador:** Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior (IAM/FIOCRUZ/PE)

**Coorientadora:** Dra. Elis Dionisio da Silva (IAM/FIOCRUZ/PE)

Recife

2022

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Lucas Portela

Avaliação de testes sorológicos para estimar a prevalência de infecção assintomática por *Leishmania infantum* em doadores de sangue / Lucas Portela Silva. – 2022.

87 f. : il.

Orientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandes.

Coorientador: Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior.

Coorientadora: Dra. Elis Dionisio da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Leishmaniose*. 2. Doenças parasitárias. 3. Doadores de sangue. I. Hernandes, Valéria Pereira (orientadora). II. Lima Júnior, Manoel Sebastião da Costa (coorientador). III. Silva, Elis Dionisio da (coorientadora). IV. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-190

LUCAS PORTELA SILVA

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA ESTIMAR A PREVALÊNCIA DE  
INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR *LEISHMANIA INFANTUM* EM DOADORES DE  
SANGUE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Aprovado em: 18 / 08 / 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Pereira Hernandes  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Walter Lins Barbosa Junior  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz-PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kamila Gaudêncio da Silva Sales  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN

---

Prof. Dr. Policarpo Ademar Sales Junior  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz-PE

Dedico essa obra a mim mesmo.

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda sabedoria, discernimento e tolerância a mim concedido para iniciar, desenvolver e finalizar esse doutorado.

Aos meus pais, que me deram todo um apoio familiar desde o meu nascimento.

A meu irmão e a minha “queridinha” cunhada/prima que me deram duas sobrinhas maravilhosas.

Aos meus avós, que vão ter o prestígio, em vida, de ter o primeiro neto da com o título de doutor.

A minha eterna Mari (*in memoriam*) que vibrou sempre com as minhas conquistas.

A todos os meus tios e tias, em especial a Tio João e Tia Myrtes, que estão sempre dispostos a ajudar.

Ao meu maravilhoso e melhor amigo Carlos, que está sempre me apoiando, alguém que sempre poderei contar. Meu endereço em SSA.

A minhas amigas/amigos e melhores professoras e professores do mundo (Tarcila, Polly, Jessica, Diego, Sidrack, Marcus). Sem vocês meu doutorado não seria tão leve.

A meus “chernos”, Allana, Martom, Elis, Catarina, Larissa, Vanessa, amigos que estavam sempre prontos para escutar meus desabafos.

Ao professor, blogueiro e amigo maravilhoso Pablo, sempre proporcionando os melhores diálogos, rolês e amizades.

Aos meus orientadores Valeria, Manoel e Elis. Sempre dispostos a desenvolver o melhor da minha pesquisa.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda infraestrutura cedida para realização do trabalho e a UFPE por proporcionar um ensino público, gratuito e de qualidade.

A todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram para esse trabalho acontecer. Muito obrigado.

## RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A forma visceral da doença tem como a principal espécie a *Leishmania infantum*, responsável pelo comprometimento dos órgãos internos, podendo apresentar-se na forma assintomática, o que é preocupante, visto que esses assintomáticos podem atuar como reservatórios do parasito e, em uma eventual transfusão sanguínea, podem contribuir para na transmissão. Diante disso, faz-se necessária a triagem laboratorial para a detecção da *Leishmania infantum* em bancos de sangue para garantir a segurança no processo de doação, principalmente em regiões endêmicas. Portanto, este estudo teve como objetivo estimar a soroprevalência da infecção assintomática por *L. infantum* em doadores de sangue, por meio de diferentes técnicas sorológicas. Selecionamos as amostras da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), localizada em Recife, região nordeste do Brasil. No total, 495 amostras de soro foram avaliadas pelos testes ELISA, utilizando o extrato solúvel de *L. infantum* e os antígenos recombinantes Q5, Lci2 e rK39. A soroprevalência foi de 30,69% (ELISA com antígeno solúvel de *L. infantum*), 23,43% (ELISA - Q5), 5,65% (ELISA-Lci2) e no ELISA- rK39, não ocorreu positividade. Na avaliação das técnicas sorológicas para a identificação de assintomáticos, com amostras triadas pela qPCR foi obtida uma positividade de 22,6% (CF- Citometria de Fluxo), 9,7% (DAT - Direct Agglutination Test), 22,6% (ELISA- Antígeno solúvel *L.infantum*), 12,7% (ELISA-Q5), 0% (ELISA-rK39) e 6,4% (ELISA-Lci2). Diante dos resultados, pode-se concluir que para a triagem de indivíduos assintomáticos para LV é necessária uma associação entre técnicas sorológicas convencionais e antígenos recombinantes. Reforçamos ser preocupante a presença da infecção assintomática em doadores de sangue nos bancos de sangue.

**Palavras-chave:** *Leishmania spp*; Doadores de sangue; ELISA; Leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The visceral form of the disease has *Leishmania infantum* as its main species, which is responsible for the involvement of internal organs and may present itself in the asymptomatic form, which is worrisome, since these asymptomatic patients may act as reservoirs of the parasite and, in an eventual blood transfusion, may contribute to the transmission. Therefore, laboratory screening for *Leishmania infantum* in blood banks is necessary to ensure safety in the donation process, especially in endemic regions. Therefore, this study aimed to estimate the seroprevalence of asymptomatic *L. infantum* infection in blood donors using different serological techniques. We selected samples from the Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), located in Recife, northeastern region of Brazil. In total, 495 serum samples were evaluated by ELISA tests using the soluble extract of *L. infantum* and the recombinant antigens Q5, Lci2 and rK39. The seroprevalence was 30.69% (ELISA with soluble *L. infantum* antigen), 23.43% (ELISA - Q5), 5.65% (ELISA-Lci2) and in the rK39 ELISA, there was no positivity. In the evaluation of serological techniques for the identification of asymptomatic patients, with samples screened by qPCR, a positivity of 22.6% (FC-Flow Cytometry), 9.7% (DAT-Direct Agglutination Test), 22.6% (ELISA-*L. infantum* soluble antigen), 12.7% (ELISA-Q5), 0% (ELISA-rK39) and 6.4% (ELISA-Lci2) was obtained. In view of the results, we can conclude that for the screening of asymptomatic individuals for VL an association between conventional serological techniques and recombinant antigens is necessary. We reinforce that the presence of asymptomatic infection in blood donors in blood banks is worrisome.

**Key words:** *Leishmania spp*; Blood donors; ELISA; Visceral leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da distribuição da leishmaniose visceral no mundo no ano de 2018.....	20
Figura 2 - Representação do ciclo de vida da leishmaniose.....	23
Figura 3 - Fluxograma das amostras submetidas aos testes sorológicos.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Soroprevalência por ELISA convencional utilizando antígeno solúvel e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana .....	45
Gráfico 2 – Soroprevalência por ELISA recombinante utilizando o antígeno Q5 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana (LTA).....	46
Gráfico 3 – Soroprevalência por ELISA recombinante utilizando o antígeno rk39 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana (LTA).....	47
Gráfico 4 – Soroprevalência por ELISA utilizando o antígeno Lci2 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana (LTA).....	48
Gráfico 5 – Padronização da diluição do soro para o ensaio da citometria de fluxo.....	49
Gráfico 6 – Curva ROC.....	49
Gráfico 7– Reatividade das amostras na CF.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos que identificaram assintomáticos infectados com <i>L. infantum</i> nos bancos de sangue do Brasil.....	25
Tabela 2 – Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio do teste ELISA com antígeno solúvel.....	43
Tabela 3 – Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio do teste ELISA com o antígeno Q5.....	43
Tabela 4 – Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio do teste ELISA com o antígeno rK39.....	43
Tabela 5 – Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio do teste ELISA com o antígeno Lci2.....	44
Tabela 6 – Resultados do teste de aglutinação direta quando aplicado em amostras de assintomáticos.....	50
Tabela 7 – Frequência dos testes sorológicos CF, DAT, Elisa convencional com antígeno solúvel e Elisa com os antígenos recombinantes Q5, Lci2 e Rk39.....	51
Tabela 8 – Sensibilidade e especificidade dos testes utilizado no estudo.....	53
Tabela 9 – Resultados laboratoriais de 31 casos de infecção assintomática por <i>Leishmania Infantum</i> em doadores de sangue.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
CF	Citometria de Fluxo
DAT	Teste de aglutinação direta
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano.
IgG	Imunoglobulina G.
IFI	Imunofluorescência Indireta.
IL	Interleucina
IPTG	Isopropylthio-beta-galactoside
LB	Luria Bertane
LV	Leishmaniose Visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-Phenylenediamine dihydrochloride
Th1	T helper
PCR	Reação em cadeia de polimerase
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>1.1.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>18</b>
1.2	JUSTIFICATIVA.....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.2	TRANSMISSÃO.....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Transmissão transfusional.....</b>	<b>24</b>
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	26
<b>2.3.1</b>	<b>Infecção assintomática.....</b>	<b>26</b>
2.4	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	27
2.5	DIAGNÓSTICO.....	29
<b>2.5.1</b>	<b>Diagnóstico parasitológico.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Diagnóstico imunológico.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Diagnóstico molecular.....</b>	<b>32</b>
2.6	DIFICULDADES E PERSPECTIVAS NA IDENTIFICAÇÃO DO ASSINTOMÁTICO.....	33
<b>3</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	35
3.2	TIPO DE ESTUDO.....	35
3.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	35
3.4	POPULAÇÃO DE ESTUDO E PERÍODO DE REFERÊNCIA.....	35
<b>3.4.1</b>	<b>Desenho do estudo.....</b>	<b>36</b>
3.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	36

3.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	37
3.7	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	37
<b>3.7.1</b>	<b>Obtenção do soro.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Obtenção do extrato de antígeno solúvel de L.infantum....</b>	<b>37</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Obtenção dos antígenos recombinantes Q5 e Lci2.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Caracterização dos antígenos Q5 e Lci2.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7.5</b>	<b>ELISA com antígeno solúvel, proteína Q5 e proteína Lci2....</b>	<b>39</b>
<b>3.7.6</b>	<b>ELISA com o antígeno RK39.....</b>	<b>40</b>
<b>3.7.7</b>	<b>Citometria de fluxo.....</b>	<b>41</b>
3.7.7.1	Obtenção das Formas promastigotas fixadas de L. infantum....	41
3.7.7.2	Ensaio de citometria de fluxo (CF).....	41
<b>3.7.8</b>	<b>Teste de aglutinação direta (DAT).....</b>	<b>42</b>
<b>3.7.9</b>	<b>Concordância dos testes utilizando a medida de Kappa.....</b>	<b>42</b>
<b>3.7.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	PADRONIZAÇÃO DO TESTE SOROLÓGICO ELISA.....	43
4.2	SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NOS TESTES SOROLÓGICOS ELISA....	44
4.3	ENSAIO DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	48
4.4	TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA COM AMOSTRAS DE PACIENTES ASSINTOMÁTICOS.....	50
4.5	FREQUÊNCIA DOS TESTES SOROLÓGICOS FRENTE AO GRUPO DE 31 DOADORES ASSINTOMÁTICOS.....	51
<b>4.5.1</b>	<b>Sensibilidade e especificidade dos testes CF, DAT, ELISA com antígeno solúvel, ELISA com a proteína Q5, ELISA com o antígeno rK39 e ELISA com a proteína Lci2.....</b>	<b>52</b>
4.6	CONCORDÂNCIA ENTRE OS ESTES USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DO ASSINTOMÁTICO NA POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE.....	53
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO NA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMEN.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* (espécies *L. donovani* e *L. infantum*), tendo espécies dominantes conforme o país (GONTIJO; MELO, 2004), é uma enfermidade crônica, debilitante e, se não tratada, pode ser letal. Considerada mundialmente como um problema de saúde pública, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas com risco de infecção (WHO, 2019). Na América Latina de todas as notificações, 96% dos casos foram registrados no Brasil (Organização Pan-Americana da Saúde, 2018).

O Brasil apresenta regiões com franca expansão da LV, o que destaca a necessidade de medidas efetivas de controle (ZUBEM; DONANALÍSIO, 2016). Em um levantamento realizado entre os anos de 2001 a 2014, foi observado a notificação de 47.859 novos casos de LV, e nesse período a taxa de incidência foi de 1,8 por 100.000 habitantes (REIS *et al.*, 2017). No ano de 2019 o Brasil foi o responsável por 97% das notificações nas Américas (SAÚDE, 2021)

De todos os casos notificados no Brasil entre os anos de 2006 e 2015, 2,4% foram notificados no estado de Pernambuco, dessas notificações, 49,6% foram das regiões do Vale do São Francisco e Araripe (SOUSA *et al.*, 2018). As concentrações de casos nestas regiões são influenciadas especialmente pela infraestrutura urbana de populações de baixa renda (ANDRADE *et al.*, 2020).

Aliada ao aumento de casos de LV, está a presença da infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV), chegando a prevalência de 16,9% como descrito em um estudo realizado em Pernambuco (GUEDES *et al.*, 2018). A coinfeção LV-HIV aumenta o risco da gravidade da doença, além de ser um desafio para o diagnóstico e tratamento (WHO, 2019).

A infecção pode se apresentar com diferentes perfis clínico-imunológicos, dentre eles a infecção assintomática e sintomática (BARBOSA *et al.*, 2010). Na forma sintomática da doença, os sintomas mais relatados são febre, fraqueza, emagrecimento, palidez, dores abdominais e hepatomegalia (ALVES; FONSECA, 2018). No entanto, os assintomáticos não apresentam nenhuma sintomatologia clínica, podendo apenas ser observada baixa parasitemia. Uma grande preocupação que surge em relação aos indivíduos assintomáticos é a possibilidade de atuarem como reservatórios do parasito (MARTHUR; SAMANTARAY, 2004; MICHEL *et al.*, 2011).

Além da espécie de *Leishmania*, as características do hospedeiro, como os fatores genéticos, nutricionais e imunológicos, estão diretamente relacionados à forma clínica da infecção (MASHAYEKHI GOYONLO et al., 2020; BLACKWELL et al., 2020). Em relação aos fatores imunológicos, a imunidade contra *Leishmania* é dependente da resposta do tipo Th1. Quando ativada por meio da produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígeno, é capaz de eliminar os parasitas por meio da ação do IFN-gama, que estimula a produção de óxido nítrico pelas células parasitadas, destruindo os parasitas (KAYE e SCOTT, 2011). Em contrapartida, dependendo da resposta do tipo Th2 a doença pode se tornar mais grave e até mesmo persistente, tudo isso por meio da síntese das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 (ROSSI e FASEL, 2018).

Ademais, os infectados podem apresentar uma alta produção de IL-10, o que pode afetar a inibição da atividade do interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) que são citocinas pró-inflamatórias antiparasitárias (GAUTAM et al., 2011; FALEIRO et al., 2014). Entretanto, devido ao alto número de indivíduos assintomáticos reagentes nos testes sorológicos, não se pode deixar de estudar a função protetora dos anticorpos (GIDWANI et al., 2011), pois grande parte dos indivíduos infectados com a forma visceral não progride para doença ativa (KUMAR, NYELEN, 2012). E isso pode ocorrer devido a vários fatores como: carga parasitária inoculada, condições nutricionais, fatores genéticos entre outros (GUEDES et al., 2022)

Em vista da possibilidade da infecção transfusional (FERREIRA-SILVA et al., 2018), torna-se necessária a triagem laboratorial para a detecção da LV em bancos de sangue, dado que é possível haver indivíduos assintomáticos no grupo de doadores. A triagem deve ser rotineira para garantir a segurança de todos os envolvidos no processo de doação, pois a população está constantemente exposta ao risco de infecção (FRANÇA et al., 2013; FUKUTANI et al., 2014).

Apesar disso, as ferramentas diagnósticas disponíveis para a realização da triagem em bancos de sangue enfrentam um desafio, dado que os testes foram desenhados para a forma sintomática da doença. Na forma sintomática, o diagnóstico para LV é realizado por critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Para a confirmação do caso, é necessário ter resultado positivo e/ou reagente em pelo menos um dos ensaios preconizados: teste rápido para a detecção de anticorpo anti-rK39, IFI

(Imunofluorescência indireta), aspirado de medula óssea ou cultura parasitológica (BRASIL, 2019).

Dentre os testes de diagnóstico que mais se destacam, temos o teste sorológico imunoenzimático (ELISA), que, devido a sua alta sensibilidade, é bastante utilizado (PEDRAS et al., 2008), principalmente na triagem inicial para o diagnóstico (ELMAHALLAWY et al., 2014; DENIAU et al., 2003). Porém, Sundar et al (2002), apresentam que a sensibilidade do teste vai depender da metodologia utilizada, enquanto a especificidade vai depender do antígeno usado. Por este motivo, vem sendo cada vez mais estudada a utilização de proteínas recombinantes nos ensaios sorológicos, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes e visando superar essas limitações (MAGALHÃES et al., 2019). Por esse motivo, estudos com biomarcadores focado no diagnóstico das infecções assintomáticas são necessários elucidar essa problemática (PORCINO et al., 2019).

O uso de ferramentas moleculares para o diagnóstico, a exemplo da PCR (Reação em cadeia da polimerase), tem se destacado com boa sensibilidade e especificidade, todavia, é necessária uma estrutura laboratorial para a sua realização, equipe qualificada e materiais e ambientes específicos (SELDER et al., 2017).

Ter o conhecimento da soroprevalência é crucial para uma melhor compreensão da doença, contribuindo, assim, para o estabelecimento de medidas de controle eficazes (THEOCHARIDOU et al., 2019; ASCHALE et al., 2019; PICÓN et al., 2020).

Nosso grupo de pesquisa, por meio da linha de pesquisa de *Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias*, vem desenvolvendo trabalhos relacionados ao diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV), com diferentes antígenos recombinantes e a avaliação de metodologias alternativas, como a identificação de anticorpos contra *Leishmania spp.*, por de citometria de fluxo. Portanto, neste trabalho, avaliamos a soroprevalência da infecção assintomática por *Leishmania infantum*. em doadores de sangue, utilizando diferentes antígenos e métodos sorológicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os testes sorológicos para estimar a prevalência de infecção assintomática por *Leishmania infantum*. em doadores de sangue.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estimar a prevalência de infecção assintomática de *Leishmania infantum*. utilizando ELISA com antígeno solúvel.
- b) Estimar a prevalência de infecção assintomática de *Leishmania infantum*. utilizando ELISA com antígenos recombinantes: Q5, Rk39 e Lci2.
- c) Avaliar a reatividade cruzada para entre leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana nos testes ELISA
- d) Avaliar o desempenho da citometria de fluxo, do teste de aglutinação direta e ELISA frente às amostras de doadores assintomáticos triados pela qPCR.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A LV é uma doença endêmica no Brasil, de crescente expansão, a qual pode ser apresentada na forma assintomática. Essa forma carece de especial atenção, principalmente pelos riscos decorrentes da transmissão transfusional, visto que indivíduos assintomáticos para LV podem facilmente passar nos critérios e serem aprovados como doadores aptos, caso não sejam utilizadas medidas de controle adequadas.

A triagem para *Leishmania* é dificultada pela baixa carga parasitária e baixo título de anticorpos anti-*Leishmania*. Portanto, são necessários estudos que avaliem a prevalência de assintomáticos e o uso de técnicas laboratoriais que possibilitem identificar e compreender o papel epidemiológico desses indivíduos nas áreas endêmicas.

