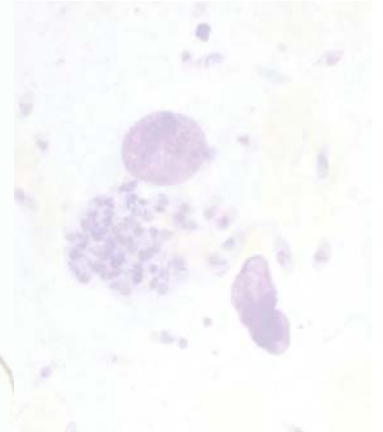
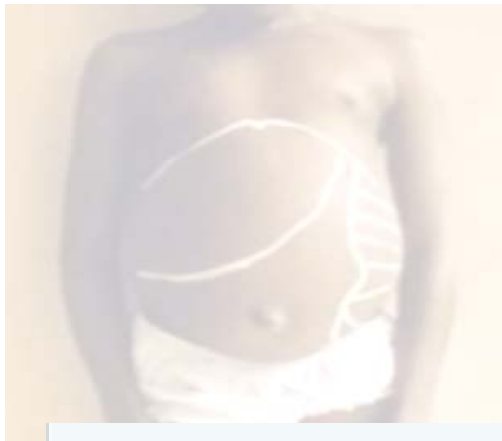


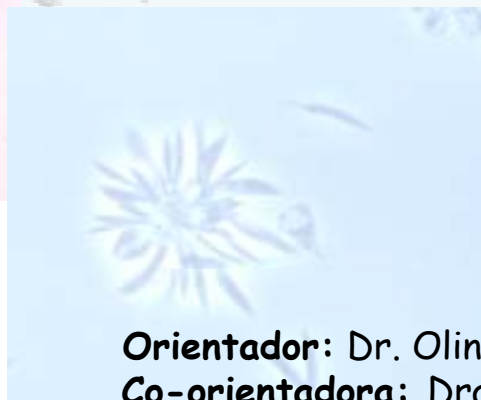
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR
Laboratório de Doença de Chagas



**DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS
ANTI-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, POR
CITOMETRIA DE FLUXO, NA MONITORAÇÃO DE
CURA NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

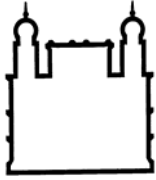


IZABELLE TEIXEIRA GOMES



Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho
Co-orientadora: Dra. Elenice Moreira Lemos

Belo Horizonte
Março de 2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Pós-Graduação em Ciência da Saúde

IZABELLE TEIXEIRA GOMES

**DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania (Leishmania) chagasi, POR CITOMETRIA DE
FLUXO, NA MONITORAÇÃO DE CURA NA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Tese apresentada ao Centro de Pesquisas René Rachou como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho
Co-orientadora: Dra. Elenice Moreira Lemos

Belo Horizonte
2006

Dedico aos meus queridos pais, Sonia e Francisco,
que com amor e carinho sempre me incentivam a
buscar o saber.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por permitir que a realização dessa dissertação fosse possível, me concedendo fé, coragem e força para enfrentar e superar os desafios e dificuldades encontradas durante esses dois anos.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, na pessoa do Dr. Álvaro Romanha, pela oportunidade de ser acolhida no seletivo quadro de alunos de pós-graduação da Fundação Oswaldo Cruz.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, por quem tive o privilégio e a honra de ser orientada, muito obrigada pelos ensinamentos, paciência, incentivo e, sobretudo, pelo interesse e comprometimento no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Elenice Moreira Lemos, pela co-orientação e também pelo apoio e incentivo recebidos, quando sob sua supervisão, ensaiava os primeiros passos no caminho da ciência. Muito obrigada pelo carinho, amizade e todos os bons momentos compartilhados durante minha iniciação científica.

Ao Dr. Silvio Fernandes Guimarães de Carvalho, pela colaboração, esclarecimentos e fornecimento de subsídios e informações sobre diagnóstico e tratamento dos pacientes portadores de Leishmaniose Visceral utilizados nesse trabalho.

Aos colegas, administradores e funcionários do Núcleo de Doenças Infecciosas – NDI/UFES, onde realizei minha iniciação científica, os quais, mesmo à distância, torceram pelo meu sucesso nesta jornada. Sinto saudades de todos, principalmente pelo companheirismo, amizade e o bom astral que sempre existiu no NDI.

Aos colegas do Laboratório de Doença de Chagas, agradeço a todos pela excelente convivência que compartilhamos, pela atenção e principalmente pela ajuda e palavras de encorajamento recebidas em todas as ocasiões que necessitei. Essa demonstração de amizade e o carinho recebido foram fundamentais para mim nessa trajetória.

À Roberta Félix, secretária do Laboratório de Chagas, pelo interesse e boa vontade em ajudar em tudo o que fosse necessário.

À Roberta Dias, pela disponibilidade, paciência, ensinamentos e palavras de otimismo. Muito Obrigada!

À Jordana, pela sua colaboração durante o desenvolvimento do meu trabalho, oferecendo sugestões inteligentes e palavras de otimismo e amizade que me ajudaram na concretização de meu objetivo.

À Lea, Márcio, Renata, Ana Paula Marciano, Ana Paula Wendling, Paula, Lili e Dany pelos conselhos, amizade e por estarem sempre dispostos a colaborar.

Aos meus queridos pais, meu “porto seguro”, pelo amor, conselhos, paciência, carinho, orações, renúncias e orgulho de um dia poderem comemorar comigo o atingimento de meu ideal.
À minha tia Dalva pela amizade, palavras de experiência e por ter estado a meu lado oferecendo amor e carinho.

Ao meu namorado e amigo Márcio Henrique, pela compreensão e paciência nos momentos de ansiedade e preocupação. Serei sempre grata pelas palavras de apoio e carinho.

Aos demais familiares, pelo incentivo e pela torcida.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
1. Leishmanioses.....	2
2. Leishmaniose Visceral.....	2
3. Aspectos clínicos.....	3
4. Diagnóstico da LV.....	4
4.1 Diagnóstico clínico.....	4
4.2 Diagnóstico laboratorial.....	4
5. Tratamento etiológico da LV.....	6
6. Critérios de cura pós-tratamento etiológico da LV.....	7
OBJETIVOS.....	11
I. Objetivo Geral.....	12
II. Objetivos específicos.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. População do Estudo.....	15
2. Preservação e processamento das amostras de soros.....	16
3. Cultivo axênico de formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	16
4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA “in house”).....	17
5. Preparo das formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo.....	17
6. Pesquisa de anticorpos IgG ou subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> (AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG).....	18
7. Aquisição e análise dos dados da metodologia de citometria de fluxo.....	20
8. Análise estatística – Teste de Wilcoxon.....	22
9. Análise do desempenho da metodologia de citometria de fluxo na pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG.....	22
9.1. Definição do ponto de corte.....	22
9.2. Escolha da diluição do soro, através da amplitude de segregação das diluições individuais e escolha do ponto de corte.....	23
9.3. Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC e critérios de seleção de ponto de corte.....	24
9.4. Avaliação do desempenho da citometria de fluxo na pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG.....	26
9.5. Intervalo de confiança – IC.....	28
RESULTADOS.....	29
I. Estabelecimento de uma nova metodologia de pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> , por citometria de fluxo (AAPF-IgG), aplicada à	

monitoração de cura pós-tratamento na LV.....	30
1. Influência da concentração do soro teste e do anticorpo secundário anti-IgG humano.....	31
2. Influência da fase de crescimento do parasito na AAPF-IgG para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo.....	33
II. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.....	35
II.1. Aplicabilidade da pesquisa de AAPF-IgG, na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.....	35
1. Reatividade média da AAPF-IgG de <i>L. (L.) chagasi</i> , antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.....	35
2. Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> , em soros individuais, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.....	36
II.2. Desempenho da AAPF-IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.....	37
1. Estudo da Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.....	38
2. Desempenho da AAPF-IgG, segundo índices expressos em porcentagem.....	39
3. Índices de desempenho da AAPF-IgG.....	40
4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG, segundo índices expressos em chance.....	41
III. Avaliação comparativa da AAPF-IgG e do ensaio imunoenzimático (ELISA) aplicados à monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV através de índices expressos em percentual.....	43
IV. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.....	45
IV.1. Aplicabilidade da pesquisa de (AAPF-IgG), na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.....	45
1. Reatividade da pesquisa de AAPF-IgG de <i>L. (L.) chagasi</i> em soros individuais de pacientes dois meses pós-tratamento (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT).....	45
IV.2. Desempenho da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.....	46
1. Estudo da Curva ROC da AAPF-IgG em soros de pacientes antes do tratamento (AT) e seis meses (6m-PT) pós-tratamento da LV.....	46
2. Desempenho da AAPF-IgG, segundo índices expressos em porcentagem.....	47
3. Índices de desempenho da AAPF-IgG.....	48
4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG, segundo índices expressos em chance.....	49
V. Padronização da metodologia para a pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> (AAPF-subclasses de IgG), aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na LV.....	51
1. Influência da concentração do soro e do anticorpo secundário na pesquisa da AAPF-subclasses de IgG.....	51
VI. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.....	54
VI. 1. Aplicabilidade da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.....	54
1. Reatividade média da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 de <i>L. (L.) chagasi</i> , antes do tratamento	

(AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.	54
2. Reatividade de IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de <i>L. (L.) chagasi</i> , em soros individuais, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.	55
VI.2. Desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.	58
1. Estudo da Curva ROC da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.	58
2. Desempenho da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em porcentagem.	59
3. Índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3.	60
4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em chance.	62
VII. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.	64
VII.1. Aplicabilidade da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.	64
1. Reatividade da pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 em soros individuais de pacientes dois meses (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT).	64
VII.2. Desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.	66
1. Estudo da Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 em soros de pacientes seis meses pós-tratamento (6m-PT) e AAPF-IgG3 em soros de pacientes dois meses (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV.	67
2. Desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, segundo índices expressos em porcentagem.	67
3. Índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3.	69
4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em chance.	72
DISCUSSÃO.	74
CONCLUSÕES.	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da seqüência das análises da pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, utilizando-se parâmetros de tamanho e granulosidade. (B) Histogramas individuais representando o percentual de parasitas fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação, (C) após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado e (D) um soro de um paciente portador de LV. O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado... 21
- Figura 2** - Representação esquemática da escolha da diluição através da amplitude de segregação entre os valores individuais de PPFP de pacientes portadores de LV antes do tratamento (●) e após o tratamento (●). As linhas vermelhas representam a amplitude de segregação e o retângulo pontilhado representa a diluição escolhida..... 24
- Figura 3** - Curvas ROC dos testes 1 (linha verde) 2 (linha rosa), construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100–especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC=0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76)..... 26
- Figura 4** - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* utilizando diferentes diluições do soro teste e diferentes concentrações do anticorpo secundário anti-IgG humano. Os resultados estão expressos como valores de PPFP para uma mistura de soros positivos (símbolos cheios) e negativos (símbolos vazados) segundo descrito em Material e Métodos. O gráfico A representa valores de PPFP de soros positivos e negativos diluídos 1:200 a 1:204.800 contra anticorpo secundário diluído 1:1.000 (●,○); 1:2.000 (●,○) e 1:4.000 (●,○). O gráfico B representa valores de PPFP de soros diluídos 1:1000 a 1:128.000 contra anticorpo secundário diluído 1:4.000 (●,○); 1:8.000 (●,○) e 1:16.000 (●,○). 32
- Figura 5** - Curva de crescimento de *Leishmania (L.) chagasi* (PP75) em meio LIT. Início de cultura com $1,0 \times 10^6$ promastigotas/mL. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia de duas culturas. As setas indicam a fase exponencial (6º dia), fase estacionária inicial (8º dia) e fase estacionária tardia (10º dia). 33
- Figura 6** - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* utilizando parasitos em diferentes dias de cultivo. O gráfico representa valores de PPFP de uma mistura de soros positivos (símbolos cheios) e negativos (símbolos vazados) diluídos 1:1.000 a 128.000 contra anticorpo secundário diluído a 1:16.000, utilizando promastigotas de 6 dias (●,○); 8 dias (●,○) e 10 dias (●,○)..... 34
- Figura 7** - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●). Os resultados estão expressos como médias de PPFP com os respectivos desvios-padrões. Após análise estatística, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições; $p \leq 0,05$ (*). 36
- Figura 8** - Curvas de titulação de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●), gráficos A e B, respectivamente. O gráfico C representa a sobreposição dos gráficos A e B e os traços em vermelho referem-se às amplitudes de segregação dos grupos avaliados. O retângulo pontilhado destaca a diluição referente à maior amplitude de segregação. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PPFP..... 37

- Figura 9** - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste aplicado em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva (ASC=1,0). A seta representa a faixa de melhor ponto de corte sugerido pela curva ROC (PFP=26% a 90%), para a avaliação de cura doze meses pós-tratamento. 38
- Figura 10** - Reatividade de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT(●) e 12m-PT(●), na diluição 1:32.000. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>50%) e valores negativos (PFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (100%) da AAPF-IgG aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT. 39
- Figura 11** - Reatividade de IgG anti-antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* por ELISA, em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como densidade óptica, empregando o valor de 0,440 (linha pontilhada) como ponto de corte entre resultados positivos e negativos. Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (85,7%) da ELISA aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT. 43
- Figura 12** - Curvas de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes 2m-PT (●) e 6m-PT (●), gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFP. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PFP e a diluição de 1:32.000 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura na LV. 46
- Figura 13** - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste aplicado em soros de pacientes antes (AT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva (ASC=0,99), utilizando-se o critério de PC de 50% de PFP. 47
- Figura 14** - Reatividade de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT(●) e 6m-PT(●), na diluição 1:32.000. Os resultados da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>50%) e negativos (PFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade de 100% e especificidade de 71,4% em soro de pacientes AT e 6m-PT, respectivamente. 48
- Figura 15** - Curva de titulação de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*. As misturas de soros positivos (AT) estão representadas como símbolos cheios e as misturas de soros negativos estão representados como símbolos vazados. O gráfico A representa valores de PFP de soros diluídos 1:1.000 a 1:128.000 contra anticorpo IgG1 diluído 1:2.000 (●,○); 1:4.000 (●,○) e 1:8.000 (●,○). O gráfico B representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG2 1:500 (◆,◇); 1:1.000 (◆,◇) e 1:2.000 (◆,◇). O gráfico C, representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG3 1:400 (▲,△) e 1:800 (▲,△). O gráfico D representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG4 1:500 (■,□); 1:1.000 (■,□) e 1:2.000 (■,□). 53

- Figura 16** - Curva de titulação de IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soro de pacientes AT (●) e doze meses pós-tratamento (●). Os resultados estão expressos como médias de PFP com os respectivos desvios-padrões. Após análise estatística, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições; $p \leq 0,05$ (*). 55
- Figura 17** - Curva de titulação de IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses pós-tratamento (●). Os gráficos A e B foram sobrepostos para uma melhor visualização da segregação entre as diluições AT e 12m-PT na pesquisa de IgG1 (C). Os gráficos D e E foram sobrepostos para uma melhor visualização da segregação entre as diluições AT e 12m-PT na pesquisa de IgG3 (F). Os traços em vermelho referem-se às amplitudes de segregação dos grupos avaliados. O retângulo pontilhado destaca a diluição referente à maior amplitude de segregação e diluição escolhida. 57
- Figura 18** - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 (A) e AAPF-IgG3 (B), construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste avaliado aplicado em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva (ASC=1,0) (A) e (ASC=0,99) (B). A seta representa a faixa de melhor ponto de corte sugerido pela curva ROC (PFP=13% a 79%) e (PFP=37% a 50%), para a avaliação de cura doze meses pós-tratamento na AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 respectivamente. 59
- Figura 19** - Reatividade de IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-promastigota de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●) e 12m-PT (●). Os resultados da reatividade de IgG1 e IgG3 para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>50%) e negativos (PFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (100%) da AAPF-IgG1 aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT e sensibilidade de (90,5%) e especificidade de (100%) da AAPF-IgG3 aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT..... 60
- Figura 20** - Curvas de titulação de IgG1 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes dois meses (●) e seis meses após o tratamento (●), representadas nos gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFP. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PFP e a diluição de 1:128.000 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura..... 65
- Figura 21** - Curvas de titulação de IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes dois meses (●) e seis meses após o tratamento (●), representadas nos gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFP. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PFP e a diluição de 1:40 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura..... 66
- Figura 22** - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 em soros de pacientes seis meses após o tratamento e AAPF-IgG3 aos dois meses e seis meses após o tratamento. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva de (ASC=0,99) para o grupo 6m-PT na pesquisa de AAPF-IgG1 e para o grupo 2m-PT (ASC=0,93) e grupo 6m-PT (ASC=0,96), na pesquisa de AAPF-IgG3, utilizando-se o critério de PC de 50% de PFP.... 67
- Figura 23** - Reatividade de IgG1 anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●) e 6m-PT (●), na diluição 1:128.000. Os resultados da reatividade de IgG1

para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada). Os resultados mostram a sensibilidade de 100% e especificidade de 76% em soro de pacientes AT e 6m-PT, respectivamente..... 68

Figura 24 - Reatividade de IgG3 anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●); 2m-PT (●) e 6m-PT (●), na diluição 1:40. Os resultados da reatividade de IgG3 para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada). Os resultados mostram a sensibilidade de 90,5% e especificidade de 71,4% e 90,5% em soro de pacientes AT, 2m-PT e 6m-PT, respectivamente..
..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	20
Tabela 2 - Categorias de resultados do teste avaliado em uma população que inclui pacientes AT (antes do tratamento/portador de LV) e indivíduos pós- tratamento (PT).....	27
Tabela 3 - Categorias de resultados da AAPF-IgG (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curados doze meses após o tratamento (12m-PT).....	40
Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa de AAPF-IgG, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.....	41
Tabela 5 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG, na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes doze meses após o tratamento.....	42
Tabela 6 - Índices de desempenho da ELISA e da pesquisa de AAPF-IgG na monitoração de cura 12 meses após o tratamento da LV.....	44
Tabela 7 - Categorias de resultados da AAPF-IgG (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).....	48
Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG, com seus respectivos intervalos de confiança a 95% na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento (6m-PT).....	49
Tabela 9 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG, na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento.....	50
Tabela 10 - Categorias de resultados de AAPF-IgG1 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curado doze meses após o tratamento (12m-PT).....	61
Tabela 11 - Categorias de resultados de AAPF-IgG3 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curados doze meses após o tratamento (12m-PT).....	61
Tabela 12 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG1 e IgG3, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.....	62
Tabela 13 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes doze meses após o tratamento.....	63
Tabela 14 - Categorias de resultados da AAPF-IgG1 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).....	70
Tabela 15 - Categorias de resultados da AAPF-IgG3 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT), dois meses (2m-PT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).....	70
Tabela 16 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG1, para a monitoração precoce de cura aos seis meses após o tratamento.....	71
Tabela 17 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG3 para a monitoração precoce de cura aos dois meses e seis meses após o tratamento.....	72

Tabela 18 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG1, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento.....	73
Tabela 19 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG3, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes dois e seis meses pós-tratamento.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual

2m-PT - 2 meses após o tratamento

6m-PT - 6 meses após o tratamento

12m-PT - 12 meses após o tratamento

AAPF-IgG - Anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas

AAPF-subclasses de IgG - Subclasses de IgG anti-formas promastigotas fixadas

AcM - Anticorpo Monoclonal

AcP - Anticorpo Policlonal

ASC - Área sob a curva

AT - antes do tratamento

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou

Curva ROC - *Receiver Operating Characteristic Curve*

DAT - *Direct Agglutination Test*

DNA - Ácido desoxiribonucléico

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

Fc - Fração constante

FL - Fluorescência

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína

FNeg – Falso negativo

FPos - Falso positivo

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

FSC - *Forward Scatter* (tamanho)

IC - Intervalo de confiança

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgG1 - Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2 - Imunoglobulina da subclasse G2

IgG3 - Imunoglobulina da subclasse G3

IgG4 - Imunoglobulina da subclasse G4

kDa – Kilodaltons

LIT - *Liver infusion tryptose medium*

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

NNN/LIT - Nicole, Novy & Neal (Meio de cultivo bifásico)

PC - ponto de corte

PCR – *Polymerase chain reaction*

PBS - *Phosphate buffer saline* (tampão fosfato salina)

PBS - T - tampão fosfato salina + detergente

PPFP - Percentual de parasitos fluorescentes positivos

PT- Pós-tratamento

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RV – Razão de Verossimilhança

SAPE - *Streptoavidin Phicoeritrin* - Estreptoavidina ficoeritrina

Sb⁺⁵ - antimônio pentavalente

SFB - Soro Fetal Bovino

SMF- Sistema Monocítico Fagocitário

SSC - *Side Scatter* (granulosidade)

VNeg - Verdadeiro negativo

VPos - Verdadeiro positivo

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

RESUMO

A busca de marcadores de doença ativa e a validação de critérios de cura pós-terapêutica têm sido amplamente investigados na LV. Entretanto, o estabelecimento de um critério de cura sorológico ainda permanece inconclusivo. Os critérios adotados atualmente para estabelecer uma eficácia terapêutica dependem da avaliação clínica 12 meses pós-tratamento. O objetivo desse trabalho, foi avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo na pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF) na avaliação 12 meses após o tratamento e encontrar um indicador laboratorial de cura 2 meses e 6 meses pós-tratamento. Foi estabelecida uma relação entre os níveis de anticorpos anti *L. (L.) chagasi* e a eficácia do tratamento na LV, através da AAPF. Neste estudo foram avaliados soros de 21 pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para LV, coletados antes e após o tratamento. As amostras de soro diluídas (1:1.000 a 1:128.000) foram incubadas com promastigotas fixadas, posteriormente incubadas com anti- IgG humana marcadas com FITC e IgG subclasses marcadas com SAPE na diluição de 1.000 a 128.000 para a pesquisa de IgG1 e 1:40 a 1:5.120 na pesquisa de IgG2, IgG3 e IgG4 e analisadas no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como o percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual, estabelecendo 50% como ponto de corte entre pacientes não tratados e tratados. Nossos dados demonstraram que 100% dos pacientes avaliados 12 meses após o tratamento apresentaram valores de PPFP < 50% na pesquisa de IgG e subclasses. Na avaliação de cura precoce, foi observado uma queda dos níveis de anticorpos 6 meses após o tratamento (71,4%). Entretanto, 2 meses após o tratamento foi encontrado valores de PPFP<50% em menos de 50% dos pacientes. Em relação a subclasses de IgG foi encontrado valores reagentes em IgG1 e IgG3. Na pesquisa da AAPF para IgG1 pacientes 6 meses pós-tratamento apresentaram 76% de valores abaixo do ponto de corte, sendo que IgG3 apresentou melhor desempenho na monitoração terapêutica. Observamos 90,5% de queda nos níveis de PPFP 6 meses e 71,4% 2 meses pós-tratamento. Nossos resultados mostraram a aplicabilidade da citometria de fluxo para detecção de anticorpos *anti-L. (L.) chagasi* e na monitoração de cura na LV.

ABSTRACT

The search for active disease markers and their validation for post-therapeutic cure criteria have been investigated. However, serological cure criteria still remain inconclusive for visceral leishmaniasis (VL). To date, the criteria adopted for establishing the efficacy of VL treatment depends on the clinical improvement of patients and negative result in parasitological methods 12 months after treatment. The aim of the present work was to assess the flow cytometry performance in the study of anti- *L. (L.) chagasi* antibodies after treatment in order to find a laboratory indicator of treatment efficacy. In this study, the profile of IgG and its subclasses were analyzed by flow cytometry using sera from 21 patients with positive parasitological examination for VL, collected prior to and after treatment. Samples of diluted sera were incubated with fixed promastigote and then with FITC conjugated anti-human IgG or IgG subclasses. The results were expressed as percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) for each individual sample, establishing $\leq 50\%$ as the cutoff between treated and non-treated patients. According to our data, all patients evaluated 12 months after treatment showed PPFP $\leq 50\%$ for IgG. In early cure assessment, a decrease in antibody levels was detected in 71,4 % of patients analyzed 6 months after treatment. Nevertheless, 2 months after treatment the PPFP values decreased in less than 50% of the patients. Concerning IgG subclasses, reactivity was found only for IgG1 and IgG3, and IgG3 showed greater performance in therapeutic monitoring. PPFP levels dropped in 90.5 % and 71.4 % of patients after 6 and 2 months of treatment, respectively. Our results suggest the potentiality of flow cytometry in studying anti-*L. (L.) chagasi* antibodies and monitoring VL therapeutic efficacy.

