



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

TÊKA LUILA BORGOMENEZES

**DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA: revisão integrativa
da literatura**

**Barreiras-BA
2022**

TÊKA LUILA BORG MENEZES

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA: revisão integrativa
da literatura**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito obrigatório para aprovação na
graduação em Medicina da Universidade
Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

Professora orientadora: Carolina Carvalho de
Souza

Professor coorientador: Luiz Gustavo
Rodrigues Oliveira

Barreiras – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

M543 Menezes, Têka Luila Borgo.

Diagnóstico para leishmaniose visceral humana: revisão integrativa da literatura. / Têka Luila Borgo Menezes. – 2022.

100f.

Orientador: Prof. Carolina Carvalho de Souza.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Leishmaniose visceral humana. 2. Diagnóstico. 3. Testes. I. Souza, Carolina Carvalho de. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 21 dias do mês de Julho de 2022, às 18 horas, em sessão pública na sala virtual do Google Meet da Universidade Federal do Oeste da Bahia, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Carolina Carvalho de Souza e composta pelos examinadores: Jonilson Berlink Lima e Márcia Regina de Oliveira Pedroso, a aluna Têka Luila Borgo Menezes apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “Diagnóstico para Leishmaniose visceral humana: revisão integrativa da literatura” como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Bacharelado em Medicina. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela ____APROVAÇÃO____ do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente



Carolina Carvalho de Souza
Data: 26/07/2022 15:42:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



JONILSON BERLINK LIMA
Data: 25/07/2022 19:36:50-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador 01

Documento assinado digitalmente



MARCIA REGINA DE OLIVEIRA PEDROSO
Data: 22/07/2022 14:32:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador 02

Dedico a construção desse trabalho a todos os pacientes que sofrem com Leishmaniose Visceral, que, por muitas vezes, são negligenciados e suas necessidades, não atendidas. Dedico também, aos profissionais da saúde que convivem de perto com os enormes impactos negativos da doença.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

A meus familiares, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

A minha orientadora, Professora Carol, e ao meu Professor coorientador Luiz, pela competência e conhecimentos oferecidos e pelas experiências compartilhadas.

A UFOB – Universidade Federal do Oeste da Bahia, pela oportunidade, incentivo e por proporcionar a tantos estudantes o acesso ao conhecimento e vivências tão valiosas para a nossa profissão.

“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte
em defesa da vida.”
(Carlos Chagas)

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose caracterizada por evolução crônica e abrangência sistêmica e possui alta morbimortalidade. O diagnóstico clínico na LVH (Leishmaniose Visceral humana) é complexo, pois os humanos podem apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias infecto-parasitárias e contagiosas. Além disso, apesar do avanço nas ferramentas diagnósticas, o diagnóstico da LV ainda é um desafio, sendo necessários suspeição clínica e confirmação laboratorial eficientes. Assim, por constituir um grave problema de saúde pública, conhecer os testes diagnósticos utilizados na detecção da LVH é importante para o direcionamento de um tratamento efetivo e das políticas de controle da doença. Dessa forma, o presente estudo visa fazer um levantamento dos métodos diagnósticos que vêm sendo utilizados na LVH, através de uma revisão integrativa da literatura. A revisão foi feita através de busca bibliográfica realizada nas seguintes bases eletrônicas de dados: Pubmed, Scielo, LILACS e ScienceDirect. Para cada artigo analisado, foram extraídas as seguintes informações: base do método, sensibilidade, especificidade, antígeno/alvos utilizados, os pontos positivos, limitações e perspectivas futuras. Após a busca de trabalhos nas bases de dados supracitadas, encontrou-se 2083 artigos. Em seguida, realizou-se a retirada dos artigos duplicados, seleção por título e resumo e avaliação de elegibilidade através da leitura na íntegra dos textos, utilizando-se dos critérios de inclusão e exclusão e foram incluídos na revisão 48 artigos considerados elegíveis, sendo que 12 artigos utilizaram apenas amostras humanas e 36 artigos utilizaram amostras humanas e caninas. Os estudos que utilizaram apenas amostras caninas não foram analisados e incluídos nessa revisão. Desse total, 33 artigos abordaram o método sorológico, 2 abordaram o método parasitológico e 13 abordaram o método molecular. Brasil foi o país de origem de 29 estudos incluídos na revisão (61,22%), conferindo ao país grande representação nos resultados discutidos. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foi o tipo de teste mais avaliado nos trabalhos, aparecendo em 27 artigos. Muitos testes apresentaram boas sensibilidades, entre 66,7% e 100%, e boas especificidades, entre 76,1% e 100%. Entretanto, uma das principais limitações relatadas nos artigos analisados, foi a quantidade pequena de amostras avaliadas, o que poderia afetar negativamente na eficácia dos testes. Assim, após a análise dos resultados, o teste de ELISA, utilizando como antígeno peptídeos sintéticos de célula B, foi o que mais se destacou e mostrou-se um bom método para diagnóstico de LVH, com alta sensibilidade e especificidade (100%), baixo custo de produção e simplicidade de execução, sendo um bom alvo para estudos futuros,

com possibilidade de incorporação em outras plataformas de imunodiagnóstico, utilização como prognóstico da doença e como alvo para a produção de vacinas.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Humana; Diagnóstico; Testes; Eficácia; Antígenos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis characterized by chronic evolution and systemic scope and has high morbidity and mortality. Clinical diagnosis in LVH (Human Visceral Leishmaniasis) is complex, because humans can present signs and symptoms that are common to other infectious-parasitic and contagious pathologies. In addition, despite advances in diagnostic tools, the diagnosis of VL is still a challenge, requiring clinical suspicion and eficiente laboratory confirmation. Therefore, as it constitutes a serious public health problem, knowing the diagnostic tests used to detect HVL is important for directing disease control policies. Thus, the present study aims to survey the diagnostic methods that have been used in HVL, through an integrative literature review. The review was carried out through a bibliographic search carried out in the following electronic databases: Pubmed, Scielo, LILACS and ScienceDirect. For each article analyzed, the following information was extracted: method basis, sensitivity, specificity, antigen/targets used, positive points, limitations and future perspectives. After searching for works in the aforementioned databases, 2083 articles were found. Then, the duplicated articles were removed, the selection by title and abstract was carried out, and eligibility assessment by reading the full text, using the inclusion and exclusion criteria, and 48 articles considered eligible were included in the review. Of these works, 12 articles used only human samples and 36 articles used human and canine samples. Studies that used only canine samples were not analyzed and included in this review. Of this total, 33 articles addressed the serological method, 2 addressed the parasitological method and 13 addressed the molecular method. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) was the most evaluated type of test in the works, appearing in 27 articles. Many tests showed good sensitivities, between 66.7% and 100%, and good specificities, between 76.1% and 100%. However, one of the main limitations reported in the articles analyzed was the small amount of samples evaluated, which could negatively affect the effectiveness of the tests. Thus, after analyzing the results, the ELISA test, using synthetic B cell antipeptides, was the one that stood out the most and demonstrated a good method for HVL diagnosis, with high sensitivity and specificity (100%), low production cost and efficiency of execution, being a good target for future studies, with the possibility of incorporation in other immunodiagnostic alternatives, use as a prognosis of the disease and as a target for vaccine production.

Keywords: Human Visceral Leishmaniasis; Diagnosis; Tests; Efficiency; antigens.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclo da Leishmaniose Visceral. _____	19
Figura 2. Organograma sobre o processo de seleção dos estudos. _____	28
Figura 3. Mapa representando os países de origem dos estudos e a quantidade de trabalho publicado por cada país. _____	79

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos, utilizando apenas amostras humanas. _____	32
Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos, utilizando amostras humanas e caninas. _____	38
Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares, utilizando apenas amostras humanas. _____	65
Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares, utilizando amostras humanas e caninas. _____	70
Tabela 5. Artigos contendo métodos diagnósticos parasitológicos, utilizando apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas. _____	76
Tabela 6. Tipo de testes avaliados e a quantidade de artigos por cada teste. _	80
Tabela 7. Os 10 artigos com os melhores resultados, dentre o total de artigos analisados. _____	84

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Total de artigos incluídos na revisão integrativa da literatura, após avaliação de elegibilidade. _____	31
Gráfico 2. Gráfico representando os anos das publicações dos artigos elegíveis e a quantidade de trabalho publicado em cada ano. _____	78
Gráfico 3. Representação gráfica dos tipos de amostras utilizadas pelos artigos para a realização de testes para diagnóstico de LVH. _____	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC: buffy coat

C: artigos que utilizaram apenas amostras caninas

DAT: teste de aglutinação direta

DTNs: Doenças tropicais negligenciadas

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

ESPEC.: especificidade

FML: Fucose-mannose ligand

H: artigos que utilizaram apenas amostras humanas

H/C: artigos que utilizaram amostras humanas e caninas

Hsp70: Proteína de choque térmico 70 (70-kDa heat shock protein)

ICT: teste rápido imunocromatográfico

IFAT: teste de imunofluorescência indireta

ITS1: espaçador transcrito interno 1

kDNA: DNA de cinetoplasto

LAg: *L. infantum* lysate

LAT: teste de aglutinação em látex

LC: leishmaniose cutânea

LMS: *Leishmania majorsoluble*

LV: Leishmaniose visceral

LVH: Leishmaniose visceral humana

PBMC's: células mononucleares do sangue periférico

PCR: reação em cadeia de polimerase

PCR-RFLP: Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

qPCR: PCR em tempo real

RFC: reação de fixação do complemento

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

rRNA: RNA ribossômico

SENS.: sensibilidade

SLA: antígeno solúvel de *Leishmania*

SLbA: antígeno solúvel de *L. braziliensis*

SLiA: antígeno solúvel de *L. infantum*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Tipo de estudo.....	25
4.2. Revisão integrativa da literatura.....	25
4.3. Critérios para seleção dos artigos.....	25
4.4. Critérios de inclusão.....	26
4.5. Critérios de exclusão.....	26
4.6. Protocolo de busca e seleção de artigos.....	26
4.7. Seleção de dados.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Seleção de artigos.....	31
5.2. Seleção de dados.....	32
5.2.1. Ano de publicação.....	78
5.2.2. Países de origem dos artigos.....	79
5.2.3. Base dos métodos utilizados.....	80
5.2.4. Amostras utilizadas.....	81
5.2.5. Antígenos/alvos utilizados.....	81
5.2.6. Sensibilidade e especificidade.....	82
5.2.7 Pontos positivos e limitações.....	83
5.2.8 Perspectivas futuras e progressos científicos.....	84
6. DISCUSSÃO.....	86
7. CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose caracterizada por evolução crônica e abrangência sistêmica e possui alta morbimortalidade. No Brasil e em outras partes da América Latina, a LV é causada pelo agente etiológico *Leishmania (L.) infantum*, também conhecida como *Leishmania (L.) chagasi* e o vetor principal é o inseto flebotomíneo, fêmea, do gênero *Lutzomyia* e espécie *Lutzomyia longipalpis*. (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2016; MISSAWA; LIMA, 2006). O vetor transmite o agente etiológico da LV para mamíferos silvestres, como raposa e marsupiais, e para mamíferos domésticos, como o cão (LAINSON; RANGEL, 2005).