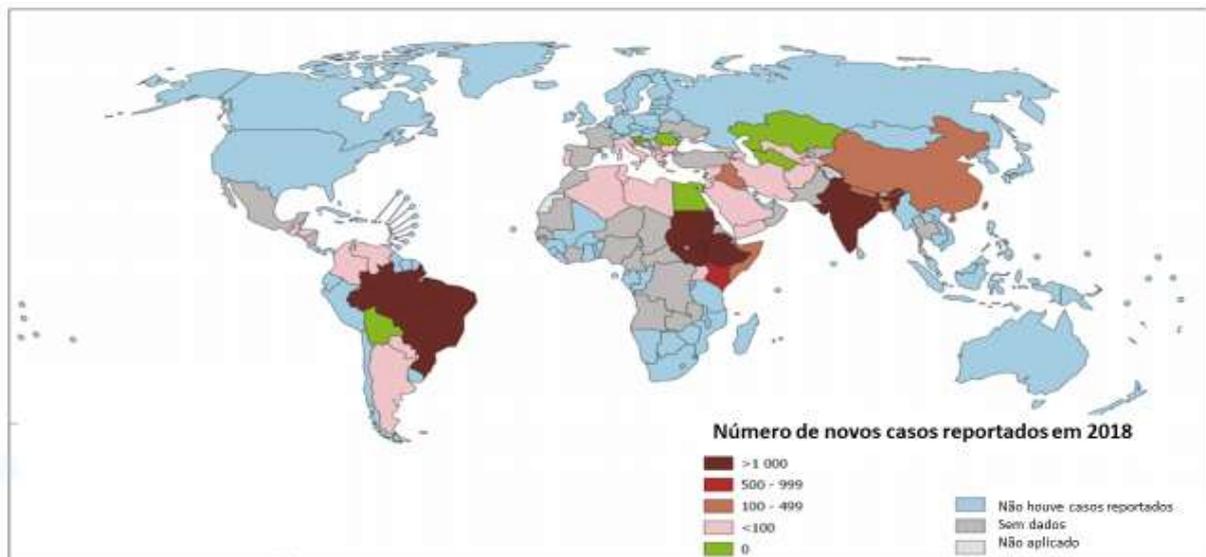
Os testes sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico, mas, para a obtenção de um melhor desempenho, há a necessidade de se estudar antígenos mais específicos. Diante disso, é importante estudar a prevalência da infecção assintomática com diferentes testes sorológicos, de modo a aumentar a precisão ao estimar a soroprevalência. Desse modo, o presente estudo reforçou a importância da implantação da triagem para a detecção de *Leishmania* spp. em bancos de sangue, contribuindo, assim, com o Sistema Único de Saúde.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses formam um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* e são transmitidas aos vertebrados pelo flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomyia*, em que a principal espécie é o *Lutzomyia longipalpis* (AKHOUDI *et al.*, 2016; BRASIL, 2014; SPIEGEL *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017, foram relatados 20.742 novos casos da doença, com 94% desses casos ocorrendo em países como Índia, Quênia, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (WHO,2020). Essa situação pode ser observada na Figura 1, que apresenta a distribuição da LV no mundo.

Figura 1- Representação da distribuição da Leishmaniose Visceral no mundo, no ano de 2018



Fonte: Adaptado WHO, 2019.

Na América Latina, a LV está presente desde o México até a Argentina, estando a grande maioria dos casos localizados no Brasil (VOLPINI *et al.*, 2004; MICHALSKY *et al.*, 2011). No território nacional, a primeira descrição na literatura ocorreu em 1953 no Nordeste brasileiro, no estado do Ceará (DEANE; DEANE, 1957), e, até o ano de 1990, cerca de 90% dos casos de LV no Brasil ocorreram nessa região (SAÚDE.,2006). A partir de 1990 até 2018, é possível observar uma queda de 90%

para 64,2% das notificações de casos; porém, em todo o país, já se somavam 91.000 ocorrências (SAÚDE, 2018). Desde então, a doença é classificada como endêmica em vários estados brasileiros, em especial, os estados da região Nordeste (SOUSA *et al.*, 2019; MICHALSKY *et al.*, 2011).

A expansão da doença ocorre por uma série de fatores, tais como: o aumento populacional, a falta de saneamento básico, o desmatamento e as mudanças ambientais (BARBOSA *et al.*, 2013; MARTINS-MELO *et al.*, 2014). Um fator que merece destaque e que pode estar contribuindo para a expansão, é que os vetores podem se adaptar às condições de moradias dos seres humanos, aumentando assim o risco de transmissão (SALES *et al.*, 2019).

Ao analisar o avanço da doença, nota-se a importância de políticas focadas na prevenção, no tratamento, no diagnóstico e na identificação das espécies. A carência de direcionamento dessas políticas reflete no aumento da morbidade e da mortalidade (MONTEIRO, 2013).

Nos anos 2000, a doença apresentou uma expansão significativa e se tornou presente em todas as regiões do estado (CARVALHO *et al.*, 2007). O estado de Pernambuco se destaca pelo alto número de casos, dado que, no período entre 2007 e 2017, foram registrados 41.263 casos da doença (SINAN, 2019). Assim, ao analisar o histórico epidemiológico da doença no estado, pode-se notar um relevante aumento nos anos 90, principalmente nas regiões do Agreste e Sertão (DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES e BRANDÃO FILHO, 2006).

Em 2018, por exemplo, foi publicado um estudo que revela uma alta incidência de casos no Sertão, mais precisamente, na região do baixo Rio São Francisco (DINIZ *et al.*, 2018). Em um levantamento epidemiológico, Machado *et al.* (2021) destacou a cidade de Petrolina como a que mais notificou casos de LV entre os anos de 2014 e 2018.

## 2.2 TRANSMISSÃO

O crescimento populacional desordenado, o grande fluxo de migração, o aumento do desmatamento, as precárias condições de moradia e a deficiência no saneamento básico são fatores que contribuem para a interação entre vetores, parasitos e reservatórios, influenciando, assim, na transmissão do agente causador da doença (VILELA *et al.*, 2011).

No Brasil, a principal espécie envolvida na transmissão da leishmaniose visceral é o flebotomíneo fêmea *Lutzomyia longipalpis* (RODRIGUES *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES *et al.*, 2019). O vetor foi descrito pela primeira vez em 1912 nos estados de São Paulo e Minas Gerais (LUTZ; NEIVA, 1912) e em grande parte do continente americano (OLAVOS, 2011).

A transmissão ocorre no momento do repasto sanguíneo, enquanto a fêmea do flebotomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro. No processo de alimentação, são inoculados no tecido as formas promastigotas do parasito, que serão capturadas pelos macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Uma vez fagocitadas, as formas promastigotas evoluirão para formas amastigotas e se reproduzirão por divisão binária até o rompimento das células e liberação das formas amastigotas no organismo. Quando o vetor se alimenta do vertebrado infectado e ingere as células contendo o parasita, as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas no intestino e depois se diferenciam em promastigotas metacíclicas, migrando para a região faríngea, e quando ocorre o repasto sanguíneo, há infecção do vertebrado, encerrando o ciclo reprodutivo. (Figura 2). (PEARSON e QUEIROZ SOUZA, 1996; OKWOR e UZONNA, 2013; LINDOSO *et al.*, 2014).



a infecção *in utero* em cães e como conclusão sugeriram ser possível haver a transmissão vertical.

Além dessas formas de infecções, destaca-se a infecção por meio do transplante de órgãos (SILVIA *et al.*, 2015), situação em que os sintomas de LV podem aparecer como uma complicação dias após o transplante (ANTINORI *et al.*, 2008). De modo geral, pessoas transplantadas, devido ao uso de imunossupressores, são mais vulneráveis às doenças parasitárias, como a Leishmaniose Visceral (LA HOZ e MORRIS.,2019). Outra via de infecção relatada é a antroponótica, que consiste no compartilhamento de seringas por usuários de drogas, dado que as formas amastigotas são inoculadas diretamente na corrente sanguínea (MARQUES *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Transmissão transfusional**

A transmissão transfusional foi relatada primeiramente na China (CHUNG *et al.*, 1948) e depois em outros países, como Suécia (ANDRÉ *et al.*, 1958), França (KOSTMAN *et al.*, 1963) e Bélgica (COHEN *et al.*, 1991).

No Brasil, a primeira pesquisa realizada em bancos de sangue ocorreu no Rio Grande do Norte (LUZ *et al.*,1997). Nela, observou-se uma soropositividade de 9% em um total de 1.194 doadores de sangue para *Leishmania* spp., por meio da detecção de anticorpos *anti-Leishmania*, utilizando o teste ELISA, demonstrando a presença de infecção assintomática nos doadores.

Em estudo realizado por Otero *et al.* (2000), verificou-se a relação da sororeatividade com a presença de DNA de *Leishmania* donovani em doadores de sangue assintomáticos. Dos 21 doadores com soropositividade utilizando Ensaio Imunoenzimático (ELISA), apenas 5 foram positivos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A baixa positividade no teste molecular se deve à baixa carga parasitária, mas, mesmo assim, os resultados ressaltam a importância da adoção de medidas para a triagem de *Leishmania* spp. em bancos de sangue no Brasil (OTERO *et al.*, 2000).

Outro estudo com doadores de sangue da cidade de Salvador, capital do estado da Bahia, apresentou soropositividade (ELISA) de 5,4% dos 700 doadores de sangue, reforçando a necessidade de implementação de estratégias de triagem (FUKUTANI *et al.*,2014).

Urias *et al.* (2009) em Minas Gérias, verificaram, em 2009, 5,4% de positividade pela imunofluorescência indireta em um grupo de 421 doadores. Por sua vez, na região Centro-Oeste, pelo mesmo método, foram detectados anticorpos *anti-leishmania* em 15,3% dos 430 doadores, sendo 65,3% dos doadores oriundos de áreas endêmicas (FRANÇA *et al.*, 2013).

É muito importante que se tenha um controle da infecção assintomática nos doadores de sangue, pois esses indivíduos podem atuar como reservatórios da doença (MICHEL *et al.*, 2011), e a triagem desses parasitas é essencial para evitar a transmissão por essa via. Além disso, a inativação do parasito em sangue total, em áreas endêmicas, é outra forma de interromper a transmissão (ORTALLI *et al.*, 2019). Isso ocorrer por meio da leucodepleção, sistemas de filtros que servem como barreira na passagem do parasito, evitando a contaminação da bolsa de sangue (ASFARAM *et al.*, 2017).

A recorrência de infecções assintomáticas em bancos de sangue no Brasil (Tabela 1) justifica a inclusão da detecção de *Leishmania* na triagem de sangue.

Tabela 1 - Estudos que identificaram assintomáticos infectados com *L. infantum* nos bancos de sangue do Brasil

<b>Autor / Ano</b>	<b>Testes</b>	<b>Taxa de infecção</b>
LUZ <i>et al.</i> ,1997	ELISA	9%
OTERO <i>et al.</i> ,2000	PCR	23%
URIAS <i>et al.</i> , 2009	RIFI / TESTE RÁPIDO	5,5%
FRANÇA <i>et al.</i> ,2013	RIFI	15,6%
FUKUTANI <i>et al.</i> , 2014	ELISA / PCR	5,4% / 21%
BRAGA <i>et al.</i> ,2015	ELISA	11,4%
MONTEIRO <i>et al.</i> , 2016	ELISA / PCR	17,1%
FRANÇA <i>et al.</i> ,2018	RIFI/ rK39 ELISA / teste rápido rK39 / kDNA-PCR	36,0%
SILVA <i>et al.</i> , 2020	qPCR	6,2%

Nota: Em URIAS *et al.* (2009), nenhuma das amostras reagentes no sorológico (RIFI) reagem no teste rápido. FUKUTANI *et al.* (2014) a sorologia foi positiva em 5,7% de 700 indivíduos, desse grupo positivo foi realizado a PCR e teve 21% de positividade. MONTEIRO *et al.* (2016) tiraram a média da reatividade

dos testes realizados. FRANÇA *et al.* (2018) consideraram positivas as amostras que reagiram em pelo menos um dos testes aplicados.

Legenda: Ensaio Imunoenzimático (ELISA); Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); Imunofluorescência Indireta (RIFI); Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR).

Fonte: Autor (2022).

É válido reconhecer que, mesmo com todos os relatos já descritos na literatura, a triagem para a leishmaniose visceral ainda não está implementada no Brasil (URIAS *et al.*, 2009; BRASIL, 2004; LIMA *et al.*, 2012).

### 2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Na leishmaniose visceral, os sintomas podem se apresentar de forma moderada ou grave. Dessa forma, o infectado pode manifestar uma clínica, como febre, perda de peso, astenia, hepatoesplenomegalia, anemia, diarreia, tosse seca, que, quando não tratados, podem evoluir e levar a óbito (QUEIROZ *et al.*, 2006; SOUZA-GOMES *et al.*, 2011; ALVES; FONSECA, 2018).

Entretanto, grande parte dos indivíduos infectados desenvolve a forma assintomática da doença. Corroborando essa informação, Barbosa *et al.* (2010) realizaram um estudo na cidade de Cametá, no estado do Pará, o qual foram caracterizados os aspectos clínicos da doença. Neste estudo, foi possível observar que 51,6% dos indivíduos apresentaram a infecção assintomática, 22,4% foram definidos como indeterminados, 24,4% foram diagnosticados com infecção oligossintomática e 1,6% apresentaram a infecção sintomática. Foi observada também a evolução desses casos, no entanto, destaca-se as infecções inicialmente indeterminadas, pois evoluíram para a forma sintomática, oligossintomática ou assintomática (BARBOSA *et al.*, 2010).

#### 2.3.1 Infecção assintomática

Singh *et al.* (1996) descreveram que existe a possibilidade os assintomáticos evoluírem para a forma sintomática em até um ano, e esses assintomáticos podem estar atuando como reservatórios, podendo ser um fator que contribua para uma epidemia no futuro (STAUCH *et al.*, 2011).

Casos assintomáticos já foram relatados em vários países, como exemplo nos estudos realizados na Itália (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974), Irã (ALBORZI *et al.*, 2008; ASFARAM *et al.*, 2010) e Iraque (SOUHAILA *et al.*, 2010). Moura *et al.* (2012) alertam que as ações voltadas para a doença devem ser focadas preferencialmente nas

famílias dos infectados, visto que dividem o mesmo ambiente, facilitando a transmissão na presença pelo vetor.

No Brasil, em 1986, foi publicado o primeiro estudo com 86 crianças, que foram identificadas com anticorpo para a *Leishmania* (BADARÓ *et al.*, 1986). O acompanhamento permitiu identificar que 20 crianças desse grupo permaneceram assintomáticas, já outras desenvolveram os sinais e sintomas da doença (BADARÓ *et al.*, 1986). Entretanto, estudos também apresentam que a grande maioria dos casos permanecem assintomáticos, ou seja, sem evolução para a forma sintomática (BERN *et al.*, 2007; HARKER *et al.*, 2014; HIVER *et al.*, 2016).

O grande desafio para o controle da LV é a identificação e manejo do assintomático. Os testes diagnósticos utilizados para identificar esta população incluem os sorológicos, parasitológicos e moleculares, mesmo com o desempenho muitas vezes insatisfatório nesses casos (VALLUR *et al.*, 2016).

Moreno *et al.* (2006), identificaram a população de assintomáticos por diferentes métodos laboratoriais, como: sorológicos (ELISA, teste rápido rK39, IFI) e moleculares (PCR). Em suma, verificaram que os resultados dos testes divergiram, revelando a dificuldade para a identificação da infecção assintomática.

Vários fatores podem influenciar no desenvolvimento da doença, dentre eles: fatores nutricionais, imunológicos, genéticos, fisiológicos do hospedeiro, espécie do vetor, virulência da cepa de parasita, entre outros fatores (JIMENES-MARCO *et al.*, 2012).

## 2.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A resposta imunológica do hospedeiro também determina a evolução clínica do indivíduo (ROSSI; FASSEL, 2018). As formas promastigotas, na derme do hospedeiro, por serem organismos estranhos, são capturadas pelas células da imunidade inata (HURDAYAL *et al.*, 2020). A modulação da resposta do hospedeiro determina o estabelecimento e a multiplicação do parasito, uma vez que a infecção de novas células é um processo contínuo (LINDOSO *et al.*, 2014; OKWOR; UZONNA, 2013; LIU., 2012). A replicação do parasito deverá ser contida após a ativação das vias sinalizadoras, que influenciam diretamente a resposta inflamatória. Isso ocorrerá com o reconhecimento inicial do parasito e das células infectadas pelos monócitos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) e células polimorfonucleares (FARIA *et al.*, 2012).

O perfil celular T helper tipo 1 (Th1) é o mediador chave para a imunidade protetora contra o parasito (ALEXANDER; BOMBACHER, 2012). As citocinas do perfil Th1 ativam as células *natural killer* (NK), promovem a liberação das Interferon-gama (INF- $\gamma$ ), o que resulta na diferenciação e na multiplicação dos linfócitos Th1 efetores. A eliminação das amastigotas está relacionada com a produção do óxido nítrico (NO), que será ativado pela citocina TNF e secretados pelos macrófagos infectados (CUNNINGHAM., 2002, KAYE; SCOTT., 2011). Entretanto, a diferenciação da resposta do tipo Th2 com produção de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  está relacionada com a progressão e suscetibilidade da doença (TRIPATHI *et al.*, 2007). Kupani *et al.*, (2021) verificaram que o aumento dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  nos infectados podem suprimir a produção de NO através da indução da arginase, ou seja, a falta de NO, pode estar associada ao aumento da atividade da arginase.

As células detriticas têm sido relacionadas a um papel protetor durante a leishmaniose visceral. Outro mecanismo importante durante a infecção é estabelecido a partir de células detriticas esplênicas, que produzem IL23p19, que, em associação com IL12p40, darão origem a IL-23 biologicamente ativa. A IL-23, associada a outras citocinas, promove a diferenciação da população Th17. Na LV, a IL-17 atua sinergicamente com Interferon (IFN  $\gamma$ ) na ativação de macrófagos e indução de produção de NO (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Vale destacar que as células Th17 são importantes para a modulação da imunidade adaptativa contra as *Leishmanias*, podendo ser importante na evolução clínica da doença (GOLÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017)

Além disso, em indivíduos assintomáticos com LV, sabe-se que anticorpos do tipo IgG e suas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 apresentam influência no curso da infecção (SCHROEDER *et al.*,2010). De forma geral, as IgG1 e IgG3 humanas serão produzidas em resposta a antígenos proteicos, e as IgG2 e IgG4 são, em grande parte, produzidas em resposta a antígenos polissacarídicos (SCHROEDER *et al.*,2010). Embora a resposta de anticorpos anti-*leishmania* ainda não esteja bem definida, na infecção ativa, são encontrados altos níveis de IgE, IgM e IgG anti-*Leishmania* (GHOSH *et al.*, 1995; ANAM *et al.*, 1999; RYAN *et al.*, 2002; KUMAR, NYELEN, 2012).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce é uma importante medida de controle, uma vez que pode contribuir para um melhor prognóstico do paciente (CARVALHO *et al.*, 2018). O Ministério da Saúde (MS) recomenda que, para o diagnóstico da LV, deve-se observar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A confirmação ocorre quando ao menos um dos testes laboratoriais for positivo (BRASIL, 2011).

O diagnóstico clínico consiste na observação dos sinais e sintomas da doença, como febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia (SOUZA-GOMES *et al.*, 2011; LINDOSO *et al.*, 2014). Já os critérios epidemiológicos contribuem como indicadores de vulnerabilidade e ajudam no momento do diagnóstico (TOLEDO *et al.*, 2017). Porém, sempre deve ser considerado que essas sintomatologias podem ser confundidas com outras doenças, como as parasitárias, a exemplo da doença de Chagas (DALTRO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020).

No diagnóstico laboratorial, os métodos mais utilizados são o parasitológico, imunológico e o molecular, e cada método aplicado apresenta uma particularidade na precisão de diagnóstico (THAKUR *et al.*, 2020). Vale destacar que a realização dos diagnósticos das leishmanioses ainda é um desafio quando se trata da identificação das espécies parasitárias (REAIMÃO *et al.*, 2020).

### 2.5.1 Diagnóstico parasitológico

Os testes parasitológicos são todos aqueles testes que identificam o parasito, seja em sangue, órgãos ou fluidos corporais (EGUCHI *et al.*, 2017). A amostra biológica geralmente é analisada por meio da histopatologia de tecido fixado em lâmina ou por meio da cultura *in vitro* do parasito (VRIES *et al.*, 2015).

Dentre todas as possibilidades de amostras que podem ser analisadas, os aspirados esplênicos são as que apresentam maior sensibilidade, variando de 93% a 99% (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Porém, apesar da grande sensibilidade, o procedimento para a obtenção do aspirado é de alto risco, podendo trazer intercorrências graves para o paciente, como hemorragia (BARRETT e CROFT 2012).

Outra amostra que pode ser utilizada para o diagnóstico parasitológico é o aspirado de medula óssea, que apresenta uma sensibilidade que varia de 60% a 80%; já o esfregaço sanguíneo, por sua vez, apresenta uma sensibilidade baixa, que pode ser relacionada com a baixa carga parasitária circulante (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

Já o diagnóstico por meio da cultura *in vitro* do parasito apresenta alta sensibilidade e especificidade e, por isso, pode ser uma técnica para o isolamento do parasito (HIDE *et al.*, 2007; SRIVIDYA *et al.*, 2012). Porém, devido a toda complexidade e à delonga da técnica, sua utilização é mais concentrada em laboratórios de pesquisa (SINGH e SUNDAR *et al.*, 2015)

Destaca-se que, para a identificação correta do parasito, é necessário que o material coletado seja de boa qualidade e que a equipe envolvida no processo, seja capacitada para tal (SRIVIDYA *et al.*, 2012). Como os testes parasitológicos são baseados na presença do parasito, se o indivíduo estiver infectado com uma carga parasitária baixa, os testes parasitológicos podem não ser os mais indicados, o que pode ocorrer nos casos dos assintomáticos (SILVA *et al.*, 2020).