INTRODUÇÃO

1. Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. As leishmanioses acometem milhares de pessoas em todo o mundo a cada ano. São endêmicas em 88 países; sendo que 72 desses são países em desenvolvimento e os outros 13 são considerados subdesenvolvidos. (World Health Organization, 2004).

As apresentações clínicas mais comuns da doença são: a leishmaniose cutânea (LC), manifestando-se como úlceras cutâneas crônicas, a leishmaniose mucocutânea (LMC), doença erosiva das superfícies das mucosas causando lesões desfigurantes e a leishmaniose visceral (LV), ocasionada pela disseminação da infecção para órgãos do sistema monocítico-fagocitário (SMF). A LV é a forma mais grave da doença, podendo progredir para a morte, caso o tratamento específico não seja estabelecido a tempo (Desjeux, 2004).

2. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença sistêmica causada por protozoários do filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* do complexo donovani, que parasitam células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (Grimaldi Jr. *et al.*, 1989). O complexo donovani engloba três espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Laison & Shaw, 1987). Na América do Sul a doença é causada por parasitas da espécie *L. (L.) chagasi* (Ben-Ismaïl & Ben-Rachid, 1989; Singh 2004), ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil, onde está distribuída em 19 das 27 unidades federativas, atingindo o nordeste, norte, centro-oeste e sudeste brasileiro. Sua maior incidência encontra-se na região nordeste onde se concentra 65% dos casos. No Brasil, registra-se em média cerca de 3.700 casos de LV por ano. A letalidade está em torno de 8%, o que corresponde a uma média de 230 óbitos por ano (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2003). No território brasileiro, a *L. (L.) chagasi* acomete frequentemente crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos da doença registrados em menores de 5 anos (Ministério da Saúde, 2003).

Nos últimos dez anos, acompanhando a tendência mundial, ocorreu a periurbanização e urbanização da LV no Brasil. Neste contexto, surtos ocorreram em cidades como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Costa *et al.*, 1990; Jerônimo *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2001).

A infecção humana ocorre quando formas promastigotas infectantes são inoculadas, durante o repasto sangüíneo de inseto vetor infectado. O inseto, ao alimentar-se, introduz no hospedeiro, saliva contendo um peptídeo que atua como vasodilatador e fator inibidor da atividade do macrófago. Dessa forma, os parasitos se instalam no interior de células fagocitárias, predominantemente macrófagos. No interior dos macrófagos, o parasito inicia um processo de transformação para a forma amastigota que, após sucessivas multiplicações, na ausência do controle parasitário, promove a ruptura da célula hospedeira, com conseqüente liberação de formas amastigotas livres que são fagocitadas por outros macrófagos. Durante um novo repasto sangüíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*, que são levadas ao intestino, onde se transformam em promastigotas e se multiplicam. Quando o inseto exerce novo hematofagismo, formas infectantes são inoculadas, reiniciando assim, o ciclo no hospedeiro vertebrado (Sacks *et al.* 2001).

3. Aspectos clínicos

Do ponto de vista clínico, a LV pode ser dividida, conforme as características clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes, em quatro formas: (1) assintomática, (2) subclínica ou oligossintomática com progressão para cura, (3) subclínica ou oligossintomática com progressão para a forma clássica e a (4) clássica. Essa caracterização baseou-se num estudo clínico e epidemiológico com crianças sorologicamente positivas, residentes em Jacobina – BA (Badaró *et al.* 1986a e b).

A LV clássica caracteriza-se por ser uma doença de instalação insidiosa e evolução prolongada, com febre irregular, diarreia, tosse seca e mal estar. O abdômen aparece muito protuso em decorrência da hepatoesplenomegalia. A pele mostra-se de coloração pardacenta. Ocorre desnutrição protéico-calórica e os cabelos ficam quebradiços. Há emagrecimento progressivo levando o indivíduo à caquexia. O Teste de Montenegro está negativo. O

estabelecimento dos sintomas iniciais da LV clássica pode ser gradual, com agravamento progressivo, geralmente lento. O primeiro sintoma de visceralização é a febre baixa recorrente, com dois ou três picos diários, que persiste durante todo o curso da doença. É caracterizada também por anemia, diarreia, tosse seca e mal estar. A medula óssea encontra-se densamente parasitada. O abdômen aparece muito aumentado em decorrência da hepatoesplenomegalia (Ministério da Saúde, 2003).

Nas análises de parâmetros laboratoriais, observa-se completa inversão na relação albumina/gama-globulinas, pancitopenia e provas de função hepática bastantes alteradas (Person & Queiroz, 1996). Em pacientes não tratados, há um progressivo emagrecimento e enfraquecimento geral, com aumento da susceptibilidade a infecções secundárias e tendência a hemorragias devido a leucopenia e trombocitopenia, respectivamente.

Vários fatores podem estar relacionados à evolução da doença, dentre eles o estado nutricional e idade. Indivíduos desnutridos e com idade inferior a cinco anos, são os mais acometidos pela LV clássica (Badaró *et al.*, 1986a e b; Queiroz *et al.*, 2004; Pastorino *et al.*, 2002).

4. Diagnóstico da LV.

4.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LV pode ser feito através dos sinais e sintomas característicos da doença como: febre recorrente, hepato-esplenomegalia e emagrecimento. Entretanto, observam-se ainda outras manifestações clínicas como tosse, diarreia, icterícia e sangramentos que dificultam os diagnósticos diferenciais com outras doenças, que cursam com quadros semelhantes, como a malária, febre tifóide e tuberculose, retardando sua identificação e levando quase sempre o paciente à morte quando não tratada (Sundar & Rai, 2002).

4.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LV baseia-se geralmente, em três grupos de exames, baseados em testes parasitológicos, imunológicos e moleculares.

O diagnóstico parasitológico da LV é feito através da visualização do parasito em cultura (formas promastigotas) ou em esfregaço de punção aspirativa de baço, medula óssea, linfonodos ou em biopsias de tecido (formas amastigotas). O aspirado esplênico é o método de maior sensibilidade, seguido do aspirado de medula óssea, biopsia hepática e aspiração de linfonodos. Na prática, devido à quase ausência de efeitos colaterais, recomenda-se o aspirado de medula óssea esternal ou crista ilíaca posterior na rotina de diagnóstico da doença, que apresentam uma sensibilidade de 60 a 85%. Com relação à punção esplênica, esta deve ser realizada somente por pessoa treinada e em hospitais com retaguarda cirúrgica e banco de sangue, devido ao grande risco de hemorragia, sendo o melhor método parasitológico de diagnóstico do calazar, devido a alta sensibilidade que excede a 95% (Sundar & Rai, 2002; Zilstra *et al.*, 1992). Além do exame direto, o material das punções aspirativas pode ser inoculado em meios especiais de cultura. A utilização de uma interface líquida sobre o NNN, como o meio LIT ou Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. A inoculação das amostras clínicas obtidas da punção aspirativa de medula óssea ou baço dos pacientes, em hamsters (*Mesocricetus auratus*), não tem valor prático no diagnóstico da doença, devido o seu longo tempo de positividade, em torno de um a três meses (Dietze & Carvalho, 2003).

O diagnóstico imunológico da LV é realizado a partir de diferentes testes sorológicos que apresentam uma boa sensibilidade em virtude da grande quantidade de anticorpos, principalmente IgG, desencadeados pela doença. Os métodos sorológicos são métodos indiretos de detecção do parasito e, devido à sua praticidade e por serem menos invasivos, devem preceder sempre que possível, os métodos parasitológicos, podendo até em algumas situações, substituí-los (da Matta *et al.*, 2000; Braz *et al.*, 2002). Esses métodos têm como base a detecção de anticorpos circulantes que surgem durante a doença e incluem o teste imunoenzimático-ELISA, Reação de Imunofluorescência-RIFI e mais recentemente o Teste Rápido utilizando o antígeno recombinante K39 (Badaró *et al.*, 1983; Guimarães *et al.*, 1990; Zilstra *et al.*, 1998; Barbosa-de-Deus *et al.* 2002; Maalej *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003). Outra metodologia é o teste de aglutinação direta (DAT) que usa promastigotas de *Leishmania* para o diagnóstico da LV. Esse teste parece ser uma boa escolha, pois apresenta boa especificidade e não requer aparelhagens caras, sendo seu resultado inferido através de interpretação visual. O DAT tem sido muito utilizado no diagnóstico de LV em áreas endêmicas da Índia (Bagchi *et al.*, 1998). No Brasil, as técnicas mais usadas são a RIFI e ELISA. Os resultados da imunofluorescência normalmente são

expressos em diluições, sendo reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:40. A RIFI, apesar de menos sensível que o ELISA, é mais utilizada, por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas, através do Programa de Leishmanioses do Ministério da Saúde. O teste imunoenzimático ELISA, mais usado na rede privada de atendimento, tem seu resultado expresso em unidades de absorbância, em uma reação que pode utilizar diluições fixas (resultado quantitativo) ou apenas reagente ou não (resultado qualitativo) (Dietze & Carvalho, 2003).

No âmbito do diagnóstico molecular, a reação em cadeia da polimerase - PCR constitui uma alternativa de elevada especificidade para o diagnóstico da LV. Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, entre elas temos: área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação e o método de extração do DNA (Ministério da Saúde, 2003). A detecção da presença do DNA do parasito em amostras biológicas, não necessariamente pode ser interpretada como infecção ativa. Dessa forma, questiona-se a importância do PCR como método diagnóstico, considerando a positividade observada em pacientes assintomáticos e indivíduos clinicamente curados após tratamento específico (Sundar & Rai, 2002).

5. Tratamento etiológico da LV

Os compostos antimoniais (Sb^{+5}) ainda são as drogas de escolha para o tratamento da LV em todo mundo, há mais de 60 anos. Após o início do seu uso de forma mais disseminada na década de 40, doses progressivamente maiores destes medicamentos vem sendo preconizadas principalmente devido à “resistência” ou não resposta terapêutica dos pacientes ao tratamento (Gradoni *et al.*, 2003). Sabe-se que os antimoniais atuam nas formas amastigotas do parasito ainda de maneira não totalmente esclarecida, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos.

Atualmente o Ministério da Saúde no Brasil recomenda a utilização de antimoniatto N-metil glucamina derivado pentavalente (Sb^{+5}) na dosagem de 20mg/kg/dia com aplicações endovenosas ou intramusculares, durante 20 dias consecutivos. Entretanto, esse tratamento apresenta diversos efeitos colaterais preocupantes como, arritmias, artralguas; adinamia; anorexia; dor no local da aplicação (intramuscular) e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária.

As drogas de segunda escolha para o tratamento da LV são a Anfotericina B e a Pentamidina, medicamentos que também apresentam efeitos colaterais graves além de serem medicamentos caros. A Anfotericina B tem sido a droga de segunda escolha para um grande número de pacientes com calazar após resistência clínica ao Pentostan e Pendamidina. As formulações com Anfotericina B são hoje muito utilizadas no tratamento da leishmaniose visceral e constituem o principal avanço no tratamento anti-*Leishmania* nas últimas duas décadas (Sinha *et al.*, 2005). Atualmente outras drogas como a Anfotericina B-lipossomal estão sendo comercializadas e utilizadas, sendo bastante eficazes no tratamento da LV. Entretanto são medicamentos de custo elevado, tendo, portanto o seu uso limitando (Davidson, 1998).

6. Critérios de cura pós-tratamento etiológico da LV

Um dos principais desafios em relação à avaliação da eficácia do tratamento é a falta de metodologias laboratoriais que possam ser usadas no controle de cura da LV. Os critérios de cura são essencialmente clínicos e incluem: desaparecimento da febre no 5º dia de medicação, redução da hepatoesplenomegalia com redução do tamanho do baço em 40% ou mais em relação à medida inicial, melhora dos parâmetros hematológicos (hemoglobina e leucócitos) a partir da segunda semana, ganho ponderal do paciente com retorno do apetite e melhora do estado geral. As alterações vistas na eletroforese de proteínas se normalizam lentamente, podendo levar meses. O seguimento dos pacientes tratados deve ser feito aos 2, 6 e 12 meses após o qual o paciente deve ser dado como curado. (Ministério da Saúde, 2003).

A principal limitação para o uso de técnicas parasitológicas na monitoração de cura pós-terapêutica consiste na natureza invasiva do procedimento, associada à sua baixa sensibilidade mesmo ao diagnóstico inicial da infecção.

Como mencionado anteriormente, as limitações para o uso de técnicas moleculares, como a PCR, no diagnóstico da LV, também se aplicam ao critério de cura pós-terapêutica da LV. A aplicabilidade restrita dos métodos moleculares na monitoração pós-terapêutica deve-se ao fato que, embora de alta sensibilidade, a positividade observada em alguns indivíduos curados após tratamento específico (Sundar & Rai, 2002), suscita o questionamento se a presença de DNA de *Leishmania* pós-tratamento refletiria falha terapêutica. Nesse contexto, tem sido sugerida a não utilização da PCR na monitoração pós-terapêutica, considerando a impossibilidade de se

discriminar se a positividade do teste estaria associada à presença de parasitos viáveis ou de resíduos de material genético do parasito (Fisa *et al.*, 2002).

No campo da monitoração de cura, os métodos sorológicos são favorecidos pela presença abundante de anticorpos séricos durante a infecção ativa, com relatos de queda significativa nos níveis de imunoglobulinas específica para *Leishmania* em indivíduos clinicamente curados. Entretanto, existem relatos que as provas sorológicas convencionais são ainda de pouca utilidade na monitoração de cura pós-terapêutica, devido ao fato de alguns pacientes apresentarem persistentemente níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* após cura clínica da LV. Diante deste fato, vários autores têm avaliado o uso de diversas preparações antigênicas bem como diferentes fundamentos metodológicos visando o estabelecimento de uma técnica capaz de ser utilizada na monitoração de cura após o tratamento na LV.

Nesse contexto, a busca de novas perspectivas de preparações antigênicas promoveu o estabelecimento de metodologias importantes de utilização de antígenos fracionados e recombinantes aplicados à monitoração de cura na LV. Kumar *et al.* em 2002 demonstraram através do Imunoblot uma alteração no padrão de reconhecimento antigênico em pacientes tratados. Entretanto essas diferenças não apresentaram consistentes em indivíduos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. No âmbito da utilização de antígenos recombinantes, Kumar *et al.* (2001) e Braz *et al.* (2002), demonstraram queda significativa nos níveis dos anticorpos IgG após o tratamento, detectada através ELISA anti-rK39. Entretanto, aos seis meses após o tratamento, 98% dos pacientes ainda apresentaram teste de ELISA positivo, sugerindo uma restrição do uso da ELISA rK39 na monitoração precoce de cura na LV. Entretanto, os elevados custos de sua produção, purificação e fracionamento têm representado o principal fator limitante em relação aos métodos que propõem o uso de preparações antigênicas brutas ou mesmo parasitos íntegros.

Uma abordagem alternativa para a monitoração de cura através de métodos sorológicos mais eficazes tem sido investigada através da pesquisa de subclasses de imunoglobulinas. Estudos realizados por Ellasad *et al.* (1994) utilizando ELISA, demonstraram uma queda significativa nos níveis de IgG1 e IgG3 um mês após o tratamento. Entretanto, essa metodologia apresentava reatividade cruzada com LC, limitando sua aplicação em estudos clínicos de monitoração em áreas endêmicas onde LV e LC co-existem, devido a relatos de casos de LC pós-calazar. Chatterjee *et al.*, (1998) utilizando ELISA sugerem que a reatividade de IgG1 e IgG2

como um vantajoso marcador sorológico de resposta ao tratamento. Entretanto, os autores não apresentaram nenhuma evidência do desempenho da metodologia na identificação de amostras com perfil negativo de reatividade pós-tratamento. A análise da dispersão dos valores de reatividade sugere um baixo desempenho da metodologia quando aplicada em amostras individuais. Estudo realizado por Da Matta *et al.* (2000) utilizando RIFI demonstrou queda significativa dos níveis de IgG4 após o tratamento. Entretanto, foi observado que 26% dos pacientes considerados curados pelos critérios clínicos não apresentaram queda nos níveis de IgG4, limitando a aplicabilidade da metodologia proposta. Atta *et al.*, (1998) demonstraram ainda a aplicabilidade da detecção de anticorpos na monitoração terapêutica da LV. A pesquisa de imunoglobulinas de baixa frequência como a IgE, requer custos adicionais com reagentes destinados à adsorção de IgG, deixando assim a metodologia mais trabalhosa e cara. Entretanto, Atta *et al.* (2004) relataram que IgE anti-*Leishmania* foi detectada em 76% de indivíduos clinicamente curados, demonstrando a limitação de seu uso na monitoração de cura da LV.

Em suma, embora as abordagens atuais de métodos sorológicos convencionais e alternativos disponíveis auxiliam na propedêutica sorológica complementar na monitoração de cura pós-terapêutica da LV, e algumas, tenham sido propostas como ferramentas aplicáveis à monitoração precoce da cura pós-terapêutica na LV, as metodologias apresentadas ainda possuem limitações de uso em estudos clínicos e nenhum estudo tem relatado até o momento o desempenho desses métodos avaliado através de ferramentas estatísticas adequadas.

Dessa forma, o desafio atual proposto pelo nosso grupo, consiste em desenvolver metodologias alternativas de maior sensibilidade e especificidade que possam ser empregadas como preditores precoces de cura na monitoração pós-terapêutica na LV. Desde 1995 nosso grupo vem trabalhando na busca de novas abordagens para a pesquisa de anticorpos através do estabelecimento de metodologias alternativas, baseadas na citometria de fluxo. Esse tipo de abordagem apresenta algumas vantagens sobre os protocolos convencionais, apresentando-se como uma metodologia que trouxe uma nova perspectiva para a pesquisa de anticorpos, apresentando sensibilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais. A possibilidade de realizar uma reação de imunofluorescência de avaliação semi-quantitativa da reatividade de classes e subclasses imunoglobulinas, utilizando formas íntegras de parasitos, representa outra vantagem dessa metodologia. Nesse contexto, Martins-Filho *et al.* (1995, 2002) e Rocha *et al.*, (2002, 2006) demonstraram a aplicabilidade da citometria de fluxo

na monitoração pós-terapêutica na Doença de Chagas e na leishmaniose tegumentar americana. Recentemente, nosso grupo demonstrou a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, detectados por citometria de fluxo, no diagnóstico sorológico da LV, com elevada sensibilidade e especificidade (Gomes, I.T., 2003). Nesse estudo, propusemos investigar o desempenho da metodologia proposta por Gomes (2003) na monitoração de cura pós-tratamento da Leishmaniose Visceral Humana, com ênfase na reatividade de IgG e subclasses de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*.

OBJETIVOS

I. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, por citometria de fluxo, aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na Leishmaniose Visceral Humana.

II. Objetivos específicos

1. Estabelecer uma nova metodologia de pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, por citometria de fluxo (AAPF-IgG), aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na LV.
2. Investigar a aplicabilidade e o desempenho da AAPF-IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.
3. Avaliar comparativamente a AAPF-IgG e o ensaio imunoenzimático (ELISA) aplicados à monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV através de índices expressos em percentual.
4. Investigar a aplicabilidade e o desempenho da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.
5. Padronizar a metodologia para a pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF-subclasses de IgG), aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na LV.
6. Avaliar a aplicabilidade e o desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

7. Avaliar a aplicabilidade e o desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

MATERIAL E MÉTODOS

1. População do Estudo.

Foram utilizadas 84 amostras de soros obtidas de 21 pacientes portadores de Leishmaniose Visceral Humana (LV), antes e após tratamento etiológico para LV. O diagnóstico dos pacientes foi confirmado parasitologicamente através da detecção de amastigotas em punção aspirativa de medula óssea, cujo material foi utilizado para preparo de esfregaço e cultura. A avaliação e o acompanhamento dos pacientes, bem como a coleta dos soros e o tratamento dos indivíduos portadores de LV, foram realizados sob a supervisão do Dr. Sílvio Fernandes Guimarães de Carvalho, no Hospital Universitário Clemente Faria, Montes Claros, Minas Gerais-MG, que desenvolveu sua tese de doutorado avaliando o tratamento da LV. No tratamento foi administrada Anfotericina B na dosagem de 1mg/Kg/dia com duração de quatorze dias.

Nas etapas de padronização das metodologias de pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania (L.) chagasi*, por citometria de fluxo (AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG) foram empregadas misturas de soros de pacientes positivos para LV e de indivíduos negativos para LV. A mistura de soros positivos foi preparada a partir de alíquotas de soros dos 21 pacientes portadores de LV, provenientes de Montes Claros-MG, coletadas antes do tratamento. A mistura de soros negativos para LV foi preparada a partir de alíquotas de soros de 20 indivíduos voluntários saudáveis, com sorologia negativa (ELISA) para LV, residentes na cidade de Vitória – ES.

Nos ensaios aplicados à monitoração de cura pós-terapêutica na LV foram utilizadas amostras individuais dos 21 pacientes. As amostras foram coletadas antes do tratamento (AT), 2 meses (2m-PT), 6 meses (6m-PT) e 12 meses após o início do tratamento (12m-PT). Todos os pacientes foram acompanhados por 12 meses e foram considerados clinicamente curados após esse período. Para a monitoração de cura 12 meses após o tratamento, criamos a denominação de monitoração tardia de cura e para a monitoração dos pacientes 2 meses e 6 meses após o tratamento, a denominação de monitoração precoce de cura. Entre os 21 pacientes avaliados, 10 eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino, cuja idade variou entre 5 a 132 meses (média = $31,6 \pm 33,7$, mediana = 24) e o tempo de doença variou entre 7 a 60 dias (média = $13,5 \pm 25,0$, mediana = 25,0).

Consentimento prévio foi obtido de todos os indivíduos, pai ou responsável, antes da inclusão dos mesmos neste trabalho. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual

de Montes Claros-UNIMONTES. Esse projeto de pesquisa contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Protocolo nº 479957/01-0.

2. Preservação e processamento das amostras de soros.

As amostras de soros foram inativadas a 56°C por 30 minutos e centrifugadas a 1.000g a 4°C por 5 minutos para remoção de partículas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliquoteado e estocado a - 20°C até sua utilização. No momento do uso, as amostras foram descongeladas e diluídas em tampão apropriado para cada metodologia empregada. Para a citometria de fluxo, as amostras foram diluídas em tampão fosfato - PBS (0,15M, 8,0g/l de NaCl, 0,2g/l de KCl, 0,24g/l de KH₂PO₄ e 1,15g/l de Na₂PO₄, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) suplementado com 3% de soro fetal bovino - SFB (Intergen). As amostras diluídas foram centrifugadas a 4°C, 1.000g por 5 minutos e os sobrenadantes utilizados para o ensaio de citometria de fluxo.

Para os ensaios de ELISA, as amostras de soro foram diluídas em PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS - T) e 1% de leite Molico desnatado.

3. Cultivo axênico de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

As formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), recém isoladas de hamsters infectados, mantidas congeladas a - 196°C em nitrogênio líquido, foram obtidas do crio banco do Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Após descongelamento rápido a 37°C, as formas promastigotas foram cultivadas em meio ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle - NNN associado ao meio líquido Liver Infusion Tryptose – LIT. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D à temperatura 25 ± 1°C, durante o período de quatro dias. A cada quatro dias as culturas foram examinadas quanto a motilidade, morfologia e ausência de contaminação e os parasitos foram re-inoculados pela transferência de 1x10⁶ promastigotas/mL para novo frasco de cultura contendo NNN-LIT. Após a terceira passagem, parasitos de quatro dia de cultivo foram transferidos para meio LIT, numa concentração inicial de 1x 10⁶ promastigotas/mL. Parasitos com no máximo dez passagens *in vitro* foram empregados nos ensaios de pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* por

citometria de fluxo, para permitir a obtenção das formas promastigotas morfológicamente mais homogêneas, com um perfil de tamanho e granulosidade bem homogêneo, além de garantir a composição antigênica dos parasitos, considerando as possíveis alterações inerentes ao processo de cultivo prolongado *in vitro*.