Em humanos, os principais aspectos clínicos da LV variam de formas assintomáticas até o óbito e incluem um quadro caracterizado por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia, perda de peso, astenia, adinamia, diarreia, palidez cutâneo-mucosa, manifestações hematológicas, como pancitopenia, linfadenomegalia, taquicardia, tosse seca e diarreia (BARBOSA; COSTA, 2013). O diagnóstico clínico na LVH (Leishmaniose Visceral humana) é complexo. Nos humanos, a LV pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias infecto-parasitárias e contagiosas, que podem estar presentes nas áreas onde a LV incide, como Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifoide e Tuberculose (BADARÓ *et al.*, 1996; BAHIA, 2020). Assim, bons métodos diagnósticos para identificação correta de humanos infectados é importante para a detecção, quantificação e mapeamento de humanos infectados, possibilitando o direcionamento estratégico das medidas de controle da doença.

Os métodos diagnósticos atuais consistem em tecnologias sorológicas, moleculares e parasitológicas (PESSOA-E-SILVA *et al.*, 2019). Nos testes sorológicos, o objetivo principal é realizar pesquisa de anticorpos anti-leishmania. Pode-se utilizar os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA- (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), principal teste utilizado, e o teste rápido imunocromatográfico (ICT). Em exames parasitológicos, a confirmação da infecção pode ser feita pela demonstração direta em esfregaços ou cultivo do parasito, obtido através de amostras coletadas de forma invasiva, com sensibilidades variadas e especificidades bem altas. Nos métodos moleculares, o objetivo é a amplificação do DNA do parasito e a principal técnica utilizada é PCR (reação em cadeia da polimerase) (ASSIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar do avanço nas ferramentas diagnósticas, o diagnóstico da LV ainda é um desafio, e sua efetividade está relacionada com diversas variáveis, como as propriedades

estruturais e antigênicas do próprio antígeno, escolha do alvo, seleção de amostras adequadas, duração da infecção e variações na população de parasitas e dos hospedeiros (DE SOUZA *et al.*, 2019). Desse modo, com o intuito de fornecer testes diagnósticos mais sensíveis e precisos, diversas ferramentas baseadas em abordagens parasitológicas, sorológicas e moleculares têm sido desenvolvidas, a fim de contribuir com o controle da disseminação da zoonose e sua repercussão na saúde humana (GOMES *et al.*, 2008; MARCILI *et al.*, 2020).

Sendo assim, pela LV constituir um grave problema de saúde pública, a realização desta revisão visa trazer benefícios a longo prazo aos sujeitos e justifica-se pela necessidade de se conhecer os testes diagnósticos utilizados na detecção da LVH e suas características, através do fornecimento de dados que possam contribuir na prevenção e controle da doença e seus impactos na saúde humana, pois a depender do tipo de teste empregado no diagnóstico, pode ocorrer um número elevado de resultados falsos negativos ou falsos positivos, o que compromete a confiabilidade em relação ao número de casos e dificulta o controle da doença. Também, espera-se que esse trabalho funcione como subsídio para a realização de novas pesquisas e planejamentos estratégicos, trazendo benefícios aos pacientes, mesmo que de forma indireta, pois um teste diagnóstico eficaz, possibilita um direcionamento adequado da conduta terapêutica, reduzindo, assim, a alta letalidade da doença. Além de contribuir com informações que ajudem na atuação dos profissionais da saúde no processo de realização de triagem e identificação de pacientes com LV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Fazer um levantamento dos métodos diagnósticos que vêm sendo estudados na LV, com foco na LVH.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar os tipos de diagnósticos utilizados para LVH, quanto à base do método, sensibilidade, especificidade, antígeno/alvos utilizados e os pontos positivos;
- Identificar as limitações e os progressos científicos na busca por métodos diagnósticos eficientes;
- Apresentar as perspectivas futuras sobre os métodos empregados no diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. As Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 22 espécies de protozoários que pertencem à família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Desse modo, o tipo de espécie de protozoário que está envolvido e a relação do parasita/hospedeiro está associado à apresentação de diversas formas clínicas da doença, como a Leishmaniose cutânea, cutânea disseminada, mucosa ou visceral (LONGONI *et al.*, 2012). As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção, 12 milhões infectadas e aproximadamente 2 milhões de novos casos por ano (OMS, 2010; OPAS, 2020). São consideradas um problema de saúde pública, devido à sua ampla distribuição geográfica e pelo fato de suas diversas formas clínicas causarem morte, incapacidades e mutilações. No ano de 2019, o Brasil foi o país das Américas com o maior número de casos notificados tanto de Leishmaniose cutânea e mucosa, com 15.484 casos, quanto de Leishmaniose Visceral, com 2.529 casos. Assim, por se tratar de doenças com amplo espectro clínico e diagnóstico diferencial com várias outras doenças e a necessidade do uso de medicamentos de alta toxicidade, o diagnóstico preciso e correto dos casos é essencial (OMS, 2010; OPAS, 2020).

3.2. A Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral (LV) pode ser causada pelo agente etiológico *Leishmania (L.) donovani*, mais comum em países da África e Ásia. No Brasil e em outras partes da América Latina, a LV é causada pelo agente etiológico *Leishmania (L.) infantum*, também conhecida como *Leishmania (L.) chagasi*. Nesses locais, o principal vetor é o inseto flebotomíneo, fêmea, do gênero *Lutzomyia* e espécie *Lutzomyia longipalpis*. Popularmente, o inseto pode ser conhecido pelo nome de mosquito palha ou “birigui”. Na fase de larva, os flebotomíneos se desenvolvem em ambientes úmidos, com baixa luminosidade e ricos em matéria orgânica vegetal e na fase adulta, se adaptam a diversos ambientes (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2016; MISSAWA; LIMA, 2006). O agente etiológico da LV é transmitido pelo vetor para marsupiais e raposas e para mamíferos domésticos, como o cão. (LAINSON; RANGEL, 2005).

Nos mamíferos infectados, a *L. infantum* parasita o baço, fígado, medula óssea e

gânglios linfáticos, ocasionando uma doença sistêmica, de início insidioso e curso crônico, com formas subclínicas, moderadas e graves. No caso da forma grave, pode haver até 90% de letalidade quando não tratada precocemente (BADARÓ *et al.*, 1996; OMS, 2010). A LV pode acometer indivíduos de qualquer idade, principalmente menores de 15 anos e imunodeprimidos, como os pacientes HIV positivos. Em alguns focos urbanos estudados, há uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de taxas altas de infecção em grupo de adultos jovens em áreas de transmissão recente (LINDOSO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2001).

A LV se enquadra nas chamadas doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que fazem parte de um grupo de doenças infecciosas ou parasitárias que afetam predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis de países em desenvolvimento. Dessa forma, as DTNs contribuem para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social (WHO, 2015).

3.3. Epidemiologia da LV

A LV é responsável por cerca de 20.000 a 40.000 mortes por ano, segundo estimativas da OMS (Organização Mundial da Saúde), com mais de 90% de casos novos ocorrendo em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (LINDOSO *et al.*, 2018). Na América Latina, cerca de 90% dos casos de LV humana ocorrem no Brasil. Apesar de estar constatado que houve uma expansão geográfica e aumento de casos autóctones nas regiões Norte, Sudeste e Centro-oeste, o Nordeste ainda possui a maior concentração de registros, com porcentagem de 67,2%, onde a doença é historicamente endêmica. Na Bahia tem ocorrido uma expansão das áreas endêmicas para LV em um número cada vez maior de municípios (BONNEY, 2016; BRASIL, 2019; FRANK *et al.*; 2002). No estado, a LV está presente em 173 municípios, dos quais 9,2% estão classificados em risco de transmissão alta, 5,5% estão classificados como risco médio de transmissão e 35% dos municípios estão classificados como risco de baixa transmissão (BAHIA, 2020).

3.4. Urbanização da LV

No Brasil, a LV era uma zoonose presente principalmente em áreas rurais. Entretanto, devido às modificações ambientais, socioeconômicas e de infraestrutura, a doença vem se expandindo para áreas urbanas, tanto em cidades de pequeno, médio e grande porte, tornando o cão doméstico o principal reservatório do parasito, contribuindo para a manutenção do ciclo

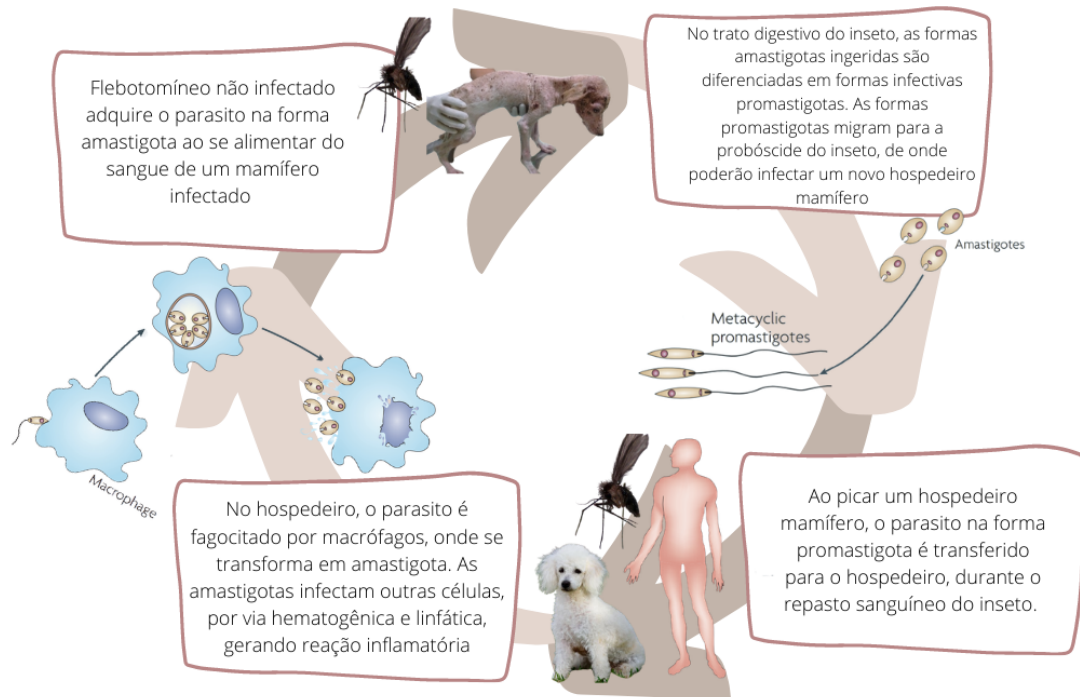
da doença humana (CARDIM *et al.*, 2013; COURA-VITAL *et al.*, 2011). Dessa forma, a ocupação desajustada dos centros urbanos em condições de vida precária e em estado de destruição ambiental, favorecem o desenvolvimento do vetor. Nesse caso, o vetor *Lutzomyia longipalpis* se adapta às condições dos peridomicílios ricos em matéria orgânica, gerada por animais domésticos e más condições sanitárias, facilitando o seu processo de distribuição pelo país (AGUIAR *et al.*, 1996; GUSMÃO *et al.*, 2014).

Na região Oeste do estado da Bahia, o município de Barreiras tem mostrado uma alta prevalência do número de casos de LV em humanos e cães. A região tem como agravante um fluxo migratório estadual e interestadual muito elevado, que, associado com a expansão do agronegócio e seus segmentos, podem ter como consequência modificações ambientais intensas, com expansão urbana rápida e desordenada, especialmente em áreas periféricas, onde as condições de vida muitas vezes são precárias e a infraestrutura pública é insuficiente. Dessa forma, esses fatores podem ter contribuído para a aproximação do vetor *L. longipalpis* da população humana e dos cães na região. (BAVIA *et al.*, 2005; BAVIA *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2013; LAINSON; RANGEL, 2005; WERNECK; MAGUIRE, 2002).