### **2.5.2 Diagnóstico imunológico**

No diagnóstico imunológico, as técnicas mais utilizadas são as sorológicas, que têm como objetivo a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos indivíduos suspeitos de LV (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). No Brasil, conforme o Guia de Vigilância Epidemiológica, em 2019, os testes preconizados são: Imunofluorescência indireta (IFI), teste rápido imunocromatográfico e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

A IFI consiste na identificação de anticorpos anti-*Leishmania*. Nessa técnica, utilizam-se lâminas com o parasita fixado e, havendo a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente, ocorrerá a ligação de anticorpos marcados com fluorocromos, e, em seguida, será possível perceber a fluorescência, que poderá ser visualizada pela microscopia de fluorescência. Serão consideradas positivas todas aquelas reações com títulos iguais ou acima de 1:80. Se os títulos ficarem entre 1:40-1:80, o diagnóstico fica como sugestivo, e é indicada uma nova coleta (BRASIL, 2009; SINGH *et al.*, 2015). Uma das grandes vantagens desse teste é a boa sensibilidade quando comparado a outros testes sorológicos (FRANÇA *et al.*, 2020). A desvantagem, no entanto, é que o IFI é uma técnica laboriosa que requer infraestrutura laboratorial adaptada para um microscópio de campo escuro e um técnico treinado para a realização das leituras das lâminas (IQBAL *et al.*, 2002; BOLAERT *et al.*, 2004).

Uma das técnicas mais utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses é o ELISA. A técnica tem como princípio a reação antígeno-anticorpo e está entre as técnicas mais sensíveis para o diagnóstico da doença, principalmente quando se

utiliza o antígeno rK39, alcançando índices de sensibilidade e especificidade em torno de 96% a 100%, respectivamente (ROMERO *et al.*, 2010; BOELAERT, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). O rK39 é um antígeno com um epítipo de 39 aminoácidos ligados a cinesina-like (BURNS *et al.*, 1993; ABASS *et al.*, 2015).

Em relação às limitações do rK39, destacam-se que o desempenho da técnica pode variar dependendo de alguns fatores, dentre eles está a coinfeção LV-HIV (KASSA *et al.*, 2020). Vem se tornando popular o teste imunocromatográfico rK39, que se baseia na detecção de anticorpos. Esse teste tem alta sensibilidade, porém, em alguns casos, pode ocorrer um resultado falso-positivo mesmo após a cura do indivíduo (MOHAPRATA *et al.*, 2015).

Com o objetivo de otimizar as técnicas sorológicas, outros antígenos recombinantes vêm sendo estudados (SRIVIDYA *et al.*, 2012), como o antígeno Lci2, que apresentou o melhor desempenho quando comparado a outros testados nos estudos de Santos *et al.* (2010). Podem ser citados também como promissora a proteína quimérica Q5, que é baseada nos três melhores antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral: Lci2, Lci3 e Lci12. Isso faz com que a sensibilidade seja aproximadamente de 82% e que quase não ocorram resultados inespecíficos (SANTOS *et al.*, 2019).

Além dos já citados, outro teste que também pode ser utilizado é o DAT (teste da aglutinação direta), que se baseia na aglutinação do parasito em placa. O DAT apresenta uma boa sensibilidade e especificidade que podem chegar a 97,3% e 98,8%, respectivamente, podendo, ainda, esses números variarem de acordo com a cepa e também com o protocolo utilizado (AYELIGN *et al.*, 2020). Entretanto, é válido ressaltar que, dentre as desvantagens do DAT, há a subjetividade da leitura da aglutinação (KÜHNE e BÜSCHER, 2019)

Outro teste que pode ser utilizado pela praticidade, mesmo que possa apresentar uma sensibilidade variante, é o KAtex (teste da aglutinação do látex). O teste se baseia na reação antígeno-anticorpo. É um teste em que a sensibilidade é aproximadamente 77%, enquanto a especificidade é de 97% (FARAROU EI *et al.*, 2018). Além disso, esse teste apresenta a vantagem de se basear na detecção de antígeno, o que é no monitoramento terapêutico e nos casos de indivíduos imunossuprimidos (GHATEE *et al.*, 2017).

Outra ferramenta que vem se demonstrando promissora é a citometria de fluxo (CF), principalmente quando aplicada no diagnóstico sorológico da LV (GOMES *et al.*,

2010). A CF proporciona uma análise quantitativa dos anticorpos *anti-Leishmania* e o método de marcação, por ser realizado com anticorpos conjugados diretamente a flurocromos, é consideravelmente simples (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; OLIVEIRAL *et al.*, 2013; PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016). A CF pode apresentar uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 82,5%, quando aplicada para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (KER *et al.*,2019). Diante dos desempenhos positivos da CF é possível que ela possa ser utilizada para a identificação da LV (SILVA *et al.*, 2021)

### 2.5.3 Diagnóstico molecular

Uma das abordagens mais promissoras para o diagnóstico da LV é o diagnóstico molecular, teste parasitológico em que é possível a identificação do DNA do parasito em indivíduos que estejam com uma carga parasitária muito baixa, porém o alto custo e a complexidade da técnica acabam inviabilizando o seu uso em larga escala (FAUCHER; PIARROUX, 2011).

Na abordagem molecular, a reação em cadeia de polimerase (PCR) é a técnica que melhor se destaca na identificação de DNA parasitário em sangue periférico, por ser uma boa alternativa para evitar os diagnósticos invasivos e poder ser realizada de forma convencional ou em tempo real (SUNDARSHAN *et al.*, 2015; MOLINA *et al.*, 2020). Ademias, a PCR em tempo real (qPCR) permite a quantificação parasitária, podendo ser aplicada tanto para o monitoramento terapêutico, como em casos com baixa carga parasitária (GALLUZZI *et al.*, 2018; MERDEKIOS *et al.*,2021).

A PCR convencional é uma técnica elaborada com várias etapas, requerendo um tempo maior de execução, sendo que sua sensibilidade é de aproximadamente 95,45%, enquanto a especificidade chega a 68,88% (CRUZ *et al.*,2002). Porém, a sensibilidade e a especificidade podem variar conforme o tipo de amostra utilizada, a metodologia aplicada, a carga parasitária, os *primers* escolhidos e os inibidores presentes na reação (LACHAUD *et al.*, 2001). Já a qPCR é uma técnica que vem ganhando destaque por ser de rápida execução, ter baixo risco de contaminação e ter menos etapas (GALUZZI *et al.*, 2018). Além disso, a sensibilidade e especificidade da técnica podem ser 100% (PAIVA-CAVANCANTI *et al.*,2015).

Vale destacar que o diagnóstico das leishmanioses compreende a combinação das técnicas laboratoriais com o perfil clínico, enquanto a detecção de assintomáticos compreende a combinação de testes com metodologias diferentes (PORCINO *et al.*,

2019; CARVALHO *et al.*, 2020), podendo, ademais, os testes moleculares serem uma boa alternativa para esses casos (HOSSAIN *et al.*, 2017).

## 2.6 DIFICULDADES E PERSPECTIVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ASSINTOMÁTICOS

O indivíduo assintomático infectado pode exercer uma atuação importante na transmissão da doença. Além disso, a grande preocupação é que entre os testes atuais nenhum é considerado padrão-ouro para a identificação desse grupo (IBARRA-MENEZES *et al.*, 2022). A infecção assintomática também é uma preocupação em indivíduos imunossuprimidos por doença autoimune, uma vez que pouco se sabe a respeito da prevalência nesses casos (BOTANA *et al.*, 2021). A existência de um teste que identifique esse assintomático seria útil para a realização de monitoramento e vigilância, além de ser mais uma ferramenta para tentar eliminar a doença (OWEN *et al.*, 2021). É necessário estudos que reforçam a necessidade de estudos altamente sensíveis e específicos para explicar melhor o desempenho desses testes (AYENE *et al.*, 2021)

Por esses e outros motivos, vêm sendo estudado a estimulação de sangue total com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), para serem avaliadas as concentrações plasmáticas de INF- $\gamma$  e IL-10. Uma vez realizada essa avaliação, seria possível estimar a prevalência desses assintomáticos (IBARRA-MENESES *et al.*, 2016). Já Kyoko *et al.* (2021) testaram ensaios com o antígeno rk28 e perceberam uma melhor sensibilidade quando comparado com os ensaios que utilizaram o antígeno rk39, porém reforçam que mais pesquisas são necessárias para melhor compreensão do assunto.

Outro biomarcador foi observado no estudo de Adriaensen *et al.* (2018) que verificaram os níveis séricos de CD40 solúvel e neopterina em pacientes assintomáticos e co-infectados com HIV. A neopterina sinalizou para uma progressão da LV em pacientes co-infectados com HIV. Já os níveis de CD40 apresentaram um papel protetor da LV, importante na resposta imune precoce.

Em outro estudo, foi verificado que as concentrações plasmáticas de INF- $\gamma$  e IL-2 parecem ser marcadores promissores para o diagnóstico de infecção por *Leishmania*, até em indivíduos assintomáticos (IBARRA-MENEZES *et al.*, 2016). Entretanto, estudos precisam ser realizados para desvendar o papel e os mecanismos de citocinas na infecção por *Leishmania* (KAMMOUN-REBAI *et al.*, 2016).

Diante disso, estimar a soroprevalência em uma região endêmica é importante para direcionar medidas que atuem no controle da LV. Para isso, foi realizada a análise laboratorial em amostras de sangue de doadores, por diferentes técnicas sorológicas.

### **3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **3.1 ÁREA DO ESTUDO**

O estudo foi realizado na cidade de Recife-PE, na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), que é uma instituição que se destaca no estado por atuar na triagem e na doação de sangue, diagnóstico laboratorial e tratamento de doenças do sangue, além de estar presente no apoio dos serviços de transplante de órgãos.

#### **3.2 TIPO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo experimental e quantitativo de base laboratorial. Esta pesquisa consiste na análise, em laboratório, das amostras de sangue fornecidas pelo HEMOPE, unidade Recife.

#### **3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas (HEMOPE e Instituto Aggeu Magalhães/IAM/FIOCRUZ/PE), CAEE 65770317.9.0000.5190 e segue as diretrizes e normas da resolução nº 466/12 (Anexo A).

#### **3.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO E PERÍODO DE REFERÊNCIA**

Foram coletadas 500 amostras de sangue periférico de doadores aptos para a doação e que passaram pela triagem clínica e laboratorial do HEMOPE. Essas foram, em seguida, armazenadas sob refrigeração a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A coleta foi realizada em doadores que compareceram ao banco de sangue da cidade de Recife entre agosto de 2017 a setembro de 2017, essas amostras foram coletadas em um estudo anterior e armazenadas para o presente estudo.

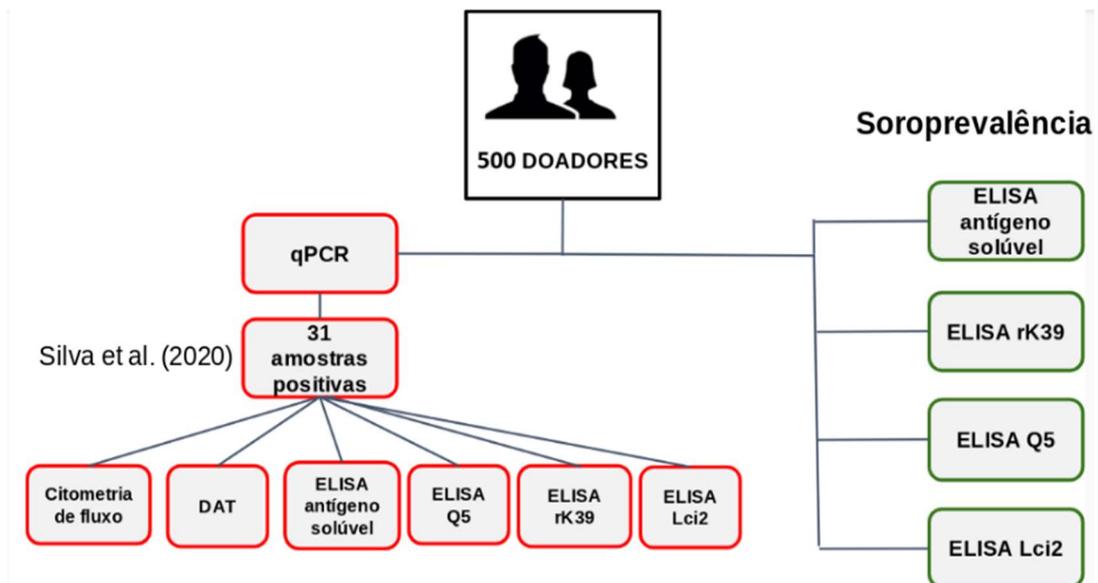
##### **3.4.1 Desenho do estudo**

Para o estudo em questão, foram selecionados como controle negativo 40 indivíduos saudáveis de área não endêmica, oriundos do banco de sangue do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ). Os controles positivos sintomáticos (n=15) para a Leishmaniose Visceral foram obtidos a partir do banco de soro do Laboratório de Doenças

Transmissíveis do IAM-FIOCRUZ, diagnosticados por, pelo menos, dois testes sorológicos e/ou moleculares. Em todos os ensaios foram adicionados esses controles positivos com objetivo de garantir a qualidade dos testes. Foram selecionados, ainda, soros (n=28) de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana, negativas para LV, diagnosticados por, pelo menos, dois testes, sendo eles, pesquisa direta e teste molecular. Essas amostras positivas para LTA foram utilizadas para verificação da reatividade cruzada de cada teste. É importante destacar que esses soros foram obtidos em colaboração com o serviço de referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ.

Das 500 amostras de sangue de doadores do banco de sangue, 31 foram positivas na triagem por qPCR, realizada em um estudo anterior por Silva *et al*, 2020. Essas amostras positivas foram utilizadas para a avaliação dos testes, utilizando a citometria de fluxo, teste de aglutinação direta e ELISA com os antígenos solúvel, Q5, rK39 e Lci2. A soroprevalência com os diferentes tipos de antígeno para o ELISA foram realizadas em todas as 500 amostras. (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma das amostras submetidas aos testes sorológicos



### 3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para a avaliação de testes sorológicos para estimar a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em doadores de sangue, foram incluídas todas as 500 amostras de doadores de sangue aptos para a doação, selecionados pela triagem clínica e

laboratorial do HEMOPE.

### 3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Para a avaliação de testes sorológicos para estimar a prevalência da infecção por *Leshmania* spp. em doadores de sangue, foram excluídas todas as amostras que apresentaram uma quantidade de soro insuficiente para a realização dos testes sorológicos, o que, no nosso estudo, resultou na exclusão de 5 amostras.

### 3.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Para a realização do presente estudo, foram utilizados os testes sorológicos ELISA com diferentes antígenos, sendo eles, os antígenos solúvel, Q5, rK39 e Lci2. Foram utilizados também para as análises a citometria de fluxo e o teste DAT. O detalhamento de cada um desses testes estão descritos abaixo.

#### 3.7.1 Obtenção do soro

O soro foi obtido após a centrifugação a 400 X g por 5 minutos, na temperatura ambiente. Após a centrifugação, o soro foi aliqotado e estocado sob refrigeração a -80° C.

#### 3.7.2 Obtenção do extrato de antígeno solúvel de *L. infantum*

Primeiramente, as formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/BH46) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's em garrafas de cultura de tamanho médio, até atingirem a fase exponencial, obtendo aproximadamente  $10^8$  de parasitos. Logo depois, os parasitos foram repassados para tubos cônicos e submetidos a uma centrifugação de 400 X g por 10 minutos.

Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com solução salina tamponada (PBS), 1x e pH 7.2. O pellet foi ressuspenso com 750µL da solução tampão de lise branda e 250µL de inibidor de protease. Após isso, foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL.

Para a lise celular, foram realizados congelamentos e descongelamentos em nitrogênio líquido e banho-maria a 36°C. Depois, foram adicionados 20µL da solução em uma lâmina de microscopia para verificar a viabilidade das células. E, para

assegurar que não haveria células viáveis, foram realizados mais ciclos de congelamento e descongelamento.

A solução final foi centrifugada a 10.000 X g a 4°C por 15 min, o sobrenadante (constituído por antígenos solúveis) foi coletado, e o pellet (constituído por antígenos insolúveis) foi ressuspenso em PBS. A fração solúvel foi quantificada com reagente de Bradford (10µL da suspensão antigênica, 200µL de Bradford e 790µL de água milli-Q). Em seguida, a suspensão foi alíquotada em tubos menores e congelados a -80°C até o uso.

### **3.7.3 Obtenção dos antígenos recombinantes Q5 e Lci2**

Esses antígenos foram cedidos já prontos para o uso pelo Departamento de Microbiologia da Fiocruz PE. Para a expressão das proteínas, as construções quiméricas foram convertidas em *E. coli* BL21 (para a proteína Lci2) de acordo com Ramos *et al.*, (2021) ou Rosetta™ 2 (Merck Millipore) para proteína Q5 de acordo com Santos *et al.*, (2020), e, logo em seguida, foi realizada uma seleção com cloranfenicol (34 µg / ml) e ampicilina (50 µg / ml). O cultivo de célula foi realizado em meio líquido Luria Bertane (LB) e a expressão de proteínas recombinantes foi induzida com a ajuda do isopropylthio-β-galactoside (IPTG) 0,5 mM em temperatura de 30°C. Os sedimentos celulares obtidos após a expressão, foram ressuspensos em 20 ml de tampão de lise e equilíbrio, e solubilizados por ultrassom, por 30 segundos, em 5 pulsos, com intervalos de um minuto, a 4° C. Para a purificação de proteínas, foi realizada uma incubação com resina de agarose Ni-NTA (Qiagen) e, logo depois, foram realizadas lavagens no mesmo tampão e também em um tampão desnaturante. A eluição, por sua vez, foi em tampão desnaturante a 1 M de imidazol, e a quantificação foi realizada pelo método de Bradford, com um rendimento aproximado de 1 mg/ ml (ZAIA, 1998). Todas as preparações proteicas foram visualizadas em 15% de SDS-PAGE corada com Comassie Blue R-250 e quantificadas adicionalmente por comparações com quantidades conhecidas de Albumina de soro bovino(BSA).

### **3.7.4 Caracterização dos antígenos Q5 e Lci2**

As quimeras são todas aquelas proteínas formadas pela união de diversos fragmentos de peptídeos, e podem ser consideradas promissoras quando aplicadas no diagnóstico da LV, devido ao aumento da sensibilidade e especificidade quando comparado com antígenos solúveis (SANTOS *et al.*, 2020).

As Lci são fragmentos de DNA que codificam as melhores regiões antigênicas de cada proteína e podem ser unidas para gerar genes quiméricos. Os genes dos antígenos Lci2, Lci3 e Lci12 foram planejados e aprimorados para expressão heteróloga em células eucarióticas, considerando a fase de leitura, frequência de códons, estrutura secundária do mRNA, conteúdo de GC e sítios de restrição (SANTOS *et al.*, 2020).

Dentre as Lci (Lci2, Lci3 e Lci12), a Lci2 é a que apresenta melhor resultado para o diagnóstico da LV. O antígeno Lci2 é uma proteína com origem nos segmentos iniciais e médio da Kinesina, do qual o antígeno rK39 é formado pelos últimos 46 resíduos da parte não repetitiva próxima ao domínio motor, inserido mais 242 aminoácidos dos segmentos repetitivos (SANTOS *et al.*, 2020). Sendo assim, a proteína quimérica Q5 foi desenvolvida com base nas proteínas Lci2, Lci3 e Lci12, que apresentam bom desempenho para diagnóstico da LV (SANTOS *et al.*, 2020).

### **3.7.5 ELISA com antígeno solúvel, antígeno Q5 e antígeno Lci2**

O ensaio de ELISA foi realizado por um protocolo *in house* no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM. Previamente, foram realizadas padronizações para determinar as condições ideais para a utilização do antígeno solúvel e das demais proteínas. Assim, controles positivos e negativos foram testados em triplicatas, em diferentes concentrações (100 ng, 200 ng, 400 ng, 600 ng), e foi escolhida a que apresentou a maior segregação entre os valores positivos e negativos.