4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA “in house”).

As formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (MHON/BR/74/PP75) de fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio líquido Liver Infusion Tryptose - LIT a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, conforme descrito anteriormente no item 3, foram coletadas por centrifugação, lavadas 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS) e lisadas por congelamento e descongelamento. A suspensão de parasitos foi homogeneizada usando um triturador de tecidos em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e usado como antígeno solúvel total. O conteúdo de proteína foi estimado através do método de Bradford.

Brevemente, placas Immulon # 4 (Dynatech, Chantilly, VA, USA) foram sensibilizadas com 20 μg de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* por poço e incubado a 4°C . As placas foram aspiradas, bloqueadas com PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T) e 2% de leite Mólico desnatado. Após 1 hora a 37°C , as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T. Soro diluído 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite Mólico desnatado foi adicionado em cada poço e incubado durante 45 minutos a 37°C . As placas foram lavadas 4 vezes e os anticorpos ligados foram detectados usando anti-IgG marcado com peroxidase, diluído 1:4.000 (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). Após incubação durante 45 minutos a 37°C as placas foram lavadas novamente e incubadas com 0.005g de O-fenilenediamino (OPD) e 3 μl de H_2O_2 em tampão citrato, durante 15 minutos. A densidade ótica foi lida a 492nm. Soros controles positivos e negativos foram avaliados em cada placa para padronizar as leituras e variações das placas.

5. Preparo das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo.

As formas promastigotas cultivadas em meio LIT, conforme descrito no item 3, foram transferidas para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego), homogeneizadas em vórtex a baixa rotação para desfazer possíveis agregados celulares. Em seguida, a suspensão foi submetida a uma centrifugação diferencial a 300g, 18°C por 10 minutos, para remoção, no sedimento, de grumos de parasitos contaminantes remanescentes. Para maximizar a recuperação dos parasitos individualizados no sobrenadante a suspensão de promastigotas foi deixada em repouso por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi então coletado e transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento desprezado. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS contendo 10% SFB, por duas vezes, por centrifugação a 1.000g, 4°C por 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Ao final das etapas de lavagem, os parasitos foram fixados, adicionando-se 20mL de solução fixadora (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cocadilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) diluída 1:1 em PBS. As formas promastigotas fixadas foram mantidas a 4°C por 24 horas. Após esse período, os parasitos fixados foram centrifugados a 1.000g, 4°C durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em 10mL de PBS. Após essa etapa, foi realizada a contagem do número de parasitos e a suspensão celular ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL.

6. Pesquisa de anticorpos IgG ou subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG).

Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos IgG e subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* foram realizados segundo o protocolo descrito por Rocha *et al* (2002), adaptado como descrito a seguir: alíquotas de 50µL de soro teste diluído em PBS-3% SFB foram adicionadas em microplacas de 96 poços de fundo em “U” (Nunc, Dinamarca). Em seguida, foram adicionados 50µL da suspensão de parasitas ($2,5 \times 10^5$ /poço) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS-3% SFB, por centrifugação a 1.000g, 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado.

Para a análise de AAPF-IgG, os parasitos foram reincubados a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz, na presença de 50µL de anticorpo policlonal anti-IgG humano (específico para porção Fc) marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp., St.Luis, MO), diluído em PBS-3% SFB.

Para análise de AAPF-suclasses de IgG, os parasitos foram reincubados a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz, com 50µL de anticorpos anti-subclasses de IgG humano marcados com biotina (Sigma Chemical Corp., St.Luis, MO), diluídos em PBS-3% SFB. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes e o sobrenadante desprezado. Na etapa seguinte, os parasitos foram incubados com 20µL de estreptoavidina conjugada a ficoeritrina - SAPE (Gibco), diluído 1:400 (segundo Rocha *et al*, 2002) em PBS-3% SFB e incubados a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz.

Após a incubação com anticorpos reveladores, os parasitos foram lavados duas vezes e fixados com 200µL de solução fixadora. As amostras foram mantidas pelo menos por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As leituras no citômetro de fluxo foram realizadas no máximo 24 horas após a fixação. Os dados coletados foram armazenados e analisados posteriormente.

Para cada ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo, foi realizado um controle interno da reação, para avaliar as ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Nesse controle, os parasitos foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença do anticorpo secundário. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivos e negativos para LV. Nas etapas de padronização da metodologia, foram testadas diferentes diluições da amostra teste (1:200 a 1:204.800 para IgG total, 1:200 a 1:128.000 para IgG1, 1:40 a 1:5120 para IgG2, IgG3 e IgG4) e do anticorpo secundário (1:1.000 a 1:16.000 para IgG total, 1:2.000 a 1:8.000 para IgG1, 1:500 a 1:2.000 para IgG2 e IgG4, 1:400 a 1:800 para IgG3). A Tabela 1 mostra os dados referentes aos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência, destacando as diluições selecionadas nas etapas de padronização das metodologias AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG, descritas detalhadamente na seção de resultados.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Especificidade	Origem	Marcação	Diluição de uso
AcP. anti IgG	-	Fragmento Fc	Cabra	FITC	1:16.000
AcM. anti IgG1	8c/6-39	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:16.000
AcM. anti IgG2	HP-6014	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:400
AcM. anti IgG3	HP-6050	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:400
AcM. anti IgG4	HP-6025	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:400

AcM. = anticorpo monoclonal; AcP. = anticorpo policlonal.

FITC = isotiocianato de fluoresceína.

*AcM biotinizados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) diluída 1:400 em PBS 3% de SFB, para detecção.

7. Aquisição e análise dos dados da metodologia de citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema óptico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (*FSC-Forward Scatter*), granulosidade ou complexidade interna (*SSC-Side Scatter*) e a emissão de fluorescência. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros, tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitos. Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com FITC ou pelo sistema biotina/SAPE que, quando excitados emitem sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo1 (FL1-fluorescência verde) e do tipo 2 (FL2-fluorescência laranja), respectivamente.

A análise da reatividade de AAPF-IgG e subclasses de IgG foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 1A). Por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7 μ m) e de pequena complexidade interna (tripanosomatídeos) os ganhos de tamanho e granulosidade, foram empregados na escala LOG, com valores E00 e 300, respectivamente, para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). As formas promastigotas apresentaram uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho *versus* granulosidade, o que

permitiu o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos, após incubação com soros de pacientes e indivíduos negativos e os respectivos reagentes fluorocromos, foram expressos sob a forma de PERCENTUAL DE PARASITOS FLUORESCENTES POSITIVOS (PPFP) observados para cada amostra individual em relação ao controle do conjugado.

Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de, no máximo, 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 1B). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores do percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 1C e 1D).

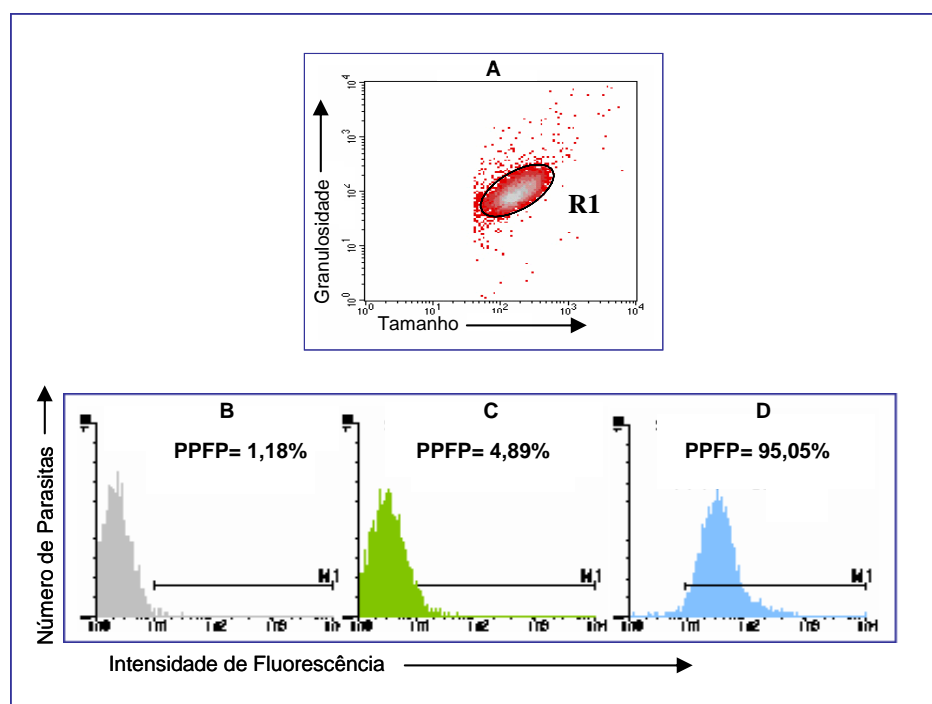


Figura 1 - Representação esquemática da seqüência das análises da pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, utilizando-se parâmetros de tamanho e granulosidade. (B) Histogramas individuais representando o percentual de parasitas fluorescentes (PPFP) obtidos com controle interno da reação, (C) após a incubação com um soro de um indivíduo não infectado e (D) um soro de um paciente portador de LV. O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado.

8. Análise estatística – Teste de Wilcoxon.

Os resultados da reatividade anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG) foram submetidos à análise no programa Minitab (Release 13.20) com o intuito de verificar três hipóteses: independência, normalidade e variância dos valores. Uma vez verificado que os grupos de resultados AT, 2m-PT, 6m-PT e 12m-PT não obedeciam a, pelo menos, uma dessas hipóteses, os dados foram considerando como de distribuição não paramétrica. O teste de Wilcoxon (programa Prism 3.0) é o indicado para o tratamento estatístico de amostras não-paramétricas pareadas. Esse teste foi empregado para calcular a existência de diferenças significativas entre os grupos 2m-PT, 6m-PT e 12m-PT em relação ao grupo AT. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. Esse tipo de abordagem foi utilizado como critério inicial de avaliação da aplicabilidade da metodologia proposta, na monitoração de cura pós-tratamento na LV.

9. Análise do desempenho da metodologia de citometria de fluxo na pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG.

9.1. Definição do ponto de corte.

Para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade da AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG foi necessário a definição de ponto de corte, ou seja, um valor que permitisse classificar os resultados dos testes como positivos e negativos. Dentre os diversos critérios para se estabelecer um ponto de corte, está sempre envolvido nesse processo um contrabalanço entre a sensibilidade e especificidade. Tal seleção pode ser até mesmo arbitrária, mas é importante levar-se em consideração na definição deste “ponto” os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos (Metz 1978, Browner *et al.* 1988, Fletcher *et al.* 1989). Para a pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasse de IgG o ponto de corte foi definido através da construção da receiver operating characteristic curve - curva ROC.

9.2. Escolha da diluição do soro, através da amplitude de segregação das diluições individuais e escolha do ponto de corte.

Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidade.

O programa estatístico MedCalc Statistical, gera a curva ROC através da comparação de dois grupos, e mostra o melhor ponto de corte onde há uma homogeneidade entre sensibilidade e especificidade no teste avaliado. Nesse contexto, comparamos valores de PFP de pacientes antes do tratamento (AT) com valores de PFP após o tratamento para LV (2m-PT, 6m-PT e 12m-PT).

Utilizando uma abordagem de sobreposição de gráficos, os valores de PFP para os soros de pacientes positivos para LV (AT) foram comparados com os valores de PFP desses mesmos pacientes após tratamento (2m-PT ou 6m-PT ou 12m-PT), criando assim, um terceiro gráfico. A Figura 2 ilustra a sobreposição dos valores de PFP de um grupo de amostras com elevada reatividade ao longo da curva de titulação e um grupo de amostras com menor reatividade a partir da diluição 1:16.000. Foi possível demonstrar a amplitude de segregação entre os grupos avaliados a partir dessa diluição, bem como selecionar a diluição que melhor discriminaria a reatividade individual entre os soros, apresentando maior amplitude de segregação entre os grupos. Uma vez eleita a diluição da amostra a ser empregada na avaliação da reatividade diferencial entre grupos, o próximo passo foi a escolha do melhor ponto de corte, referente aos valores de reatividade expressos sob a forma de PFP utilizando como base de cálculos, o ponto de corte oferecido pela curva ROC.

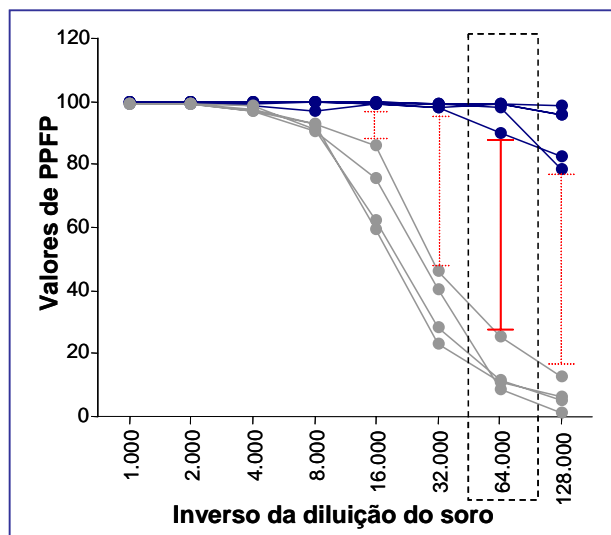


Figura 2 - Representação esquemática da escolha da diluição através da amplitude de segregação entre os valores individuais de PFP de pacientes portadores de LV antes do tratamento (●) e após o tratamento (●). As linhas vermelhas representam a amplitude de segregação e o retângulo pontilhado representa a diluição escolhida.

9.3. Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC e critérios de seleção de ponto de corte

Neste estudo, utilizou-se a Receiver Operating Characteristic Curve, conhecida como Curva ROC, para a seleção do melhor ponto de corte para segregação da reatividade de PFP bem como a avaliação da acurácia global da AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG. As curvas foram obtidas utilizando-se o programa MedCalc Statistical.

A curva consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal, para diferentes pontos de corte do teste avaliado (Greiner *et al.* 1981, Zweig *et al.* 1993, Greiner *et al.* 2000). Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva - ASC. A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere Swets (1988), em função do valor da ASC podemos classificar o teste avaliado como: sem valor ($ASC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < ASC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < ASC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < ASC \leq 1$) e como teste perfeito ($ASC=1$).

A Figura 3 mostra uma curva ROC esquemática, representando dois testes diagnósticos. A avaliação da ASC permite concluir que aquela do teste 1 ($ASC=0,85$) é maior que a do teste 2 ($ASC=0,76$), o que significa dizer que o teste 1 apresenta melhor desempenho que o teste 2, ou seja, uma melhor capacidade em discriminar duas populações distintas (doentes e não doentes). As setas no gráfico, demonstram de forma esquemática o sentido que aumenta a sensibilidade e a especificidade. Cada ponto do gráfico representa os índices sensibilidade e (100-especificidade) de um ponto de corte estabelecido.

A curva ROC além de indicar a acurácia do teste avaliado, permite identificar com precisão, o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos. Segundo comentam Browner *et al.* (1988) e Sackett *et al.* (1991), quando a prevalência da doença no estudo é de aproximadamente 50%, o valor correspondente ao ponto situado o mais próximo do ângulo superior esquerdo da curva, trata-se do ponto de corte associado a um menor número de resultados falso-positivos e negativos.

Nesse estudo, verificamos que a análise da curva permitiu ainda identificar uma faixa de valores de pontos de corte onde as variáveis sensibilidade e especificidade mantêm-se estáveis. Assim, com exceção da AAPF-IgG3, foi adotado um critério para a seleção do melhor ponto de corte a ser empregado na interpretação dos resultados do teste. Inicialmente foram identificados os pontos de corte adjacente e subjacente àquele indicado pela curva ROC, que eram acompanhados de valores inalterados de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Em seguida, foi calculado o valor médio entre os valores mínimo e máximo de pontos de corte que compreendiam uma faixa sem variação da sensibilidade e especificidade a fim de garantir uma margem de segurança pela utilização de um ponto de corte intermediário.

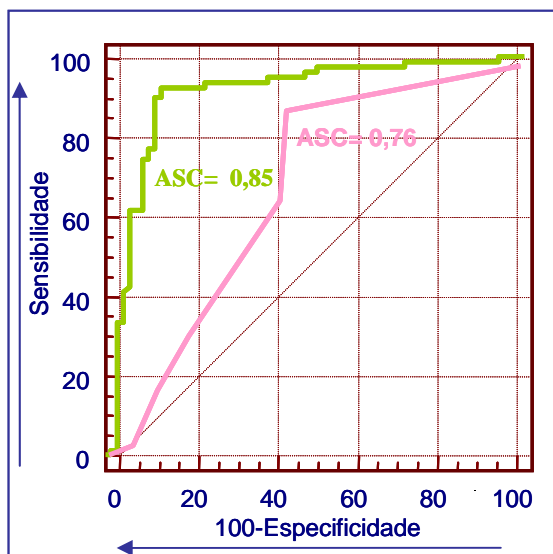


Figura 3 - Curvas ROC dos testes 1 (linha verde) 2 (linha rosa), construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100–especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC=0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76).

9.4. Avaliação do desempenho da citometria de fluxo na pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG.

Para avaliar o desempenho da pesquisa de AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG, por citometria de fluxo, foram utilizados índices de validade expressos em porcentagem e em chance, calculados a partir da classificação dos resultados em quatro categorias de acordo com pacientes antes do tratamento (AT) ou pós-tratamento (PT) (Griner *et al.* 1981, Fletcher *et al.* 1989, Sackett *et al.* 1991, Jaeschke *et al.* 1994a, Jaeschke *et al.* 1994b). Tais categorias estão expressas na Tabela 2 e foram definidas da seguinte forma: “*verdadeiro-positivo*” (VPos) = antes do tratamento e teste positivo; “*falso-positivo*” (FPos) = após o tratamento e teste positivo; “*falso-negativo*” (FNeg) = antes do tratamento e teste negativo e “*verdadeiro-negativo*” (VNeg) = após o tratamento e teste negativo.

Tabela 2 - Categorias de resultados do teste avaliado em uma população que inclui pacientes AT (antes do tratamento/portador de LV) e indivíduos pós- tratamento (PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(PT)	
Teste avaliado	Positivo	VPos (a)	FPos (b)	(a+b)
	Negativo	FNeg (c)	VNeg (d)	(c+d)
TOTAL		(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Com base nesses fundamentos, tabelas similares foram preenchidas de acordo com o modelo da Tabela 2 com o número de ocorrências de cada uma das categorias (a, b, c, e d). A partir dos resultados obtidos, o desempenho dos testes sorológicos, AAPF-IgG e AAPF-subclasses de IgG, foram avaliados segundo diferentes índices, incluindo: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e razões de verossimilhança. Os índices de desempenho foram obtidos utilizando-se o programa estatístico MedCalc Statistical.

A sensibilidade é calculada pela relação $a/(a+c)$ traduzindo, assim, a proporção de pacientes portadores LV (AT), nos quais o teste, AAPF-IgG ou AAPF-subclasses de IgG, foi positivo. Já, a especificidade diz respeito à proporção de indivíduos pós-tratamento da LV cujo teste é negativo sendo, portanto, determinada pela relação $d/(b+d)$. Cabe aqui ressaltar que a sensibilidade e a especificidade, não são afetadas pela variação da proporção entre doentes e “não-doente” e, assim são consideradas propriedades “estáveis” do teste.

O valor preditivo de um resultado positivo - VPP (ou probabilidade de LV pós-teste positivo) e o valor preditivo de um resultado negativo - VPN (ou probabilidade da ausência de LV pós-teste negativo) denominados de forma simplificada, de valores preditivos positivo e negativo são fornecidos, respectivamente, pelas relações $a/(a+b)$ e $d/(c+d)$ traduzindo, assim, a proporção de indivíduos com teste positivo que apresentam LV e a proporção de indivíduos com teste negativo que não apresentam LV. Os valores preditivos, ao contrário da sensibilidade e especificidade, são definidos a partir do eixo horizontal da tabela, portanto, variam com a

proporção entre pacientes positivos para LV e pacientes após tratamento da LV, sendo então, consideradas propriedades instáveis de um teste.

Uma outra forma de abordagem do desempenho de testes diagnósticos, particularmente daqueles cujos resultados são expressos em escala contínua, consiste na determinação das razões de verossimilhança (RVs) para diferentes resultados. A RV para um determinado resultado do teste sorológico é expressa em chance e é definida pela razão entre proporção de um referido resultado em pacientes antes do tratamento/portadores de LV (AT) em relação à proporção do mesmo resultado em indivíduos tratados de LV (2m-PT ou 6m-PT ou 12m-PT). As RVs para um resultado positivo ou negativo dos testes foram determinadas, respectivamente, pelas relações $[a/(a+c)]/[b/(b+d)]$ e $[c/(a+c)]/[d/(b+d)]$. Desta forma, as RVs expressam quantas vezes é mais provável (ou menos provável) se encontrar um determinado resultado do teste, neste estudo AAPF-IgG ou AAPF-subclasses de IgG, em um paciente antes do tratamento/portador de LV (AT) em relação a um indivíduo pós-tratamento da LV (PT).

Essa forma de abordagem permite ampliar o espectro de informações úteis em relação às fornecidas pelos indicadores calculados a partir de resultado dicotômico (positivo/negativo), uma vez que permitiu também trabalhar diferentes faixas de valores de resultados, também definidas por pontos de corte.

A literatura registra que valores acima de 10 praticamente confirmam a presença de doença e valores abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência de doença (Jaeschke *et. al.*, 1994).

9.5. Intervalo de confiança – IC.

Os índices avaliados neste estudo foram expressos com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC_{95%}) calculados pelo método do Fleiss Quadratic (Fleiss 1981). Embora os valores calculados para os diferentes indicadores representem a melhor estimativa do valor real do índice, este pode corresponder (obviamente com uma probabilidade de 95%) a qualquer outro valor situado entre os extremos definidos pelo intervalo de confiança a 95%. Além de permitir a inferência do valor do índice, o intervalo de confiança a 95% também fornece informação a respeito da precisão do valor estimado, que está relacionado com a amplitude do referido intervalo, sendo que intervalos mais estreitos correspondem a estimativas mais precisas.

RESULTADOS

I. Estabelecimento de uma nova metodologia de pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, por citometria de fluxo (AAPF-IgG), aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na LV.

Dentre os tópicos abordados na análise da resposta imune humoral na LV, pode-se citar aqueles que avaliam o uso das investigações sorológicas na monitoração de cura da doença. Os principais questionamentos enfrentados por pesquisadores em investigações sorológicas estão baseados nos problemas relacionados à sensibilidade e especificidade dos testes. No que se refere a especificidade, a reatividade cruzada existente entre soros de hospedeiros infectados com outros protozoários, principalmente tripanosomatídeos, têm sido o centro das atenções. No âmbito da sensibilidade, encontram-se os estudos que visam a busca de métodos mais sensíveis.

Os métodos sorológicos de diagnóstico e monitoração de cura, mais amplamente utilizados na LV, como RIFI e ELISA são utilizados por apresentarem uma boa produtividade e fácil operacionalização, entretanto, atribui-se, porém baixa especificidade devido a elevada taxa de reatividade cruzada entre as diversas espécies de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos (Kar 1995). Vários autores procuram superar as limitações destas técnicas e o principal desafio tem sido a busca de uma preparação do antígeno ideal para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*.

Considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo (Martins-Filho *et al.* 1995, Cordeiro *et al.* 2001), sistema metodológico com sensibilidade muito superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, foi proposto pelo nosso grupo, padronizar uma metodologia de pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas (AAPF-IgG) de *Leishmania (L.) chagasi*, na busca de uma metodologia alternativa que possa ser utilizada na monitoração de cura na LV.

Para responder a esta questão realizamos um estudo inicial da influência de algumas variáveis chaves da reação antígeno-anticorpo, na busca de evidências de reatividade sorológica diferencial entre soros de pacientes portadores de LV (soros positivos) e indivíduos não infectados (soros negativos). Nesta etapa inicial de padronização, a escolha de variáveis como: o número de parasitos em suspensão ($5,0 \times 10^6$ promastigotas/mL), a temperatura e tempo de reação (37°C por 30 minutos), basearam-se nas condições descritas por Rocha *et al.*, (2002) para pesquisa de anticorpos humanos anti- *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Inicialmente, no presente estudo, buscou-se identificar a concentração ideal da mistura de soros positivos e negativos para LV e a concentração ideal do anticorpo anti-Fc de IgG humano. Numa segunda etapa, foi avaliada a influência da fase de cultivo das formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, visando identificar as condições experimentais que melhor permitissem distinguir o perfil da reatividade dos soros positivos e negativos para LV.