3.5. Ciclo de infecção

O ciclo da doença ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo, que transmite o parasito que causa LV. Um flebotomíneo não infectado adquire o parasito ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, por meio da ingestão do parasito na forma amastigota livres ou intramacrofágicos do tecido subcutâneo. No trato digestivo do inseto, essas formas ingeridas intracelulares são liberadas, e há a diferenciação das formas amastigotas para as formas infectivas promastigotas, através de divisão binária. As formas promastigotas migram para a probóscide do inseto, estrutura localizada na faringe do mesmo, que a fêmea utiliza para penetrar a pele e inserir a saliva contaminada e sugar o sangue, de onde poderá infectar um novo hospedeiro mamífero. Ao picar um hospedeiro mamífero, o parasito na forma promastigota é transferido para o hospedeiro, durante o repasto sanguíneo do inseto. No hospedeiro, o parasito é fagocitado por macrófagos, onde se transforma em amstigota. As amastigotas se multiplicam por divisão binária até romperem a célula hospedeira, disseminando-se pelas vias hematogênicas e linfáticas, infectando outras células e gerando reação inflamatória, momento no qual o paciente começa a exibir os sintomas. O ciclo é completado quando outra fêmea do flebotomíneo ingere o sangue contaminado, com parasitos na forma amastigota (BASANO; CAMARGO, 2004; BATES, 2007; REY, 2001).

Figura 1. Ciclo da Leishmaniose Visceral



Fonte das imagens: Adaptado de (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

3.6. Aspectos clínicos da LV

Em humanos, os principais aspectos clínicos da LV variam de formas assintomáticas até o óbito e incluem um quadro caracterizado por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia, perda de peso, astenia, adinamia, diarreia, palidez cutâneo-mucosa, manifestações hematológicas, como pancitopenia, linfadenomegalia, taquicardia, tosse seca e diarreia (BARBOSA; COSTA, 2013). O diagnóstico tardio da LV, ocorrência de anemia, febre por mais de 60 dias, desnutrição, diarreia, pancitopenia, a presença de infecções e sinais hemorrágicos, são fatores que contribuem para o aumento da letalidade por LV. Dessa maneira, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são ferramentas importantes para a redução da letalidade (BAHIA, 2020).

3.7. Aspectos que influenciam a ocorrência de LVH: o papel do cão

O cão doméstico tem papel importante na epidemiologia da doença, pois é considerado o principal reservatório da LV no Brasil (BANETH; AROCH, 2008). Tal questão tem sido demonstrada pela presença do parasito na pele de animais acometidos pela doença. Na transmissão da LV, esses parasitos são ingeridos na forma de amastigotas, através de sangue contaminado por flebotomíneos fêmeas, que transformam essas amastigotas em promastigotas, podendo infectar humanos (BATES, 2007). Assim, a alta prevalência de infecção por LV em cães está associada com um aumento do risco de casos humanos (BANETH; AROCH, 2008; LAURENTI *et al.*, 2013; REITHINGER *et al.*, 2003). Além disso, nos cães assintomáticos e oligossintomáticos há uma dificuldade maior em identificá-los em uma população, devido à ausência ou quantidade restrita de sinais clínicos e a ocorrência de resultados falsos-negativos nos testes diagnósticos, fazendo com que esses animais funcionem como fonte de infecção para o vetor (BANETH *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008). Dessa maneira, no Brasil, tal como no mundo, esses animais são considerados alvos estratégicos para medidas de controle da doença (MORENO; ALVAR, 2002).

3.8. Diagnóstico

3.8.1. Histórico

Até a década de 30, os diagnósticos humanos e caninos de LV eram realizados através de exames diretos, como pela punção de fígado, baço e raspado de pele. Esses exames se mostraram seguros quanto à questão da positividade dos casos, mas não se mostraram eficazes para funcionarem como uma ferramenta para a cobertura total dos humanos e animais positivos, devido à necessidade de utilização de procedimentos invasivos (ADLER, 1930). Em 1937 foi utilizado pela primeira vez o exame sorológico, por meio da reação de fixação do complemento (RFC), para diagnóstico da LV humana. Em 1957, pesquisadores brasileiros descreveram a RFC para inquéritos caninos, utilizando-se antígeno extraído do bacilo da tuberculose, e concluíram que essa técnica era mais sensível e específica para detectar LV, em comparação com os exames diretos (NUSSENZWEIG, 1957).

Após a década de 60, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada, mas até os dias de hoje a sua especificidade ainda é prejudicada, devido à presença

de reações cruzadas com outras doenças, como a Doença de Chagas (DA COSTA *et al.*, 1991; GENARO, 2000; MOHAMMED *et al.*, 1986).

Foi a partir da década de 70, pela necessidade de que houvesse uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, que surgiram muitos estudos avaliando e aprimorando o teste ELISA-padrão (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rk39, específicas do gênero *Leishmania*, melhoraram a sensibilidade e especificidade da técnica. No entanto, ainda podem ocorrer reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos (BADARÓ *et al.*, 1996; JAFFE; ZALIS; JAFFE, 1988; MOHAMMED *et al.*, 1986; OZENSOY *et al.*, 1998).

O teste de aglutinação direta foi descrito pela primeira vez em 1975 e foi adaptado para o diagnóstico da LV humana e canina em 1986. O teste se mostrou com boa sensibilidade e especificidade e com uma execução simples e de baixo custo, quando comparado com os outros testes (EL SAFI; EVANS, 1989).

Na década de 80, desenvolveu-se a técnica molecular de PCR (reação em cadeia de polimerase), que é o método mais sensível e específico para o diagnóstico de LV, mas que ainda possui utilização limitada em inquéritos epidemiológicos, devido ao seu alto custo, disponibilidade de reagentes e equipamentos (WEISS, 1995).

3.8.2. Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico é complexo. Nos humanos, a LV pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias infecto-parasitárias e contagiosas, que podem estar presentes nas áreas onde a LV incide, como Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifoide e Tuberculose. Um caso humano pode ser considerado suspeito quando um indivíduo proveniente de área com ocorrência de transmissão para LV apresenta febre e esplenomegalia e quando um indivíduo proveniente de área sem ocorrência de transmissão apresenta febre e esplenomegalia e já foram descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes naquela região (BADARÓ *et al.*, 1996; BAHIA, 2020).

3.8.3. Diagnóstico sorológico

Nos testes sorológicos, o objetivo principal é realizar pesquisa de anticorpos anti-leishmania. Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e

canina. Atualmente são usados os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste rápido imunocromatográfico (ICT). Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática e na disponibilidade de reagentes (ASSIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013; SUNDAR; RAI, 2002). Apesar das vantagens, os testes sorológicos têm limitações importantes, como a dificuldade de se estabelecer um diagnóstico definitivo de infecção por *L. infantum* em animais assintomáticos e a reatividade cruzada dos testes com outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, com protozoários de outras famílias, como *Toxoplasma gondii* e com a bactéria *Ehrlichia canis*. Um aspecto importante que limita a performance dos testes sorológicos utilizados atualmente, é o antígeno utilizado na técnica. Dessa forma, na tentativa de melhorar esses testes, tem sido realizada a identificação de antígenos dominantes, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos (FRAGA *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017; ZANETTE *et al.*, 2014).

A técnica da RIFI consiste em aderir antígeno constituído de promastigotas mortas de *Leishmania spp.* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde a reação é processada com o soro a ser testado. O resultado é dado em títulos e representa a diluição máxima em que as promastigotas foram visualizadas. Apesar de ser produzido em escala nacional por Biomanguinhos- unidade FIOCRUZ, o que facilita a utilização do teste, o mesmo apresenta baixo desempenho diagnóstico para LV com valores de sensibilidade e especificidade muito variados, além de requerer infraestrutura laboratorial (BRASIL, 2014; PERUHYPE-MAGALHÃES; MACHADO-DE-ASSIS; RABELLO, 2012).

O ELISA é o teste mais realizado para o imunodiagnóstico de LV e o antígeno frequentemente utilizado na técnica é aquele solúvel bruto preparado a partir de suspensão de promastigotas em solução salina tamponada com fosfato. O teste é um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI, sendo que a sensibilidade do teste varia de acordo com a metodologia utilizada e a especificidade está relacionada com o antígeno escolhido. O ELISA permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas não é muito preciso na detecção de casos oligossintomáticos ou assintomáticos (EVANS *et al.*, 1990; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; PEDRAS *et al.*, 2008).

O DAT foi descrito pela primeira vez para uso no diagnóstico da LV em 1986, por El Harith, e desde então tem sido avaliado e aperfeiçoado. O teste é baseado na reação de antígenos constituídos de promastigotas com anticorpos anti-Leishmania, que resulta em reação de aglutinação após o período de incubação. A técnica tem mostrado boa sensibilidade em vários

estudos, e combina altos níveis de validade com a facilidade de execução, apesar de apresentar problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno (BOELAERT *et al.*, 1999; HARITH *et al.*, 1986).

No ICT, o antígeno é imobilizado em tiras de nitrocelulose para se ligar aos anticorpos específicos presentes nas amostras. Os testes rápidos são amplamente utilizados em campo e em clínica e fornecem os resultados de forma muito rápida. Entretanto, a sua precisão, em termos de sensibilidade e especificidade, varia de acordo com antígeno empregado (ATHANASIOU *et al.*, 2014; BURNS *et al.*, 1993; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2014)

3.8.3.1. Teste rápido

Para o controle da LV, a detecção, quantificação e mapeamento de humanos infectados é um passo importante para o direcionamento estratégico das medidas de controle. Assim, o teste de aglutinação direta e o teste rápido imunocromatográfico são empregados como forma de triagem nessas medidas de controle, devido à sua praticidade, baixo custo e boa sensibilidade (TRAVI *et al.*, 2018). Para o diagnóstico de LVH, no Brasil, o teste atualmente fornecido pelo Ministério da Saúde é o LSH Ab ECO Teste, teste imunocromatográfico com sensibilidade de 93% e especificidade de 99%, que utiliza como antígeno a proteína recombinante rK39. Para o diagnóstico de LV canina, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde, é utilizado o teste imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform, Biomanguinhos) como ferramenta de triagem e o ELISA como teste confirmatório. (COURA-VITAL *et al.*, 2014). Dessa forma, os testes baseados em métodos de imunodiagnóstico são úteis na identificação de casos específicos e podem ser usados para a vigilância comunitária (SUNDAR; RAI, 2002).

No entanto, falhas nos resultados dos testes diagnósticos, como resultados falso-positivos podem causar tratamento desnecessário para humanos não infectados, e, por outro lado, falhas nos testes com resultados falso-negativos, não detectam casos positivos, favorecendo a disseminação da doença, ocorrência de subnotificações e dificuldade de controle da doença (BERRAHAL *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2016).

3.8.4. Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos são métodos de referência no diagnóstico da LV e baseiam-se na visualização direta do parasito e no seu isolamento em cultivo. A demonstração do parasito na forma de amastigota pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do

baço, fígado, medula óssea, linfonodos ou por escarificação da lesão. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas histológicas, ou isolamento em meios de cultura. A especificidade desse método é muito alta, podendo chegar a 100%. Entretanto, a sensibilidade costuma ser reduzida, pois varia de acordo com a expertise do microscopista, do grau de parasitismo e pelo fato de que a distribuição dos parasitas pode não ser homogênea no mesmo tecido. A sensibilidade mais alta, cerca de 98%, é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. Além disso, a biópsia e aspiração são técnicas invasivas e exigem ambientes apropriados para a coleta, e não são procedimentos adequados para estudos epidemiológicos (MOREIRA *et al.*, 2007; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; SOUSA, 2017; SUNDAR; RAI, 2002).