Para a padronização da diluição do soro, foram testadas diferentes diluições: 1:450, 1:900, 1:1.800, 1:3.600. O mesmo procedimento foi realizado para a padronização do anticorpo anti-IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase, testados nas seguintes diluições: 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000.

As placas foram sensibilizadas com 100µL dos antígenos e das proteínas de interesse, a 600 ng/mL previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0.06 M pH 9,6 e incubadas por 4°C, por 18 horas, em câmara úmida. Logo depois, foram lavadas por 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7,2 contendo 0.05% de tween 20, e, posteriormente, foram adicionados 100 µL por poço das amostras de soros diluídos em 1:900 de PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0.05% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado.

Em seguida, foram acrescentados os controles positivos e negativos com as mesmas diluições das amostras e houve um novo ciclo de incubação e lavagens, como descrito anteriormente. Mais adiante, foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo anti-IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase (Calbiochem). Após o novo ciclo de incubação e lavagens, foram adicionados 150 µL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com o peróxido de hidrogênio. Passados os 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 100µL por poço de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Para a interpretação dos resultados, o *cutoff* foi calculado levando-se em consideração a média aritmética das absorbâncias das diluições dos controles negativos mais 2 vezes o desvio padrão. Diante disso, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram valores acima do *cutoff*.

### **3.7.6 ELISA com o antígeno rk39**

O ensaio de ELISA utilizando o antígeno rk39 (Rekom biotech RAG0061) foi realizado como descrito por Pedras *et al.* (2008). As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl por poço do antígeno a 5.000 ng/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Em seguida, as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C e lavadas cinco vezes com água destilada estéril. O bloqueio foi realizado com 100µL de albumina de soro bovino a 2% (BSA) em tampão PBS (pH 7,4) com 0,05% Tween-20 (PBS-BSA-T20) e incubadas por 1 h a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes. Os soros foram diluídos a 1:900 em tampão PBS-T20 e foram adicionadas 100µl em duplicatas para cada amostra. As placas foram incubadas novamente por 1 h a 37°C e, logo depois, lavadas cinco vezes. O anticorpo conjugado com peroxidase IgG anti-humano (Calbiochem) foi diluído a 1: 10.000 e adicionado (100µl / poço) nos poços. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C e, a posteriori, lavadas cinco vezes. Após a lavagem, foram adicionados 150µl de solução de OPD (cálculo como padrão ELISA), e, depois de 30 min, a placa foi lida a 490 nm em um leitor de microplaca.

### 3.7.7 Citometria de fluxo

#### 3.7.7.1 Obtenção das formas promastigotas fixadas de *L. infantum*

As formas promastigotas da cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/BH46) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's até a fase exponencial. Posteriormente, os parasitos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL e centrifugados (7 X g), a 25°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi recuperado após 10 minutos em repouso na temperatura ambiente, transferido para um tubo de 50mL e descartado o precipitado. Os parasitos foram lavados com salina tamponada 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por três vezes, a 4°C, 871 X g, durante 10 minutos, e o precipitado foi homogeneizado cuidadosamente. Para a fixação, o precipitado formado foi ressuscitado em solução fixadora MFF (10g de paraformaldeído, 10,2g de cacodilato de sódio, 6,65g de cloreto de sódio/L) e estocado 24h a 4°C. Uma alíquota contendo os parasitos da suspensão foi contada e a concentração ajustada para o ensaio de citometria de fluxo.

#### 3.7.7.2 Ensaio de citometria de fluxo (CF)

O ensaio de citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *L. infantum* foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002). Primeiramente, foi feita uma suspensão de parasitos ( $2,5 \times 10^5$ /poço) e, depois, eles foram incubados em placas de 96 poços, a 37°C, por 30 minutos com diferentes diluições do soro (1:64 a 1:32.768). Após a incubação dos soros, foram adicionados 45ul de uma suspensão de parasitos ( $5 \times 10^6$ /por poço) e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação com soros, os parasitos foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS-10% SFB (1000 X g por 10 minutos, a 4°C). Em seguida, ocorreu a incubação a 37°C, por 30 minutos protegidos da luz, na presença de anti-IgG humana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída 1:1200 in PBS-10% SFB. Depois da segunda lavagem, os parasitos marcados com FITC foram lavados e fixados com 200µL de solução fixadora e mantidos por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo de luz, até a leitura no citômetro de fluxo no equipamento FACS Calibur - Becton & Dickson usando Cell Quest Pro software.

### **3.7.8 Teste de aglutinação direta (DAT)**

O DAT foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL). O teste foi realizado em placas com fundo em V de 96 poços, e os soros foram diluídos de 1:50 a 1:51200. A leitura dos resultados foi realizada após uma incubação *overnight* em temperatura ambiente. A maior diluição em que a aglutinação foi visível determinou o título do DAT. Foram considerados positivos aqueles que tiveram titulação igual ou acima de 1:6400.

### **3.7.9 Concordância dos testes utilizando a medida de Kappa**

Para verificar se havia concordância entre os testes foi utilizada a medida de Kappa, que auxilia na identificação dos resultados concordantes. De acordo com Landis JR e Koch GG (1997), caso o resultado seja menor que zero, não há concordância entre os testes; caso seja entre 0 e 0.19, a concordância é ruim; caso seja entre 0.20-0.39, a concordância é classificada como razoável; caso seja entre 0.40-0.59, a concordância é moderada, caso seja entre 0.60-0.79, a concordância é classificada como considerável, e, por fim, caso seja entre 0.80-1.00, concordância é perfeita.

### **3.7.10 Análise estatística**

Para a CF, uma análise foi realizada para a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos em estudo. A fim de definir o ponto de corte, utilizamos o PFP (Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos) para diferenciar os resultados positivos e negativos. Foi construída a receiver operating characteristic curve – curva ROC, que foi estruturada com os valores de especificidade no eixo x e sensibilidade no eixo y. Todas as conclusões foram admitidas no nível de significância de 5%. As análises e os gráficos de CF e ELISA foram realizados no programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Os valores de concordância dos testes, assim como a sensibilidade e especificidade, foram calculados a partir do programa Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (OpenEpi) version 3.01.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS ELISA

Foi realizada uma padronização antes de todos os ensaios visando identificar a melhor concentração dos antígenos, soro e anticorpo a serem aplicadas. Estão apresentadas, nas próximas tabelas, as concentrações padronizadas para cada ensaio realizado.

Tabela 2 - Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio ELISA com antígeno solúvel

Variável	Concentração/ Diluição
Antígeno solúvel	600ng
Soro	1:900
Anticorpo Anti-igG	1:10.000

Fonte: Elaboração do autor (2022)

Tabela 3 - Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio ELISA com o antígeno Q5

Variável	Concentração/Diluição
Proteína Q5	600ng
Soro	1:900
Anticorpo Anti-igG	1:10.000

Fonte: Elaboração do autor (2022)

Tabela 4 - Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio ELISA com o antígeno rK39

Variável	Concentração
Antígeno rK39	5.000ng
Soro	1:900
Anticorpo Anti-igG	1:10.000

Fonte: Elaboração do autor (2022)

Tabela 5 - Concentrações e diluições padronizadas para o ensaio ELISA com o antígeno Lci2

Variável	Concentração/Diluição
Proteína Lci2	600ng
Soro	1:450
Anticorpo Anti-igG	1:5.000

Fonte: Elaboração do autor (2022)

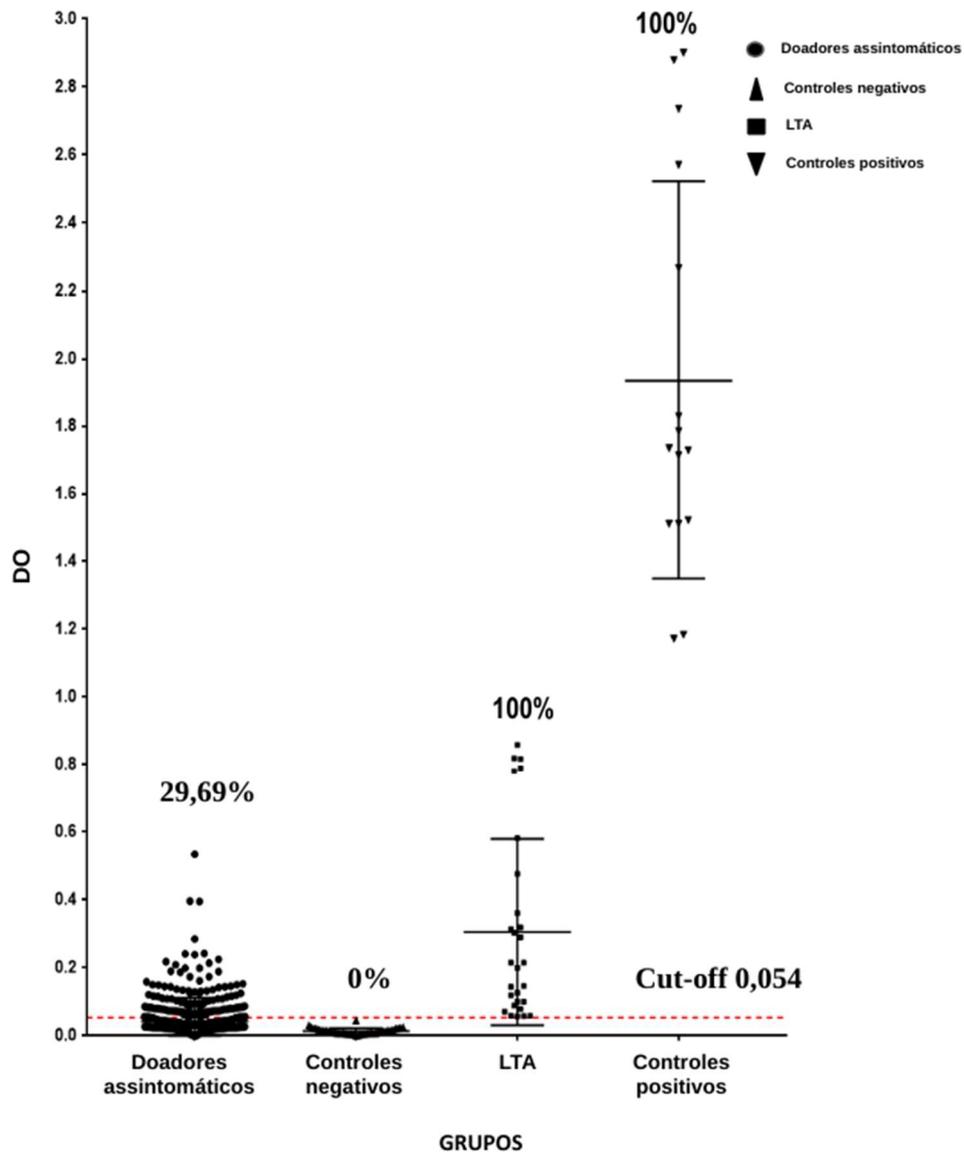
#### 4.2 SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NOS TESTES SOROLÓGICOS ELISA

Estão apresentados, nos próximos gráficos, os resultados de cada ensaio realizado com os antígenos testado. Cada gráfico apresenta o grupo de doadores testados, os assintomáticos, o grupo controle negativo e o grupo positivo para LTA.

Em todos os ensaios eram adicionados nas placas amostras positivas para controle e em nenhum dos ensaios realizados nunca as amostras positivas deram resultado negativos.

No gráfico 1 foi possível verificar que de todas as amostras de doadores analisadas, foi observado uma reatividade de 29,69% (147). Além disso, foi avaliada a reatividade cruzada, dos quais 100% (28) dos indivíduos com LTA avaliados também obtiveram positividade para LV.

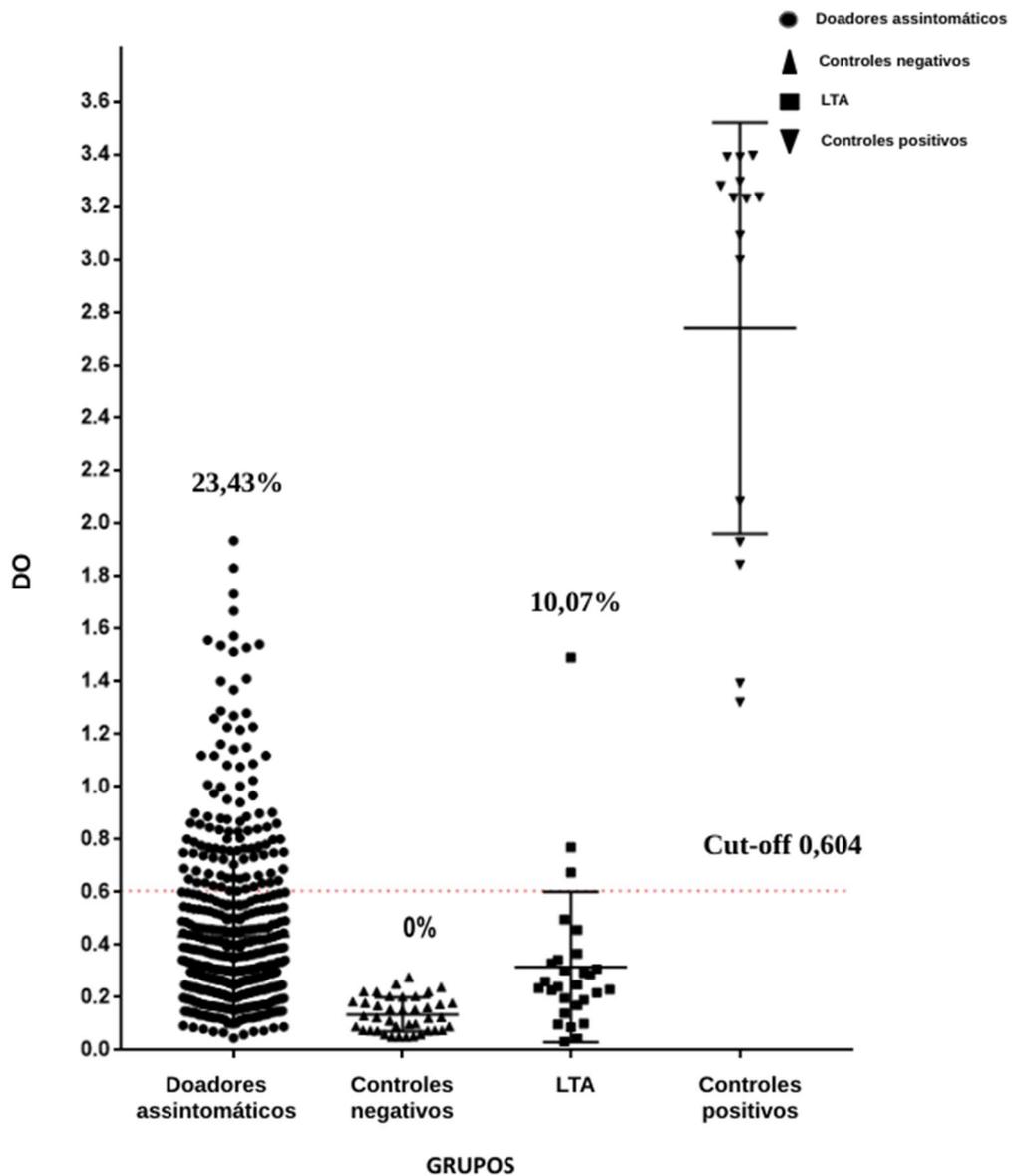
Gráfico 1 - Soroprevalência por ELISA convencional utilizando antígeno solúvel e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana



Fonte: Elaboração do autor (2022)

No gráfico 2, temos os resultados do ELISA utilizando o antígeno Q5. É possível observar que 23,43% (116) dos 495 doadores apresentaram positividade para LV, enquanto a reatividade cruzada com as amostras de LTA foi de 10,07% (3).

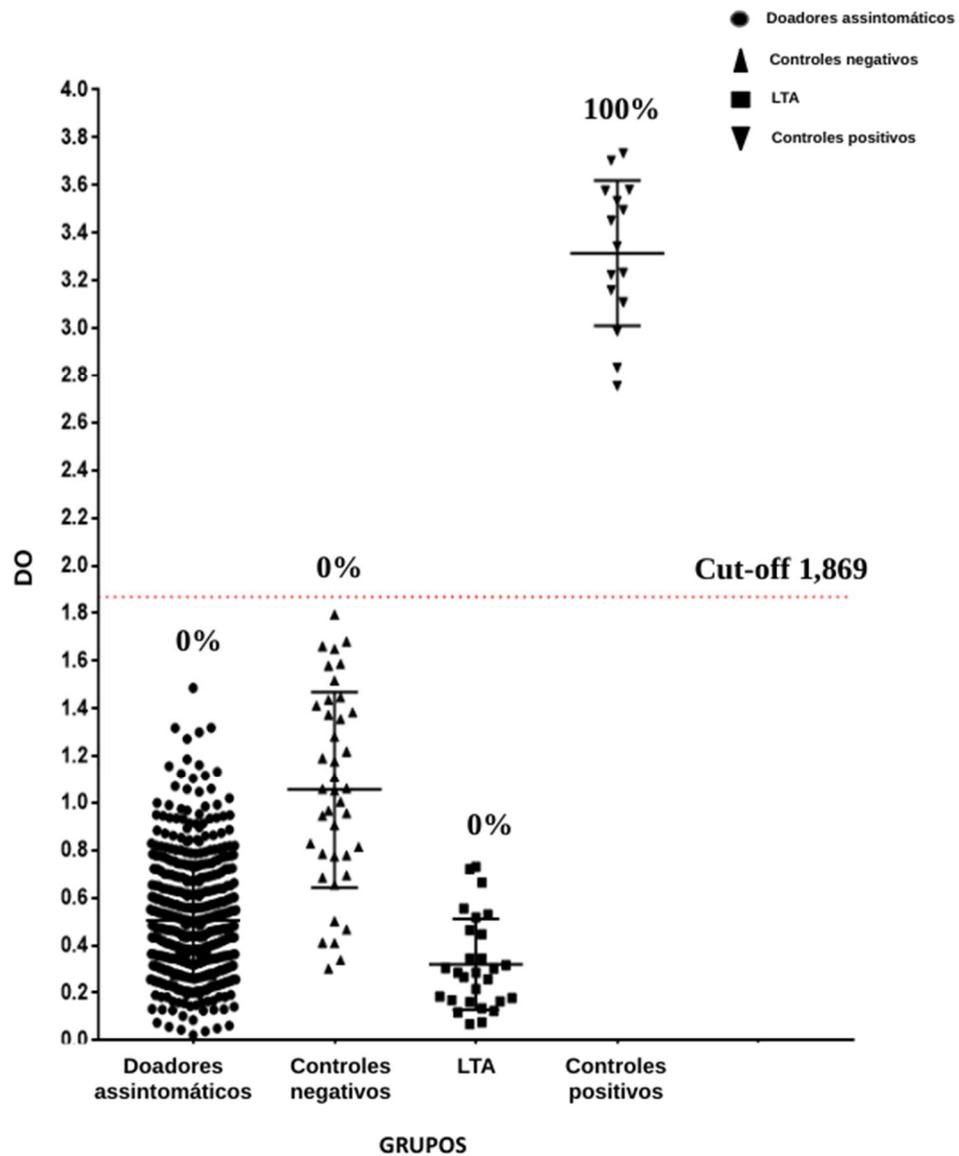
Gráfico 2 - Soroprevalência por ELISA recombinante utilizando o antígeno Q5 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana



Fonte: Elaboração do autor (2022)

O ELISA com antígeno rK39 não obteve um bom desempenho em relação à busca por doadores de sangue assintomáticos. O ensaio de ELISA utilizando o antígeno rK39 não apresentou positividade para nenhum indivíduo do grupo de 495 doadores. Frente à avaliação da reatividade cruzada, também não houve positividade para o grupo de LTA. Esses resultados podem ser observados no gráfico 3.