1. Influência da concentração do soro teste e do anticorpo secundário anti-IgG humano.

A Figura 4 mostra as curvas de titulação de AAPF-IgG em mistura de soros de indivíduos positivos e negativos para LV, nas diluições (1:200 a 1:204.800) após a incubação com formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* de 10 dias de cultivo, nas condições previamente padronizadas por Rocha *et al.*, (2002) para a pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* aplicada ao diagnóstico e monitoração de cura da leishmaniose tegumentar americana.

A revelação da ligação de anticorpos IgG total a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos policlonais anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC em diferentes concentrações (1:1.000, 1:2.000 e 1:4.000). A análise dos resultados demonstrou uma alta reatividade para a mistura dos soros de indivíduos positivos para LV, em todas as diluições testadas para o anticorpo secundário. Por outro lado, foi observada uma alta reatividade para a mistura dos soros de indivíduos negativos para LV apenas nas primeiras diluições, fato esse observado para todas as diluições testadas para o anticorpo secundário (Figura 4A).

Visando prosseguir na identificação da concentração do anticorpo secundário, posteriormente, foi realizado um segundo teste de padronização, utilizando diluições dos soros de 1:1.000 a 1:128.000 e preparações do anticorpo secundário diluídas de 1:4.000 a 1:16.000. Os resultados mostraram valores elevados de PFP para a mistura dos soros de indivíduos positivos para LV em todas as diluições testadas para o anticorpo secundário. De forma diferente, os resultados mostraram valores de PFP pouco reativos para a mistura dos soros de indivíduos negativos para LV em todas as diluições testadas para o anticorpo secundário. Dessa forma, foi possível segregar com maior segurança as misturas de soros positivos e negativos para LV, numa ampla faixa de diluição das amostras avaliadas. A partir dos resultados obtidos, foi escolhida a

diluição do anticorpo secundário de 1:16.000 e mantendo-se as diluições dos soros de 1:1.000 a 1:128.000 (Figura 4B).

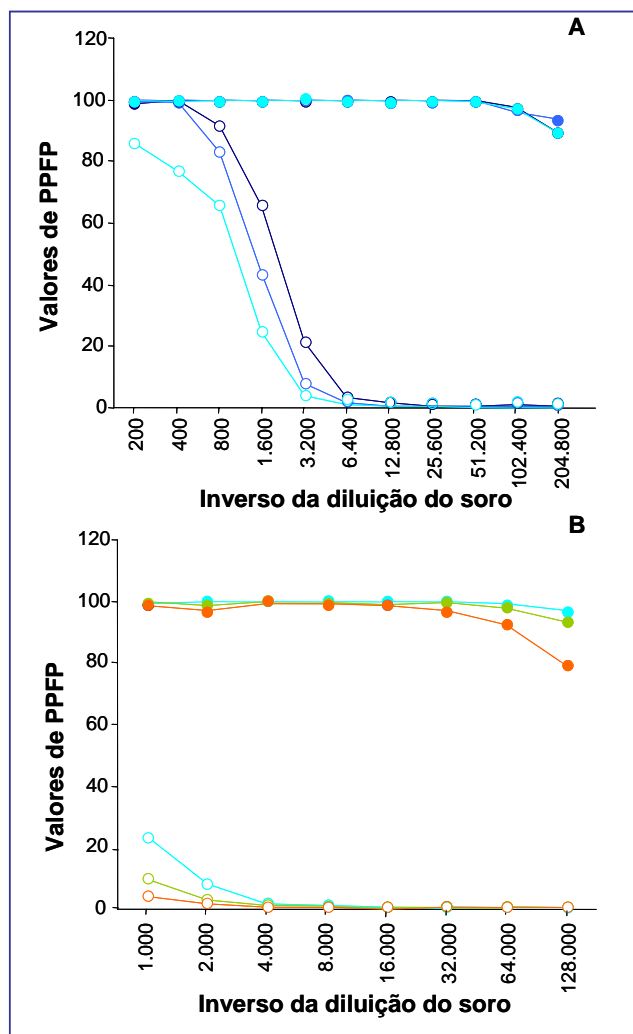


Figura 4 - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* utilizando diferentes diluições do soro teste e diferentes concentrações do anticorpo secundário anti-IgG humano. Os resultados estão expressos como valores de PFPF para uma mistura de soros positivos (símbolos cheios) e negativos (símbolos vazados) segundo descrito em Material e Métodos. O gráfico A representa valores de PFPF de soros positivos e negativos diluídos 1:200 a 1:204.800 contra anticorpo secundário diluído 1:1.000 (●,○); 1:2.000 (●,○) e 1:4.000 (●,○). O gráfico B representa valores de PFPF de soros diluídos 1:1.000 a 1:128.000 contra anticorpo secundário diluído 1:4.000 (●,○); 1:8.000 (●,○) e 1:16.000 (●,○).

2. Influência da fase de crescimento do parasito na AAPF-IgG para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo.

Numa outra abordagem foi avaliada a reatividade da AAPF-IgG empregando formas promastigotas de diferentes fases de crescimento em meio axênico, visando identificar a preparação antigênica que melhor permitira distinguir pacientes positivos para LV de indivíduos negativos.

A análise da curva de crescimento da *Leishmania (L.) chagasi* em meio LIT representada na Figura 5. A avaliação da curva de crescimento mostrou que a cepa apresentou um crescimento da ordem 10^7 sendo possível observar uma fase exponencial ou logarítmica (log) com intervalo de seis dias de cultivo. O crescimento passou a atingir uma fase estacionária a partir do oitavo dia de cultivo. Nos experimentos para avaliar a influência da fase de crescimento do parasito na reatividade da AAPF-IgG, foram testados três momentos da curva de crescimento, incluindo parasitos em fase exponencial (6º dia), fase estacionária inicial (8º dia) e fase estacionária tardia (10º dia).

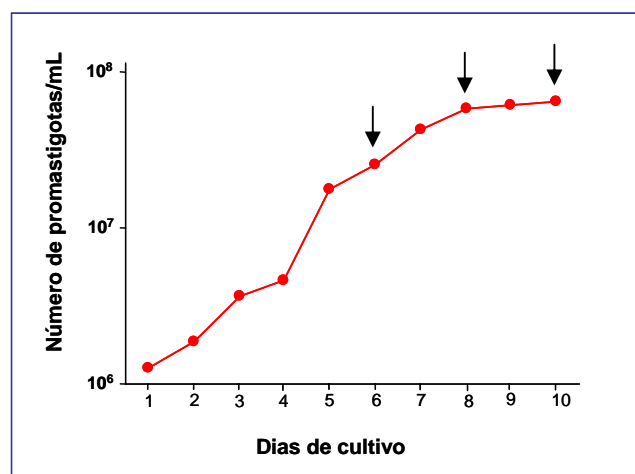


Figura 5 – Curva de crescimento de *Leishmania (L.) chagasi* (PP75) em meio LIT. Início de cultura com $1,0 \times 10^6$ promastigotas/mL. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia de duas culturas. As setas indicam a fase exponencial (6º dia), fase estacionária inicial (8º dia) e fase estacionária tardia (10º dia).

A Figura 6 mostra as curvas de titulação da AAPF-IgG em misturas de soros de indivíduos positivos e indivíduos negativos para LV, empregando promastigotas em diferentes dias de cultivo: fase exponencial (6º dia), fase estacionária inicial (8º dia) e fase estacionária

tardia (10° dia). Os resultados demonstraram que promastigotas de 6, 8 e 10 dias de cultivo apresentaram um perfil de reatividade idêntico, capaz de segregar soros positivos e negativos para LV, em todas as diluições testadas. Entretanto, apenas no oitavo dia de cultivo foi observado um perfil de tamanho versus granulosidade homogêneo como observado na Figura 1A. Durante a fase exponencial (6° dia), a elevada taxa de multiplicação celular promoveu uma elevada heterogeneidade de aspectos morfométricos favorecendo distorções no perfil de tamanho e granulosidade dos parasitos. Da mesma forma, durante a fase estacionária tardia (10° dia), a alta taxa de mortalidade, associada ao processo de metaciclogênese, contribuiu para alterações no perfil de tamanho *versus* granulosidade com elevado grau de “*debris*” celulares, além da maior incidência de população dupla de promastigotas (procíclicas e metacíclicas), respectivamente.

Assim, foi selecionada a utilização de formas promastigotas de fase estacionária inicial (8° dia) para todos os experimentos subseqüentes, considerando suas características intrínsecas de aspectos morfométricos e de antigenicidade.

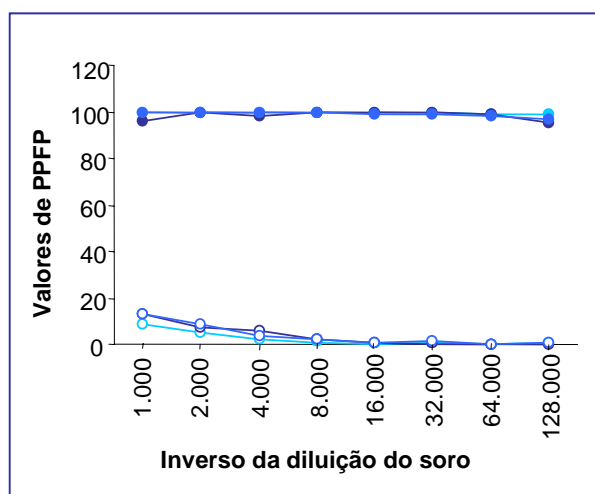


Figura 6 - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* utilizando parasitos em diferentes dias de cultivo. O gráfico representa valores de PPF de uma mistura de soros positivos (símbolos cheios) e negativos (símbolos vazados) diluídos 1:1.000 a 128.000 contra anticorpo secundário diluído a 1:16.000, utilizando promastigotas de 6 dias (●,○); 8 dias (●,○) e 10 dias (●,○).

II. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.

II.1. Aplicabilidade da pesquisa de AAPF-IgG, na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.

Depois de concluída a etapa de padronização da pesquisa de AAPF-IgG, foram conduzidos os estudos sorológicos para a análise da aplicabilidade e do desempenho da metodologia proposta para a monitoração de cura pós-tratamento na LV. Considerando que o padrão ouro de cura pós-terapêutica na LV, consiste de ausência de sinais e sintomas clínicos aos 12 meses pós-tratamento, inicialmente, foi avaliada a aplicabilidade da metodologia proposta para detectar padrão de reatividade diferencial entre pacientes portadores de LV, não tratados, daquele observado para indivíduos clinicamente curados 12 meses após tratamento etiológico da LV, aqui denominado monitoração tardia de cura pós-tratamento na LV.

1. Reatividade média da AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi*, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A Figura 7 mostra os resultados da pesquisa de AAPF-IgG, expressos como média dos valores de PFP e seus respectivos desvios-padrões, para amostras de soros individuais dos grupos de pacientes antes do tratamento (AT) e indivíduos clinicamente curados doze meses após o tratamento (12m-PT), em diferentes diluições da amostra (1:1.000 a 1:128.000). Os resultados demonstraram diferença significativa entre os valores de PFP das amostras de soros dos pacientes AT e 12m-PT em todas as diluições testadas.

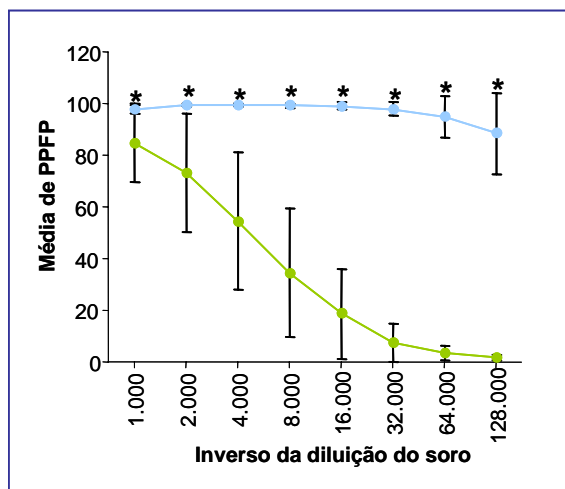


Figura 7 - Curva de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●). Os resultados estão expressos como médias de PPF com os respectivos desvios-padrões. Após análise estatística, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições; $p \leq 0,05$ (*).

Embora esse tipo de abordagem estatística apresenta-se como importante instrumento para identificar diferenças no perfil de reatividade entre grupos de indivíduos, na rotina de um laboratório clínico, esse tipo de abordagem possui utilização restrita uma vez que não se aplica na avaliação individual de amostras de soros. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de métodos estatísticos apropriados para a determinação da reatividade diferencial, em nível individual. O primeiro passo para essa nova abordagem, consiste na identificação da diluição ideal para as amostras de soros a ser utilizada na interpretação dos resultados do ensaio sorológico.

2. Reatividade de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, em soros individuais, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A Figura 8 mostra os resultados da pesquisa de AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi*, expressos em valores de PPF, das amostras dos soros individuais de pacientes antes do tratamento (AT) (Gráfico 8A), e indivíduos clinicamente curados doze meses pós-tratamento (12m-PT) (Gráfico 8B). Empregando-se uma abordagem de sobreposição dos gráficos A (AT) e B (12m-PT), criou-se dessa forma um terceiro gráfico C, foi possível demonstrar a amplitude de segregação da reatividade de IgG entre os grupos AT e 12m-PT (traços vermelhos). Com base na magnitude da

segregação entre os grupos AT e 12m-PT, foi identificada a diluição do soro de 1:32.000 como a ideal para discriminar os grupos avaliados.

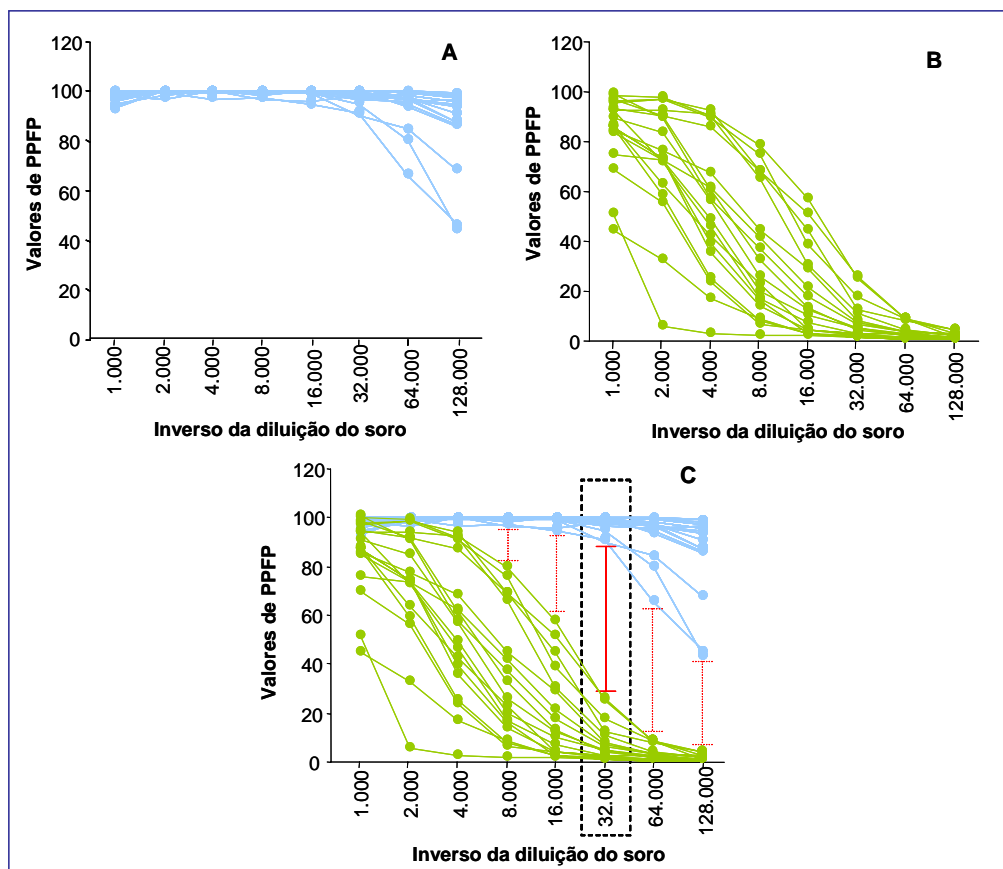


Figura 8 - Curvas de titulação de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●), gráficos A e B, respectivamente. O gráfico C representa a sobreposição dos gráficos A e B e os traços em vermelho referem-se às amplitudes de segregação dos grupos avaliados. O retângulo pontilhado destaca a diluição referente à maior amplitude de segregação. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFPF.

II.2. Desempenho da AAPF-IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

Após a conclusão da performance da pesquisa de AAPF-IgG nas amostras de soros individuais de pacientes AT e 12m-PT, o próximo passo foi avaliar o desempenho da metodologia. Para tal, foram construídas as curvas ROC e calculados os índices de avaliação de

desempenho do teste, expressos em porcentagem e em chance, conforme descrito em Material e Métodos.

1. Estudo da Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A curva ROC da AAPF-IgG aplicada em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV está representada na Figura 9. O estudo da curva ROC sugeriu que na diluição do soro 1:32.000 o ponto de corte (PC) para a segregação dos grupos AT e 12m-PT estaria compreendido numa faixa de 26% a 90% sem variação na sensibilidade (100%) e especificidade (100%). Para a avaliação do desempenho do teste foi considerado o ponto de corte de 50% de PFP, a fim de obter uma margem de segurança entre o PC mínimo e PC máximo.

A análise dos resultados da curva ROC demonstrou ainda que o valor da ASC da AAPF-IgG aplicada em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV foi de 1,0 ($IC_{95\%}=91,3-100,0$). Conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 1,0 indica uma acurácia perfeita da metodologia.

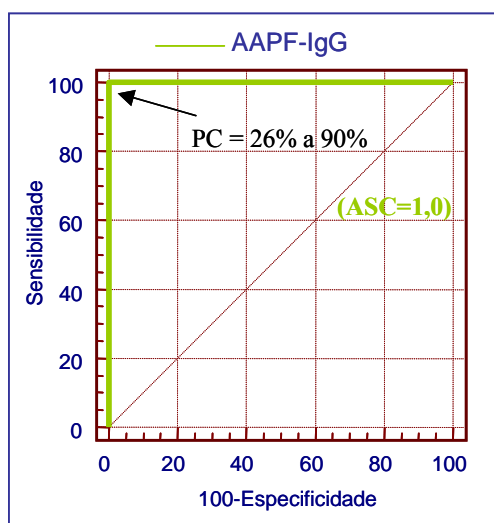


Figura 9 - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste aplicado em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva ($ASC=1,0$). A seta representa a faixa de melhor ponto de corte sugerido pela curva ROC ($PPFP=26\%$ a 90%), para a avaliação de cura doze meses pós-tratamento.

2. Desempenho da AAPF-IgG, segundo índices expressos em porcentagem.

Os resultados de PFP para as amostras individuais dos soros de pacientes AT e 12m-PT, testadas na diluição de 1:32.000, foram analisados com o objetivo de avaliar o desempenho da metodologia na monitoração tardia de cura na LV. A Figura 10 mostra a reatividade de soros individuais dos grupos de pacientes AT e 12m-PT. Empregando-se o do ponto de corte de 50% de PFP, foi possível demonstrar que a pesquisa de AAPF-IgG permite discriminar pacientes antes do tratamento de indivíduos curados doze meses após o tratamento da LV. Identificando os pacientes como negativos aos doze meses após o tratamento, a pesquisa de AAPF-IgG apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

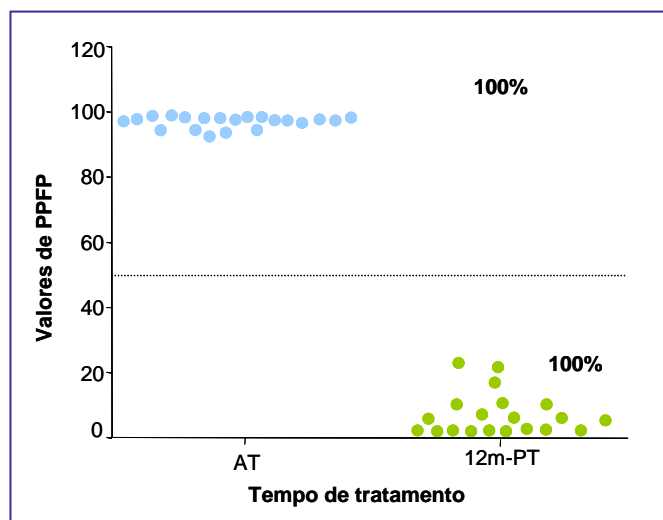


Figura 10 - Reatividade de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT(●) e 12m-PT(●), na diluição 1:32.000. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>50%) e valores negativos (PFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (100%) da AAPF-IgG aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT.

3. Índices de desempenho da AAPF-IgG.

Os resultados da pesquisa de AAPF-IgG aplicada a pacientes portadores de LV antes do tratamento e indivíduos curados doze meses após o tratamento foram classificados em quatro categorias: verdadeiro positivo (VPos), falso positivo (FPos), verdadeiro negativo (VNeg) e falso negativo (FNeg) como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Categorias de resultados da AAPF-IgG (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curados doze meses após o tratamento (12m-PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(12m-PT)	
AAPF-IgG	Positivo (>50%PPFP)	VPos = 21	FPos = 0	21
	Negativo (\leq 50%PPFP)	FNeg = 0	VNeg = 20	20
TOTAL		21	20	41

A Tabela 4 resume as informações referentes aos índices de desempenho da AAPF-IgG, com os seus respectivos intervalos de confiança a 95%. A pesquisa de AAPF-IgG empregada na monitoração de cura após 12 meses de tratamento demonstrou sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia 100%. A análise dos índices de desempenho mostrou que a AAPF-IgG apresentou um ótimo desempenho na monitoração tardia de cura pós-tratamento na LV.

Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa de AAPF-IgG, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

Índices	AAPF-IgG- 12m-PT
	Valores - %
Sensibilidade	100 (84,5-100)
Especificidade	100 (83,9-100)
VPP	100 (84,5-100)
VPN	100 (83,9-100)
Acurácia	100 (91,3-100)

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%

4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG, segundo índices expressos em chance.

Para complementação dos índices de desempenho do método, foram avaliadas as razões de verossimilhança (RVs) para as faixas de valores de PFP estabelecidas na pesquisa de AAPF-IgG. A RV para o resultado positivo da AAPF-IgG (PFP>50%) foi >10 e para o resultado negativo (PFP≤50%) foi de 0,0. Isto significa que o valor de PFP>50% confirma a presença de LV antes do tratamento. Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 50% de PFP apresentam uma chance nula (0,0) de advir de um paciente portador de LV. A análise das RVs confirmou o elevado desempenho do método avaliado através de indicadores expressos em chance, PFP>50% contribuem para a confirmação de pacientes antes do tratamento e valores de PFP≤50% excluem pacientes antes do tratamento de LV (Tabela 5).

Tabela 5 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG, na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes doze meses após o tratamento.

AAPF-IgG - 12m-PT	RVs
>50	>10*
≤50	0,0**

*RV que contribui para confirmação de portadores de LV.

**RV que praticamente exclui a presença de LV.

III. Avaliação comparativa da AAPF-IgG e do ensaio imunoenzimático (ELISA) aplicados à monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV através de índices expressos em percentual.

Com o objetivo de avaliar comparativamente a pesquisa de AAPF-IgG e o ensaio imunoenzimático (ELISA) na monitoração de cura da LV, foram avaliados paralelamente os desempenhos das duas metodologias. Para tal, foram calculados os índices de desempenho expressos em porcentagem.