3.8.5. Diagnóstico Molecular

Nos métodos moleculares, o objetivo é a amplificação do DNA do parasito (ASSIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013). Desde 1980, a PCR é a técnica amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias, dentre esses métodos moleculares (VASOO; PRITT, 2013; WEISS, 1995). Essa técnica possui alto desempenho e resultados confiáveis, com uma boa sensibilidade e especificidade, e tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasito, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Ela pode ser aplicada em várias amostras biológicas, como sangue total, creme leucocitário, aspirado de medula óssea, baço e linfonodos. Além disso, a PCR pode ser realizada com inúmeros alvos moleculares, como genes de minixon, DNA nuclear, RNA ribossômico (rRNA), sequências nucleares repetidas ou DNA do cinetoplasto (kDNA), sendo esse último o alvo mais aplicado na PCR (CRUZ *et al.*, 2002; CUPOLILLO *et al.*, 2003; LACHAUD *et al.*, 2001; PIZZUTO *et al.*, 2001; SREENIVAS *et al.*, 2004).

Entretanto, o uso da técnica está restrito aos centros de referência e laboratórios de pesquisa, pois apesar de inúmeros estudos na área, poucos kits comerciais estão disponíveis, devido à falta de padronização. Assim, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina. Para a utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar menos complexa e com um custo operacional mais baixo (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; VASOO; PRITT, 2013).

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

O presente trabalho tratou-se de um estudo retrospectivo e descritivo, de abordagem qualitativa, por meio da realização de uma revisão integrativa da literatura, acerca dos métodos diagnósticos utilizados na Leishmaniose Visceral Humana.

4.2. Revisão integrativa da literatura

A pergunta norteadora do trabalho foi elaborada e definida a partir da estratégia PICO: “Quais os métodos diagnósticos utilizados na detecção da Leishmaniose Visceral humana?”, respondendo as afirmativas do acrônimo, como demonstra o quadro:

Quadro 1. descrição dos elementos do pico

P (participantes)-	humanos
I (intervenção)-	tipos de métodos diagnósticos
C (comparação)-	sem grupos comparativos
O (resultado)-	tipos de métodos diagnósticos na detecção da LV

4.3. Critérios para seleção dos artigos

Os estudos utilizados foram identificados por meio de busca bibliográfica nas bases de dados eletrônicas: Pubmed, Scielo, LILACS e ScienceDirect.

Os descritores aplicados na estratégia de busca pelos artigos foram consultados no “Descritores em Ciências da Saúde” (DeCS) e no “Medical Subject Headings” (Mesh). A combinação dos descritores foi realizada com o emprego dos operadores booleanos “AND”.

No Pubmed foram utilizadas duas estratégias diferentes, a fim de abranger o maior número possível de artigos. A primeira estratégia foi chamada de “estratégia 1”: (((“Leishmaniasis, Visceral”[Mesh]) AND “Diagnosis”[Mesh]) AND “Humans”[Mesh]) AND “Dogs”[Mesh] e a segunda estratégia foi chamada de “estratégia 2”: “Visceral leishmaniasis” AND diagnosis AND humans AND dogs.

No Scielo, no LILACS e no ScienceDirect foi utilizada a estratégia: “Visceral

leishmaniasis" AND diagnosis AND humans AND dogs.

Vale ressaltar que, mesmo que os artigos que utilizaram apenas amostras caninas não tenham sido submetidos à avaliação de elegibilidade através de leitura na íntegra dos trabalhos, o descritor “Dogs” foi mantido, pois, ao utilizá-lo, foi possível encontrar também artigos que utilizaram conjuntamente amostras humanas e caninas, sendo essas primeiras, de interesse para essa revisão.

4.4. Critérios de inclusão

Foram incluídos artigos experimentais originais publicados em português ou inglês que abordaram os métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral humana e para Leishmaniose Visceral canina. Incluíram-se artigos entre o período de 1930, pois foi nessa época que começaram a utilizar testes sorológicos para o diagnóstico de LV, até o ano de 2020.

4.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos artigos de revisão sistemática, revisão integrativa, carta ao editor, relato de caso, bem como artigos que não possuíam o resumo na base de dados, artigos não publicados em revistas, versões não corrigidas de artigos, artigos aceitos mas não editados, artigos experimentais que não utilizaram humanos ou cães nos experimentos, artigos que utilizaram amostras que não foram provenientes de humanos ou de cães e artigos que não responderam à pergunta norteadora do estudo. Na fase de avaliação de elegibilidade através da leitura na íntegra dos trabalhos, os artigos que utilizaram apenas amostras caninas foram excluídos dessa revisão.

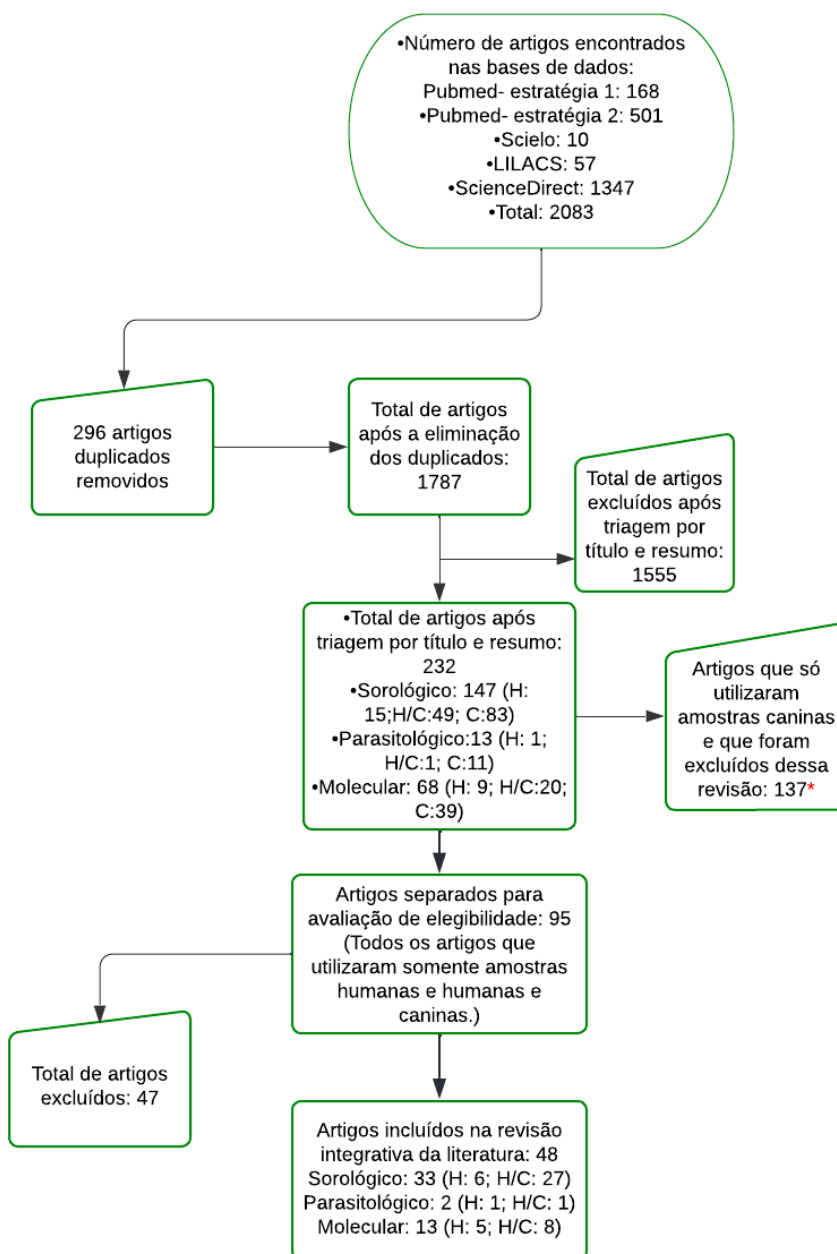
4.6. Protocolo de busca e seleção de artigos

A primeira parte do processo de busca e seleção de artigos, foi realizada através da utilização dos descritores supracitados nas bases de dados e retirada dos artigos duplicados através do software Mendeley. A seleção inicial dos artigos utilizados foi feita por meio da leitura dos títulos e resumos dos trabalhos, aplicando-se os critérios de inclusão e exclusão aqui descritos. Nessa etapa, foi confeccionada uma tabela no Microsoft Excel, separando os artigos nas seguintes categorias: artigos que abordaram métodos sorológicos, artigos que abordaram

métodos moleculares, artigos que abordaram métodos parasitológicos, artigos que abordaram mais de um método e artigos que abordaram outros métodos. Dentro de cada categoria, os artigos selecionados por título e resumo foram ainda classificados em artigos que utilizaram apenas amostras humanas, artigos que utilizaram amostras humanas e caninas e artigos que utilizaram apenas amostras caninas. Ainda nessa etapa, foram coletados os seguintes dados de cada artigo: base de dados na qual o artigo foi encontrado, número do DOI, ano de publicação e título do trabalho.

Na segunda etapa, os artigos previamente selecionados por título e resumo que utilizaram apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas foram lidos na íntegra e, após a utilização dos critérios de inclusão e exclusão descritos, foram classificados como elegíveis para a inclusão na revisão integrativa ou não elegíveis. Nessa etapa, devido à limitação de tempo para execução do trabalho, os artigos que utilizaram apenas amostras caninas não foram lidos na íntegra e nem avaliados para elegibilidade. Os artigos considerados como elegíveis passaram pelo processo de seleção de dados.

Figura 2. Organograma sobre o processo de seleção dos estudos.



H: artigos que utilizam apenas amostras humanas; H/C: artigos que utilizam amostras humanas e caninas; C: artigos que utilizam apenas amostras caninas; *: os artigos que utilizaram apenas amostras caninas não foram separados para avaliação de elegibilidade e não foram lidos na íntegra.

Utilizando as estratégias de busca já descritas anteriormente, encontrou-se um total de 2083 artigos. Desses, 168 foram encontrados no Pubmed, utilizando a estratégia 1, 501 também no Pubmed, utilizando a estratégia 2, 10 foram encontrados no SciELO, 57 no LILACS e 1347 no ScienceDirect. Após remover os 296 artigos duplicados, utilizando o software Mendeley,

restaram 1787 artigos.

Desse total, foi realizada a triagem por título e resumo, utilizando os critérios de inclusão e exclusão já mencionados, excluindo, assim, 1555 artigos, restando um total de 232. Desse conjunto, realizou-se uma separação por número de artigos por cada método diagnóstico e tipo de amostra utilizada, resultando em 147 artigos que utilizaram método sorológico, sendo 15 apenas com amostras humanas, 49 com amostras humanas e caninas, 83 somente com amostras caninas; 13 artigos que abordaram método parasitológico, sendo 1 apenas com amostras humanas, 1 com amostras humanas e caninas e 11 apenas com amostras caninas; 68 que empregaram o método molecular, sendo 9 somente com amostras humanas, 20 com amostras humanas e caninas e 39 apenas com amostras caninas e 4 artigos que utilizaram outros métodos apenas com amostras caninas.