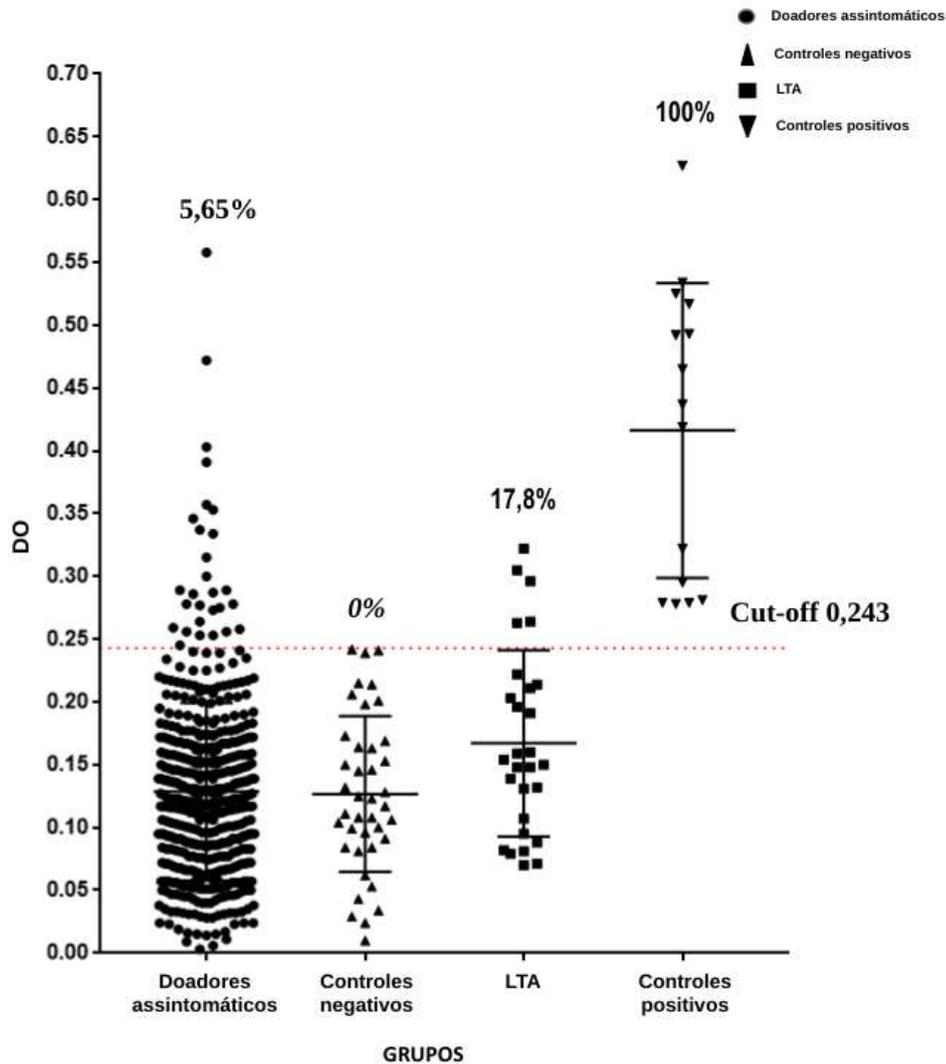
Gráfico 3 - Soroprevalência por ELISA recombinante utilizando o antígeno rk39 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana (LTA)



Fonte: Elaboração do autor (2022)

E no gráfico 4, é possível visualizar os resultados do teste ELISA, utilizando o antígeno Lci2. Dos 495 doadores, 5,65% (28) reagiram no teste. No teste de reação cruzada para LTA, 17,8% (5) positivaram, como observado no gráfico.

Gráfico 4- Soroprevalência por ELISA utilizando o antígeno Lci2 e avaliação da reatividade cruzada com leishmaniose tegumentar americana (LTA)

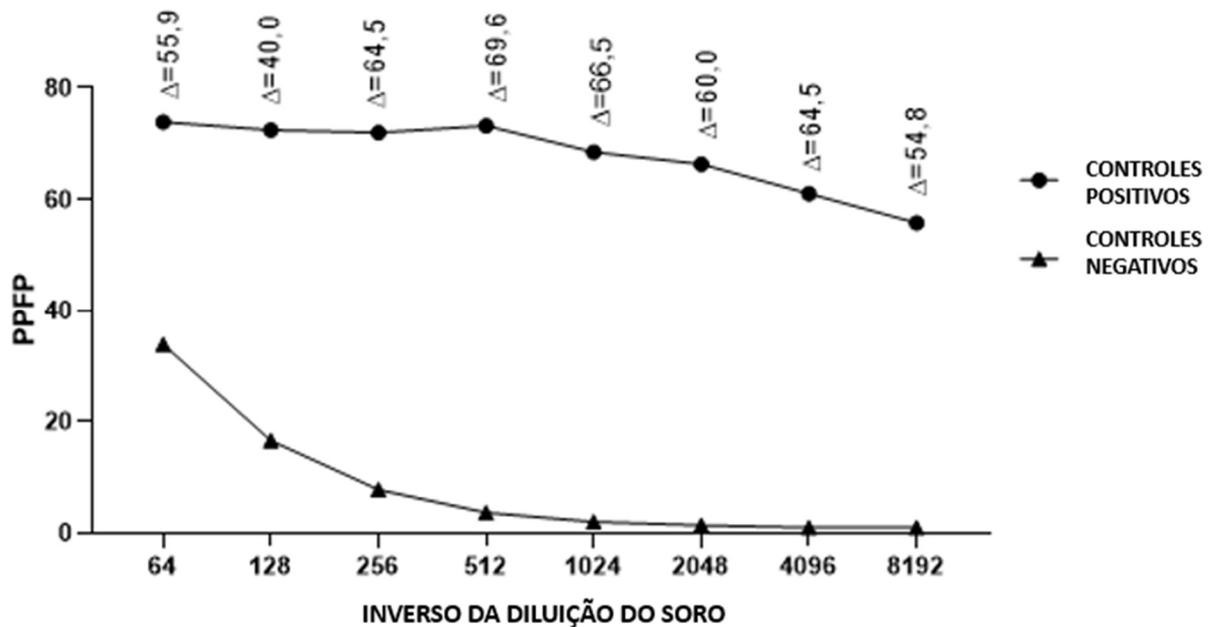


Fonte: Elaboração do autor (2022)

#### 4.3 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para a padronização dos ensaios, foram utilizadas amostras de soro na diluição 1:512, como é possível observar no Gráfico 5. Destaca-se que essa foi a diluição em que ocorreu uma maior variação entre os valores de Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) dos controles negativos e positivos. Essas diluições foram definidas por protocolo *in house* já estabelecido.

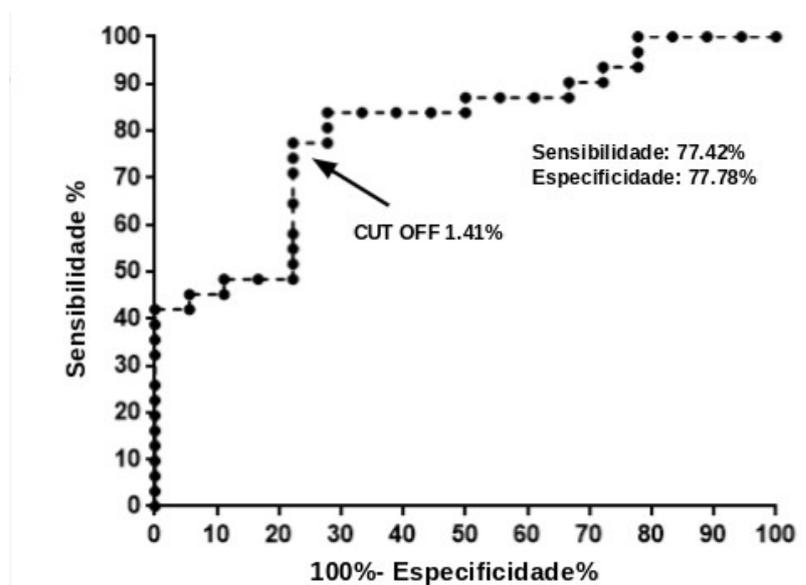
Gráfico 5 - Padronização da diluição do soro para o ensaio da citometria de fluxo



Fonte: Elaboração do autor (2022)

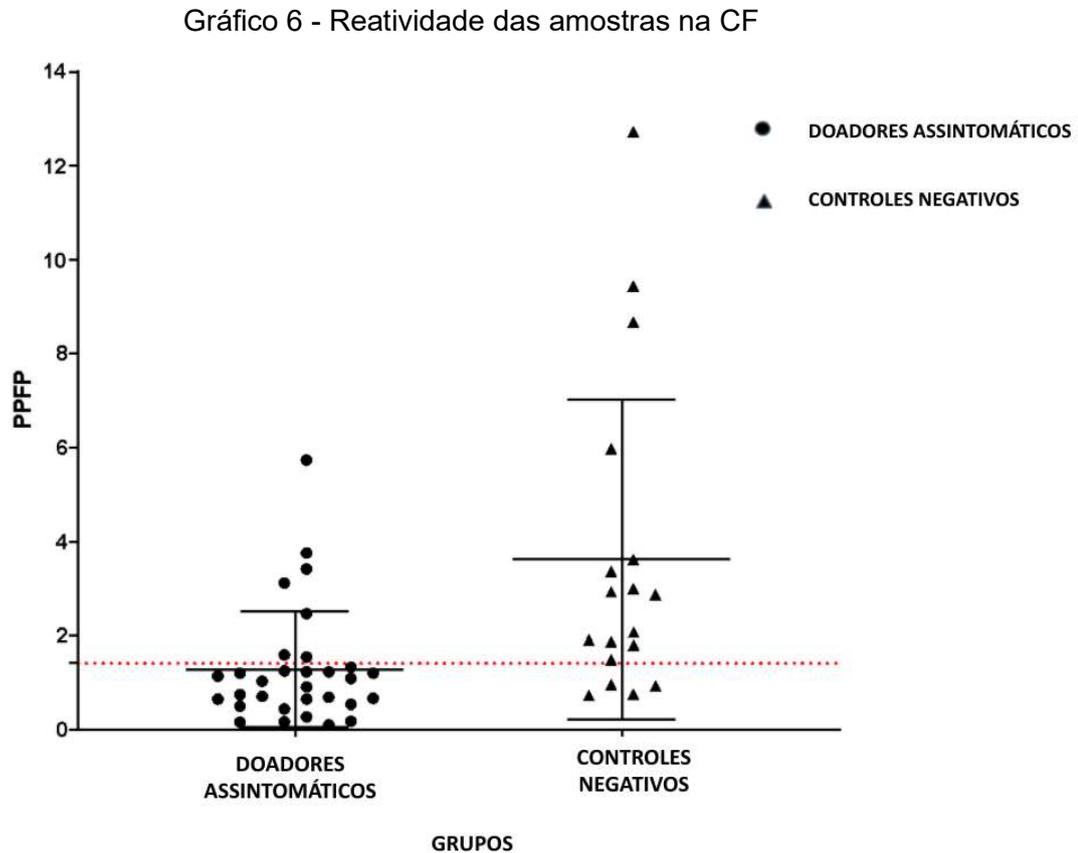
Em seguida, foi calculado o *cutoff* por meio da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*). Para isso, foram usados os valores de PPFP das amostras de controle de pacientes saudáveis e dos indivíduos assintomáticos. Os resultados da curva ROC mostraram que o *cutoff* ideal foi de 1,41% (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Curva ROC



Fonte: Elaboração do autor (2022)

Assim, apenas 2,17% (7) das 31 amostras positivaram no grupo de assintomáticos e 77,77 % (14) reagiram no grupo dos controles negativos, como apresentado no Gráfico 6.



Fonte: Elaboração do autor (2022).

#### 4.4 TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA COM AMOSTRAS DE PACIENTES ASSINTOMÁTICOS

O teste de aglutinação direta foi realizado com o intuito de verificar o desempenho quando usado em pacientes assintomáticos. Foram submetidas as mesmas 31 amostras aplicadas no teste da CF. Como resultado, apenas 9,7% (3) de todas as 31 amostras positivou, tal como está presente na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do teste de aglutinação direta quando aplicado em amostras de assintomáticos

Paciente	Resultado	Título	Paciente	Resultado	Título
1	Positivo	1/6400	17	Negativo	1/3200

<b>2</b>	Negativo	1/3200	<b>18</b>	Negativo	1/3200
<b>3</b>	Negativo	1/3200	<b>19</b>	Negativo	1/3200
<b>4</b>	Positivo	1/6400	<b>20</b>	Negativo	1/3200
<b>5</b>	Negativo	1/3200	<b>21</b>	Negativo	0
<b>6</b>	Negativo	1/3200	<b>22</b>	Negativo	1/3200
<b>7</b>	Negativo	1/3200	<b>23</b>	Negativo	1/3200
<b>8</b>	Negativo	0	<b>24</b>	Negativo	1/3200
<b>9</b>	Negativo	0	<b>25</b>	Negativo	1/3200
<b>10</b>	Negativo	1/3200	<b>26</b>	Negativo	1/3200
<b>11</b>	Negativo	0	<b>27</b>	Negativo	1/3200
<b>12</b>	Negativo	0	<b>28</b>	Negativo	0
<b>13</b>	Negativo	1/3200	<b>29</b>	Negativo	0
<b>14</b>	Negativo	1/3200	<b>30</b>	Negativo	0
<b>15</b>	Negativo	1/3200	<b>31</b>	Positivo	1/12.800
<b>16</b>	Negativo	1/3200			

Fonte: Elaboração do autor (2020)

#### 4.5 FREQUÊNCIA DOS TESTES SOROLÓGICOS FRENTE AO GRUPO DE 31 DOADORES ASSINTOMÁTICOS

Para uma melhor análise de dados, foi executado o cálculo da frequência dos testes dos grupos CF, DAT, ELISA com antígeno bruto, ELISA com o antígeno Q5, ELISA com o antígeno rK39 e ELISA com o antígeno Lci2, no qual objetivou identificar a frequência dos casos nas amostras coletadas. A tabela 7 sumariza todos os achados da análise realizada.

Gráfico 7 – Frequências dos testes sorológicos CF, DAT, ELISA convencional com antígeno solúvel e ELISA com os antígenos recombinantes Q5, Lci2 e o rK39

	<b>Falso negativo</b>	<b>Verdadeiro positivo</b>	<b>Verdadeiro negativo</b>	<b>Falso positivo</b>
<b>CF</b>	77,4%	22,6%	22,4%	77,7%
<b>DAT</b>	90,3%	9,1%	100%	0%

<b>ELISA antígeno solúvel</b>	77,4%	22,6%	100%	0%
<b>ELISA Q5</b>	87,1%	12,7%	100%	0%
<b>ELISA rK39</b>	100%	0%	100%	0%
<b>ELISA Lci2</b>	93,4%	6,4%	100%	0%

Fonte: Elaboração do autor (2022)

Como pode ser visto, analisando os gráficos, que totalizam 31 casos cada, destaca-se a seguinte configuração de resultados: na citometria de fluxo, 22,6% (7) foram verdadeiramente positivos, 77,4% (24) foram falsos negativos. No grupo controle negativo, 77,7% (14) foram falsos positivos e 22,2% (4) foram verdadeiramente negativos.

No teste DAT, em nosso estudo no grupo de assintomáticos, 90,3% (28) foram falsos negativo e apenas 9,7% (3) foram verdadeiros positivos. No grupo controle negativo, todos os 100% dos 18 casos foram verdadeiros negativos.

O ELISA com o antígeno solúvel teve, no grupo de assintomáticos, 77,4% (24) falsos negativos e 22,6% (7) verdadeiros positivos, e 100% (18) do grupo se apresentaram como verdadeiro negativo. No ELISA com o antígeno Q5, do grupo de assintomáticos, 87,1% (27) foram falsos negativos e apenas 12,7% (4) verdadeiros positivos no grupo controle nenhuma das 18 amostras positivaram. Já o ELISA com rK39, no grupo de assintomáticos, 100% (31) foram falsos negativos e no grupo controle negativo 100% (18) foram verdadeiros negativos. E por último o ELISA com o antígeno Lci2, 6,45% (2) foram verdadeiros positivos e 93,54% (29) falsos negativos, no grupo controle negativo todas as amostras permaneceram negativas. Com esses valores, foi possível, calcular a sensibilidade e a especificidade de cada teste.

### **6.5.1 Sensibilidade e especificidade dos testes CF, DAT, ELISA com antígeno solúvel, ELISA com a proteína Q5, ELISA com o antígeno rK39 e ELISA com a proteína Lci2**

Para uma melhor compreensão dos resultados, foram calculadas a sensibilidade e especificidade de cada teste. A sensibilidade vai é a capacidade de o teste apresentar resultado positivo em uma população sabidamente com a doença,

já a especificidade é a capacidade do teste apresentar resultado negativo em indivíduos saudáveis.

Tabela 8: Sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no estudo

	FC	DAT	ELISA Antígeno Solúvel	ELISA Q5	ELISA rK39	ELISA Lci2
<b>Sensibilidade</b>	22,58%	9,67%	22,58%	12,9%	0,0%	6,45%
<b>Especificidade</b>	22,22%	100%	50,0%	91,67%	100%	86,11%

Fonte: Elaboração do autor (2022)

#### 4.6 CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DO ASSINTOMÁTICO NA POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE.

Após todas as análises verificou-se que não houve concordância entre os testes. Os resultados laboratoriais de cada teste de forma individual estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados laboratoriais de 31 casos de infecção assintomática por *L. Infantum* em doadores de sangue.

Paciente	Citometria de fluxo (>1.41 %PPFP)	DAT (Título >1/12.800)	ELISA Antígeno bruto (Absorbância 490nm/ cutoff 0,054)	ELISA Q5 (Absorbância-490nm/ cutoff 0,604)	ELISA rK39 (Absorbância-490nm/cutoff 1,881)	ELISA Lci2 (Absorbância-490nm/cutoff 0,243)
1	Negativo (0,16)	Positivo (1/6400)	Negativo (0,008)	Negativo (0,398)	Negativo (0,893)	Negativo (0,215)
2	Negativo (0,27)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,027)	Negativo (0,500)	Negativo (0,551)	Negativo (0,184)
3	Negativo (0,17)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,071)	Negativo (0,300)	Negativo (0,536)	Negativo (0,181)
4	Negativo (0,69)	Positivo (1/6400)	Negativo (0,001)	Positivo (0,844)	Negativo (0,744)	Negativo (0,076)
5	Negativo (1,03)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,027)	Negativo (0,278)	Negativo (0,745)	Negativo (0,033)
6	Negativo (1,14)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,022)	Negativo (0,326)	Negativo (1,046)	Negativo (0,032)
7	Negativo (0,10)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,001)	Negativo (0,445)	Negativo (0,663)	Negativo (0,170)

8	Negativo (0,18)	Negativo (0)	Negativo (0,001)	Negativo (0,526)	Negativo (0,505)	Negativo (0,183)
9	Positivo (5,74)	Negativo (0)	Negativo (0,004)	Negativo (0,453)	Negativo (0,844)	Negativo (0,167)
10	Negativo (1,09)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,002)	Negativo (0,240)	Negativo (0,328)	Negativo (0,083)
11	Negativo (0,44)	Negativo (0)	Negativo (0,007)	Negativo (0,349)	Negativo (0,873)	Negativo (0,158)
12	Negativo (0,65)	Negativo (0)	Negativo (0,009)	Negativo (0,152)	Negativo (0,467)	Negativo (0,214)
13	Positivo (2,47)	Negativo (1/3200)	Negativa (0,024)	Negativo (0,267)	Negativo (0,775)	Negativo (0,153)
14	Negativo (0,45)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,019)	Negativo (0,297)	Negativo (0,505)	Negativo (0,137)
15	Positivo (3,42)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,001)	Negativo (0,296)	Negativo (0,156)	Negativo (0,029)
16	Positivo (3,76)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,032)	Positivo (0,643)	Negativo (0,334)	Negativo (0,045)
17	Positivo (3,12)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,099)	Negativo (0,279)	Negativo (0,786)	Negativo (0,165)
18	Negativo (0,91)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,038)	Negativo (0,084)	Negativo (0,129)	Negativo (0,158)
19	Negativo (0,67)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,057)	Negativo (0,271)	Negativo (0,273)	Negativo (0,171)
20	Positivo (1,59)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,045)	Negativo (0,281)	Negativo (0,203)	Negativo (0,143)
21	Positivo (1,55)	Negativo (0)	Negativo (0,003)	Negativo (0,308)	Negativo (0,478)	Negativo (0,123)
22	Negativo (1,20)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,055)	Negativo (0,299)	Negativo (0,464)	Negativo (0,167)
23	Negativo (1,23)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,055)	Negativo (0,224)	Negativo (0,247)	Negativo (0,052)
24	Negativo (0,54)	Negativo (1/3200)	Negativo (0,025)	Negativo (0,551)	Negativo (0,440)	Negativo (0,117)
25	Negativo (1,33)	Positivo (1/12.800)	Negativo (0,034)	Negativo (0,202)	Negativo (0,720)	Positivo (0,277)
26	Negativo (0,54)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,089)	Negativo (0,278)	Negativo (0,281)	Negativo (0,123)
27	Negativo (0,65)	Negativo (1/3200)	Positivo (0,078)	Positivo (1,258)	Negativo (0,613)	Positivo (0,256)
28	Negativo (0,50)	Negativo (0)	Negativo (0,037)	Negativo (0,326)	Negativo (0,232)	Negativo (0,102)
29	Negativo (0,71)	Negativo (0)	Positivo (0,062)	Negativo (0,426)	Negativo (0,131)	Negativo (0,095)

30	Negativo (1,23)	Negativo (0)	Negativo (0,039)	Positivo (1,555)	Negativo (0,354)	Negativo (0,163)
31	Negativo (1,20)	Negativo (0)	Negativo (0,038)	Negativo (0,425)	Negativo (0,355)	Negativo (0,090)

---

**Fonte:** Elaboração do autor (2020)

## 5 DISCUSSÃO

A Leishmaniose visceral é uma infecção de caráter zoonótico e amplamente distribuída pelo mundo (WILHELM, 2020). No Brasil, foram notificados 18.274 casos e 1.195 mortes por LV entre os anos de 2010 e 2014, atingindo 6,5% o coeficiente de letalidade (BRASIL, 2019). E no ano de 2019 o Brasil foi o responsável por 97% das notificações nas Americas (SAÚDE, 2021).