A Figura 11 mostra os resultados da reatividade de IgG detectados por ELISA dos soros de paciente antes do tratamento (AT) e doze meses após o tratamento (12m-PT). A análise dos dados demonstrou que a ELISA foi capaz de identificar como positivas todas as amostras testadas antes do tratamento, qualificando o método com 100% de sensibilidade. Entretanto, quando aplicada na pesquisa sorológica de indivíduos curados doze meses após o tratamento, a ELISA permitiu identificar somente 18 amostras como negativas, demonstrando assim, uma especificidade de 85,7% quando aplicada na monitoração de cura da LV.

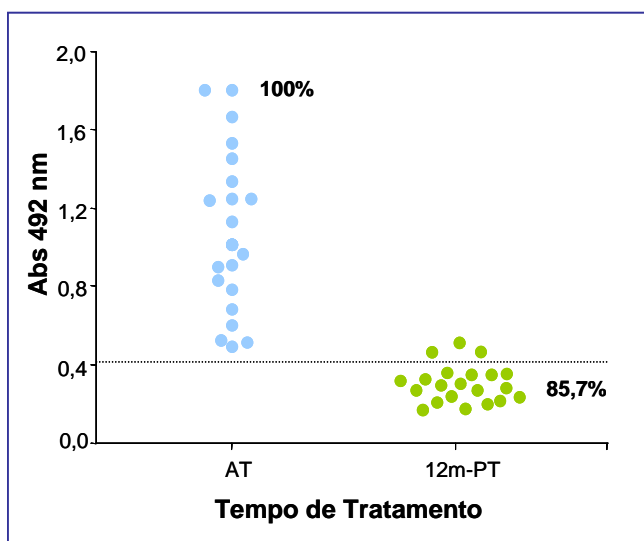


Figura 11 – Reatividade de IgG anti-antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* por ELISA, em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses após o tratamento (●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como densidade óptica, empregando o valor de 0,440 (linha pontilhada) como ponto de corte entre resultados positivos e negativos. Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (85,7%) da ELISA aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT.

A Tabela 6 resume as informações referentes à avaliação comparativa da AAPF-IgG e do ensaio imunoenzimático (ELISA) aplicados à monitoração tardia de cura pós-tratamento da LV através de índices expressos em percentual, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%. Os resultados mostram o ganho relativo da AAPF-IgG em relação a ELISA, expresso em porcentagem. Na análise de desempenho observa-se que a AAPF-IgG apresentou ganho real (superior a 10%) nos índices especificidade e VPP em relação a ELISA.

Tabela 6 - Índices de desempenho da ELISA e da pesquisa de AAPF-IgG na monitoração de cura 12 meses após o tratamento da LV.

Índices	AAPF-IgG	ELISA	Ganho -%
	Valores - %	Valores -%	
Sensibilidade	100 (84,5-100)	100 (84,5-100)	00,0
Especificidade	100 (83,9-100)	85,7 (65,4-95)	14,3
VPP	100 (84,5-100)	87,5 (69,0-95)	12,5
VPN	100 (83,9-100)	100 (82,4-100)	00,0
Acurácia	100 (91,3-100)	99,5 (90,7-100)	01,5

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%. Em vermelho estão destacados os ganhos considerados reais (superiores a 10%)

IV. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.

IV.1. Aplicabilidade da pesquisa de AAPF-IgG, na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.

Após a análise dos resultados da AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi* em relação à ELISA foi possível demonstrar que devido ao seu desempenho elevado, essa metodologia poderia ser uma ferramenta sorológica adicional na monitoração tardia de cura pós-terapêutica na LV.

Aqui, cabe ressaltar que um método laboratorial que realmente apresentasse valor na monitoração de cura pós-terapêutica na LV seria aquele que proporcionasse uma predição precoce de cura, uma vez que, o critério de cura clínico já contempla o parâmetro tardio de cura pós-terapêutica aos doze meses após o tratamento.

Assim, foi de interesse avaliar a pesquisa de IgG na monitoração precoce de cura em indivíduos clinicamente curado após tratamento etiológico eficaz. O acompanhamento sorológico foi realizado aos dois meses e seis meses após o tratamento, utilizando o mesmo critério adotado na pesquisa da AAPF-IgG para monitoração tardia. Os resultados foram avaliados na diluição do soro de 1:32.000 e ponto de corte de 50% de PFP como ponto de corte para a segregação de resultados positivos e negativos.

1. Reatividade da pesquisa de AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi* em soro individuais de pacientes dois meses pós-tratamento (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT).

A Figura 12 mostra os resultados da AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi*, expressos em valores de PFP, das amostras dos soros individuais de pacientes 2m-PT (Gráfico 12A) e 6m-PT (Gráfico 12B). O estudo das amostras individuais demonstrou uma elevada reatividade de IgG ao longo da curva de titulação dos soros de pacientes 2m-PT. A curva de titulação das amostras de soros de pacientes 6m-PT revelou um padrão variado de reatividade, com maior número de amostras apresentando baixa reatividade. Os valores de PFP avaliados na diluição do soro de 1:32.000 para as amostras testadas 2m-PT não apresentou aplicabilidade na monitoração precoce

de cura, uma vez que, apenas 1 paciente apresentou valor de PFPF abaixo do ponto de corte de 50%, qualificando o método com uma especificidade de 4,8%. Por outro lado, um elevado número de amostras de soro de pacientes 6m-PT apresentou baixa reatividade, demonstrando a aplicabilidade da AAPF-IgG quando aplicada aos seis meses pós-tratamento da LV.

Dessa forma, a seguir foi avaliado o desempenho apenas da AAPF-IgG aplicada apenas em amostras de soro obtidas de pacientes 6m-PT.

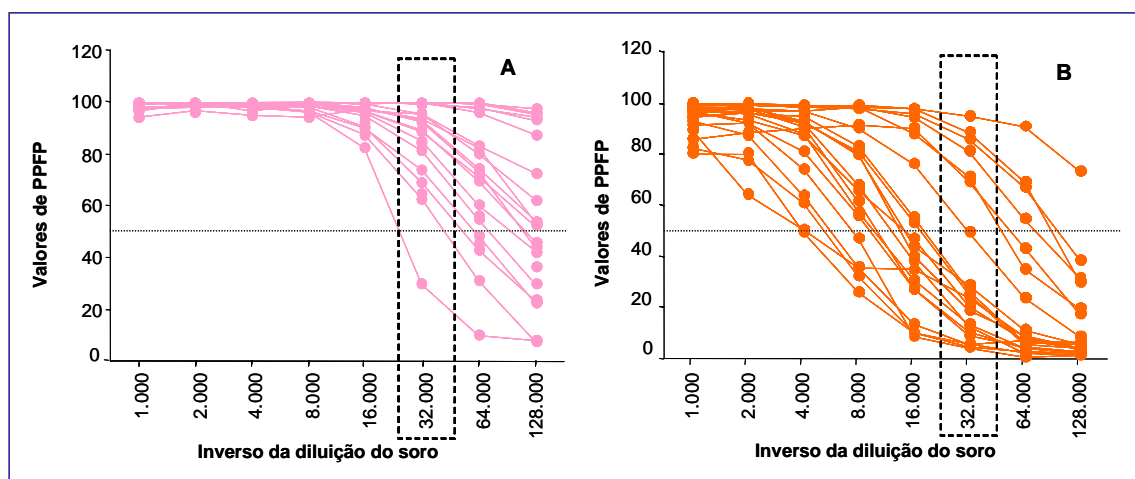


Figura 12 - Curvas de titulação de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes 2m-PT (●) e 6m-PT (●), gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFPF. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PFPF e a diluição de 1:32.000 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura na LV.

IV.2. Desempenho da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

1. Estudo da Curva ROC da AAPF-IgG em soros de pacientes antes (AT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV.

A curva ROC da AAPF-IgG aplicada em soros de pacientes antes (AT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV está representada na Figura 13. Após a obtenção dos resultados individuais dos valores de PFPF da AAPF-IgG aos seis meses pós-tratamento na diluição do soro

1:32.000, os valores para os grupos AT e 6m-PT foram trabalhados no ponto de corte de PFP de 50%, a fim de construir a curva ROC do teste utilizando-se o programa estatístico MedCalc Statistical. A análise do resultado demonstrou que o valor da área sob a curva da AAPF-IgG foi de 0,99 ($IC_{95\%}=90,2-100,0$). Conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 0,99 apresentado pela AAPF-IgG indica uma acurácia elevada da metodologia.

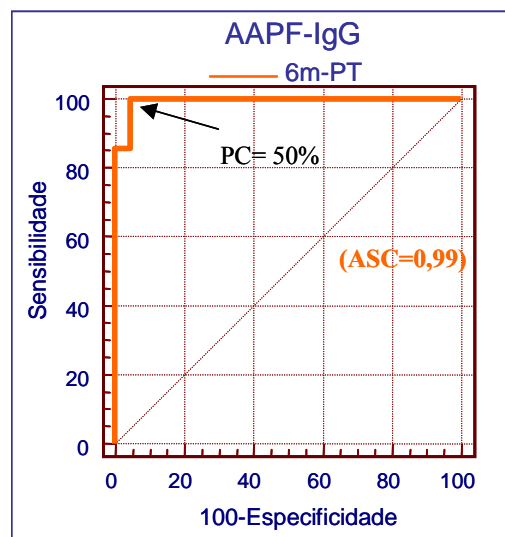


Figura 13 - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste aplicado em soros de pacientes antes (AT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva ($ASC=0,99$), utilizando-se o critério de PC de 50% de PFP.

2. Desempenho da AAPF-IgG, segundo índices expressos em porcentagem.

Os resultados de PFP para as amostras individuais dos soros de pacientes AT e 6m-PT, obtidos na diluição 1:32.000, foram analisados com o objetivo de avaliar o desempenho da metodologia na monitoração precoce de cura na LV. A Figura 14 mostra a reatividade de soros individuais dos grupos de pacientes AT e 6m-PT. Empregando o ponto de corte de 50% de PFP, foi possível demonstrar que a pesquisa de AAPF-IgG permitiu discriminar a reatividade de amostras obtidas de pacientes antes do tratamento daquela observada para amostras de indivíduos 6m-PT. Os resultados permitiram identificar 71,4% (15/21) dos pacientes com valores de PFP

restritos a uma região de resultados negativos, demonstrando o bom desempenho da metodologia na monitoração de cura precoce quando aplicada aos 6m-PT.

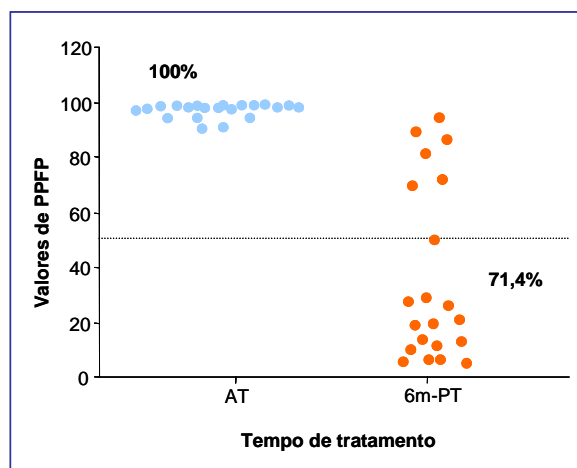


Figura 14 - Reatividade de IgG anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT(●) e 6m-PT(●), na diluição 1:32.000. Os resultados da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PPFp, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP>50%) e negativos (PPFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade de 100% e especificidade de 71,4% em soro de pacientes AT e 6m-PT, respectivamente.

3. Índices de desempenho da AAPF-IgG.

Os resultados da pesquisa de AAPF-IgG aplicada a pacientes portadores de LV antes do tratamento e seis meses após o tratamento foram classificados em quatro categorias: verdadeiro positivo (VPos), falso positivo (FPos), verdadeiro negativo (VNeg) e falso negativo (FNeg) como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Categorias de resultados da AAPF-IgG (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(6m-PT)	
AAPF-IgG	Positivo (>50%PPFP)	VPos = 21	FPos = 6	27
	Negativo (≤50%PPFP)	FNeg = 0	VNeg = 15	15
TOTAL		21	21	42

Tabela 8 resume as informações referentes aos índices de desempenho da AAPF-IgG, com os seus respectivos intervalos de confiança a 95%. A pesquisa de AAPF-IgG empregada na monitoração de cura após seis meses de tratamento demonstrou sensibilidade de 100%, especificidade de 71,4%, valor preditivo positivo 77,8%, valor preditivo negativo de 100% e acurácia de 99%. A análise dos índices de desempenho mostrou que a AAPF-IgG apresentou um bom desempenho na monitoração precoce de cura pós-tratamento na LV.

Tabela 8- Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG, com seus respectivos intervalos de confiança a 95% na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento (6m-PT).

Índices	AAPF-IgG – 6m-PT
	Valores - %
Sensibilidade	100 (84,5-100)
Especificidade	71,4 (50,0-86,2)
VPP	77,8 (59,2-89,4)
VPN	100 (79,6-100)
Acurácia	99,0 (90,2-100)

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%

4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG, segundo índices expressos em chance.

Para complementação dos índices de desempenho do método, foram avaliadas as razões de verossimilhança (RVs). A RV para o resultado positivo da AAPF-IgG (PPFP>50%) foi 3,5 e para o resultado negativo (PPFP≤50%) foi de 0,0. Isto significa que o valor de PPFP>50% é cerca de 3,5 vezes mais provável de ser observado em um paciente com LV antes do tratamento em relação a um paciente após o tratamento. Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 50% de PPFP apresentam uma chance nula (0,0) de advir de um paciente portador de LV. A análise das RVs da AAPF-IgG confirmou o bom desempenho do método para a exclusão da presença de doença em pacientes que apresentem PPFP≤50% (Tabela 9).

Tabela 9 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG, na diluição do soro 1:32.000 e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento.

AAPF-IgG - 6m-PT	(RVs)
>50	3,5
≤50	0,0**

**RV que praticamente exclui a presença de LV.

V. Padronização da metodologia para a pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF-subclasses de IgG), aplicada à monitoração de cura pós-tratamento na LV.

A análise dos índices de desempenho permitiu qualificar a AAPF-IgG como uma metodologia de bom desempenho aplicável na monitoração precoce de cura na LV aos 6m-PT.

Visando aprimorar o desempenho da metodologia na monitoração de cura pós-tratamento na LV, principalmente na monitoração precoce de cura aos dois meses pós-tratamento, o próximo passo consistiu no estabelecimento de uma metodologia de pesquisa de subclasses de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, a qual poderia representar um importante avanço na busca de uma maior especificidade do método.

Para tal, foi proposto um estudo detalhado para avaliar a utilidade da AAPF-subclasses de IgG para identificar reatividade diferencial das amostras de soro de pacientes inicialmente analisadas pela AAPF-IgG. Assim para a pesquisa de subclasses de IgG foram conduzidas inicialmente todas as etapas de padronização aplicadas para AAPF-IgG, exceto a análise da influência do dia de cultivo do parasito, variável considerada otimizada para qualquer modalidade da AAPF.

Numa etapa subsequente, a AAPF-subclasses de IgG foi aplicada em amostras antes do tratamento (AT), dois meses (2m-PT), seis meses (6m-PT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT).

1. Influência da concentração do soro e do anticorpo secundário na pesquisa da AAPF-subclasses de IgG.

Para análise da reatividade de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* foram empregadas diluições seriadas de misturas de soros positivos para LV antes do tratamento (AT) e misturas de soros negativos para LV.

A revelação da ligação das subclasses de anticorpos IgG a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos monoclonais anti-subclasses de IgG humano,

conjugados com biotina em diferentes concentrações, seguida pela incubação com estreptoavidina marcada com PE (SAPE) (Figura 15).

Para a pesquisa de AAPF-IgG1 (Gráfico 15A) foram utilizadas diluições das misturas dos soros de 1.000 a 128.000 e preparações do anticorpo secundário diluídas de 1:2.000 a 1:8.000. As curvas de titulação de IgG1 demonstraram valores elevados de PFP para o grupo AT em todas as diluições testadas para o anticorpo secundário e baixa reatividade para a mistura de soros negativos para LV.

Para a pesquisa de AAPF-IgG2 (Gráfico 15B) e AAPF-IgG4 (Gráfico 15D), foram testadas diluições dos soros de 1:40 a 1:5.120 e preparações dos anticorpos secundários diluídos de 1:500 a 1:2.000. Durante os experimentos de padronização, os resultados demonstraram ausência de reatividade para as subclasses IgG2 e IgG4. Assim, a AAPF-IgG2 e AAPF-IgG4 não foram incluídas nesse estudo.

Para a AAPF-IgG3 (Gráfico 15C) foram testadas diluições dos soros de 1:40 a 1:5.120 e preparações do anticorpo secundário diluídas de 1:400 a 1:800. Os resultados de IgG3 mostraram valores elevados de PFP para a mistura de soros de indivíduos positivos para LV em relação aos soros de indivíduos negativos para LV.

Com base nesses dados, continuamos a análise da aplicabilidade da AAPF-subclasses de IgG avaliando apenas IgG1 e IgG3, utilizando a diluição do soro de 1:1.000 a 128.000 e concentração do anticorpo secundário a 1:16.000 na pesquisa de IgG1 e a diluição do soro de 1:40 a 1:5.120 e a concentração do anticorpo secundário a 1:400 para a avaliação da reatividade de IgG3.

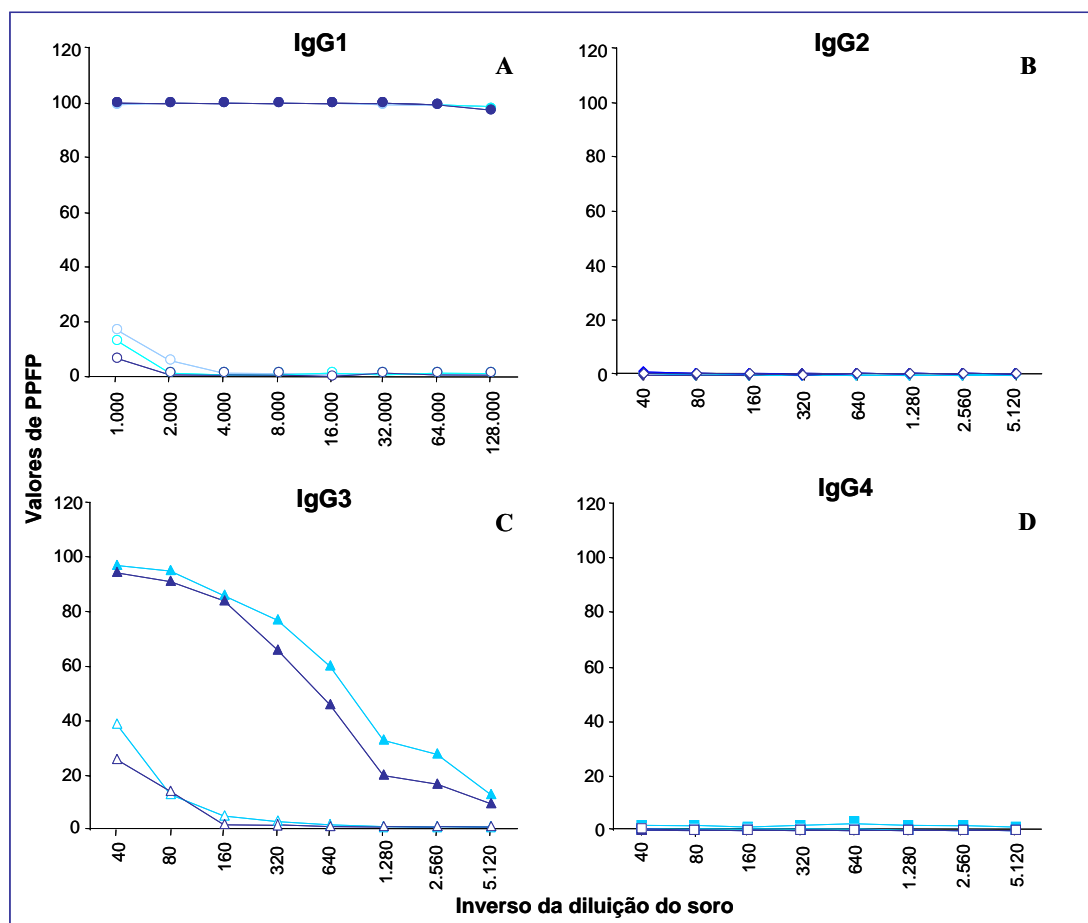


Figura 15 - Curva de titulação de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*. As misturas de soros positivos (AT) estão representadas como símbolos cheios e as misturas de soros negativos estão representados como símbolos vazados. O gráfico A representa valores de PFP de soros diluídos 1:1.000 a 1:128.000 contra anticorpo IgG1 diluído 1:2.000 (●,○); 1:4.000 (●,○) e 1:8.000 (●,○). O gráfico B representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG2 1:500 (◆,◇); 1:1.000 (◆,◇) e 1:2.000 (◆,◇). O gráfico C, representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG3 1:400 (▲,△) e 1:800 (▲,△). O gráfico D representa valores de PFP para as diluições dos soros 1:40 a 1:5.120 e diluições do anticorpo IgG4 1:500 (■,□); 1:1.000 (■,□) e 1:2.000 (■,□).

VI. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.

VI. 1. Aplicabilidade da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV.

Após conclusão da etapa de padronização da AAPF-IgG-subclasses de IgG, foram conduzidos os estudos sorológicos para a análise da aplicabilidade e do desempenho da metodologia proposta para a monitoração de cura pós-tratamento na LV. Considerando que o padrão ouro de cura pós-terapêutica na LV, consiste de ausência de sinais e sintomas clínicos aos 12 meses pós-tratamento, inicialmente, foi avaliada a aplicabilidade da metodologia proposta para detectar padrão de reatividade diferencial entre pacientes portadores de LV, não tratados, daquele observado para indivíduos clinicamente curados 12 meses após tratamento etiológico da LV, aqui denominado monitoração tardia de cura pós-tratamento na LV. Nesse contexto foi adotada a mesma seqüência de passos utilizada para a avaliação da aplicabilidade da AAPF-IgG, para identificação da melhor diluição do soro e do ponto de corte ideal para segregação dos grupos clínicos.

1. Reatividade média da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 de *L. (L.) chagasi*, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A Figura 16 mostra os resultados da pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, expressos como média dos valores de PFP e seus respectivos desvios-padrões, para amostras de soros individuais dos grupos de pacientes antes do tratamento (AT) e doze meses após o tratamento (12m-PT), em diferentes diluições da amostra. Os resultados demonstraram diferença significativa entre os valores de PFP das amostras de soros dos pacientes AT e 12m-PT em todas as diluições testadas.

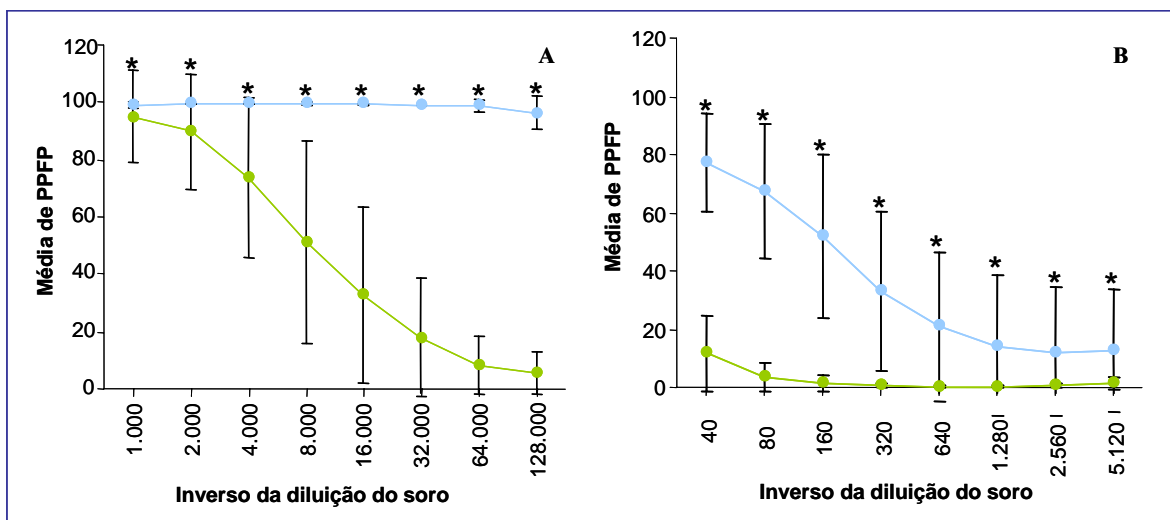


Figura 16 - Curva de titulação de IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soro de pacientes AT (●) e doze meses pós-tratamento (●). Os resultados estão expressos como médias de PFP com os respectivos desvios-padrões. Após análise estatística, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições; $p \leq 0,05$ (*).