Após a realização dessa separação, foram excluídos 137 artigos que utilizavam apenas amostras caninas. Essa exclusão ocorreu devido ao fato de que, apesar do projeto inicial ter como um dos objetivos a avaliação desses artigos e as estratégias de busca de artigos utilizadas nessa revisão terem incluído o descritor “Dogs”, devido à limitação de tempo para a execução do projeto, foi necessário retirá-los deste trabalho.

Assim, restaram 95 artigos, que utilizaram amostras apenas humanas e humanas e caninas, que foram separados para a realização de leitura completa e avaliação de elegibilidade. Posteriormente a essa avaliação, utilizando os critérios de inclusão e exclusão descritos, 47 artigos foram excluídos. Desse total, 24 foram excluídos por não responderem à pergunta norteadora do trabalho, não possuírem o objetivo de avaliar um método diagnóstico em específico, identificar reservatórios animais para Leishmaniose, avaliar aspectos epidemiológicos em um determinado local com indivíduos já sabidamente infectados com LV, examinar diferenças imunológicas entre hospedeiros já infectados, diferenciar *L. donovani* de *L. infantum*, comparar a preparação de amostras, identificar reagentes estabilizadores para prevenir a degradação de DNA e RNA durante o armazenamento e transporte para laboratórios que realizam diagnóstico de LV; 14 foram excluídos, pois o texto completo, publicado em revista, não estava disponível para leitura ou porque não havia um artigo completo publicado em revista, apenas resumo e relatórios curtos; 4 foram excluídos por utilizarem outras amostras além de amostras humanas e humanas e caninas, como amostras de raposas, roedores e hyraxes; 3 foram excluídos por utilizarem apenas amostras caninas para validar um estudo sobre LV, cujos resultados também serão úteis para o diagnóstico em humanos; 1 artigo foi excluído por não utilizar amostras humanas positivas para LV e 1 artigo foi excluído por não estar em português ou em inglês.

4.7. Seleção de dados

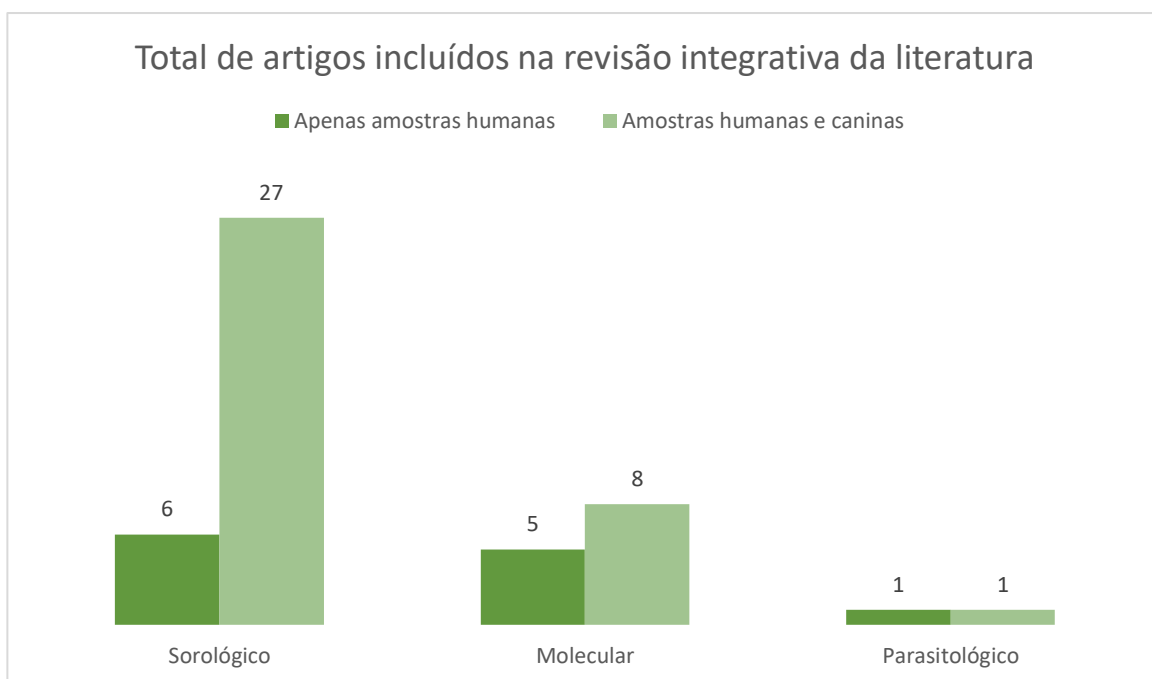
Para cada categoria de método diagnóstico previamente descrita, foram criadas cinco tabelas no Microsoft Excel (Apêndice A), uma para artigos que avaliaram métodos sorológicos e utilizaram apenas amostras humanas, a segunda para artigos que avaliaram métodos sorológicos e utilizaram amostras humanas e caninas, a terceira para artigos que avaliaram métodos moleculares e utilizaram apenas amostras humanas, a quarta para artigos que avaliaram métodos moleculares e utilizaram amostras humanas e caninas e a quinta para artigos que avaliaram métodos parasitológicos e utilizaram apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas. Todas as cinco tabelas continham os seguintes dados: número de identificação de cada artigo, com numeração de 1 a 48, e letra de identificação para cada categoria, precedendo os números, sendo letra “A” para artigos da primeira tabela, “B” para artigos da segunda tabela, “C” para artigos da terceira tabela, “D” para artigos da quarta tabela e “E” para artigos da quinta tabela; base do método de cada trabalho, antígeno/alvo, sensibilidade, especificidade, pontos positivos, se já estava em uso comercial, limitações e perspectivas futuras, país de origem do estudo, ano de publicação e referências do artigo. Para cada artigo elegível lido, essas informações foram coletadas e adicionadas na tabela. Além disso, dentro de cada categoria, os artigos foram organizados de forma crescente, dos artigos mais antigos para os mais recentes. Também, foi criada uma sexta tabela (Tabela 2), contendo os artigos que apresentaram os melhores resultados, dentre o total de artigos avaliados. A tabela contém os seguintes dados: número e letra de identificação, método avaliado, tipo de amostra, antígeno/alvo, sensibilidade, especificidade, vantagens e referências.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de artigos

Após a avaliação de elegibilidade e exclusão dos 47 artigos, 48 artigos considerados elegíveis foram incluídos na revisão integrativa da literatura. Desse total, 33 artigos abordaram o método sorológico, sendo que 6 utilizaram apenas amostras humanas e 27 amostras humanas e caninas; 2 abordaram o método parasitológico, 1 utilizou apenas amostras humanas e 1 utilizou amostras humanas e caninas e 13 abordaram o método molecular, sendo que 5 utilizaram apenas amostras humanas e 8 amostras humanas e caninas (Gráfico 1).

Gráfico 1. Total de artigos incluídos na revisão integrativa da literatura, após avaliação de elegibilidade.



5.2. Seleção de dados

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A01	ELISA: complexo solúvel de fração glicoproteica de promastigotas de <i>L. donovani</i> , o fucose-mannose ligand (FML) para o diagnóstico de LV, para detecção de infecções subclínicas entre indivíduos que vivem em área endêmica e entre doadores de sangue e para o acompanhamento sorológico pós-terapêutico.	Soro humano.	Fucose-mannose ligand (FML)	100%.	92%.	Os resultados obtidos mostraram que FML pode ser seguramente utilizado para o diagnóstico de LV, com alta sensibilidade e especificidade. O antígeno pode separar a LV de todas as outras infecções cutâneas intimamente relacionadas, causadas por <i>Leishmania</i> . Na área endêmica, o FML-ELISA foi altamente discriminatório, distinguindo soro não reativo de soro de indivíduos considerados como subclínicos, mas com FML reativo. No período do estudo, nenhum indivíduo com resultado negativo no FML-ELISA desenvolveu LV. Nos pacientes que receberam tratamento, houve um decréscimo de anticorpos anti-FML, correlacionado com a melhora de suas condições clínicas.	Não.	Ao contrário de dados relatados anteriormente em outros estudos, o antígeno FML isolado de uma cepa de <i>L. donovani</i> foi acurado no diagnóstico de LV americana, e aparentemente pode ser usado para diagnosticar todas as infecções causadas pelo complexo <i>L. donovani</i> . FML pode até ser um marcador para LV ativa e pode ser usado para monitorar o sucesso do tratamento.	Brasil.	PALATNIK-DE-SOUZA <i>et al.</i> , 1995.

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A02	ELISA: Utilização da proteína recombinante rLiHsp70, derivada da Hsp70 (70-kDa heat shock protein) e de epítomos específicos de célula B, três peptídeos sintéticos 50-mer, chamados 70-P1, 70-P2 e 70-P3, e peptídeos sintéticos 20-mer (H1-H43) derivados da sequência da proteína Hsp70, para serodiagnóstico de LV e Leishmaniose mucocutânea.	Soro humano.	rLiHsp70 e peptídeos sintéticos 50-mer, chamados 70-P1, 70-P2 e 70-P3, peptídeos sintéticos 20-mer (H1-H43) derivados da sequência da proteína Hsp70.	Não calculado.	Não calculado.	70-P2, pode ser usado como antígeno alvo em ensaios para um sorodiagnóstico diferencial de LV e Doença de Chagas, já que é reconhecido por soros de Leishmaniose mas, não, pelos soros de pacientes com doença de Chagas. Portanto, uma vez que os soros chagásicos são o grupo de reação cruzada mais comum com a Leishmaniose e ambas as infecções se sobrepõem em algumas áreas geográficas, acredita-se que um sorodiagnóstico diferencial da leishmaniose baseado no peptídeo 70-P2 deve ser altamente específico.	Não.	70-P2 não apresentou uma alta sensibilidade no sorodiagnóstico da Leishmaniose uma vez que foi reconhecido por 57% dos soros de leishmaniose. No entanto, a alta especificidade deste peptídeo sugere que seu uso em combinação com outras moléculas antigênicas, como proteínas ribossomais ácidas P2, constituiria uma abordagem para o projeto de sorodiagnóstico específico e sensível da Leishmaniose.	Espanha.	QUIJADA <i>et al.</i> , 1998.

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A03	ELISA: Análise da prevalência de anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes LmSIR2, LmS3a, LimTXNPx, LicTXNPx e LiTXN1 em soros de crianças de uma área endêmica de Portugal, para avaliar a imunogenicidade dessas proteínas durante infecções humanas naturais e examinar o potencial como antígenos diagnósticos. Antígeno utilizado como controle: extrato de promastigotas de <i>L. infantum</i> .	Soro humano.	LmSIR2, LmS3a, LimTXNPx, LicTXNPx e LiTXN1.	LicTXNPx apresentou a maior sensibilidade: 78%.	LicTXNPx: 94%.	LicTXNPx apresentou a maior imunorreatividade em relação aos demais antígenos e foi o mais reconhecido no caso da LV aguda, apresentando maior potencial para ser utilizado como antígeno de diagnóstico. Além disso, LicTXNPx parece ser a proteína com maior capacidade fazer a distinção entre infecção e cura, com diminuição dos níveis de anticorpos comnta essa proteína após o tratamento.	Não.	A sensibilidade e especificidade obtidas com LicTXNPx são da mesma ordem que as obtidas com o antígeno utilizado como controle. Também não foi observada correlação entre a positividade do título de anticorpos com a idade das crianças e a origem geográfica dos pacientes.	Portugal.	SANTARÉM, <i>et al.</i> , 2005.