Devido a essas notificações, se faz necessária a aplicação de medidas mais eficientes para o controle, evitando, assim, as altas taxas de mortalidade (YESHAW *et al.*, 2020). Um diagnóstico preciso e precoce é uma das melhores medidas aplicadas para combater a doença (LÉVÊQUE *et al.*, 2020), visto que, em lugares endêmicos, grande parte dos infectados apresenta a doença na forma assintomática (MAGILL *et al.*, 2015; MURRAY *et al.*, 2005).

A temática a ser discutida é que um indivíduo assintomático pode ser um candidato a doação de sangue e, conseqüentemente, um potencial transmissor do agente causador da doença (SILVA *et al.*, 2020). Nesse contexto, estimar a soroprevalência em uma região endêmica é importante para direcionar medidas que atuem no controle da LV, elucidar as lacunas do conhecimento existentes nessa população. Para isso, foi realizada a análise laboratorial em amostras de sangue de doadores por diferentes técnicas sorológicas.

Novos resultados foram destacados neste estudo e foi observado que as técnicas utilizadas apresentaram desempenhos diferentes. Uma possibilidade de corrigir isso é associar mais de uma técnica para a obtenção de um diagnóstico preciso, como demonstrado no estudo de ASFARAM *et al.* (2017) onde se verificou a prevalência global da infecção por *Leishmania* entre doadores de sangue. A seguir, discutimos detalhadamente todos os resultados.

No teste ELISA com o antígeno solúvel, observamos uma soroprevalência de 29,69%. No entanto, ressaltamos que alguns estudos apontam a ocorrência de reatividade cruzada quando essa categoria de antígeno é utilizada (SANTOS *et al.*, 2012; SRIVIDYA *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2011; CABELLERO *et al.*, 2007). Até existem estudos que aplicaram esse antígeno para o diagnóstico da LTA (DEEPACHANDI *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2018). Justificando e corroborando os nossos resultados, marcados pela ocorrência de uma positividade expressiva com as amostras positivas para LTA 100%, que para bancos de sangue é muito importante.

O desempenho final do teste ELISA com o antígeno solúvel neste estudo respalda outro estudo, como o de Porcino *et al.* (2019), no qual, em um grupo de 115 indivíduos, 13% reagiram no teste. Outro estudo também semelhante confirma que a utilização do antígeno solúvel deixa o teste mais sensível (FUKUTANI *et al.*, 2014). Já um estudo realizado na Índia indica que, para aumentar a capacidade de identificação do assintomático, o ideal é a combinação de mais de um teste (KAUSHAL *et al.*, 2017).

Seguindo os objetivos desse trabalho, o segundo passo foi avaliar o desempenho do teste ELISA com antígeno Q5. Foi observado uma baixa reatividade das amostras quando comparadas com o desempenho do antígeno solúvel, porém, na avaliação da reação cruzada, o ensaio se mostrou mais específico. O uso de antígenos recombinantes, como Q5 é promissor, visto que a sensibilidade do teste pode chegar a 85% e a especificidade a 100% (SANTOS *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020). Maia *et al.* (2008) já haviam descrito que os antígenos recombinantes têm uma maior especificidade do que os antígenos solúveis. Assim, o uso de novos antígenos, como o Q5 surgem como alternativa (MACHADO *et al.*, 2020).

Quando aplicado o ELISA com o antígeno Lci2, foram observados que apenas 5,65% do grupo de doadores reagiram ao teste. O antígeno Lci2 ainda é pouco estudado, porém, é promissor, como apresentado no estudo de Ramos *et al.* (2021), que realizaram uma comparação entre a Lci2 e a rK39 no diagnóstico da co-infecção LV/HIV e no qual foi demonstrado que a Lci2 apresentou uma sensibilidade de 98%. Esse resultado corrobora o nosso, porque a Lci2 apresentou um melhor desempenho quando comparada com o antígeno rK39.

Diferentemente dos testes anteriores, o ELISA com o antígeno rK39 teve reação apenas nas amostra de controle positivo, os restantes das amostras foram 100% não reagentes, o que diverge de outros estudos, como o de Hasker *et al.* (2013), em que o rK39 foi aplicado em 741 indivíduos de uma área não endêmica e, destes, 5,9% reagiram no teste, sugerindo uma infecção assintomática. No estudo citado, é destacado que a reação aumentou conforme a idade do paciente, e uma das justificativas para isso é que a pessoa com mais idade pode ter sido mais exposta ao parasito. A relação da positividade conforme a idade também é relatada no estudo de Biglino *et al.* (2010). Outros estudos, relacionam os altos títulos do rK39 com a progressão da doença (CHAPMAN *et al.*, 2015; HASKER *et al.*, 2014). Chakravarty *et*

*al.* (2019) afirmam que os assintomáticos com uma titulação alta merecem atenção, dado que apresentam a probabilidade de desenvolverem a doença.

Como visto nos resultados deste trabalho, a positividade de amostras para LTA só não esteve presente quando utilizado o antígeno rK39, nos demais houve reação. Esse resultado é muito importante se tratando de banco de sangue, pois no estudo de Braga *et al.* (2015) foi analisado a presença de anticorpos de *anti-L. braziliensis* em 176 doadores de sangue e, deste grupo estudado, 11,4% foram positivos, reforçando a necessidade de compreender o risco da transmissão da LTA, assim como o da LV.

Para uma melhor caracterização dos resultados aqui aparentados, foi avaliado o desempenho dos testes sorológicos, citometria de fluxo e teste de aglutinação direta frente as 31 amostras de doadores assintomáticos. Por não haver um padrão ouro para a identificação de assintomáticos, essas amostras foram selecionadas por meio de testes moleculares por Silva *et al.* (2020). Vale destacar que a qPCR é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LV (SAKKAS *et al.*, 2016; GALUZZI *et al.*, 2011).

Diversos testes sorológicos podem ser aplicados para o diagnóstico da LV no Brasil, apesar do conhecimento sobre o desempenho deles ainda ser muito restrito (FREIRE *et al.*, 2019). Assim, as amostras de assintomáticos deste trabalho foram submetidas ao teste DAT, que é considerado de bom desempenho para diagnóstico da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Estudos como o de Chappuis *et al.* (2006) destacaram que, para o diagnóstico da LV, a sensibilidade desse teste pode atingir 94,8%, mas apresenta baixa sensibilidade quando o objetivo é identificar infecções passadas ou subclínicas (GRACEZ *et al.*, 1996). O que pode justificar os resultados desta pesquisa, visto que apenas 9,7% (3) amostras positivaram, ficando a sensibilidade em 6,45% CHAKRAVARTY *et al.* (2019) relacionam, ainda, as amostras positivas com uma possível progressão da doença.

Considerada um teste de alto desempenho, a CF apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicada em diferentes tipos de amostras (NOLLAN; CONDELLO, 2013; MCKINNON; KATHERINE, 2018; KER *et al.*, 2019). Porém, ao analisar todos os resultados, observou-se que a sensibilidade foi de 22,58% e especificidade de 22,22%. Em amostras de pacientes sintomáticos, a CF apresenta bons resultados na sensibilidade (SILVA *et al.*, 2019), e estudos como os de Silveira *et al.*, (2018) até apresentam resultados promissores na identificação de assintomáticos, porém, o estudo foi realizado em cães. Destaca-se que a presente

pesquisa é pioneira na aplicação da CF para a identificação de assintomáticos, por isso, até então, conclui-se que a CF demonstrou-se ineficaz em amostras de assintomáticos.

Quanto ao desempenho do ELISA com antígeno solúvel, antígeno Q5, rK39 e Lci2, foi obtida uma sensibilidade de 22,58% utilizando o antígeno solúvel, 12,9% quando utilizado o antígeno Q5, sensibilidade de 0% para o antígeno rK39 e 6,25% para o antígeno Lci2.

Quando foram comparados os resultados dos testes, foram observados desempenhos divergentes, porque cada teste tem uma diferente sensibilidade e especificidade. Deve-se destacar, então, que, por se tratar da forma assintomática, as respostas humoral e celular podem ser baixas, dificultando o resultado (RIERA *et al.*, 2004; GADISA *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2018). Devido a essa dificuldade, até o momento, a melhor forma de identificar, na população, o assintomático é a combinação de mais de uma técnica de diagnóstico (IBARRA-MENESES *et al.*, 2017).

Neste estudo, obteve-se uma porcentagem de indivíduos assintomáticos realizando a doação de sangue e isso confere um grande risco para o banco de sangue, visto que pouco se sabe a respeito do papel desse assintomático no processo de transmissão (JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2016; JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2018). Para uma melhor compreensão dos aspectos gerais da infecção assintomática, seria interessante acompanhar esse assintomático identificado (ROMERO *et al.*, 2009).

Sabendo que o Brasil é um dos países que mais concentra casos da doença (FAUCHER *et al.*, 2011), é importante uma triagem laboratorial eficiente para a detecção da forma assintomática da doença, a qual está relacionada ao objetivo deste estudo. Ainda com o objetivo de garantir a segurança dos envolvidos no processo de doação, alguns estudos aconselham a aplicação de métodos de inativação do parasito nas bolsas de sangue (ORTALLI *et al.*, 2019), e outros estudos sugerem a aplicação de filtros de leucodepleção para barreira (MANSUETO *et al.*, 2014; ASFARAM *et al.*, 2017).

Devido ao grande número de notificações da doença e às dúvidas referentes ao papel do assintomático no banco de sangue, são necessários mais estudos que abordem essa temática, como exemplo o desenvolvimento de novos antígenos recombinantes ou até mesmo novas técnicas de diagnóstico, tornando, assim, o processo de doação de sangue mais seguro e trazendo uma melhor compreensão a respeito do papel desse assintomático na população.

## 6 CONCLUSÕES

- a) A prevalência de indivíduos assintomáticos utilizando o antígeno solúvel foi de 30,69%
- b) A prevalência de indivíduos assintomáticos utilizando antígenos recombinantes foi de 23,43% para o antígeno Q5, 5,65% para o antígeno Lci2 e 0% para o antígeno rK39.
- c) As técnicas citometria de fluxo, ELISA com antígeno solúvel, ELISA com antígeno Q5, ELISA com antígeno rK39 e ELISA com antígeno Lci2 não apresentaram desempenho satisfatório em identificar indivíduos assintomáticos triados pelo diagnóstico molecular
- d) Os antígenos recombinantes como Q5 e Lci2 podem ser utilizados em combinação com técnicas sorológicas convencionais de LV para a triagem de indivíduos assintomáticos para LV.

## REFERÊNCIAS

- ABASS, E. *et al.* Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLoS ONE**, 2015.
- ABEIJON, C. *et al.* Urine-based antigen detection assay for diagnosis of visceral leishmaniasis using monoclonal antibodies specific for six protein biomarkers of *Leishmania infantum* / *Leishmania donovani*. **PLoS neglected tropical diseases**, 2020. v. 14, n. 4, p. e0008246.
- ADRIAENSEN, W. *et al.* Serum Levels of Soluble CD40 Ligand and Neopterin in HIV Coinfected Asymptomatic and Symptomatic Visceral Leishmaniasis Patients. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2018.
- ALBORZI, A. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, 2012. v. 3, n. APR, p. 1–13.
- ALIAGA, L. *et al.* Asymptomatic *Leishmania* infection in blood donors from the Southern of Spain. **Infection**, 2019.
- ALAVR Jorge *et al.* “Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.” *PloS one* vol. 7,5: e3567, (2012)
- ALVARENGA, D. G. De *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade Visceral leishmaniasis : retrospective study on factors associated with lethality. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2010.
- ALVES, W. A.; FONSECA, D. S. Leishmaniose visceral humana: Estudo do perfil clínico-epidemiológico na região leste de Minas Gerais, Brasil. **Journal of Health & Biological Sciences**, 2018.
- ANAM, K. *et al.* Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-Azar patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 1999.
- ANTINORI, S. *et al.* **Leishmaniasis among organ transplant recipients. The Lancet Infectious Diseases.**
- ASCHALE, Y. *et al.* Malaria-visceral leishmaniasis co-infection and associated factors among migrant laborers in West Armachiho district, North West Ethiopia: Community based cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, 2019.
- Asfaram, Shabnam *et al.* “Global status of visceral leishmanial infection among blood donors: A systematic review and meta-analysis.” **Transfusion and apheresis**

**science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis** vol. 56,5 , 2017

ASHFORD, R. W. *et al.* Control of the leishmaniasis. [S.l.]: [s.n.], 2008.

AYELIGN, B. *et al.* Validation of in-house liquid direct agglutination test antigen: The potential diagnostic test in visceral Leishmaniasis endemic areas of Northwest Ethiopia. **BMC Microbiology**, 2020.

ALMEIDA LEAL, G. G. DE *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, 2014.

ARAÚJO, F. M. R. DE; OLIVEIRA FELICIANO, K. V. DE; MEDEIROS MENDES, M. F. DE. Aceitabilidade de doadores de sangue no hemocentro público do Recife, Brasil. **Ciencia e Saude Coletiva**, 2011.

ARAÚJO, F. M. R. DE *et al.* Doadores de sangue de primeira vez e comportamento de retorno no hemocentro público do Recife. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2010.

BADARO, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, 1986.

BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. **Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**.

BARBOSA, I. R. *et al.* Aspectos Da Coinfecção Leishmaniose Visceral E Hiv No Nordeste Do Brasil. **Revista Baiana de Saúde Pública**, 2013.

BARBOSA, R. N. P. *et al.* Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 2010.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. **Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. British Medical Bulletin**.

BELATO, D. *et al.* Perfil dos doadores e não doadores de sangue de um município do sul do Brasil. **Revista de Enfermagem da UFSM**, 2011. v. 1, n. 2, p. 164.

BERN, C. *et al.* The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2007.

BEST, I. *et al.* IFN- $\gamma$  response is associated to time exposure among asymptomatic immune responders that visited American Tegumentary Leishmaniasis endemic areas in Peru. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018.

BIGLINO, A. *et al.* Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. **Journal of Clinical Microbiology**, 2010.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; CASTELLUCCI, L. C. Human genetics of leishmania infections. **Human Genetics**, . v. 139, n. 6, p. 813–819. 2020.

BLOCH, E. M.; VERMEULEN, M.; MURPHY, E. Blood Transfusion Safety in Africa: A Literature Review of Infectious Disease and Organizational Challenges. **Transfusion Medicine Reviews**, 2012.

BOELAERT, M. *et al.* Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KATex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008.

BOELAERT, M. *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2004.

BOTANA, Laura *et al.* "Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease." **PLoS neglected tropical diseases** vol. 15,8 e0009662. 2 Aug. 2021

BRAGA, Lais de Souza *et al.* . Presence of anti-Leishmania (Viannia) braziliensis antibodies in blood donors in the West-Central region of the State of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 48, n. 5, p. 622-625, Oct. 2015 .

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <<http://ci.nii.ac.jp/naid/130001170738>>.

BURNS, J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis (repetitive epitope/motor protein/parasite/diagnosis). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. [S.l.]: [s.n.], 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.523 p.

CABALLERO, Z. C. *et al.* Evaluation of serological tests to identify Trypanosoma cruzi infection in humans and determine cross-reactivity with Trypanosoma rangeli and Leishmania spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2007.

CARVALHO, A. M. R. S. *et al.* New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. **PLoS ONE**, 2018.

CHAKRAVARTY, J. *et al.* Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018.

CHAPMAN, L. A. C. *et al.* Age trends in asymptomatic and symptomatic Leishmania donovani infection in the Indian subcontinent: A review and analysis of data from diagnostic and epidemiological studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018.

CHAPPUIS, F. *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, 2006.

Chappuis, François *et al.* "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?." **Nature reviews. Microbiology** vol. 5,11, 2007.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011.

COURA-VITAL, W. *et al.* Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Journal**, 2011.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, 2002.

CARVALHO, F. L. N. DE *et al.* Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**, 2018.

CARVALHO, M. R. DE *et al.* Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, 2007.

DALTRO, R. T. *et al.* Cross-Reactivity Using Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens: Diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis are coendemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 8. 2019.

DANTAS-TORRES, F. **Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. Revista de Saude Publica.**

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniasis control in the context of one health. **Emerging Infectious Diseases**, 2019.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**.vol. 35,2 97-101.2019.:

American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, 2013.

DE PAIVA\_CAVALCANTI, Milena *et al.* "Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools." **Cell & bioscience** vol. 5 31. 17 Jun. 2015

DENIAU, M. *et al.* **The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. Annals of Tropical Medicine and Parasitology.**

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: A case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 2006.

DEEPACHANDI, Bhagya *et al.* "Prevalidation of an ELISA for Detection of a New Clinical Entity: *Leishmania donovani*-Induced Cutaneous Leishmaniasis."

*International journal of analytical chemistry* vol. 2020 9289651. 15 Jul. 2020, doi:10.1155/2020/9289651

DINIZ, L. F. B.; SOUZA, C. D. F. DE; CARMO, R. F. DO. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in the urban centers of the lower-middle São Francisco Valley, Brazilian semiarid region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2018.

SANTOS MARQUES, L. H. DOS *et al.* Leishmania infantum: Illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. **Parasitology**, 2017.

SANTOS, A. R. R. DOS *et al.* Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2019.

DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**, 2008.

ROUFAIE MOHAMMED, E. A. EL *et al.* Elisa using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1985.

Elmahallawy, Ehab Kotb *et al.* "Diagnosis of leishmaniasis." *Journal of infection in developing countries* vol. 8,8 961-72. 13 Aug. 2014

FARAROUEI, M. *et al.* "Diagnostic accuracy of urinary latex agglutination test (KAtex) for the diagnosis of visceral leishmaniasis: A meta-analysis." *Journal of infection in developing countries* vol. 12,12 1045-1051. 31 Dec. 2018.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. **Actualités** sur les **leishmanioses viscérales**. La **Revue de Médecine Interne**, v. 32, n. 9, p.544-551, 2011.

FERREIRA, G. R. *et al.* Human Competence to transmit leishmania infantum to lutzomyia longipalpis and the influence of human immunodeficiency virus infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2018.

FERREIRA-SILVA, M. M. *et al.* Socio-epidemiological characterisation of blood donors with asymptomatic Leishmania infantum infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, 2018.

FIGUEIRA, L. De P. *et al.* New human case reports of cutaneous leishmaniasis by Leishmania (Viannia) naiffi in the Amazon region, Brazil. **Acta Amazonica**, 2017.

FOLLADOR, I. *et al.* Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of Leishmania braziliensis Infection . **Clinical Infectious Diseases**, 2002.

FOLLADOR, I. *et al.* Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of Leishmania braziliensis Infection . **Clinical Infectious Diseases**, 2002.

FONSECA, T. H. S. *et al.* Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal**, 2019.

FRANÇA, A. De O. *et al.* Anti-Leishmania antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, 2013.

FRANCA *et al.* Leishmania infection in blood donors: A new challenge in leishmaniasis transmission? *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e0198199, 2018.

FREIRE, M. L. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019.

FUKUTANI, K. F. *et al.* Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, 2014.

FUJISAWA, KYOKO *et al.* “Emergent canine visceral leishmaniasis in Argentina: Comparative diagnostics and relevance to proliferation of human disease.” **PLoS neglected tropical diseases** vol. 15,7 e0009552. 19 Jul. 2021, doi:10.1371/journal.pntd.0009552

Gautam, Shalini *et al.* “IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis.” *The Journal of infectious diseases* vol. 204,7 (2011): 1134-7.