Embora esse tipo de abordagem estatística apresenta-se como importante instrumento para identificar diferenças no perfil de reatividade entre grupos de indivíduos, na rotina de um laboratório clínico, esse tipo de abordagem possui utilização restrita uma vez que não se aplica na avaliação individual de amostras de soros. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de métodos estatísticos apropriados para a determinação da reatividade diferencial, em nível individual. O primeiro passo para essa nova abordagem, consiste na identificação da diluição ideal para as amostras de soros a ser utilizada na interpretação dos resultados do ensaio sorológico.

2. Reatividade de IgG1 e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, em soros individuais, antes do tratamento (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A Figura 17 mostra os resultados da pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 de *L. (L.) chagasi*, expressos em valores de PFP, das amostras dos soros individuais de pacientes antes do tratamento (AT) e indivíduos clinicamente curados doze meses pós-tratamento (12m-PT).

Para a pesquisa de AAPF-IgG1 empregando-se a abordagem de sobreposição dos gráficos de amostras de soros de pacientes individuais antes do tratamento (Gráfico 17A) e de amostras de

soros de indivíduos clinicamente curados doze meses após o tratamento (Gráfico 17B), criando um terceiro gráfico C, foi possível demonstrar a amplitude de segregação da reatividade de IgG1 entre os dois grupos AT e 12m-PT (traços vermelhos). Com base na segregação entre os grupos, foi identificada a diluição do soro de 1:128.000 como a ideal para discriminar os grupos AT (A) e 12m-PT (B).

Para a pesquisa de AAPF-IgG3 foi empregada a mesma estratégia de sobreposição dos gráficos. Através da sobreposição dos gráficos de amostras de soros de pacientes antes do tratamento (Gráfico 17D) e indivíduos clinicamente curados doze meses após o tratamento (Gráfico 17E), foi construído o gráfico F. Visando preservar ao máximo a sensibilidade da metodologia, foi identificada como a melhor diluição aquela que detectou o maior número de pacientes antes do tratamento com valores mais elevados de PFP. Em vista disso, foi selecionada a diluição de 1:40 como a diluição ideal para discriminar pacientes AT (D) e 12m-PT (E).

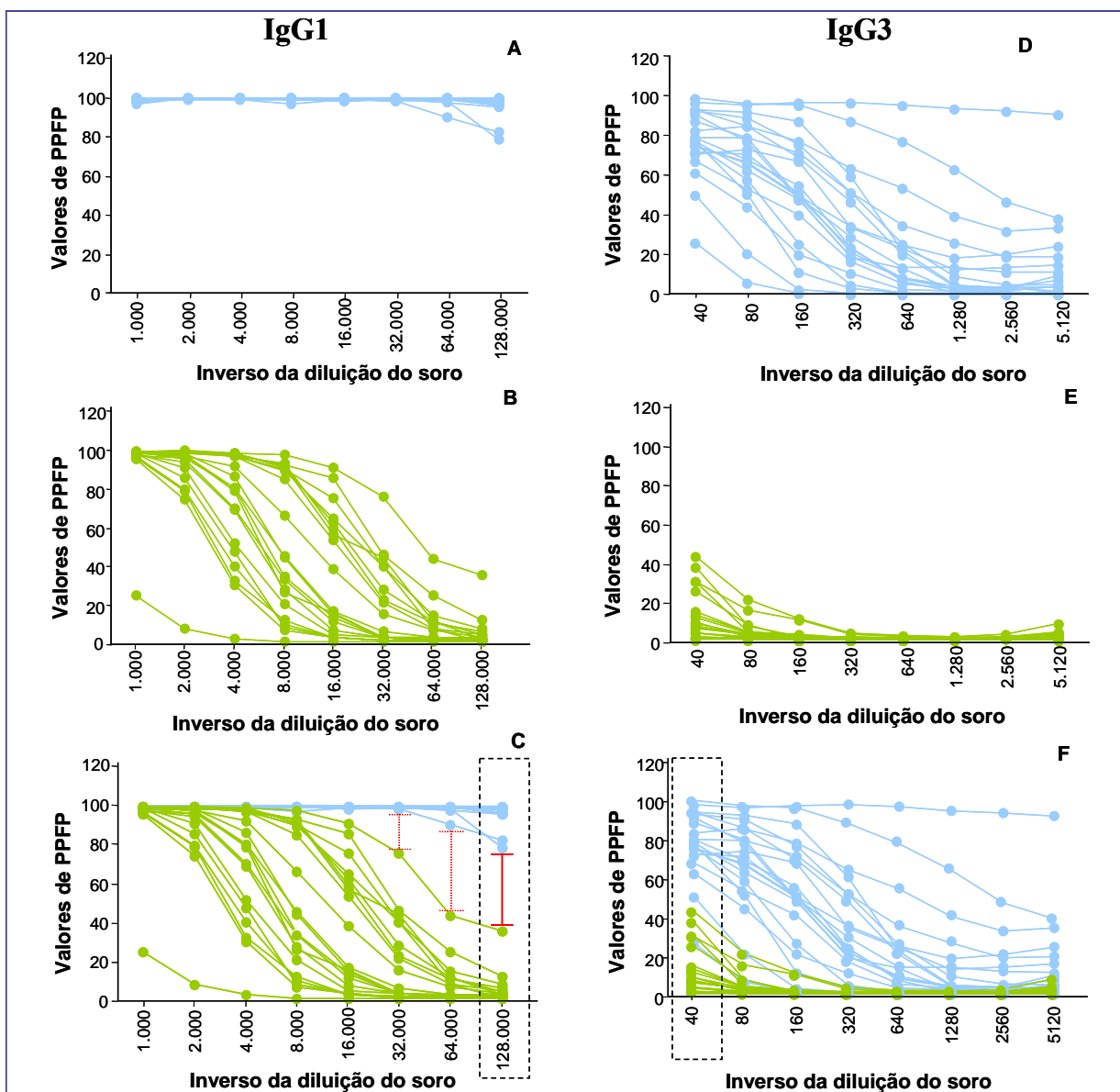


Figura 17 - Curva de titulação de IgG1e IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes antes do tratamento (●) e doze meses pós-tratamento (●). Os gráficos A e B foram sobrepostos para uma melhor visualização da segregação entre as diluições AT e 12m-PT na pesquisa de IgG1 (C). Os gráficos D e E foram sobrepostos para uma melhor visualização da segregação entre as diluições AT e 12m-PT na pesquisa de IgG3 (F). Os traços em vermelho referem-se às amplitudes de segregação dos grupos avaliados. O retângulo pontilhado destaca a diluição referente à maior amplitude de segregação e diluição escolhida.

VI.2. Desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

Uma vez identificada a aplicabilidade da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 para a segregação das amostras de soros individuais de pacientes AT e 12m-PT, o próximo passo foi avaliar o desempenho da metodologia. Para tal, foram construídas as curvas ROC e calculados os índices de avaliação de desempenho do teste, expressos em porcentagem e em chance.

1. Estudo da Curva ROC da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV.

A curva ROC da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 aplicada em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV está representada na figura 18. O estudo da curva ROC sugeriu que na diluição do soro 1:128.000 na pesquisa de AAPF-IgG1 o ponto de corte (PC) para a segregação dos grupos AT e 12m-PT estaria compreendido numa faixa de 13% a 79% de PFP, sem variação na sensibilidade (100%) e especificidade (100%). Para a avaliação do desempenho do teste foi considerado o ponto de corte de 50% de PFP, a fim de obtermos uma margem de segurança entre o PC mínimo e PC máximo, semelhante ao que foi realizado na pesquisa de AAPF-IgG.

A análise do resultado da curva ROC demonstrou ainda que o valor da ASC da AAPF-IgG1 aplicada em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV foi de 1,0 ($IC_{95\%}=91,5-100,0$) indicando uma acurácia perfeita da metodologia.

No estudo da curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG3 foi sugerido que na diluição do soro de 1:40, o ponto de corte para a discriminação das amostras dos soros individuais dos grupos avaliados compreendia um intervalo de 37% a 50% de PFP sem que houvesse variação na sensibilidade (90,5%) e especificidade (100%). Dessa forma, foi considerado o ponto de corte de PFP=50%, a fim de obtermos uma margem de segurança entre o PC mínimo e PC máximo. A análise da curva ROC para AAPF-IgG3 demonstrou ainda que o valor da ASC foi de 0,99 ($IC_{95\%}=89,8-100,0$) indicando uma acurácia elevada da metodologia.

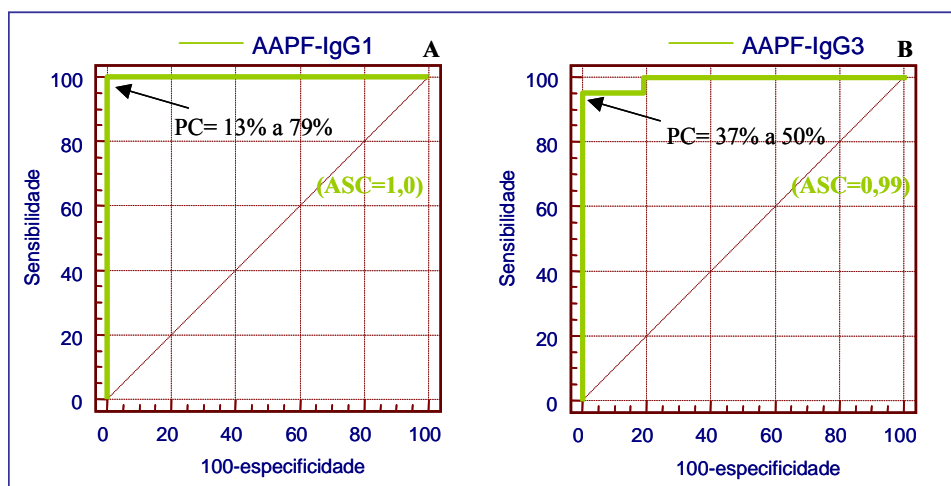


Figura 18 - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 (A) e AAPF-IgG3 (B), construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade) do teste avaliado aplicado em soros de pacientes antes (AT) e doze meses pós-tratamento (12m-PT) da LV. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva (ASC=1,0) (A) e (ASC=0,99) (B). A seta representa a faixa de melhor ponto de corte sugerido pela curva ROC (PPFP=13% a 79%) e (PPFP=37% a 50%), para a avaliação de cura doze meses pós-tratamento na AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 respectivamente.

2. Desempenho da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em porcentagem.

Os resultados de PFP para as amostras individuais dos soros de pacientes AT e 12m-PT, testadas nas diluições escolhidas, foram analisados com o objetivo de avaliar o desempenho da metodologia na monitoração tardia de cura na LV. A Figura 19 mostra a reatividade de soros individuais dos grupos de pacientes AT e 12m-PT na pesquisa da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 de *L. (L.) chagasi*. Empregando-se o ponto de corte de 50% de PFP, foi possível demonstrar que a metodologia permite discriminar pacientes antes do tratamento de indivíduos curados doze meses após o tratamento da LV tanto na pesquisa de IgG1 quanto na pesquisa de IgG3. Identificando os pacientes como negativos aos doze meses após o tratamento, a pesquisa de AAPF-IgG1 apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Na pesquisa de AAPF-IgG3 identificando os pacientes como negativos aos doze meses após o tratamento, a metodologia demonstrou 90,5% de sensibilidade e 100% de especificidade.

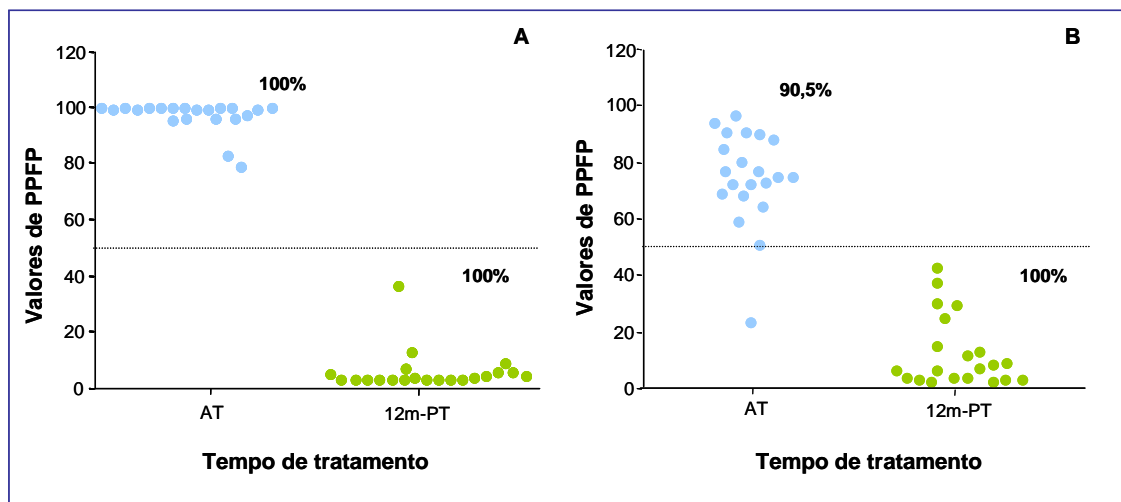


Figura 19 - Reatividade de IgG1 (A) e IgG3 (B) anti-promastigota de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●) e 12m-PT (●). Os resultados da reatividade de IgG1 e IgG3 para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>50%) e negativos (PFP≤50%). Os resultados mostram a sensibilidade (100%) e especificidade (100%) da AAPF-IgG1 aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT e sensibilidade de (90,5%) e especificidade de (100%) da AAPF-IgG3 aplicada em soros de pacientes AT e 12m-PT.

3. Índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3.

Os resultados da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 aplicada a pacientes portadores de LV antes do tratamento e indivíduos curados doze meses após o tratamento foram classificados em quatro categorias: verdadeiro positivo (VPos), falso positivo (FPos), falso negativo (FNeg) e verdadeiro negativo (VNeg) como demonstrado nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10- Categorias de resultados de AAPF-IgG1 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curado doze meses após o tratamento (12m-PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(12m-PT)	
AAPF-IgG1	Positivo (>50%PPFP)	VPos = 21	FPos = 0	21
	Negativo (≤50%PPFP)	FNeg = 0	VNeg = 21	21
TOTAL		21	21	42

Tabela 11 - Categorias de resultados de AAPF-IgG3 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) para pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e indivíduos curados doze meses após o tratamento (12m-PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(12m-PT)	
AAPF-IgG3	Positivo (>50%PPFP)	VPos = 19	FPos = 0	19
	Negativo (≤50%PPFP)	FNeg = 2	VNeg = 21	23
TOTAL		21	21	42

A Tabela 12 resume as informações referentes aos índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 na monitoração de cura doze meses após o tratamento, com os seus respectivos intervalos de confiança a 95%. A análise do desempenho da AAPF-IgG1 apresentou sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo, acurácia de 100%. Na AAPF-IgG3 a análise do desempenho apresentou sensibilidade de 90,5% especificidade no valor de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 91,3%, acurácia de 99,0%. A análise dos índices de desempenho mostrou que a AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 apresentam um ótimo desempenho na monitoração tardia de cura pós-tratamento na LV.

Tabela 12 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG1 e IgG3, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

Índices	AAPF-IgG1 – 12m-PT	AAPF-IgG3 – 12m-PT
	Valores - %	Valores -%
Sensibilidade	100 (84,5-100)	90,5 (71,1-97,3)
Especificidade	100 (84,5-100)	100 (84,5-100)
VPP	100 (84,5-100)	100 (83,2-100)
VPN	100 (84,5-100)	91,3 (73,2-97,6)
Acurácia	100 (91,5-100)	99,0 (89,8-100)

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%

4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em chance.

Para complementação dos índices de desempenho do método, foram avaliadas as razões de verossimilhança (RVs) para as faixas de valores de PFP estabelecidas na pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3. A RV para o resultado positivo (PFP>50%) foi >10 e para o resultado negativo (PFP≤50%) foi de 0,0. Isto significa que o valor de PFP>50% confirma a presença de LV antes do tratamento. Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 50% de PFP apresentam uma chance nula (0,0) de advir de um paciente portador de LV. A análise das RVs confirmou o elevado desempenho do método avaliado através de indicadores expressos em chance, PFP>50% contribuem para a confirmação de pacientes antes do tratamento e valores de PFP≤50% excluem pacientes antes do tratamento de LV. Os valores encontrados na AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 foram exatamente os mesmos, a representação desses valores estão na Tabela 13.

Tabela 13- Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes doze meses após o tratamento.

AAPF-IgG1 – 12m-PT	RVs	AAPF-IgG3 – 12m-PT	RVs
>50	>10*	>50	>10*
≤50	0,0**	≤50	0,0**

*RV que contribui para confirmação de portadores de LV. **RV que praticamente exclui a presença de LV.

Após a análise dos resultados da pesquisa da AAPF-IgG1 e IgG3 foi possível demonstrar a aplicabilidade na monitoração tardia de cura na LV. Dessa forma, uma nova abordagem foi estabelecida para avaliar a utilidade da AAPF-IgG1 e IgG3 na monitoração precoce de cura na LV.

VII. Aplicabilidade e desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.

VII.1. Aplicabilidade da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV.

Após a avaliação das pesquisas de IgG1 e IgG3 e a comprovação da sua utilidade como uma ferramenta adicional na monitoração de cura da LV doze meses após o tratamento, realizamos as avaliações precoces de cura, utilizando o mesmo critério adotado na pesquisa da AAPF-IgG1 e IgG3 para monitoração tardia, ou seja, mesma diluição e ponto de corte.

1. Reatividade da pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 em soros individuais de pacientes dois meses (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT).

A Figura 20 mostra os resultados das curvas de titulação de AAPF-IgG1 dos soros individuais de pacientes 2m-PT (A) e 6m-PT (B). O estudo das amostras individuais demonstrou uma elevada reatividade ao longo da curva de titulação dos soros de pacientes 2m-PT. A curva de titulação das amostras de soros de pacientes 6m-PT revelou um padrão variado de reatividade, com maior número de amostras apresentando baixa reatividade. Os valores de PPFp avaliados na diluição do soro de 1:128.000 para as amostras testadas 2m-PT não apresentou aplicabilidade na monitoração precoce de cura, uma vez que, apenas quatro pacientes apresentaram valor de PPFp abaixo do ponto de corte de 50%, qualificando o método com uma especificidade de 19%. Por outro lado, um elevado número de amostras de soros de pacientes 6m-PT apresentou baixa reatividade, demonstrando a aplicabilidade da AAPF-IgG1 quando aplicada 6m-PT. Dessa forma, a seguir foi avaliado o desempenho apenas da AAPF-IgG1 aplicada apenas em amostras de soro obtidas de pacientes 6m-PT.

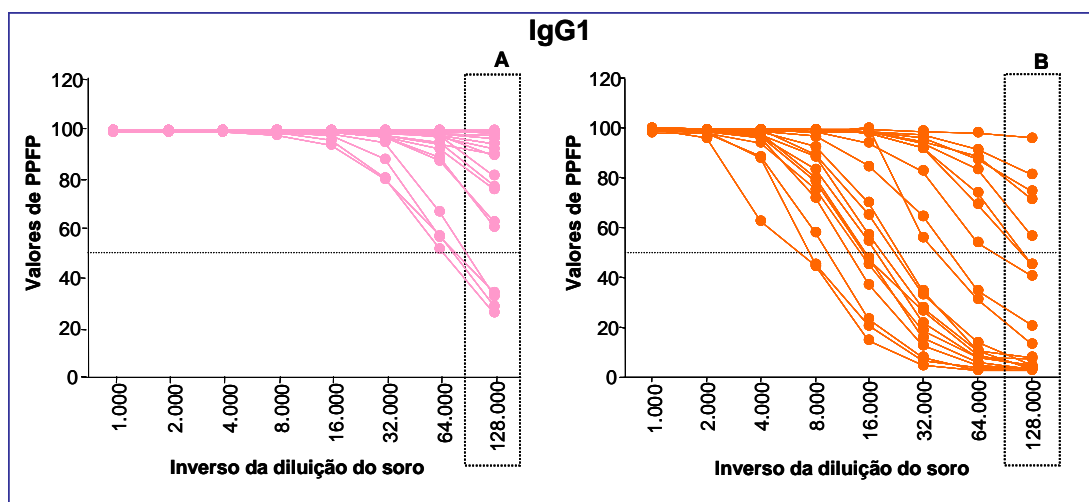


Figura 20 - Curvas de titulação de IgG1 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes dois meses (●) e seis meses após o tratamento (●), representadas nos gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PFP. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PFP e a diluição de 1:128.000 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura.

Na avaliação das curvas de titulação de AAPF-IgG3 (Figura 21), as amostras de soros de pacientes 2m-PT (A) bem como 6m-PT (B) apresentaram valores de PFP abaixo de 50% na maioria das diluições testadas. Assim, considerando a aplicabilidade da AAPF-IgG3 na monitoração precoce de cura em ambos os tempos, foi avaliado o desempenho da metodologia empregando amostras de soros de pacientes 2m-PT e 6m-PT.

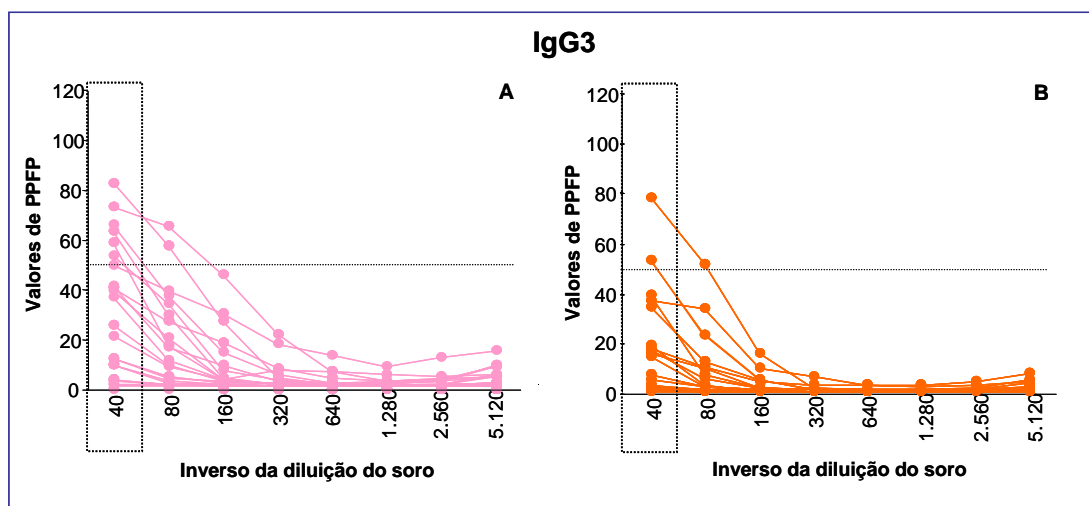


Figura 21 - Curvas de titulação de IgG3 anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes dois meses (●) e seis meses após o tratamento (●), representadas nos gráficos A e B, respectivamente. Os resultados da reatividade de cada grupo estão expressos como valores individuais de PPF. O ponto de corte utilizado foi de 50% de PPF e a diluição de 1:40 (pontilhado no gráfico), baseando-se nos critérios adotados para a monitoração tardia de cura.

VII.2. Desempenho da AAPF-subclasses de IgG na monitoração PRECOCE de cura pós-tratamento na LV, através de índices expressos em percentual e em chances.

Os valores de PPF das amostras individuais AT e 6m-PT, na diluição de 1:128.000 para a pesquisa de AAPF-IgG1 bem como amostras AT, 2m-PT e 6m-PT, na diluição de 1:40 para a pesquisa de AAPF-IgG3, foram utilizados para construir a curva ROC e calcular os índices de avaliação de desempenho do teste, expressos em porcentagem e em chance.

1. Estudo da Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 em soros de pacientes seis meses pós-tratamento (6m-PT) e AAPF-IgG3 em soros de pacientes dois meses (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV.