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A04	ELISA: Utilização de seis epítomos (peptídeos 1, 2, 3, 4, 5, 6) de células B lineares previstos de três proteínas do parasita <i>L. infantum</i>, expressos em estágio de amastigota e altamente divergentes das proteínas do <i>T. cruzi</i>. Os peptídeos 1 e 2 são derivados da proteína LinJ.30.2730, 3 e 4 da proteína LinJ.32.0280 e 5 e 6 da proteína LinJ.27.0980. Os peptídeos foram avaliados individualmente e em conjunto (Mix I: peptídeos 2, 3 e 6, Mix II: 1, 2, 3, 4, 5, 6, Mix III: 2 e 6, Mix IV: 3 e 6), como um sistema único de detecção. Antígeno utilizado como controle: antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> (SLiA).	Soro humano	Peptídeos sintéticos previstos por células B (1, 2, 3, 4, 5, 6) derivados de LinJ.30.2730, LinJ.32.0280, LinJ.27.0980.	Ordem decrescente: peptídeo 2, 3, 1, 5, 4 (82,86% - 92,86%). Peptídeo 6, Mix I, Mix II, III e IV: 100%.	Mix IV: 100.00%, Peptídeo 6 e Mix III: 99,28%, Mix I (97.83), peptídeos 1 e 3: 94,20%, peptídeo 2: 93,48%, Mix II: 87,68%, peptídeo 4: 86,23%, peptídeo 5: 66,67%.	O Mix IV foi capaz de identificar os casos de LV e simultaneamente diferenciar infecções causadas por <i>T. cruzi</i>. Peptídeo 6, Mix III e I também são potenciais antígenos capazes de serem utilizados no diagnóstico de LV. Os dados revelaram que os genes que codificam os potenciais peptídeos são expressos no parasito intracelular em estágio amastigota, assim, poderiam ser expostos às células do hospedeiro e ao sistema imunológico e induzir alta produção de anticorpos. A alta sensibilidade e especificidade observadas na avaliação dos peptídeos pode ser explicada pela alta expressão em estágios intracelulares, localização subcelular (secretada/excretada) e alta antigenicidade demonstrada pela predição de células B.	Não.	A perspectiva do presente estudo é fazer a triagem em indivíduos assintomáticos de áreas endêmicas para métodos diretos. O trabalho traz uma estratégia para a descoberta de novos antígenos aplicada ao diagnóstico sorológico que contribuirá para o aprimoramento do diagnóstico da LV.	Brasil.	CARVALHO <i>et al.</i> , 2018.

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A05	ELISA: Produção de uma nova proteína recombinante baseada em um gene relacionado à cinesina de <i>Leishmania braziliensis</i>(Lbk39), que mostra 59% de identidade de aminoácidos com o homólogo de <i>L.infantum</i>, para o sorodiagnóstico de LV e LC. O gene Lbk39 foi sintetizado, inserido no vetor pLEXSY-sat2 e transfectado em células de <i>L. tarentolae</i> por eletroporação. Ferramenta utilizada como controle: extrato bruto de <i>L. braziliensis</i>, soros positivos e negativos agrupados foram incluídos em cada placa no ELISA ao testar soros individuais, cada amostra foi medida em triplicado, e todo o ensaio foi realizado em duplicata.	Soro humano.	Lbk39	LV: 100%. LC: 88%.	LV: 100%. LC: 98%.	A proteína recombinante Lbk39 produzida foi capaz de reconhecer a infecção por <i>Leishmania</i> no soro de humanos com leishmaniose tegumentar ou visceral no Brasil. . Com o antígeno recombinante Lbk39, a reatividade cruzada com soros de pacientes chagásicos foi muito reduzida.	Não.	Mais trabalhos são necessários para investigar o uso potencial deste antígeno em soros de diferentes populações, bem como em diferentes regiões geográficas, a fim de determinar a capacidade específica de detectar níveis de anticorpos anti-<i>Leishmania</i> em pacientes com LV ou LC. A análise da resposta ao Lbk39 por soros de cães infectados com <i>L. infantum</i> devem ser considerados para determinar como o antígeno se comporta em diferentes hospedeiros.	Brasil.	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2019.