GALLUZZI, Luca *et al.* “Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis.” *Parasites & vectors* vol. 11,1 273. 2 May. 2018,

GAMA KER, H. *et al.* Effect of the preservative and temperature conditions on the stability of Leishmania infantum promastigotes antigens applied in a flow cytometry diagnostic method for canine visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2013.

GHATEE, M. A. *et al.* Survey of false-positive reactivity of latex agglutination test for kala-azar (Katex) without urine sample boiling process in autoimmune patients. **Iranian Journal of Public Health**, . v. 46, n. 6. 2017

GHOSE, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian Kala-Azar and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 1995.

GIDWANI, K. *et al.* Interferon-Gamma release assay (modified quantiFERON) as a potential marker of infection for Leishmania donovani, a proof of concept study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011.

GOMES, I. T. *et al.* Anti-Leishmania chagasi immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, 2010.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2004. v. 7, n. 3, p. 338–349. GROTTTO, R.; PARDINI, M. Biologia molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arquivos de Ciências da Saúde**, 2006.

Gonçalves-de-Albuquerque, Suênia da C et al. "The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis." *Frontiers in immunology* vol. 8 1437. 30 Oct. 2017

GUEDES, D. L. *et al.* **Sexual Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Neglected Story.** *Trends in Parasitology*. GUEDES, D. L. *et al.* Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2018.

H.L., C.; H.K., C. The first two cases of transfusion kala-azar. **Chinese Medical Journal**, 1948.

HARHAY, M. O. *et al.* **Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil.** *Trends in Parasitology*.

HASKER, E. *et al.* Latent Infection with *Leishmania donovani* in Highly Endemic Villages in Bihar, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2013.

HASKER, E. *et al.* Strong Association between Serological Status and Probability of Progression to Clinical Visceral Leishmaniasis in Prospective Cohort Studies in India and Nepal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.

HIDE, M. *et al.* Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. **International Journal for Parasitology**, 2013.

HIDE, M. *et al.* A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, 2007.

HIRVE, S. *et al.* Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent – A Systematic Literature Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

HORIMOTO, A. M. C.; COSTA, I. P. DA. Frequência de autoanticorpos e dosagem de complemento sérico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2009.

HOSSAIN, F. *et al.* Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PLoS ONE**, 2017.

HURDAYAL, R. *et al.* Inflammatory Dendritic Cells, Regulated by IL-4 Receptor Alpha Signaling, Control Replication, and Dissemination of *Leishmania major* in Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**, 2016.

IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017.

IBARRA-MENESES, Ana Victoria et al. "Identification of asymptomatic Leishmania infections: a scoping review." **Parasites & vectors** vol. 15,1 5. 5 Jan. 2022.

IQBAL, J. *et al.* Imported visceral leishmaniasis: Diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002.

JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. **Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. Current Opinion in Infectious Diseases.** JIMENEZ-MARCO, T. *et al.* Transfusion-transmitted leishmaniasis: A practical review. **Transfusion**, 2016.

JIMENEZ-MARCO, T. *et al.* The utility of pathogen inactivation technology: A real-life example of Leishmania infantum inactivation in platelets from a donor with an asymptomatic infection. **Blood Transfusion**, 2012.

KAMMOUN-REBAI, W. *et al.* Protein biomarkers discriminate Leishmania major-infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, 2016.

KASSA, M. *et al.* Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rk39 elisa and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without hiv coinfection in ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2020. v. 14, n. 12.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 2011. v. 9, n. 8, p. 604–615.

KER, H. G. *et al.* Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

KIP, A. E. *et al.* "Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 59,1 (2015): 1-14.

KÜHNE, V.; BÜSCHER, P. "The Unknown Nature of the Antigen in the Direct Agglutination Test for Visceral Leishmaniasis Hampers Development of Serodiagnostic Tests." *The American journal of tropical medicine and hygiene* vol. 100,2 . 2019.

KÜHNE, V. *et al.* Experimental evidence on the nature of the antigen in the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2020.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. "Immunobiology of visceral leishmaniasis." **Frontiers in immunology** vol. 3 251. 14 Aug. 2012, doi:10.3389/fimmu.2012.00251

Kupani, Manu et al. "IL-10 and TGF- $\beta$  Induced Arginase Expression Contributes to Deficient Nitric Oxide Response in Human Visceral Leishmaniasis." *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 10 614165. 18 Feb. 2021, doi:10.3389/fcimb.2020.614165

HOZ, R. M. LA; MORRIS, M. I. Tissue and blood protozoa including toxoplasmosis, Chagas disease, leishmaniasis, Babesia, Acanthamoeba, Balamuthia, and Naegleria in solid organ transplant recipients— Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community . **Clinical Transplantation**, 2019.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, 1977. LEITE DE SOUSA-GOMES, M. *et al.* Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 2011.

LÉVÊQUE, M. F. *et al.* Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2020. v. 14, n. 3, p. 1–12.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, 1993.

LIMA ARRUDA, A. B. *et al.* Perfil dos doadores de sangue de primeira vez de um serviço de hemoterapia. **Brazilian Journal of Health Review**, 2019. v. 2, n. 6, p. 5135–5147.

LIMA, L. M. De *et al.* Prevalence of Chagas disease in blood donors at the Uberaba Regional Blood Center, Brazil, from 1995 to 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012.

LIMA JT, Gennari SM, Soares HS, *et al.* Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(1):61-66

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1912.

LUZ, K. G. *et al.* Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1997.

LUZ, Z. M. P. Da *et al.* A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2001.

LIMA, V. M. F. DE *et al.* Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 2010.

MELO NETO, O. P. DE; STANDART, N.; SA, C. M. DE. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. **Nucleic Acids Research**, 1995.

MORAIS, R. C. S. DE *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental & applied acarology**, 2013.

OLIVEIRA FRANÇA, A. DE *et al.* Presence of anti-Leishmania antibodies in candidates for kidney transplantation. **International Journal of Infectious Diseases**, 2020.

OLIVEIRA, A. P. DE *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of

MACHADO, C. A. L. *et al.* Epidemiological profile and lethality of visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infection in an endemic area in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2021. v. 54.

MACIEL, D. B. *et al.* Infection with Leishmania (Leishmania) infantum of 0 to 18-month-old children living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2014.

MAGALHÃES, F. B. *et al.* Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2017.

MAGILL, A. J. Leishmania Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. [S.l.]: [s.n.], 2014, V. 2.

Maia, C, and L Campino. "Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection." *Veterinary parasitology* vol. 158,4 274-87.2008.

MANSUETO, P. *et al.* "Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas?." *Travel medicine and infectious disease* vol. 12,6 Pt A : 617-27.2014.

MARCELINO, A. P. *et al.* Comparative PCR-based diagnosis for the detection of Leishmania infantum in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, v. 207. 2020.

MAROLI, M. *et al.* "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern." *Medical and veterinary entomology* vol. 27,2 123-47.2013.

MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 1995.

MASHAYEKHI GOYONLO, V. *et al.* Nutritional intake and chronicity associated with the old world cutaneous leishmaniasis: Role of vitamin A. **Iranian Journal of Public Health**, 2020.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, 2004.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: An overview. **Current Protocols in Immunology**, 2018. v. 2018, n. February, p. 5.1.1-5.1.11.

MEINECKE, C. K. *et al.* Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, 1999. v. 104, n. 5.

- MERDEKIOS, B. *et al.* Evaluation of conventional and four real-time pcr methods for the detection of leishmania on field-collected samples in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2021. v. 15, n. 1.
- METTLER, M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent- antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005.
- MICHALSKY, É. M. *et al.* Infecção natural de Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera: Psychodidae) por leishmania infantum chagasi em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011.
- MICHEL, G. *et al.* Michel, Grégory et al. "Importance of worldwide asymptomatic carriers of Leishmania infantum (L. chagasi) in human." *Acta tropica* vol. 119,2-3 (2011): 69-75. doi:10.1016/j.actatropica.2011
- Ministério da Saúde (BR). Departamento de Informática do SUS. Datasus: Tabnet - informações de saúde, epidemiológicas e morbidade [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021
- Ministério da Saúde- SVS . Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1st ed. Editora MS, editor. 2006. p. 120.
- Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. 2018.
- MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J. C.; GHOSH, A. A comparative study of serum, urine and saliva using rk39 strip for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**,. v. 10, n. 1. 2016
- MOLINA, R. *et al.* Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. **PLoS neglected tropical diseases**, 2020.
- MORENO, E. C. *et al.* Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2006.
- MOURA, A. S. De *et al.* Doador de sangue habitual e fidelizado: fatores motivacionais de adesão ao programa. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, 2006.
- MOURA, G. S. *et al.* Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Cadernos de Saúde Pública**, 2012.
- NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites and Vectors**, 2012.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Journal of Immunology Research**, 2013. v. 45, p. 163–171.

OLIVEIRA, E. *et al.* Direct agglutination test (DAT): Improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 414–416. 2011.

OLIVEIRA, G. G. S. *et al.* Characterization of novel Leishmania infantum recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2011.

ORTALLI, M. *et al.* Asymptomatic Leishmania infantum infection in blood donors living in an endemic area, northeastern Italy. **Journal of Infection**, 2020.

OTERO, A. C. S. *et al.* Short report: Occurrence of Leishmania donovani DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2000.

Owen, Sophie I *et al.* “Detection of asymptomatic Leishmania infection in Bangladesh by antibody and antigen diagnostic tools shows an association with post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients.” **Parasites & vectors** vol. 14,1 111. 17 Feb. 2021.

PAMPIGLIONE, S. *et al.* Studies on mediterranean leishmaniasis: 2. asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1974.

Pearson, R D, and A Q Sousa. “Clinical spectrum of Leishmaniasis.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 22,1 1996

PEDRAL-SAMPAIO, G. *et al.* Detection of IgG Anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2016.

PEDRAS, M. J. *et al.* Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008.

PICÓN, Y. *et al.* Seroprevalence, clinical, and pathological characteristics of canine leishmaniasis in a central region of Colombia. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, 2020.

PORCINO, G. N. *et al.* Evaluation of methods for detection of asymptomatic individuals infected with Leishmania infantum in the state of Piauí, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: Clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria**, 2004.

RAI, A. K. *et al.* Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, 2012.

RAMOS, R. E. M. *et al.* Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for Visceral Leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases. **PLoS ONE**, 2021. v. 16, n. 5 May 2021.

REAL, F. *et al.* Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, 2014.

RÊGO, F. D. *et al.* Ecology and Molecular Detection of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae: Phlebotominae) Collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A New Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 2019.

RÊGO, F. D. *et al.* Potential Vectors of *Leishmania* Parasites in a Recent Focus of Visceral Leishmaniasis in Neighborhoods of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 2020.

REIMÃO, J. Q. *et al.* **Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: Current and future methods. Microorganisms.**

REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002.

RIERA, C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* crytic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2004.

RIERA, C. *et al.* Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). **Transfusion**, 2008.

Reis, Lisiane Lappe dos *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2017, v. 50, n. 05

RODRIGUES, A. C. M. *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2017.

ROMERO, H. D. *et al.* Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2009.

ROMERO, I. *et al.* Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2010.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, 2018. v. 30, n. 3, p. 103–111.

RYAN, J. R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera

from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002.

SAHA, S. *et al.* IL-10- and TGF- $\beta$ -Mediated Susceptibility in Kala-azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis: The Significance of Amphotericin B in the Control of *Leishmania donovani* Infection in India . **The Journal of Immunology**, 2007.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. **Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis. Journal of Vector Borne Diseases.**

SALES, K. G. D. S. *et al.* Home sweet home: Sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. **Parasites and Vectors**, 2019.

SALANT, H., Nachum-Biala, Y., Feinmesser, B. *et al.* Early onset of clinical leishmaniasis in a litter of pups with evidence of in utero transmission. *Parasites Vectors* 14, 326 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04824-0>

SANTOS, L. Da S. *et al.* In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012.

SANTOS, W. J. T. *et al.* Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2020.

SANTOS ARRD, Serufo ÂV, Figueiredo MM, *et al.* Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e180405. Published 2019 Feb 4.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

SELDER, R. *et al.* Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Journal**, 2018.

SILVA, F. L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 2009.

SILVA, J. De A. *et al.* Leishmaniose visceral e gestação em transplantada renal: Relato de Caso TT - Visceral leishmaniasis and pregnancy in renal transplanted patient: Case Report. **J Bras Nefrol**, 2015.

SILVA, L. P. *et al.* Asymptomatic leishmania infection in blood donors from a major blood bank in northeastern Brazil: A cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2020.

SINGH, O. P. *et al.* Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2012.

Singh, Om Prakash, and Shyam Sundar. "Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era." *Journal of parasitology research* vol. 2015

Singh, S et al. "Transfusion-transmitted kala-azar in India." *Transfusion* vol. 36,9.1996.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. "Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis." *Journal of postgraduate medicine* vol. 49,1 2003.

SOUHAILA, M. A.; KHAWLA, H. Z.; KHITAM, Y. A.-D. Indirect Fluorescent antibody test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: An epidemiological study in Iraq. **J. of university of anbar for pure science**, 2010. v. 4.

SOUSA, J. M. Dos S.; RAMALHO, W. M.; MELO, M. A. DE. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2018.

SOUSA-GOMES, M. L. De *et al.* Coinfecção leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais TT - Co-infection leishmania/HIV in Brazil: epidemiological, clinical and laboratorial aspects. **Epidemiol. serv. saúde**, 2011.

SPIEGEL, C. N. *et al.* "The Lutzomyia longipalpis complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication." *Parasites & vectors* vol. 9,1 580. 14 Nov. 2016,

SRIVIDYA, G. *et al.* "Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade." *Parasitology research* vol. 110,3 . 2012.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. "Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis." *Immunology and cell biology* vol. 85,2 . 2007.

STAUCH, A. *et al.* "Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control." *PLoS neglected tropical diseases* vol. 5,11.2011.

SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2014.

SUNDAR, S. *et al.* Noninvasive Management of Indian Visceral Leishmaniasis: Clinical Application of Diagnosis by K39 Antigen Strip Testing at a Kala-azar Referral Unit. **Clinical Infectious Diseases**, 2002.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 2002.

T., J.-M. *et al.* Strategies for reducing the risk of transfusion-transmitted leishmaniasis in an area endemic for Leishmania infantum: A patient- And donor-targeted approach. **Blood Transfusion**, 2018.

TELFORD, W. G. Near infrared lasers in flow cytometry. **Methods**, 2015.

- THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. "Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods." *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology* vol. 44,2. 2020.
- THEOCHARIDOU, D. *et al.* Human visceral leishmaniasis in northern Greece: Seroepidemiology and risk factors in endemic region. **Journal of Vector Borne Diseases**, 2019.
- TOLEDO, C. R. S. De *et al.* Vulnerability to the transmission of human visceral leishmaniasis in a Brazilian urban area. **Revista de saude publica**, 2017.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. "Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm." *FEMS immunology and medical microbiology* vol. 51,2. 2007.
- TURCHETTI, A. P. *et al.* "Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis." *Journal of infection in developing countries* vol. 8,4 403-7. 15 Apr. 2014
- URIAS, E. V. R. *et al.* Prevalência de adultos infectados por *Leishmania leishmania* chagasi entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009.
- VAN GRIENSVEN J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(1):79-99.
- V.LIN, A. ELISA: Methods and Protocols. **ELISA: Methods and Protocols**, 2015. v. 1318, p. 1–216.
- VALLUR, A. C. *et al.* Accurate serodetection of asymptomatic leishmania donovani infection by use of defined antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, 2016.
- VILELA, M. L. *et al.* Phlebotomine fauna (diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in impacted area by Hydroelectric Plant, State of Tocantins, Brazil. **PLoS ONE**, 2011.
- VOLPINI, Â. C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, 2004.
- YIMAM AYENE, Yonas *et al.* "A comparative study of nested-PCR and direct agglutination test (DAT) for the detection of *Leishmania infantum* infection in symptomatic and asymptomatic domestic dogs." **BMC research notes** vol. 14,1 270. 13 Jul. 2021
- ZUBEN, A. P. B. VON; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saude Publica**, 2016.
- WEIRATHER, J. L. *et al.* Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. **Annals of Human Genetics**, 2017.
- WERNECK, G. L. Forum: Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cadernos de Saude Publica*. WHO.

Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro Relatório da OMS sobre as doenças tropicais negligenciadas.

**WHO/HTM/NTD**. [S.l.]: [s.n.], 2010.

WILHELM, T. J. Visceral leishmaniasis. **Chirurg**, 2019. v. 90, n. 10, p. 833–837.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. **World Health Organization Technical Report Series**, 2010.

WU, Y. *et al.* Application of Quantitative PCR in the Diagnosis and Evaluating Treatment Efficacy of Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020. v. 10.

YESHAW, Y.; TSEGAYE, A. T.; NIGATU, S. G. Incidence of mortality and its predictors among adult visceral leishmaniasis patients at the university of gondar hospital: A retrospective cohort study. **Infection and Drug Resistance**, 2020.

ZAGO, A.; SILVEIRA, M. F. DA; DUMITH, S. C. Prevalência de doação de sangue e fatores associados, Pelotas, RS. **Revista de Saude Publica**, 2010.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quimica Nova**, 1998.

ZHANG, W. W. *et al.* Development of a sandwich ELISA to detect Leishmania 40S ribosomal protein S12 antigen from blood samples of visceral leishmaniasis patients. **BMC Infectious Diseases**, 2018.

ZIJLSTRA, E. E. Biomarkers in Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2019. v. 9, n. July, p. 228.

## APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

### An assessment of serological techniques for the identification of asymptomatic visceral leishmaniasis in blood donors in Northeastern Brazil

**Lucas Portela Silva**

<https://orcid.org/0000-0002-1378-2094>

Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.  
[portella.lucas.lp@gmail.com](mailto:portella.lucas.lp@gmail.com)

**Elis Dionisio Silva**

<https://orcid.org/0000-0001-5119-3920>

Universidade Federal do Amazonas. [dionisio.elis@gmail.com](mailto:dionisio.elis@gmail.com)

**Allana Maria de Souza Pereira**

<https://orcid.org/0000-0001-5188-043X>

Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.  
[allanamariasp@gmail.com](mailto:allanamariasp@gmail.com)

**Wagner José Tenório dos Santos**

<https://orcid.org/0000-0001-7605-4687>

Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Pernambuco, Recife, Brazil.  
[wagner.tenorio@bio.fiocruz.br](mailto:wagner.tenorio@bio.fiocruz.br)

**Anderson Henrique da Silva**

<https://orcid.org/0000-0002-1842-2725>

Programa de Pós-graduação em Ciência Política da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.  
[andersonheri@gmail.com](mailto:andersonheri@gmail.com)

**Herintha Coeto Neitzke-Abreu**

<https://orcid.org/0000-0001-5848-670X>

Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brazil. [herintha@yahoo.com.br](mailto:herintha@yahoo.com.br)

**Zulma Maria de Medeiros**

<https://orcid.org/0000-0002-4434-955X>

Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Pernambuco, Recife, Brazil.  
[medeiros@cpqam.fiocruz.br](mailto:medeiros@cpqam.fiocruz.br)

**Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior**

<https://orcid.org/0000-0003-0146-7123>

Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Pernambuco, Recife, Brazil.  
[manoel.lima@fiocruz.br](mailto:manoel.lima@fiocruz.br)

**Valéria Rêgo Alves Pereira**

<https://orcid.org/0000-0002-7995-7360>

Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Pernambuco, Recife, Brazil.  
[valeria@cpqam.fiocruz.br](mailto:valeria@cpqam.fiocruz.br)

#### Abstract:

**Background:** Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease caused by species of the *Leishmania donovani* complex and transmitted mainly by the bite of infected sandflies. A less frequent form of transmission is the

transfusion route, important in countries lacking screening procedures for VL in blood banks. **Methods:** To identify asymptomatic infection by *Leishmania* sp, our goal here was to evaluate and compare the performance of three different serological techniques: Flow Cytometry (FC); Direct Agglutination Test (DAT); and Immunoenzymatic Test (ELISA). Thirty-one asymptomatic carriers of *L. infantum* were selected, from a single blood bank located in Recife, northeastern Brazil. **Results :** When evaluating the frequency of asymptomatic positive samples in the tests, the ELISA based on soluble *Leishmania* proteins (25.8%) and FC (22.8%) Identified more positive than the DAT (9.7%) or the ELISA based on a single recombinant protein (12.9%). A similar pattern was seen when evaluating the sensitivity of the tests, with greater values for FC (22.58%) and the ELISA with soluble proteins (22.58%) than the DAT (6.45%) and the recombinant ELISA (12.9%). Only FC showed low specificity (22.22%), contrasting with the other techniques (100% specificity). **Conclusion:** Given the results presented, we highlight the low effectiveness of serological techniques for the identification of asymptomatic individuals, thus emphasizing the need to develop more accurate methods for this purpose.