A curva ROC da AAPF-IgG1 em soros de pacientes seis meses pós-tratamento (6m-PT) e da AAPF-IgG3 em soros de pacientes dois meses (2m-PT) e seis meses pós-tratamento (6m-PT) da LV estão representadas na Figura 22. A análise do resultado para IgG1 demonstrou que o valor da ASC foi de 0,99 ($IC_{95\%}=89,4-99,2$), indicando uma acurácia elevada e o estudo da curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG3 apresentou uma ASC de 0,93 ($IC_{95\%}=80,0-98,3$) para pacientes 2m-PT e ASC de 0,96 ($IC_{95\%}=85,5-99,5$) para pacientes 6m-PT.

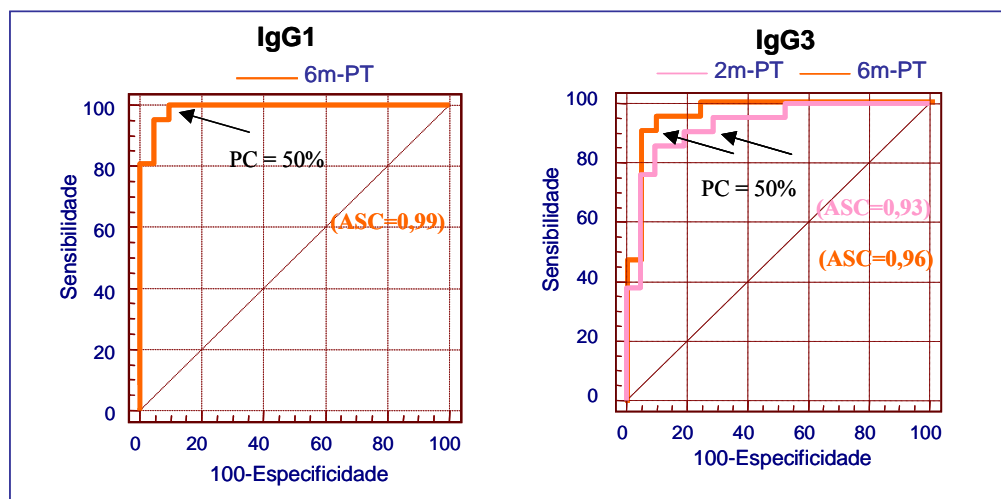


Figura 22 - Curva ROC da pesquisa de AAPF-IgG1 em soros de pacientes seis meses após o tratamento e AAPF-IgG3 aos dois meses e seis meses após o tratamento. Os resultados estão expressos sob a forma dos referidos índices calculados em diferentes pontos de corte (PC) para a reatividade de PFP, determinando assim a área sob a curva de (ASC=0,99) para o grupo 6m-PT na pesquisa de AAPF-IgG1 e para o grupo 2m-PT (ASC=0,93) e grupo 6m-PT (ASC=0,96), na pesquisa de AAPF-IgG3, utilizando-se o critério de PC de 50% de PFP.

2. Desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, segundo índices expressos em porcentagem.

A Figura 23 mostra a reatividade da pesquisa de AAPF-IgG1 dos soros individuais AT e 6m-PT. Utilizando o ponto de corte de 50% de PFP, foi possível detectar aos 6m-PT, 76% (16/21) dos pacientes com valores de PFP restritos a uma região de resultados negativos,

demonstrando dessa forma que a pesquisa de AAPF-IgG1 tem valor na monitoração de cura precoce quando aplicada 6m-PT.

Para a pesquisa de AAPF-IgG3 empregando-se o ponto de corte de 50% de PFP, foi possível verificar 71,4% (15/21) amostras de soros de pacientes aos 2m-PT e 90,5% (19/21) amostras 6m-PT, abaixo do ponto de corte (Figura 24). Esses resultados demonstraram o bom desempenho da AAPF-IgG3 na monitoração de cura precoce quando aplicada tanto 2m-PT quanto 6m-PT.

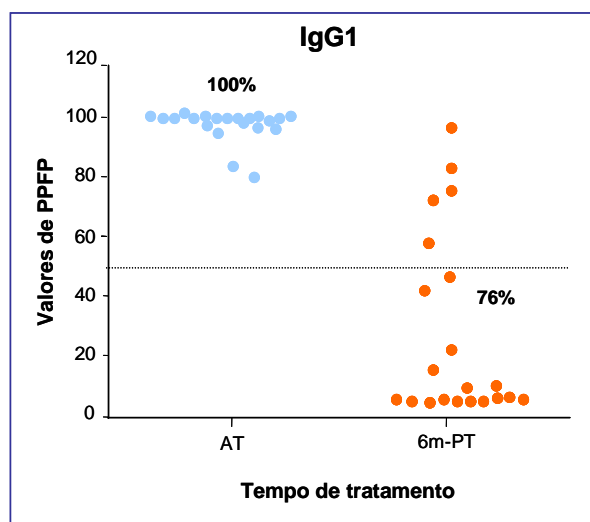


Figura 23 - Reatividade de IgG1 anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●) e 6m-PT (●), na diluição 1:128.000. Os resultados da reatividade de IgG1 para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada). Os resultados mostram a sensibilidade de 100% e especificidade de 76% em soro de pacientes AT e 6m-PT, respectivamente.

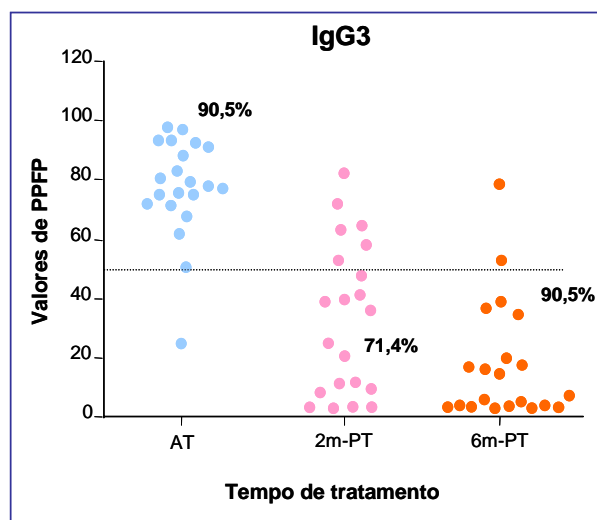


Figura 24 - Reatividade de IgG3 anti-promastigotas de *L. (L.) chagasi* em soros individuais de pacientes AT (●); 2m-PT (●) e 6m-PT (●), na diluição 1:40. Os resultados da reatividade de IgG3 para cada amostra individual estão expressos como PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 50% (linha pontilhada). Os resultados mostram a sensibilidade de 90,5% e especificidade de 71,4% e 90,5% em soros de pacientes AT, 2m-PT e 6m-PT, respectivamente.

3. Índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3.

Os resultados das pesquisas de AAPF-IgG1 em pacientes portadores de LV antes do tratamento e seis meses após o tratamento (Tabela 14) e AAPF-IgG3 em pacientes portadores de LV antes do tratamento, dois meses e seis meses após o tratamento (Tabela 15) foram classificados em quatro categorias: verdadeiro positivo (VPos), falso positivo (FPos), verdadeiro negativo (VNeg) e falso negativo (FNeg).

Tabela 14 - Categorias de resultados da AAPF-IgG1 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).

Resultado do teste		LV		TOTAL
		(AT)	(6m-PT)	
AAPF-IgG1	Positivo (>50%PPFP)	VPos = 21	FPos = 5	26
	Negativo (\leq 50%PPFP)	FNeg = 0	VNeg = 16	16
TOTAL		21	21	42

Tabela 15 - Categorias de resultados da AAPF-IgG3 (VPos, FPos, FNeg e VNeg) em pacientes portadores de LV antes do tratamento (AT), dois meses (2m-PT) e seis meses após o tratamento (6m-PT).

Resultado do teste		LV		Total	LV		Total
		(AT)	(2m-PT)		(AT)	(6m-PT)	
AAPF-IgG3	>50%PPFP	VPos = 19	FPos = 6	21	FPos = 19	FPos = 2	21
	\leq 50%PPFP	FNeg = 2	VNeg = 15	21	VNeg = 2	VNeg = 19	21
TOTAL		21	21	42	21	21	42

A Tabela 16 resume as informações referentes aos índices de desempenho da AAPF-IgG1 aplicada à monitoração de cura em pacientes seis meses após o tratamento. A análise de desempenho apresentou sensibilidade de 100%, 76,2% de especificidade, valor preditivo positivo de 80,8%, valor preditivo negativo de 100% e acurácia de 99%.

Tabela 16 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG1, para a monitoração precoce de cura aos seis meses após o tratamento.

Índices	AAPF-IgG1 – 6m-PT
	Valores - %
Sensibilidade	100 (84,5-100)
Especificidade	76,2 (54,9-89,4)
VPP	80,8 (62,1-91,5)
VPN	100 (80,6-100)
Acurácia	99,0 (89,4-99,2)

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%

A Tabela 17 resume as informações referentes aos índices de desempenho da pesquisa de AAPF-IgG3 para análise de cura dois e seis meses após o tratamento. Os valores dos índices para pacientes 2m-PT foram de 90,5% de sensibilidade e 71,4% de especificidade. Os valores preditivos positivo e negativo foram 76,0% e 88,2% respectivamente. A acurácia do teste foi 93%. Para a análise de cura seis meses após o tratamento, a pesquisa de AAPF-IgG3 apresentou sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 90,5% e acurácia de 96%.

Tabela 17 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da pesquisa da AAPF-IgG3 para a monitoração precoce de cura aos dois meses e seis meses após o tratamento.

Índices	AAPF-IgG3 – 2m-PT	AAPF-IgG3 – 6m-PT
	Valores - %	Valores -%
Sensibilidade	90,5 (71,1-97,3)	90,5 (71,1-97,3)
Especificidade	71,4 (50,0-86,2)	90,5 (71,1-97,3)
VPP	76,0 (56,6-88,5)	90,5 (71,1-97,3)
VPN	88,2 (65,7-96,7)	90,5 (71,1-97,3)
Acurácia	93,0 (80,0-98,3)	96,0 (85,5-99,5)

Os valores dentro dos parênteses significam IC 95%

4. Razão de Verossimilhança da AAPF-IgG1 e IgG3, segundo índices expressos em chance.

As RVs para o resultado positivo da AAPF-IgG1 (PPFP>50%) para pacientes seis meses após o tratamento foi de 4,2 e para o resultado negativo foi de 0,0, demonstrando que valor de PPFP>50% é cerca de 4,2 vezes mais provável de ser observado em pacientes com LV em relação a um indivíduo tratado e que valores iguais ou inferiores a 50% de PPFP apresentam uma chance nula do teste de detectar um paciente portador de LV (Tabela 18).

A análise das RVs da pesquisa de AAPF-IgG3 para resultados positivos em pacientes aos 2m-PT foi de 3,2 e para resultados negativos 0,1. Valores de PPFP>50% é 3,2 vezes mais provável de ser observado em pacientes com LV em relação a um indivíduo tratado e valores de PPFP≤50% apresentam 0,1 vezes de chance do teste de detectar um paciente portador de LV. A RV na avaliação de resultados positivos para pacientes 6m-PT foi de 10 e para o resultado negativo foi de 0,1, demonstrando que valores de PPFP>50% é cerca de 10 vezes mais provável de ser observado em pacientes com LV em relação a um indivíduo tratado e que valores iguais ou inferiores a 50% de PPFP apresentam 0,1 vezes de chance do teste de detectar um paciente portador de LV (Tabela 19).

Tabela 18 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG1, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes seis meses pós-tratamento.

AAPF-IgG1 – 6m-PT	RVs
>50	4,2
≤50	0,0**

**RV que praticamente exclui a presença de LV.

Tabela 19 - Razões de verossimilhança (RVs) da AAPF-IgG3, nas diluições dos soros selecionadas e ponto de corte 50%, na avaliação de pacientes dois e seis meses pós-tratamento.

AAPF-IgG3 – 2m-PT	RVs	AAPF-IgG3 – 6m-PT	RVs
>50	3,2	>50	10*
≤50	0,1**	≤50	0,1**

*RV que contribui para confirmação de portadores de LV.

**RV que praticamente exclui a presença de LV.

DISCUSSÃO

Dentre os aspectos recentemente abordados nos estudos que avaliam parâmetros imunológicos na infecção humana pela *Leishmania (L.) chagasi*, destacam-se os trabalhos que visam compreender os mecanismos envolvidos nos eventos de resistência e/ou patogenia bem como aqueles que focalizam em lacunas importantes em busca de novos métodos diagnósticos e de monitoração de cura pós-tratamento da LV. Nesse contexto, o estabelecimento de metodologias que avaliam a resposta imune que conferissem maior especificidade e sensibilidade representam o principal foco de inúmeras investigações. Como a infecção pela *L. (L.) chagasi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, promovendo além da imunidade celular uma intensa resposta humoral, a pesquisa de anticorpos nos soros dos pacientes infectados apresenta-se como uma importante estratégia na avaliação dessas questões.

No âmbito da monitoração de cura pós-tratamento na LV, até o momento, o critério adotado para o estabelecimento da eficácia terapêutica baseia-se na avaliação de aspectos clínicos, ou seja, o desaparecimento da sintomatologia após o final do tratamento, incluindo a avaliação de parâmetros utilizados ao diagnóstico, tais como ausência de febre, redução do tamanho do baço e fígado, normalização das contagens das células sanguíneas.

Assim, um dos desafios atuais relacionados à avaliação do tratamento efetivo é a falta de abordagens laboratoriais confiáveis a serem usadas como ferramentas no critério de cura. Vale ressaltar que os métodos parasitológicos rotineiramente utilizados para a monitoração de resposta ao tratamento da LV são técnicas extremamente invasivas e necessitam de pessoal treinado, além de apresentar baixa sensibilidade até mesmo ao diagnóstico inicial.

A utilização de métodos sorológicos, tais como a RIFI, ELISA, DAT e Imunoblotting na imunoserologia, com eventual ênfase na monitoração de cura da LV, tem sido objeto de estudo de vários trabalhos (Shiddo *et al.*, 1996; Sundar *et al.*, 1998; Zijlstra *et al.*, 1998; Oskam *et al.*, 1999; Hailu *et al.*, 2001; Atta *et al.*, 2004; Boelaert *et al.*, 2004). Diversos trabalhos têm sugerido que a diminuição dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos pacientes após o tratamento, poderia ser um método alternativo no prognóstico da LV (Atta *et al.*, 1998; Anam *et al.*, 1999 a e b; da Matta *et al.*, 2000). Entretanto, algumas dessas abordagens técnicas sorológicas não relatam soronegativação mesmo quando empregadas anos após a cura clínica.

Na busca de novas perspectivas para abordagens imunoserológicas no estudo de monitoração clínico-terapêutica em doenças infecto-parasitárias, o nosso grupo vem desde 1995 procurando identificar preparações antigênicas, bem como protocolos experimentais que

permitam o estabelecimento de metodologias alternativas para utilização em estudos clínicos. Em 1995, Martins-Filho *et al.*, desenvolveram uma metodologia baseada na citometria de fluxo para a detecção de anticorpos anti-tripomastigotas vivas do *Trypanosoma cruzi* e demonstrou sua utilização na monitoração de cura pós-tratamento na doença de Chagas. Em (2002) Rocha *et al.* utilizou essa mesma metodologia para a pesquisa de anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis* e demonstrou sua aplicabilidade na identificação de casos de leishmaniose cutânea localizada ativa. Recentemente, nosso grupo demonstrou a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*, detectados por citometria de fluxo, no diagnóstico sorológico da LV (Gomes, I.T., 2003). Dando continuidade nessa linha de pesquisa, considerando-se a aplicabilidade da metodologia proposta, o presente trabalho buscou avaliar a aplicabilidade dessa nova abordagem sorológica para a monitoração de cura pós-terapêutica da LV através da pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* focalizando o perfil diferencial de reatividade de anticorpos IgG e subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) em soros de pacientes portadores de LV antes e após o tratamento etiológico. Para tal, foi realizada uma avaliação sorológica de 84 amostras de soros de 21 pacientes portadores de LV, antes do tratamento (AT), dois meses (2m-PT), seis meses (6m-PT) e doze meses após o início do tratamento (12m-PT).

Inicialmente a pesquisa de AAPF-IgG de *L. (L.) chagasi* foi padronizada considerando algumas variáveis chave da reação antígeno-anticorpo como: diluição do soro, concentração do anticorpo anti-Fc de IgG e o dia de cultivo das formas promastigotas. Nos procedimentos de padronização foi demonstrada a aplicabilidade da AAPF-IgG na segregação de indivíduos positivos e negativos para LV, empregando as diluições do soro teste de 1:1.000 a 1:128.000. Embora, todas as diluições do anticorpo secundário testadas fossem capazes de garantir a segregação entre indivíduos negativos e pacientes portadores de LV, foi selecionada a diluição 1:16.000 a fim de garantir a especificidade da metodologia. Parasitos de oito dias de cultivo foram selecionados por apresentarem uma população de promastigotas com um perfil mais homogêneo.

Uma vez estabelecidas às condições metodológicas adequadas para pesquisa de AAPF-IgG, o próximo passo foi avaliar a aplicabilidade e o desempenho da metodologia proposta para a monitoração de cura na LV.

Na etapa de avaliação da aplicabilidade da AAPF-IgG na monitoração tardia de cura na LV, todas as diluições do soro testadas foram capazes de segregar os valores médios de PFP entre o grupo de pacientes avaliados antes do tratamento e doze meses após o tratamento. Entretanto, esse tipo de abordagem estatística apresenta-se inapropriada para aplicação em estudos clínicos onde a reatividade diferencial de amostras individuais deve ser considerada. Assim, foi realizada a análise da reatividade de amostras individuais de soros, sendo possível identificar a diluição 1:32.000 como a condição que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos avaliados. Utilizando as reatividades de PFP obtidas para amostras individuais nessa diluição, foi construída uma curva ROC para a escolha do melhor ponto de corte para segregação entre pacientes AT e 12m-PT. Dentre as possibilidades fornecidas pela curva ROC, o ponto de corte de PFP=50% foi selecionado a fim de garantir a sensibilidade e especificidade da metodologia, minimizando as eventuais oscilações de desempenho do método quando aplicado numa amostragem distinta, considerando a possibilidade de reatividade heterogênea de IgG inerente à população humana.

A análise dos índices de desempenho expressos em percentual demonstrou 100% de sensibilidade (co-positividade) e 100% de especificidade (co-negatividade) da AAPF-IgG, quando aplicada na monitoração de cura aos 12 meses pós-tratamento. Numa análise comparativa, a AAPF-IgG apresentou um melhor desempenho comparado à ELISA convencional que demonstrou 85,7% de especificidade (co-negatividade), oferecendo ainda um ganho de 12,5% no índice valor preditivo positivo. A restrição para uso da ELISA em estudos de monitoração tardia de cura pós-tratamento também foram relatados por Braz *et al.* (2002), que demonstraram a persistência de anticorpos IgG anti-rK39 um ano após o tratamento da LV em 70% das amostras avaliadas.

No âmbito da monitoração pós-tratamento na LV, uma metodologia capaz de predizer precocemente o estado de cura do paciente, apresenta-se como um desafio mais relevante, considerando que aos doze meses, o critério clínico apresenta-se soberano na definição da eficácia terapêutica. Visando avaliar a aplicabilidade da AAPF-IgG nesse contexto, foram avaliadas a reatividade das amostras de soros 2 meses e 6 meses após o tratamento comparativamente à reatividade antes do tratamento. Nossos dados revelaram que embora apenas 4,8% (1/21) dos pacientes avaliados aos dois meses pós-tratamento apresentaram resultados negativos, 71,4% (15/21) dos pacientes analisados aos 6 meses após o tratamento já poderiam ser

identificados como indivíduos curados, por apresentarem resultados de PFPF \leq 50%. É importante ressaltar, que os pacientes que ainda apresentavam resultados positivos aos seis meses, os valores de PFPF, sugeriram uma menor reatividade em relação àquela observada para pacientes não tratados. Em conjunto, a análise dos índices de desempenho demonstraram que AAPF-IgG pode ser útil na monitoração precoce de cura aos 6 meses após o tratamento da LV.

A ineficiência da pesquisa de IgG total para avaliação precoce pós-tratamento etiológico da LV, foi relatada por Elasad *et al.*, em 1994, através da pesquisa de anticorpos IgG anti-antígeno solúvel de *L. (L.) donovani* através da técnica de ELISA convencional. Estes autores demonstraram que os níveis de IgG específicos para *Leishmania* permaneciam inalterados um mês após o tratamento. Por outro lado, Da Matta *et al.*, (2000) demonstraram queda nos níveis de IgG avaliados de 1-22 meses após o tratamento em cerca de 30% das amostras investigadas através da RIFI. De forma promissora, Anam *et al.*, (1999a) identificaram uma queda significativa nos níveis séricos de IgG, 50 dias após o tratamento, quando utilizaram a técnica de ELISA empregando antígeno de membrana de *L. (L.) donovani*. Kumar *et al.*, em (2001) demonstraram que 94% dos pacientes tratados apresentaram níveis de anticorpos anti-rK39 abaixo do ponto de corte quando avaliados aos seis meses após o tratamento, enquanto que apenas 47% deles apresentaram níveis reduzidos de IgG quando empregava-se o antígeno solúvel de *L. (L.) donovani*. Esses resultados sugerem que a utilização de diferentes preparações antigênicas parece ser um fator importante no estabelecimento de uma metodologia aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica na LV. Estudo realizado por Viana, LG (2005), demonstrou que o elevado percentual de positividade para IgG anti-*Leishmania* observado antes do tratamento apresenta uma queda significativa aos seis meses pós-tratamento quando empregando ELISA anti-rK39 e aos três e seis meses após o tratamento quando empregando ELISA anti-*Leishmania (L.) chagasi*. Entretanto, cabe salientar que o tipo de abordagem empregada pelos autores, através da análise comparativa das médias e medianas de reatividade de IgG, não contempla as exigências estatísticas de uma metodologia a ser empregada em ensaios clínicos onde as alterações na reatividade de IgG antes e após o tratamento devem ser avaliadas em relação ao ponto de corte proposto a fim de segregar amostras individuais como negativas após o tratamento. Considerando essa abordagem, pode-se observar pelos dados apresentados pelos autores que um elevado percentual de amostras (95% para rK39 e 85% para antígeno de *L. (L.) chagasi*) ainda permanecia acima do ponto de corte até seis meses pós-tratamento.

Na imunoserologia no campo da propedêutica laboratorial a pesquisa de anticorpos refere-se principalmente à imunoglobulina IgG. Entretanto, o conhecimento da reatividade diferencial de subclasses de IgG, embora possa não ter uma aplicabilidade imediata numa rotina laboratorial, apresenta-se como uma perspectiva na busca de uma metodologia capaz de minimizar os eventos de imunidade residual pós-terapêutica.

A classe de imunoglobulinas IgG é a mais abundante no soro humano, incluindo 4 subclasses que diferem entre si pela seqüência de aminoácidos da fração constante, propriedades físicas e químicas e suas concentrações no soro. Essas subclasses possuem funções biológicas distintas, participando diferencialmente da resposta imune a antígenos protéicos, mediada preferencialmente por IgG1 e IgG3 e antígenos de natureza polissacarídica que envolvem IgG2 e IgG4 (Cataldo e Paternostro, 1990).

Nesse contexto, a reatividade residual frequentemente relatados na monitoração laboratorial pós-terapêutica pode-se dever a uma subclasse específica de IgG. Na tentativa de obter um método com melhor desempenho para a monitoração precoce de cura, avaliamos a reatividade de subclasses de imunoglobulinas de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) frente a promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi*. Estudos prévios realizados por Hailu *et al.* (2001), sugerem a ineficácia da pesquisa de IgG1 na monitoração tardia de cura na LV demonstrando a persistência de anticorpos IgG1 em pacientes tratados e curados 1-9 anos após o tratamento eficaz, empregando a metodologia de ELISA convencional utilizando antígeno solúvel de *L. (L.) donovani*. Acreditamos que a abordagem metodológica via ELISA, representando uma metodologia qualitativa que não empregam titulações, necessitaria de uma adequação para fins de monitoração de cura. Além disso, a preparação antigênica empregada na metodologia poderia representar uma limitação da aplicabilidade proposta para a monitoração de cura. Dessa forma, prosseguimos em nossa investigação visando elucidar o perfil de subclasses de IgG em indivíduos não tratados e sua eventual aplicabilidade na monitoração de cura pós-terapêutica na LV.