Tabela 1. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
A06	ELISA: Utilização da versão recombinante (rLiHyL) da proteína LiHyL para diagnóstico de Leishmaniose Visceral e Tegumentar humana. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de Leishmania (SLA). Também foi avaliado o papel prognóstico de rLiHyL na LVH, com acompanhamento sorológico pós-terapêutico e a imunogenicidade induzida pela proteína.	Soro humano.	rLiHyL.	100%.	100%.	Os resultados mostraram que rLiHyL foi altamente eficaz para diferenciar pacientes com leishmaniose de indivíduos saudáveis e pacientes com reação cruzada, pois rLiHyL não mostrou reatividade cruzada com soros de pacientes com doença de Chagas, hanseníase, aspergilose ou paracoccidioidomicose. Além disso, a proteína induziu uma resposta imune do tipo Th1 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes tratados com leishmaniose, permitindo, assim, inferir sobre um papel imunogênico desenvolvido por esta proteína na leishmaniose humana. rLiHyL apresentou uma diminuição significativa nos níveis de anticorpos específicos após o tratamento.	Não.	Como limitação, a resposta imune foi avaliada uma vez após o tratamento, sendo necessário mais estudos para que o antígeno seja considerado como biomarcador da progressão da Leishmaniose. A proteína foi altamente eficaz em reagir com anticorpos de soros de ambas as classes de pacientes com leishmaniose, apresentando alta sensibilidade e especificidade para identificar soros positivos, mas, não, negativos ou com reação cruzada, demonstrando a possibilidade de utilização para o serodiagnóstico da doença. O trabalho traz que rLiHyL poderia ser incorporado em outros sistemas de diagnóstico, como aqueles que usam tiras imunocromatográficas.	Brasil.	LAGE, <i>et al.</i> , 2019.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B07	ELISA: O estudo objetivou analisar uma técnica específica, no caso o micro-ELISA, ao invés ter o maior foco em avaliar um antígeno em particular. O estudo compara o uso do micro-ELISA para o diagnóstico de LVH e cutânea e LVC com outras técnicas de sorodiagnóstico. O micro-ELISA foi comparado com o teste de Imunofluorescência indireta (para soro humano e canino) e com o teste de difusão dupla de Ouchterlony (para soro canino).	Soro humano e canino.	Este estudo priorizou avaliar a técnica, nesse caso, o micro-ELISA, ao invés de focar em um antígeno. Mas para avaliar a técnica, foi utilizado uma linhagem de <i>Leishmania infantum</i> (coleção de Liverpool no. LV/1 14).	100%.	Não calculado.	Os resultados obtidos neste estudo confirmam que o micro-ELISA é um método adequado para o sorodiagnóstico da leishmaniose humana e canina, e pode fornecer um complemento útil à bateria de técnicas já disponíveis para o diagnóstico desta doença. O micro-ELISA foi mais sensível que o teste de difusão dupla de Ouchterlony e do que o teste de Imunofluorescência indireta.	No momento em que o estudo foi realizado, não.	O número limitado de soros testados de pacientes com Doença de Chagas não permite quaisquer conclusões a serem tiradas sobre a ausência de reação cruzada. Houveram resultados negativos em soros de pacientes com leishmaniose cutânea confirmada parasitologicamente, que de acordo com o estudo, correlacionam-se com a usual ausência de anticorpos relatada em tais casos. os resultados deste ensaio confirmaram a utilidade do técnica de micro-ELISA para o diagnóstico sorológico da leishmaniose, porém mais pesquisas são necessárias.	França.	HOMMEL <i>et al.</i> , 1978.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B08	ELISA: Desenvolvimento de um novo antígeno, o LMS (<i>Leishmania majorsoluble</i>) oriundo de promastigotas (cultivadas <i>in vitro</i>) de organismo <i>Leishmania major</i> -like para o diagnóstico de LVH e LVC. Ferramenta utilizada como controle e comparação: teste de anticorpos imunofluorescentes indiretos (IFAT ou RIFI).	Soro humano e canino.	LMS.	92% (soro humano) 98% (soro canino).	100% (soro humano) 95% (soro canino).	O estudo mostrou que o antígeno LMS é muito específico, capaz de detectar baixos níveis de imunoglobulinas anti-leishmania presentes em amostras positivas, e pode discriminar entre negativas e soros positivos, além de baixos níveis de reações cruzadas (testado em soros de pacientes com doença de Chagas, Hanseníase, Malária, Tuberculose, fator reumatóide, Leishmaniose cutânea, Toxoplasmose, Riquetsiose, Hepatite B, Esquistossomose, Ascariíase e soro de cães com doença de Chagas, Erliquiose, Riquetsiose e soro de cães saudáveis). LMS apresentou resultados melhores quando foi usado no ELISA em comparação ao uso no IFAT. Os dados sugerem que LMS é um indicador sorológico de LV.	Não.	Os resultados apresentados demonstraram que LMS é altamente satisfatório para uso no diagnóstico ELISA de LV e, quando comparado ao IFAT, é um teste confiável que pode ser utilizado com segurança para o diagnóstico da leishmaniose.	Brasil.	BARBOSA-DE-DEUS <i>et al.</i> , 2002.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B09	ELISA: Utilização da versão recombinante (A2-HIS) da proteína A2 para avaliar sua eficácia no diagnóstico de LVH, LT e LVC . Antígeno utilizado como controle: SLA.	Soro humano e canino.	A2-HIS.	77% (soro humano) 94% (soro canino).	100%.	Não foi observada reatividade cruzada significativa em soros de animais com outras doenças caninas e A2- HIS mostrou-se significativamente mais específico que o SLA no diagnóstico da infecção em cães.	No momento em que o estudo foi realizado, não.	Em humanos, foi detectada reatividade cruzada com A2-HIS em 0,5 e 10% dos soros de pacientes com tuberculose e hanseníase. Os achados sugerem que a proteína A2 é uma ferramenta potencial para o diagnóstico de LV no Novo Mundo, e será particularmente útil para o diagnóstico de cães. Como proteína recombinante, A2 poderia ser útil no desenvolvimento e aperfeiçoamento de outros formatos de testes sorológicos mais simples e mais rápidos.	Brasil.	CARVALHO <i>et al.</i> , 2002.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B10	Teste diagnóstico rápido com vareta: Utilização do antígeno rK39 em teste rápido com vareta para diagnóstico de LVH e LVC. Ferramentas utilizadas como controle e comparação: Teste de Imunofluorescência indireta (IFAT ou RIFI) e avaliação microscópica de medula óssea e aspirados de linfonodo. O estudo foi baseado em trabalhos anteriores utilizando rK39-ELISA, que se mostraram sensíveis e específicos com amostras da Turquia.	Soro humano e canino.	rK39.	100% em soro humano e canino.	100% em soro humano e canino.	O teste diagnóstico rápido com vareta utilizando o antígeno rK39 é um método simples, barato, conveniente e não invasivo para sorodiagnóstico de VL e mostrou-se um método adequado para sorodiagnóstico de LVH e LVC endêmicas na Turquia, com alta sensibilidade e especificidade.	Não.	O tamanho da amostra utilizada no estudo foi pequeno, que, de acordo com o trabalho, é devido à baixa endemicidade da LV doença na Turquia.	Turquia.	TOZ et al., 2004.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B11	ELISA indireto: Produção de uma proteína quimérica recombinante, através da união dos epítomos de <i>L. infantum</i> K9, K26 e K39sub por meio da técnica de PCR para o sorodiagnóstico de rotina em LVH e LVC. A construção sintética foi clonada em um vetor de expressão procariótica e a proteína recombinante foi expressa em <i>Escherichia coli</i> e purificada por etapas de dupla afinidade. Ferramenta utilizada como controle: IFAT.	Soro humano e canino.	Proteína quimérica K9-K39-K26.	82% (soro humano) 96% (soro canino).	99% em soro humano e canino.	Os resultados sugerem o uso potencial deste novo antígeno para sorodiagnóstico de rotina da LV em humanos e hospedeiros caninos. O soro dos pacientes com Doença de Chagas não reagiu com a proteína quimérica em questão no ELISA.	Não.	De acordo com o estudo, a estratégia simples empregada para a fusão de epítomos permitirá incorporar qualquer sequência que poderá estar disponível no futuro para aumentar a sensibilidade do teste diagnóstico para LV.	Itália.	BOARINO <i>et al.</i> , 2005.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B12	ELISA: 4 antígenos recombinantes previamente obtidos e 1 novo antígeno recombinante, codificados por 5 genes/ família de genes (cytoplasmic heat-shock protein 70, kinesin, polyubiquitin, e duas novas proteínas hipotéticas), promovendo uma fusão de polipeptídeos (rLci1A-NH6, rLci2B-NH6, rLci3A-NH6, rLci4A-NH6, rLci5A-I-NH6), foram caracterizados e suas reatividades foram testadas para diagnóstico de LVH e LVC.	Soro humano e canino.	rLci1A-NH6, rLci2B-NH6, rLci3A-NH6, rLci4A-NH6, rLci5A-I-NH6	LVH: 72,2% (rLci1A-NH6), 97,2% (rLci2B-NH6), 36,4% (rLci3A-NH6), 81,8% (rLci4A-NH6), 86,4% (rLci5A-I-NH6) LVC: 93% (rLci1A-NH6), 83,7% (rLci2B-NH6), 91,9% (rLci3A-NH6), 91,9% (rLci4A-NH6), 67,4% (rLci5A-I-NH6)	LVH: 93,8% (rLci1A-NH6), 97,3% (rLci2B-NH6), 96,5% (rLci3A-NH6), 93,9% (rLci4A-NH6), 90,4% (rLci5A-I-NH6) LVC: 76,1% (rLci1A-NH6), 84,8% (rLci2B-NH6), 95,7% (rLci3A-NH6), 100% (rLci4A-NH6), 94,9% (rLci5A-I-NH6)	Melhor antígeno recombinante para diagnóstico de LVH: rLci2B-NH6. Melhores antígenos recombinantes para diagnóstico de LVC: rLci3A-NH6 e rLci4A-NH6	Não.	Nenhum antígeno recombinante único foi suficiente para fazer o sorodiagnóstico de todos os casos de LVH ou LVC. As proteínas recombinantes avaliadas no estudo apresentaram diferentes capacidades de reagir com os anticorpos de humanos e cães infectados com LV. Além disso, sugeriu-se que a resposta imune em humanos e cães com LV é diferente, e essas diferenças devem ser levadas em conta no desenvolvimento de métodos de sorodiagnóstico. Alternativamente, plataformas específicas podem ser desenvolvidas para diferentes espécies hospedeiras.	Brasil.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B13	DAT: Preparar e avaliar um antígeno preservado em glicerol de uma cepa iraniana de <i>L. infantum</i> para uso em testes de aglutinação direta preservados em glicerol (GP-DAT) como alternativa aos testes de aglutinação direta liofilizados (FD-DAT) que usam antígeno liofilizado, para o sorodiagnóstico de LVH e LVC.	Soro humano e canino.	Antígeno preservado em glicerol de uma cepa iraniana de <i>L. infantum</i> .	75%.	100%.	O antígeno GP-DAT armazenado entre 22-37°C é altamente estável em temperaturas flutuantes de laboratório, fácil de transporte e pode ser usado para o sorodiagnóstico de LVH e LVC sem a necessidade de equipamentos para transporte ou manutenção de uma cadeia de frio.	Não.	O antígeno GP-DAT armazenado a 50°C foi considerado de qualidade inaceitável. Isto ocorreu provavelmente devido a altas temperaturas, que destruiu o antígeno, o que levou à diminuição da sensibilidade do teste durante os estágios iniciais do estudo.	Irã.	AKHOUNDI <i>et al.</i> , 2012.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B14	ELISA: Utilização de combinações de peptídeos sintéticos previstos por células B derivados de antígenos de A2, NH, LACK e K39 para o sorodiagnóstico de LVH e LVC. Os peptídeos foram testados individualmente e em conjunto, como componentes de um único sistema de detecção.	Soro humano e canino.	Peptídeos sintéticos previstos por células B derivados de antígenos de A2, NH, LACK e K39.	Peptídeos individualmente: 82-100%- (soro humano) 55- 100% (soro canino). Combinações de peptídeos: 71-100% (soro humano) 80-95% (soro canino)	Peptídeos individualmente: 81-94%- (soro humano) 92 100% (soro canino). Combinações de peptídeos: 93-100% (soro humano) 100% (soro canino)	Antígenos utilizados em conjunto apresentaram boa sensibilidade e especificidade, em comparação aos antígenos testados individualmente, para o diagnóstico de LVH e LVC.	Não.	Os peptídeos identificados podem ser muito interessantes para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos sensíveis, uma vez que não requerem instalações laboratoriais sofisticadas e são práticos e de fácil aplicação.	Brasil.	COSTA <i>et al.</i> , 2012.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B15	LAT (Teste de aglutinação em látex): Avaliação comparativa entre o uso do LAT utilizando a fração A2 da cepa iraniana de <i>L. Infantum</i> e o LAT que utiliza proteínas solúveis de promastigostas lisadas para o diagnóstico de LVH e LVC. Ferramenta utilizada como controle: teste de aglutinação direta (DAT).	Soro humano e canino.	Fração A2 da cepa iraniana de <i>L. Infantum</i> e proteínas solúveis de promastigostas lisadas.	LVH: • A2-LAT = 88,4% • Pro.-LAT = 88,4% LVC: • A2-LAT = 95% • Pro.-LAT = 96,8%	LVH: • A2-LAT = 93,5% • Pro.-LAT = 91,9% LVC: • A2-LAT = 100% • Pro.-LAT = 90,3%	Nesse estudo, a acurácia de A2-LAT e Pro.-LAT para a detecção de LV em soros humanos e caninos foram idênticos e ambos os antígenos podem ser usados em paralelo para rastrear LV em áreas endêmicas no Irã. Os resultados mostraram que A2-LAT teve uma taxa mais baixa de falsos positivos do que Pro-LAT para soros humanos e caninos. No entanto, a técnica de eletroeluição usada para concentração das amostras e o antígeno A2 recombinante são caros e exigem um alto nível de habilidade. LAT é um teste simples, fácil, barato e rápido para exames de triagem de rotina para LV em áreas endêmicas, e inúmeras amostras de soro podem ser facilmente rastreadas com uma combinação desses dois testes (LAT e DAT) em pouco tempo.	Não.	Reteste de amostras LAT negativas com DAT é desnecessário. Porém, amostras positivas para LAT devem ser submetidas a um DAT para confirmação. São recomendadas mais pesquisas para validar este teste em maiores populações em áreas endêmicas e não endêmicas para LV. O uso de outras concentrações e tamanhos de esferas de látex podem ser úteis para reduzir a taxa de reações falso-positivas.	Irã.	AKHOUNDI et al., 2013.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B16	ELISA: Avaliação do uso da peroxidoxina recombinante (rPeroxidoxin) de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> como potencial antígeno para o imunodiagnóstico de LVH, LT e LVC. O trabalho buscou identificar epítomos antigênicos polimórficos lineares de célula B presentes nessa proteína que não são reconhecidos por indivíduos que possuem doença de Chagas. Ferramentas utilizadas como controle: antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> (SLbA) e kit de imunoensaio EIE-LVC (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos, Brasil), para soro de cães.	