**Keyword:** Flow Cytometry, Direct Agglutination Test, ELISA, recombinant ELISA

## Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is a neglected human disease, caused by protozoa belonging to the *Leishmania donovani* complex (*L. donovani* and *L. infantum*), whose main form of transmission is the bite of infected female sandflies (Michel *et al.*, 2011) . VL diagnosis is based on the observation of clinical symptoms aligned with the results of laboratory tests (Chappuis *et al.*, 2007). It is characterized by the classic triad: fever, hepatosplenomegaly and pancytopenia. The asymptomatic condition, where the individual does not show symptoms, remains an important epidemiological challenge. Afflicted individuals in most cases are characterized by a low parasitemia (Brazil, 2009), but reactivation of the disease may occur during the course of the infection. In addition, asymptomatic individuals can act as reservoirs for the parasite and facilitate VL transmission through different means, such as the blood transfusion route (Michel *et al.*, 2011; Ferreira-Silva *et al.*, 2018). Therefore, laboratory screening for VL detection in blood banks is necessary to ensure the safety of the blood donation process and the health of recipients, especially in VL endemic regions (França *et al.*, 2031; Fukutani *et al.*, 2014).

So far, there is still no gold standard method for the identification of asymptomatic VL cases. One of the standard methods more generally used for VL diagnosis is the Enzymatic Immunoassay Test (ELISA). Its sensitivity, however, varies depending on the antigen used (Liew e O'donnell *et al.*, 1993; Riera *et al.*, 2008) and cross-reactivity is common in methods using non-purified antigens, such as crude soluble *Leishmania* antigen. As an alternative, the Direct Agglutination Test (DAT) uses lyophilized antigen to visualize agglutination in positive cases and is considered a promising tool for the VL diagnosis, especially in VL-HIV coinfections and immunosuppressed individuals (Cota *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2016; Kühne *et al.*, 2020). Alternatively, recombinant proteins have been identified and evaluated as potential antigens for the detection/capture of antibodies against *Leishmania* proteins. They can be applied in Cytometry (FC), used for the quantification of anti-*Leishmania* antibodies (Gomes *et al.*, 2010; Pedro-sampaio *et al.*, 2016; Ker *et al.*, 2019)

In summary, there is a clear need for precise tools to be used for the VL screening in blood banks. However, few studies have compared the performance of available techniques for VL diagnosis in asymptomatic

blood donors (Silvestre *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2018; Thakur *et al.*, 2020). In this context, the present study aims to evaluate different serological techniques to identify asymptomatic *Leishmania* infection in blood donors.

## Material and Methods

### *Study population and serum samples*

The asymptomatic donors whose sera were evaluated in the present study are all voluntary donors at the Pernambuco Foundation for Hematology and Hemotherapy (HEMOPE), located in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil. Blood samples from all *Leishmania*-positive individuals were previously screened and found to be positive for *Leishmania* spp. infection using a qPCR test, as previously reported (Silva *et al.*, 2020). All 31 samples were previously tested and found to be negative for Hepatitis, Syphilis, HIV, HTLV and Chagas Disease. The control group (n = 18) consisted of sera from healthy individuals, negative for leishmaniasis (ELISA, DAT, IIF) and/or PCR, residing in non-endemic areas for VL, from the biorepository of the Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology (LIBM) of Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz. To calculate the cutoff point, 45 sera, negatives for VL were selected from the same biorepository mentioned above. Ethics and research of participating institutions (HEMOPE and IAM/FIOCRUZ), sob CAEE 65770317.9.0000.5190.

### *Enzymatic immunoassay test (ELISA)*

The ELISA tests were performed based on the protocol described by Oliveira *et al.* (2011). Where microplates (NUNC, Maxisorp, Roskilde, Denmark) were sensitized with 600 ng of soluble *L. infantum* antigen and chimeric protein Q5 by Santos *et al.* (2020) and peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody (Sigma, St. Louis, MO) was used at the dilution of 1:10000. The conventional ELISA were those in which the soluble antigen was applied in the assay, whereas in the recombinant ELISA the Q5 protein was used.

### *Production of the L. infantum soluble antigen extract*

Promastigote forms of *L. infantum*, from the MHOM/BR/BH46 strain, were maintained and expanded in Schneider's medium until reaching exponential phase. The parasites were harvested by centrifugation at 400 g, 10 min, washed with PBS and resuspended in (50mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) supplemented with 1mM of the protease inhibitors N-ethylmaleimide (NEM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cell lysis was performed through successive steps of freeze/thawing in liquid nitrogen and water bath (36°C). Cellular lysis was monitored in a light microscope followed by centrifugation at 10,000 g at 4°C, for 15 min, with the supernatant (the soluble fraction) quantified with Bradford's reagent, aliquoted and frozen at -80°C until use. The pellet (consisting of insoluble antigens) was resuspended in PBS and stored.

### *Q5 production*

The expression and purification of the chimeric Q5 was performed as previously described by Santos et al. (2020). Briefly, the recombinant plasmid with the Q5 gene was transformed into *E. coli* Rosetta™ 2 DE3 bacteria (from Novagen), with the transformed bacteria cultured in LB medium supplemented with ampicillin (50 µg/ml) and chloramphenicol (34 µg/ml) at 37°C. Recombinant protein expression was induced with 0.5 mM IPTG at 30°C. Bacterial cells were resuspended in denaturing lysis buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 8 M Urea, 20 mM imidazole, pH 8.0) and lysed by ultrasonication. Proteins were purified with Ni-NTA agarose beads (Qiagen, catalog #30210), with washes and elution carried out with the same lysis buffer supplemented with different concentrations of imidazole (100 mM for washes and 1 M for elution).

#### *DAT*

The test was performed on 96-well plates with V-bottom, with serial dilutions from 1:50 to 1:51200, according to the manufacturer's specifications (Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherlands). The plaque was read by visualizing the agglutination, where those with a titration equal to or above 1:64000 were considered positive. The values referring to the dilutions and the cut-off were performed according to Harith *et al.* (1986).

#### *Flow Cytometry*

The flow cytometry (FC) assay for the detection of anti-promastigote antibodies of *L. infantum*, was carried out as previously described by Rocha *et al.* (2002). Briefly, 96-well plates were sensitized with sera samples diluted from 1:64 to 1: 32,768 in PBS plus 10% fetal calf serum, followed by incubations with a parasite suspension and anti-human IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate-FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) at a 1: 200 dilution. Labeled parasites were washed, fixed and kept for 30 minutes at 4°C, protected from light, prior to reading on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using the Cell Quest Pro software. The labeled parasites were acquired in 20,000 events per sample and identified based on their specific frontal (FSC) and lateral (SSC) light scattering properties. The relative FITC fluorescence intensity of each event was analyzed in histograms, delimited by the FITC conjugate internal control histogram and applied to all samples, in order to determine the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) for each sample.

#### *Statistical Analysis*

All conclusions were taken at the 5% significance level. For the analysis of the results of the ELISA and FC test, we used version 7.0 of GraphPad Prism (GraphPad Prism Inc., San Diego, California, USA). The cutoff point for FC was defined using the PPFP, where we evaluated the positive and negative results for the test. For this, we built the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve, from the values of specificity on the x axis and sensitivity on the y axis. Sensitivity and specificity values were calculated using the Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (OpenEpi) version 3.01 program. To assess the agreement of the tests performed, the Kapp identification measure was used, which helps to determine the concordant results of the tests. According to Landis JR & Koch GG (1977)

## Results

### *Performance of FC, DAT and ELISA in asymptomatic blood donors*

When analyzing the performance of the tests with the 31 sera from the asymptomatic group previously classified as VL positive using a PCR based assay in the study by Silva et al. (2020). We observed a greater positivity using FC, although with only 22.6% (7) of the sera tested having a VL positive result, while 77.4% (24) of those were negative, in the negative control group, 77.7% (14) of the samples were positive while 22.2% (4) remained negative. In contrast, the DAT test gave a positive test for only 9.7% (3) of the sera tested, with 90.3% (28) of those testing negative, in the negative control group none of the 100% samples (18) were positive. The ELISA assay using whole soluble *Leishmania* proteins performed similar to FC, with 22.6% (7) positive sera and 77.4% (24) negative, as in the DAT test, none of the samples from the negative control group were positive. Using only the Q5 recombinant protein decreased the efficiency of the assay with 12.1% (4) of the sera testing positive and 87.1% (27) negative. In addition, there was no positive sample from the negative control group. In table 1, the sensitivity and specificity values for the different test are shown. Noteworthy is the much-reduced specificity observed for FC in comparison with the other assays evaluated here. In the supplementary table we have the results of all tests.

**Table 1. Sensitivity and specificity of FC, DAT, ELISA with soluble antigen and ELISA with Q5 protein in the 31 positive samples**

	FC	DAT	ELISA Soluble antigen	ELISA Q5
<b>Sensitivity</b>	22.58%	6.45%	22.58%	12.9%
<b>Specificity</b>	22.22%	100%	100%	100%

### *Agreement between the tests used to identify the asymptomatic in the blood donor population.*

After all tests were performed, an agreement assessment was performed using the Kappa measure. If the result less than zero means that there was no agreement between the tests. Said that, no agreement between the tests evaluated was observed when compared to qPCR (Kappa = 0).

## Discussion

Performing a routine laboratory screening for VL detection in blood banks is a major challenge for control of the disease (França *et al.*, 2013; Fukutani *et al.*, 2014). To this end, it is crucial the correct identification of asymptomatic individuals who may be potential blood donors and that, if unidentified, may transmit the disease through transfusion. Here, samples from donors known to be asymptomatic, diagnosed by qPCR (Silva *et al.*, 2020), were subjected to different serological tests that included FC, DAT, and two different ELISA assays. Of

the techniques used, the one that showed the greatest positivity and specificity was the ELISA based on soluble *Leishmania* proteins.

In the absence of a gold standard diagnosis, qPCR can be considered one of the most promising techniques for the diagnosis of VL, as it has high values of sensitivity and specificity (Landis e Koch, 1977; Sakkas *et al.*, 2016). Despite being the technique used as an initial screening to identify asymptomatic cases, the costs associated with its use still limit its use in the routine screening of blood banks, especially in endemic countries (Silva *et al.*, 2020). This highlights the importance of studying the performance of different serological techniques for the identification of this population, as performed in this study.

DAT is a simple, semi-quantitative test that does not require the use of sophisticated equipment, in addition to being a low-cost method. In a meta-analysis developed by Chappuis *et al.* (2006), the sensitivity of the test for the diagnosis of VL reached 94.8%, being classified as an excellent test. However, in our study with asymptomatic patients, the sensitivity of the test was the lowest in comparison with the other techniques tested. Also evaluating asymptomatic patients, a previous study saw no positive results, reaching the conclusion that the test has a low sensitivity for detecting subclinical or past infections (Garcez *et al.*, 1996). DAT has thus been advised to be performed in combination with the patient's clinical evaluation (Terán-Angel *et al.*, 2007). However, there is no standard method for evaluating the test result and there is also no standard antigen (Srivastava *et al.*, 2011). More validation studies would be needed for DAT to be applied for the identification of asymptomatic individuals.

Unlike DAT, the ELISA based on the soluble *Leishmania* antigens had the highest frequency of positive samples, however, published studies state that this test may cross-react with other endemic diseases (Caballero *et al.*, 2007; Srividya *et al.*, 2012). Our results corroborate a previous study, in which in a group of 115 asymptomatic individuals, 13% (15) of the samples were positive in a ELISA with soluble antigens (Porcino *et al.*, 2019). Fukutami *et al.* (2014) reinforce that when the soluble antigen is used, the test will become more sensitive, but less specific. The results of these studies differ from the study by Lima *et al.* (2010), where the test had a sensitivity of 100% and a specificity of 91.2%. Similar results were also presented by Mettler *et al.* (2005). However, the differences in results between the studies, can be attributed to the origin of the antigen used (Mohammed *et al.*, 1985; Reithinger *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003). When comparing the ELISA with the soluble antigen with the recombinant Q5 protein (Santos *et al.*, 2020), we observed a lower positivity for the ELISA Q5. One of the great advantages of this test, however is a much reduced chance of cross-reaction with sera from individuals exposed to other diseases.

Regarding the results shown here using FC, these are associated with a very low specificity, due to similar results seen for the tested sera and the negative control group. We emphasize that the use of FC has been an innovation for the diagnosis of parasitic diseases such as Leishmaniasis (Silva *et al.*, 2019). Previous studies have shown that FC is a valuable diagnostic technique, with good sensitivity and specificity (Nolan *et al.*, 2013; McKinnon *et al.*, 2018; Ker *et al.*, 2019). Silva *et al.* (2019) showed that when compared to other serological techniques, FC presented a better sensitivity for the diagnosis; however, the study was carried out with symptomatic patients. Regarding our results, we can take into account the work of Gama Ker *et al.* (2013), where they carried out a study involving FC and the antigens used. The authors state in the discussion that dilution can

be one of the important points to avoid false negative and positive results; however, the study was carried out with canine samples.

When comparing the tests evaluated in the present study, we observed that each test performed differently. This variation in results can be justified by the methodological differences that are the basis for each approach (Elmahallawy *et al.*, 2014). In addition, the evaluation of asymptomatic individuals, with reduced or even null humoral and cellular responses to the parasite (Riera *et al.*, 2004; Gadisa *et al.*, 2012; Sundar *et al.*, 2018), might impact significantly on the efficiency of each test. This justifies the low agreement seen between the tests. Due to this difficulty, so far the best way to identify the asymptomatic population in the population is the combination of more than one diagnostic technique (Ibarra-Meneses *et al.*, 2017.)

## Conclusion

Serological techniques were not able to satisfactorily identify the asymptomatic *L. infantum* infection. More studies are needed that use more sensitive diagnostic approaches for this group.

## Acknowledgements

The Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) supported the English review. We thank the supported financial by Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) [PROCESS 400325/2019-5, Call No. 39/2018 - Track B PROEP/IAM].

## References

- Assis TSM, Azevedo-da-Silva ALF, Werneck GL, Rabello A. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016; 110(8):464–71.
- Brazil, Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. 3ª edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2019.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa E. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(8):1045–9.
- Carvalho FLN, Riboldi EO, Bello GL, Ramos RR, Barcellos RB, Gehlen M, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect.* 2018; 146(5):571–6.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *Br Med J.* 2006; 333(7571):723.
- Chappuis F, Sunder S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling R, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment, and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5:873–82.
- Cota GF, Sousa MR, Nogueira BMF, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: A cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89(3):570–7.
- Elmahallawy EK, Martinez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari JMN, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 8(8):961–72.
- Ferreira-Silva MM, Teixeira LAS, Tibúrcio MS, Pereira GA, Rodrigues V, Palis M, et al. Socio-epidemiological characterization of blood donors with asymptomatic *Leishmania infantum* infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral leishmaniasis. *Transfus Med.* 2018; 28(6):433–9.
- França AO, Castro VL, Lima Junior MSC, Cury ERJ, Dorval MEC. Anti-*Leishmania* antibodies in blood donors from the Midwest region of Brazil. *Transfus Apheresis Sci.* 2013; 49(3):627–30.
- Fukutani KF, Figueiredo V, Celes FS, Cristal JR, Barral A, Barral-Neto M, et al. Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1):422.

- Gadisa E, Custodio E, Cañavate C, Sordo L, Abede Z, Nieto J, et al. Usefulness of the rK39-immunochromatographic test, direct agglutination test, and leishmanin skin test for detecting asymptomatic *Leishmania* infection in children in a new visceral leishmaniasis focus in Amhara State, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(5):792–8.
- Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M, et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites Vectors.* 2018; 11:273.
- Gama Ker H, Aguiar-Soares RDO, Roatt BM, Moreira ND, Coura-Vital W, Carneiro CM, et al. Effect of the preservative and temperature conditions on the stability of *Leishmania infantum* promastigotes antigens applied in a flow cytometry diagnostic method for canine visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76(4):470–6.
- Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29(2):165–180.
- Gomes IT, Carvalho SFG, Rocha RDR, Magalhães VP, Dietze R, Martins-Filho AO, et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods.* 2010; 360(1–2):76–83.
- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7(3):338–49.
- Harith AE, Kolk AHJ, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, Laarman JJ. A simple and economical direct agglutination test for the serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:583–7.
- Ibarra-Meneses AV, Ghosh P, Hossain F, Chowdhury R, Mondal D, Alvar J, et al. IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 31(7):200.
- Ker HG, Coura-Vital W, Valadares DG, Aguiar-Soares RD, Brito RCF, Veras PST, et al., Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(19):8179–90.
- Kühne V, Verstraete R, Ostade X, Büscher P. Experimental evidence on the nature of the antigen in the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2020; 102(4):788–96.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159-74. PMID: 843571.
- Liew FY, O'donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *In: Advances in Parasitology.* Academic Press, 1993; 161–259.
- Lima VM, Fattori KR, Michelin Ade F, da Silveira Neto L, Vasconcelos Rde O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2010.
- McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018; 120(1):5–1.
- Mettler M, Grimm F., Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent- antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11):5515–9.
- Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop.* 2011; 119(2-3):69–75.
- Mohammed EA, Wright EP, Kager PA, Laarman JJ, Pondman KW. Elisa using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79(3):344–50.
- Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2013; Chapter 1:Unit1.27.
- Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, et al. 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.* 2011; 85(6):1025–34.
- Pedral-Sampaio G, Alves JS, Schriefer A, Magalhães A, Meyer R, et al. Detection of IgG Anti-*Leishmania* antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE.* 2016; 11(9):e0162793.
- Porcino GN, Carvalho KSS, Braz DC, Silva VC, Costa CHN, Santos IKFM. Evaluation of methods for detection of asymptomatic individuals infected with *Leishmania infantum* in the state of Piauí, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13(7):e0007493.
- Reithinger R, Quinell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7):2352–6.
- Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 2008; 48(7):1383–9.

- Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004; 98(2):102–110.
- Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6):551–62.
- Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou, S. Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016; 53(1):8–16.
- Santos WJT, Tavares DHC, Castro Neto AL, Nascimento MB, Dhália R, Albuquerque AL, et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(7):e0008488.
- Silva ED, Oliveira BC, Oliveira AP, Santos WJT, Diniz GT, Melo Neto OP, et al. Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2019; 469:18–25.
- Silva LP, Montenegro S, Werkauser R, Sales KGS, Soares FCS, Costa VMA, et al. Asymptomatic Leishmania infection in blood donors from a major blood bank in Northeastern Brazil: a cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2020; 62:e92.
- Silvestre Santarém N, Cunha J, Cardoso L, Nieto J, Carrilo E, Moreno J, et al. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Vet Parasitol*. 2008; 158(1–2):23–30.
- Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 2003; 49(1):55–60.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105(1):1-6.
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012; 110(3):1065–78.
- Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagn Ther*. 2018; 22(4):443–57.
- Terán-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodríguez V, Ulrich M, Cabrera M.. Evaluación de una prueba de aglutinación directa como método alternativo para el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina y humana en Venezuela. *Biomédica*, 2007; 27(3):447–53.
- Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis*. 2020; 44(2):253–72

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Comitê de Ética em Pesquisa

**Título do Projeto:** "Prevalência de infecção por Leishmania Spp. em Doadores de Sangue dos Hemocentros de Recife-PE e Caruaru-PE".

**Pesquisador responsável:** Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 16/03/2017

**Registro no CAAE:** 65770317.9.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 2.030.334

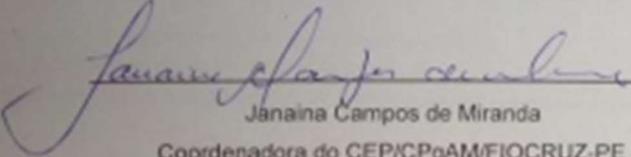
**PARECER**

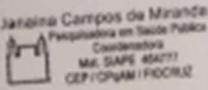
O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 25 de abril de 2017.

  
 Janaina Campos de Miranda  
 Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE



Rua Carlos de Alencar, 130 - São Marcos - Recife - PE  
 CEP: 51060-910 - Fone: (51) 3464-2626  
 Fax: (51) 3463-3511 - 2300-2629  
 Recife - PE - Brasil  
 e-mail: comite@cpqam.fiocruz.br