Estudos realizados por Elasad *et al.*, 1994, avaliando o nível de anticorpos anti-antígeno solúvel de *Leishmania* através da ELISA em soros pacientes portadores de LV, demonstraram níveis de IgG3>IgG1>IgG2>IgG4. Da Matta *et al.*, (2000), observaram através da RIFI a presença de um padrão de IgG1>IgG3>IgG4>IgG2. Anam *et al.*, (1999a) relatam a presença de IgG1=IgG3=IgG4>IgG2 utilizando a técnica de ELISA empregando antígeno de membrana de *L.*

(*L. donovani*). Em estudo recente realizado por Viana LG (2005), utilizando a metodologia ELISA rK39 relatou um perfil de subclasses de IgG com presença de IgG1>IgG4>IgG2>IgG3 quando expressos em percentual de positividade de amostras de soros de pacientes portadores de LV avaliados antes do tratamento. Esses mesmos autores relatam que ao empregar a metodologia de ELISA anti-*L. (L.) chagasi* foi possível observar um perfil de subclasses de IgG caracterizado por IgG1>IgG4>IgG3>IgG2 na avaliação de pacientes antes do tratamento. Estudos prévios de Rocha *et al.*, (2006) também sugerem através da pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* (AAPV- subclasses IgG) a presença de IgG1 e IgG3 em soros de pacientes portadores de LV, como menor reatividade para IgG2 e ausência de IgG4. Embora possam ser identificadas alterações na seqüência das subclasses de IgG, numa análise em conjunto, a maioria dos estudos sugerem um predomínio de IgG1 e IgG3 que parecem ser as subclasses dominantes nos soros dos pacientes portadores de LV avaliados antes do tratamento.

Considerando os resultados do nosso estudo referente ao perfil da AAPF-subclasses de IgG que demonstraram reatividade detectável de IgG1 e IgG3, numa etapa de padronização para detecção das diferentes subclasses de IgG, empregando amostras de soros de pacientes portadores de LV não tratados, observamos que a reatividade AAPF possui um perfil de IgG1<IgG3 com ausência de IgG2 e IgG4. Dessa forma, nas análises subseqüentes foram incluídas apenas as subclasses IgG1 e IgG3. Para a pesquisa de IgG1 foram escolhidas as diluições do soro de 1:1.000 a 1:128.000 e diluição do anticorpo secundário a 1:16.000, a mesma escolhida para IgG total, demonstrando a alta reatividade de IgG1 no soros de pacientes portadores de LV. Para a pesquisa de IgG3 a diluição do soro foi de 1:40 a 1:5.120 e a diluição do anticorpo anti-IgG3 foi de 1:400.

Inicialmente, realizamos uma pesquisa de validação da aplicabilidade da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 na monitoração tardia de cura na LV, empregando amostras individuais de pacientes portadores de LV coletadas antes e doze meses após o tratamento, a fim de estabelecer os parâmetros a serem considerados para a classificação de um resultado como positivo ou negativo para IgG1 e IgG3. Nesse estudo foram escolhidas as diluições do soro de 1:128.000 para a pesquisa de AAPF-IgG1 e 1:40 para AAPF-IgG3, as quais apresentaram maior amplitude de segregação entre os grupos avaliados. Na avaliação das curvas ROC para AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 foi estabelecido o ponto de corte de PFP=50%, visando obter maior margem de segurança

na segregação entre os resultados positivos e negativos, garantindo assim, a sensibilidade e especificidade das metodologias.

A análise dos índices de desempenho expressos em percentual demonstrou uma sensibilidade de 100% para AAPF-IgG1 e 90,5% para a AAPF-IgG3 com valores de especificidade de 100% para ambas as metodologias quando aplicadas na monitoração de cura aos 12 meses pós-tratamento.

Na perspectiva de uma predição precoce de cura, demos continuidade à pesquisa de AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 na monitoração de cura aos 2 meses e 6 meses após o tratamento. A análise dos dados demonstrou que a AAPF-IgG1 não se aplica ao controle precoce de cura aos 2 meses pós-tratamento na LV, uma vez que, apenas 19% (4/21) dos pacientes apresentaram resultados negativos. Entretanto, nossos dados mostraram que aos 6m-PT, 76% (16/21) dos pacientes tratados apresentaram resultados negativos.

Embora os dados demonstrem a aplicabilidade de AAPF-IgG1 na monitoração de cura aos 12 e 6 meses após o tratamento da LV, os resultados não apresentaram um ganho suficiente em relação a IgG total que justifique a utilização de IgG1. A pesquisa de IgG total apresentou resultados muito semelhantes aos obtidos para IgG1, ou seja, as duas metodologias foram capazes de classificar 100% das amostras obtidas 12 meses após o tratamento como negativas. Com relação aos seis meses, AAPF-IgG detectou 71,4% das amostras como negativas e AAPF-IgG1 detectou 76%, demonstrando não haver grande diferença entre os resultados.

Como principal achado de nosso estudo, observamos que a AAPF-IgG3 revelou resultados bastante promissores, demonstrando que 71,4% (15/21) dos pacientes tratados curados já apresentavam resultados negativos ($PPFP \leq 50\%$) dois meses após o tratamento e 90,5% (19/21) dos pacientes aos seis meses, oferecendo assim, uma abordagem laboratorial confiável a ser usadas como ferramentas no critério de cura.

Estudos realizados por Ellassad *et al.*, 1994, avaliando o nível de anticorpos anti-antígeno solúvel de *Leishmania* através da ELISA, um mês após o tratamento demonstraram queda significativa de $IgG3 > IgG1$, seguido de $IgG2 > IgG4$. Da Matta *et al.*, (2000), verificaram através da RIFI que 1-22 meses após o tratamento queda nos níveis das imunoglobulinas, principalmente de $IgG4$, seguido de $IgG3 > IgG2 > IgG1$. Anam *et al.*, (1999a), utilizando a técnica de ELISA empregando antígeno de membrana de *L. (L.) donovani*, verificaram queda nos níveis de imunoglobulinas cerca de dois meses após o tratamento, com destaque para $IgG3$. Em outro

estudo, Anam *et al.*, (1999b), empregando a mesma metodologia, verificaram queda dos níveis de IgG1, IgE e IgG4 em casos de susceptibilidade terapêutica. Em estudo realizado por Ghosh *et al.*, (1995) e Ravindran *et al.*, (2004), apresentaram resultados comparáveis de Western blot anti-*Leishmania* antes e após o tratamento na LV. Antes do tratamento os níveis de imunoglobulinas foi IgG1>IgG2>IgG3>IgG4 e após o tratamento, foi detectada a persistência principalmente de IgG1.

Um estudo recente realizado por Viana, LG (2005), representou um grande passo para a caracterização do perfil de reatividade de subclasses de IgG com enfoque na monitoração de cura pós-tratamento da LV. Trata-se de um estudo bem conduzido, de acompanhamento longitudinal de pacientes portadores de LV, residentes na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Considerando as particularidades da reatividade imunológica inerente à população humana distribuída em diferentes regiões do globo, bem com as características intrínsecas da composição antigênica de cepas de *Leishmania* distribuídas num amplo espectro epidemiológico, acreditamos que o estudo de Viana, L.G. (2005) represente um marco e uma referência para estudos posteriores que visem avaliar a reatividade de imunoglobulinas de pacientes brasileiros. Dessa forma, a seguir serão apresentados de forma mais detalhada os principais achados do estudo de Viana, L.G. (2005) a fim de permitir uma análise comparativa com os dados apresentados pelo nosso estudo. Empregando a metodologia de ELISA utilizando dois antígenos distintos rK39 e antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi*, foi observada queda na positividade em todas as subclasses de imunoglobulinas quando amostras de soro foram avaliadas após o tratamento. No caso de rK39 IgG1, IgG2 e IgG4 mostraram queda apenas aos seis meses após o tratamento, enquanto IgG3 apresenta-se como imunoglobulina chave para observar queda precoce aos três meses pós-tratamento. Entretanto, cabe ressaltar que além da metodologia estatística empregada não permitir a segregação das amostras ao longo do ponto de corte proposto, as amostras avaliadas antes do tratamento já apresentavam apenas 52% de positividade para IgG3, o que impossibilitaria a utilização dessa metodologia na monitoração de amostras individuais, como anteriormente discutido para a reatividade de IgG total. Para os estudos com antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi*, os autores mostraram uma queda de positividade para IgG1, IgG3 e IgG4 quando avaliadas ao três e seis meses após o tratamento, com queda de IgG2 apenas aos seis meses após o tratamento. Cabe salientar que o percentual de positividade de IgG2, IgG3 e IgG4 já apresentavam-se reduzidos mesmo antes do tratamento (27,5%, 32,5% e 60%,

respectivamente). Embora IgG1 apresentasse um percentual de positividade elevado antes dos tratamento (95%) essa reatividade ainda permanecia elevado aos três e seis meses pós-tratamento (92,5% e 77,5%, respectivamente). Os nossos dados demonstraram presença de IgG1 e IgG3 antes do tratamento e queda significativa principalmente na pesquisa de IgG3 aos 2 meses e 6 meses após o tratamento. A aplicabilidade da metodologia proposta em nosso estudo está em acordo com a proposta de monitoração de IgG3 sugerida por Anam *et al.*, (1999a).

Esses diversos trabalhos descritos na literatura, demonstram elevados níveis de subclasses de IgG no soro de pacientes portadores de LV antes do tratamento e uma queda nos níveis das subclasses de IgG após o tratamento específico da LV. Entretanto, não há um consenso em relação os dados obtidos na literatura sobre os níveis de subclasses encontradas antes e após o tratamento. Essas diferenças encontradas na literatura, como discutido anteriormente, provavelmente devem-se à utilização de diferentes metodologias sorológicas além da utilização de preparações antigênicas distintas.

Em suma, através deste trabalho foi possível estabelecer uma nova metodologia para a pesquisa de anticorpos IgG e subclasses de IgG anti-formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Esta metodologia demonstrou, através de seu desempenho, que pode ser um método alternativo na monitoração de cura pós-terapêutica específica na LV. Entretanto, devido ao fato de todos os pacientes avaliados neste estudo terem curado após o tratamento, uma conclusão definitiva sobre a utilização da AAPF-IgG ou subclasses de IgG na monitoração de cura na LV ainda precisa ser avaliada utilizando amostras de pacientes que não apresentaram sucesso no tratamento.

Vale ainda ressaltar que a pesquisa de anticorpos através da citometria de fluxo trata-se de um método de boa reprodutibilidade, com sensibilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais. Entretanto, a utilização da citometria de fluxo em ensaios sorológicos na rotina de um laboratório clínico apresenta ainda custo elevado considerando o alto investimento financeiro para a aquisição e manutenção do citômetro de fluxo, bem como as exigências inerentes ao analista clínico, no âmbito do treinamento e qualificação profissional. Por outro lado, a capacidade da citometria de fluxo de detectar um grande número de parasitas fluorescentes de forma automatizada, fornecendo assim resultados fidedignos e a possibilidade de utilizar parasitos íntegros como fonte de antígeno e não apenas antígeno solúvel, demonstra a importância dessa técnica sobre outras metodologias.

CONCLUSÕES

I. Fica estabelecida uma nova metodologia de pesquisa sorológica de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (AAPF-IgG), baseada na citometria de fluxo, para estudos clínicos na LV;

Comentário: “*Essa metodologia possibilitou discriminar a reatividade de IgG do soro de pacientes portadores de LV daquela observada para indivíduos negativos para LV, empregando-se em cada teste: a) promastigotas de 8 dias de cultivo; b) soro teste na diluição de 1:1.000 a 1:128.000 e c) anticorpo secundário anti-IgG humano-FITC na diluição 1:16.000.*”

II. 1. O estudo de amostras individuais demonstra que a AAPF-IgG aplica-se na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento na LV;

Comentário: “*Empregando-se a diluição do soro 1:32.000 e o valor de 50% de PFP como ponto de corte, indicado pela curva ROC, a AAPF-IgG foi capaz de distinguir corretamente 100% (21/21) de pacientes antes do tratamento (AT) com valores de PFP confinados a uma região de alta reatividade ou positivos (PFP>50%) e 100% (20/20) de indivíduos curados 12 meses pós-tratamento (12m-PT) com valores de PFP restritos a uma região de baixa reatividade ou negativos (PFP≤50%).*”

II. 2 Os índices de desempenho da AAPF-IgG, expressos em percentual e em chance, qualificam o seu uso na monitoração TARDIA de cura pós-terapêutica da LV;

Comentário: “*A análise das RVs demonstrou que na AAPF-IgG, valores de PFP>50% contribuem para a confirmação da presença de LV e valores de PFP≤50% praticamente excluem a presença de LV.*”

III. Os índices de desempenho expressos em percentual demonstram melhor desempenho da AAPF-IgG em relação ao ensaio imunoenzimático (ELISA), na monitoração TARDIA de cura pós-tratamento da LV;

Comentário: *“A análise dos índices de desempenho qualificou a AAPF-IgG com um ganho real nos índices avaliados em relação a ELISA, principalmente na especificidade e valor preditivo positivo.”*

IV. 1. A AAPF-IgG aplica-se também na monitoração PRECOCE de cura pós-terapêutica da LV quando empregada para a monitoração de pacientes 6m-PT;

Comentário: *“A AAPF-IgG permitiu confirmar 71,4% (15/21) dos indivíduos 6 meses pós-tratamento com valores de PFP \leq 50%, embora na avaliação aos 2 meses pós-tratamento apenas 4,8% (1/21) apresentaram valores abaixo do ponto de corte.”*

IV. 2. Os índices de desempenho, expressos em percentual e em chance, confirmam a aplicabilidade da AAPF-IgG na monitoração PRECOCE de cura aos 6m-PT;

Comentário: *A análise das RVs demonstrou que valores de PFP \leq 50% praticamente excluem a presença de LV;*

V. Fica padronizada a metodologia para a pesquisa de subclasses de IgG anti-promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* (AAPF-subclasses de IgG) para estudos clínicos na LV;

Comentário: *“O perfil de subclasses de IgG detectados pela citometria de fluxo foi caracterizado por uma ausência de IgG2 e IgG4 e elevada reatividade de IgG1>IgG3, capaz de discriminar amostras de soro de pacientes portadores de LV daquela observada para indivíduos negativos para LV. Para tal empregou-se em cada teste: a) promastigotas de 8 dias de cultivo; b) soro teste nas diluições de 1:1.000 a 1:128.000 para IgG1 e 1:40 a*

1:5.120 para IgG3 e c) anticorpo secundário anti-IgG1 humano-FITC na diluição 1:16.000 e anti-IgG3 na diluição 1:400.”

VI. 1. A AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 aplicam-se na monitoração TARDIA de cura pós-terapêutica na LV;

Comentário: “Empregando-se a diluição do soro de 1:128.000 e ponto de corte de PFPF=50% na AAPF-IgG1, a metodologia foi capaz de segregar corretamente 100% (21/21) das amostra de soro de pacientes antes do tratamento (PFPF>50%) e 100% (21/21) dos indivíduos doze meses após o tratamento (PFPF≤50%). Na pesquisa de AAPF-IgG3 utilizando a diluição do soro de 1:40 e mesmo ponto de corte o teste demonstrou 90,5% (19/21) dos pacientes antes do tratamento com valores acima do ponto de corte e 100% (21/21) com valores de PFPF≤50%.”

VI. 2. Os índices de desempenho da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3, expressos em percentual e em chance, confirmam sua aplicabilidade na monitoração TARDIA de cura pós-terapêutica da LV;

Comentário: “A análise das RVs demonstrou que tanto na AAPF-IgG1 quanto na AAPF-IgG3, os valores de PFPF>50% contribuem para a confirmação da presença de LV e valores de PFPF≤50% praticamente excluem a presença de LV quando aplicada 12m-PT.”

VII. 1. A AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 aplicam-se também na monitoração PRECOCE de cura pós-terapêutica da LV;

Comentário: “A AAPF-IgG1 permitiu confirmar 76% (16/21) dos indivíduos com valores de PFPF≤50%, 6 meses pós-tratamento, embora na avaliação aos 2 meses pós-tratamento apenas 19% (4/21) apresentaram valores abaixo do ponto de corte. Por outro lado, a AAPF-IgG3 permitiu identificar 90,5% (19/21) dos indivíduos com valores de PFPF≤50%, 6 meses pós-tratamento e também 71,4% (15/21) deles com valores de PFPF≤50% aos 2 meses pós-tratamento.”

VII. 2. Os índices de desempenho, expressos em percentual e em chance, confirmam a aplicabilidade da AAPF-IgG1 e AAPF-IgG3 na monitoração PRECOCE de cura pós-terapêutica na LV.

Comentário: “A análise das RVs demonstrou que para a AAPF-IgG1 aplicada aos 6m-PT, valores de PFPF \leq 50% praticamente excluem a presença de LV. Para a AAPF-IgG3 aplicada aos 2m-PT, valores de PFPF \leq 50% praticamente excluem a presença de LV, para a análise da AAPF-IgG3 aplicada aos 6m-PT, valores de PFPF $>$ 50% praticamente confirmam a presença de LV e valores de PFPF \leq 50% praticamente excluem a presença de LV.”

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Gupta PN, Saha SK, Ali N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 mar; 6(2): 231-5 a.
- Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK e Ali N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE and IgG subclass antibodies in Indian Kala-azar patients after chemotherapy. Infec Immunity 1999 dec: 6663-6669 b.
- Atta AM, D'Oliveira JRA, Correa J, Atta MLB, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1998 set; 59(3): 426-30.
- Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta MLB, Jerônimo SMB, Nascimento MDSB, Bezerra GF, Orge G, Carvalho EM. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswal Cruz. 2004; 99 (5):525-530.
- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. Am J Trop Med Hyg 1983 mai; 32(3): 480-4.
- Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD Jr. A prospective study of Visceral Leishmaniasis in an endemic area of Brazil. J Infect Dis 1986; 154: 639-649 a.
- Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1986; 166: 1124-1132 b.
- Bagchi AK, Tiwari S, Gupta S, Katiyar JC. The latex agglutination test: standardization and comparison with direct agglutination and dot-ELISA in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Índia. Ann Trop Med Parasitol. 1998 mar; 92(2): 159-63.
- Ben-Ismaïl R & Ben-Rachid MS. Epidémiologie des leishmanioses en Tunisie. Maladies Tropicales Transmissibles. Jonh Libbey Eurotext 1989; 73-80.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Van Der Stuyft P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2004; 70: 72-7.
- Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CAP. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitivite serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 1361-6.

Braz RFS, Nascimento ET, Martins DRA, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jerônimo SMB. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:344-348.

Browner WS, Newman TB, Cummings SR Designing a new study. III. Diagnostic Tests. In: Hulley SB, Cumings SR. *Designing clinical research*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1988. p.139-50.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, DIETZE R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 321-4.

Cataldo F & Paternostro D. IgG subclasses and their clinical significance. *Minerva Pediatr*. 1990; 42 (12): 509-514.

Chatterjee M, Basu K, Basu D, Bannerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian kala-azar patients. *Clinical Exp Immunol* 1998; 114 (3): 408-413.

Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Rocha MOC, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001 jan; 8(1): 112-8.

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saúde Públ São Paulo* 1990; 24:361-72.

Da Matta VLR, Hoshino-Shimizu S, Dietze R e Corbett CEP. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American Visceral Leishmaniasis. *J Clin Lab Anal* 2000; 14:5-12.

Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998; 56(6):1109-18.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Micro Infect Dis* 2004; 305-218.

Dietze R, Carvalho SG. Leishmaniose Visceral-Calazar. In: Cimerman S, Cimerman B. *Medicina Tropical*. Atheneu, 2003; 72-73.

Elassad AMS, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalib HW. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol* 1994 fev; 95(2): 294-9.

Fisa R, Riera C, Ribera E, Gallego M, Portus M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc trop Med Hyg* 2002; 191-194.

Fleiss JL An introduction to applied probability. In: Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons; 1981. p.1-18.

Fletcher RH, Fleter SW, Wagner EH. Diagnóstico. In: Fleter RH, Fleter SW, Wagner EH. Epidemiologia Clínica: bases científicas de conduta médica. 2º ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989. p. 68-108.

Ghosh AK, Dasgupta S, Ghose AC. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmanial. Clin Diag Lab Immunol. 1995; 2:291-6.

Gomes, Izabelle Teixeira. Avaliação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral humana. 2003; 34f. Monografia (conclusão de curso)- Universidade Federal do Espírito Santo- Centro de Estudos Gerais- graduação em Ciências Biológicas- UFES.

Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. Emer Infect Dis 2003 (12): 1617-1620.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med 2000; 45: 23-41.

Greiner PF, Maywski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. Ann Intern Med 1981 abr; 94 (4 Pt 2): 557-92.

Grimaldi Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg 1989; 6: 687-725.

Guimarães MCS, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. Bull. WHO 1990; (68): 39-43.

Hailu A, Menon JN, Berhe N, Gedamu L, Hassard TH, Kager PA, Olobo J e Bretscher PA. Distinct immunity in patients with visceral leishmaniasis from that subclinically infected and drug-cure people: implications for the mechanism underlying drug cure. J Infect Dis 2001; 184:112-5.

Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. User's guides to the medical literature. III: How to use an article about a diagnosis test. A. Are the results of the study valid? The Evidence-Based Medicine Working Group. JAMA, 1994; 271:389-391 a.

Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. User's guides to the medical literature. III: How to use an article about a diagnosis test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. JAMA, 1994; 271: 703-707 b.

Jerônimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandez MZ, Jernigan J, Person RD. Na urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc trop Hyg* 1994; 88:386-388.

Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Critical Rev Microb* 1995; 21(2): 123-52.

Kumar R, Pai K, Pathak K e Sundar S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001:1220-1224.

Kumar R, Pai K, Tripathi K, Pandey HP, Sundar S. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 9:1119-23.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W & Killick-Kendric R. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987; 1-120.

Luz KG, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:249-54.

Martins-Filho OA, Eloi-Santos SM, Carvalho AT, Correa-Oliveira R, Rassi A, Luquetti AO, Rassi GG, Brener Z. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live Trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas' disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 1107-1113.

Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado J, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live Trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in Human Chagas' disease. *Clin Diag Lab Immunol* 1995; 2(5): 569-73.

Metz C. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 1978 out; 8(4): 283-98.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica Vol II. Boletim eletrônico Epidemiológico [on-line]. Brasil; 2002a. [capturado 18 out. 2003] Disponível em:<<http://www.funasa.gov.br>>.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stores sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:275-7.

Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *Jornal de Pediatria* 2002; 78: 120-127.

Person RD, Queiroz AS. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.

Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *Jornal de Pediatria* 2004; 80: 141-146.

Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Banerjee D, Ali N. Characterization of Immunoglobulin G and Its subclass response to Indian Kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infec Immunity* 2004; 863-870.

Rocha RDR, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Correa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anticorpos anti-promastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados por citometria de fluxo, para identificação de leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002 nov-dez; 35(6): 551-62.

Rocha RDR, Gontijo CM, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Correa-Oliveira R, Ferrari TC, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2006 Feb;11(2):156-66.

Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Diagnosis. In: Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. *Cinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*. Boston: Little, Brown and Company; 1991. p.3-170.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Ver Microbiol* 2001; 55:453-483.

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

Singh S & Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis *J Infect Chemother* 2004; 10:307-315

Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis e management of leishmania/HIV co-infection. 2005; *Indian J Med Res* 121: 407-414.

Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:951-958.

Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PCK, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *The Lancet* 1998; 563-5.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988 jun 3; 240(4857): 1285-93.

Viana, Luciana de Gouvêa. Avaliação de métodos sorológicos na abordagem diagnóstica da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2005 Tese de doutorado-Instituto Oswaldo Cruz- Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Belo Horizonte-MG

World Health Organization (WHO). Tropical Diseases Research. Leishmaniasis. [online]. Genebra; 2004. [Capturado 10 outubro 2004] Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>.

Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86:505-7.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, el-Hassan, Reed SG, Ghalib HW. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 717-720.

Zweig MH, Campbell G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine [Review]. Clin Chem 1993; 39: 561-77.