Soro humano e canino.	rPeroxidoxin.	LVH: 98,18% LT: 98,46% LVC: 95,79%	LVH: 95,71% LT: 100% LVC: 100%	O estudo demonstrou que a rPeroxidoxin é uma das moléculas alvo que podem ser usadas como um potencial antígeno para imunodiagnóstico de diferentes espécies de <i>Leishmania</i>, apresentando alta sensibilidade e especificidade. O ELISA de rPeroxidoxina também mostrou uma boa capacidade de discriminar entre animais vacinados e animais infectados. Epítomos antigênicos polimórficos lineares de célula B identificaos no estudo que não são reconhecidos por indivíduos com doença de Chagas: VRDPAPQFS e TPGKPTLDT.	Não.	Outros estudos prospectivos usando grandes coortes de indivíduos negativos e positivos de áreas endêmicas são necessárias para caracterizar melhor esta abordagem como um possível marcador para diagnosticar LVH, LT e LVC e para acompanhamento da cura pós-terapêutica de LVH ou LT.	Brasil.	MENEZES-SOUZA <i>et al.</i> , 2014a.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B17	ELISA: Utilização da versão recombinante (rHSP83.1) da proteína HSP83.1 (heat shock protein 83.1) e de epítomos específicos de célula B (peptídeos 1, 2 e 3), derivados da sequência da rHSP83.1 para diagnóstico de LT humana e LVH e LVC. Ferramentas utilizadas como controle: antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> (SLbA) e kit EIE-LVC (para soro canino).	Soro humano e canino.	rHSP83.1 e epítomos específicos de célula B, derivados da sequência de rHSP83.1.	LVH: 78,18% (rHSP83.1), 83,64% (peptídeo 1), 85,45% (peptídeo 2), 87,27% (peptídeo 3). LVC: 90% (rHSP83.1), 96,67% (peptídeo 1), 63,33% (peptídeo 2), 93,33% (peptídeo 3).	LVH: 97,14% (rHSP83.1), 95,71% (peptídeo 1), 92,86% (peptídeo 2), 94,29% (peptídeo 3). LVC: 84,44% (rHSP83.1), 93,33% (peptídeo 1), 80% (peptídeo 2), 97,78% (peptídeo 3).	O presente estudo demonstra que rHSP83.1 e os epítomos mapeados em sua sequência podem estar entre as moléculas alvo que podem ser usadas em um teste de imunodiagnóstico, sendo confirmado pela alta sensibilidade para diagnosticar infecções por LV, a alta especificidade para discriminar entre outras infecções humanas e caninas, e o alto grau de concordância com as técnicas parasitológicas para o diagnóstico da leishmaniose.	Não.	São necessários mais estudos prospectivos utilizando coortes maiores de indivíduos positivos e negativos oriundos de áreas endêmicas para leishmaniose, para caracterizar melhor essa abordagem como um possível marcador no diagnóstico de LT, LVH e LVC e para monitoramento pós-terapêutico dessas doenças.	Brasil.	MENEZES-SOUZA <i>et al.</i> , 2014b.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B18	ELISA: Utilização da versão recombinante (rCatL) da proteína <i>L. braziliensis</i> CatL para avaliar sua eficácia no diagnóstico de LVH, LT e LVC. Além disso, um epítipo específico de célula B (Peptide-1), derivado da sequência de CatL foi sintetizado, avaliado como marcador diagnóstico e comparado com a proteína recombinante. Ferramentas utilizadas como controle: antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> (SLbA) e EIE-LVC Kit para soro canino.	Soro humano e canino.	rCatL e peptídeo sintético de célula B (Peptide-1), derivado da sequência de CatL.	LVH: rCatL: 74,55% Peptídeo: 94,55% LT: rCatL: 96,92% Peptídeo: 96,92% LVC: rCatL: 80% Peptídeo: 80%	LVH: rCatL: 91,43% Peptídeo: 97,14% LT: rCatL: 95,71% Peptídeo: 91,43% LVC: rCatL: 95,56% Peptídeo: 88,89%	O peptídeo sintético obteve melhores valores de performance para diagnóstico de LHV. A proteína recombinante mostrou ter melhor valor diagnóstico para LT e LVC. Para LVC, rCatL e o peptídeo sintético tiveram maior especificidade do que o EIC-LVC, enquanto o kit comercial apresentou a maior sensibilidade. O peptídeo sintético mostrou alta sensibilidade na identificação de indivíduos infectados com <i>L. infantum</i> e alta especificidade na discriminação de indivíduos infectados com <i>T. cruzi</i> . Além disso, foi observada uma baixa reatividade cruzada com as proteínas do hospedeiro, ajudando na habilidade de discriminar indivíduos infectados de controles.	Não.	Tanto a proteína recombinante quanto o peptídeo sintético apresentaram maior especificidade e sensibilidade do que as preparações brutas comumente usadas para outros antígenos, e assim, eles são alvos valiosos para compor um painel de antígenos que poderia melhorar significativamente diagnóstico de leishmaniose.	Brasil.	MENEZES-SOUZA <i>et al.</i> , 2015.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B19	ELISA: Utilização da versão recombinante (rSGT) da proteína contendo repetições de tetratricopeptídeo ricos em glutamina (SGT) para avaliar sua eficácia no diagnóstico de LVH e LVC. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de Leishmania (SLA). A proteína também foi usada para estimular PBMCs coletadas de pacientes tratados e não tratados com LV, para avaliar a resposta linfoproliferativa específica e a produção de citocinas induzidas nestas células imunes. O papel antigênico de SGT também foi avaliado, empregando painéis sorológicos caninos e humanos, visando identificar seu potencial como novo marcador sorológico da LV.	Soro humano e canino.	rSGT.	100% (soro humano) 100% (soro canino).	100% (soro humano) 100% (soro canino).	A proteína apresentou valores máximos de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LV. Não foi encontrada reatividade cruzada com soros de humanos ou cães que tiveram outras doenças (Paracoccidiodomicose, Hanseníase, aspergilose e doença de Chagas, para humanos e animais saudáveis vacinados com Leish-Tec®, <i>Ehrlichia canis</i> ou <i>Trypanosoma cruzi</i> , para cães. A imunidade polarizada em Th1 e a alta resposta linfoproliferativa encontrada em PBMCs de pacientes com LV usando rSGT como estímulo, sugerem uma aplicação desta proteína contra a doença humana.	Não.	Devido ao baixo número de amostras testadas, bem como pela diversidade limitada de soros caninos e humanos, ainda é prematuro concluir que rSGT é um antígeno apropriado para ser usado em testes sorológicos para diagnosticar LVH e LVC. Estudos adicionais usando um painel sorológico maior são necessários para validar a aplicação sorod diagnóstica desta proteína recombinante na LV.	Brasil.	DIAS <i>et al.</i> , 2017.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B20	ELISA: Marcados com poli-histidina, polipeptídeos(Lci6, Lci7,Lci8, Lci9, Lci10, Lci11, Lci12) foram gerados a partir de seis genes, para serem avaliados como antígenos para o diagnóstico de LVH e LVC. Cada antígeno foi avaliado separadamente e também como sendo componentes de um único sistema de detecção. Antígeno utilizado como controle: LAg (<i>L. infantum</i> lysate).	Soro humano e canino.	Lci6, Lci7,Lci8, Lci9, Lci10, Lci11, Lci12	26 -52% (soro humano) 49-91% (soro canino)	98-100% (soro humano) 100% (soro canino)	O Mix de proteínas como um sistema único para detecção de LV aumenta substancialmente a sensibilidade de diagnóstico de LVH e com uma menor diminuição no desempenho para diagnóstico de LVC, sem resultados falsos positivos, quando comparados com o controle.	Não.	Os antígenos utilizados obtiveram baixa sensibilidade de detecção em soro humano e apenas um polipeptídeo foi útil para o diagnóstico de LVC. Um mix contendo 3 proteínas (que inclui proteínas avaliadas pelo grupo em um estudo anterior) apresentou sensibilidade maior para detecção de LVH e LVC (84% em soro humano e 88% em soro canino). Com melhorias, pode ser validado o uso de várias proteínas, incluindo as que foram utilizadas nesse estudo, como componentes de um único sistema de detecção de LVH e LVC.	Brasil.	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2017.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B21	ELISA e Immunoblotting: Utilização da versão recombinante (rLiHyS) da proteína LiHyS para diagnóstico de LVH e LVC. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de Leishmania (SLA). Também foi avaliado a imunogenicidade, através de um índice de linfoproliferação em PBMCs purificadas de indivíduos saudáveis e pacientes com LV, e eficácia protetora (testes realizado em ratos) da proteína contra infecção por <i>L. infantum</i>.	Soro humano e canino.	rLiHyS.	O artigo não traz essa informação.	O artigo não traz essa informação.	Tanto os humanos como os cães infectados com <i>L. infantum</i> foram altamente reativos contra rLiHyS, enquanto os piores resultados de sensibilidade e especificidade foram encontrados quando utilizou-se rA2 ou SLA. Com relação à imunogenicidade, observou-se altos valores proliferativos quando foi realizada incubação com LiHyS.	Não.	Não foi coletado soro de humanos vivendo em áreas endêmicas para a doença e de cães saudáveis. Os resultados sugerem que o antígeno pode ser usado para o diagnóstico da doença e levantam a possibilidade de avaliar rLiHyS como um imunógeno contra a doença humana.	Brasil.	DIAS <i>et al.</i> , 2018a.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B22	ELISA: Utilização da versão recombinante (rLiHyS) da proteína LiHyS para diagnóstico de Leishmaniose Visceral e Tegumentar humana e canina. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de Leishmania (SLA).	Soro humano e canino.	rLiHyS	100%	99% (para cães); 100% (para humanos)	Esse antígeno apresenta um alto grau de conservação em sua sequência de aminoácidos entre as espécies <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , além de que seus principais epítomos de células B estão conservados entre essas espécies. Assim, o antígeno apresentou boa sensibilidade e especificidade para identificar cães assintomáticos e sintomáticos infectados e humanos infectados, quando comparado com os antígenos utilizados como controle. rLiHys também pode ser utilizado como estratégia adicional para avaliar o prognóstico da doença após o tratamento em humanos, quando utilizado como antígeno diagnóstico em ensaios ELISA.	Não.	Devido ao seu alto grau de conservação na sequência de aminoácido entre as espécies descritas, a utilização dessa molécula para o diagnóstico de Leishmaniose pode ser investigada não só pela técnica de ELISA, como também por outras metodologias. Além disso, são necessários mais estudos comparando a reatividade do antígeno em amostras de soro de pacientes humanos tratados e não tratados, para que seja utilizado como biomarcador para o prognóstico dessa doença.	Brasil.	DIAS <i>et al.</i> , 2018b.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B23	ELISA: Utilização da versão recombinante (rKDDR) baseado na porção repetitiva degenerada derivada de Kinesina de <i>L.infantum</i> (KDDR), para uso em testes de sorodiagnóstico de LVH e LVC. Ferramentas utilizadas como controle: antígeno rK39 (para soro humano), antígeno rK39 e o kit EIE-LVC (para soro canino).	Soro humano e canino.	rKDDR	92,86% (soro humano) 88,54% (soro canino).	100% (soro humano) 97,3% (soro canino).	rKDDR mostrou bom potencial antigênico, apresentando grande densidade de epítomos de célula B previstos em sua repetição, sugerindo que esse antígeno pode ser utilizado amplamente em várias regiões. O estudo mostrou que rKDDR pode ser utilizado para o diagnóstico preciso de LVH e LVC, com melhores resultados em relação aos controles.	Não.	Em um próximo estudo, pretende-se desenvolver a metodologia de um teste imunocromatográfico utilizando a rKDDR.	Brasil.	DHOM-LEMOs <i>et al.</i> , 2019.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B24	ICT (Teste imunocromatográfico): avaliar o desempenho diagnóstico de quatro ICTs para LV em amostras de soro que foram coletadas de humanos e cães em áreas endêmicas da Colômbia. Foi avaliado o desempenho de dois testes em humanos (Teste rápido Ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo e Kalazar Detect™) e dois em cães (Teste rápido Kalazar Detect™ e Teste rápido DPP®). Todos os testes utilizaram o antígeno rK39.	Soro humano e canino.	rK39.	LVH: Ad-bio: 91,5% Kalazar Detect: 91,5% LVC: Kalazar Detect: 82,9% DPP: 85,7%	LVH: Ad-bio: 93,2% Kalazar Detect: 89,2% LVC: Kalazar Detect: 92,6% DPP: 79,6%	Em humanos, o este rápido Ad-bio Leishmania IgG/IgM Combo demonstrou um desempenho melhor em relação ao Kalazar Detect™. Em cães, o teste rápido DPP® apresentou melhor sensibilidade em relação ao teste rápido Kalazar Detect™. Entretanto, este último se destacou em outros parâmetros.	Sim.	Embora os testes avaliados tenham apresentado bom desempenho, nenhuma decisão clínica deve ser tomada com base apenas em seus resultados, pois é necessário avaliar tanto aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes antes da implementação da terapia.	Colômbia.	Herrera <i>et al.</i> , 2019.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B25	ELISA e ICT: Avaliação de três proteínas recombinantes rC9, rA2 e do novo antígeno rFc como antígenos diagnósticos para LVH e LVC, utilizando ELISA e ICT.	Soro humano e canino.	rC9, rA2 e rFc.	ELISA: LVH: rFc: 84,2% rC9: 87,2% rA2: 91,5% LVC: rFc: 93,3% rC9: 95,7% rA2: 93,6% ICT: LVH: rFc: 88,6% rC9: 78,6% rA2: 92,3% LVC: rFc: 88,6% rC9: 86,5% rA2: 87%	ELISA: LVH: rFc: 72% rC9: 67% rA2: 87% LVC: rFc: 82,3% rC9: 87,5% rA2: 81,2% ICT: LVH: rFc: 64,1% rC9: 84% rA2: 88% LVC: rFc: 84% rC9: 92% rA2: 100%	O estudo demonstrou que os antígenos rA2, rC9 e rFc são antígenos promissores para diagnóstico de LV, independentemente do formato do teste. ELISA, mesmo que tenha ocorrido uma baixa reatividade cruzada com soro de pessoas com doença de Chagas. rA2 exibiu a melhor performance para identificação de LVH, enquanto rFc e rC9 exibiram melhores performances para diagnóstico de LVC. Embora o rA2 seja um antígeno candidato promissor para triagem ou testes confirmatórios, também tem sido associado à respostas de anticorpos induzidas pela vacina Leish-Tec®.	Não.	Como limitações, os ensaios ELISA e ICT foram desenvolvidos em um ambiente de laboratório de pesquisa e testados em uma pequena escala. Além disso, a procedência predominante de cães dos Centros de Controle de Zoonoses e a falta de resultados de exames parasitológicos para parte das amostras que constituíram o painel de soros humanos. Os antígenos testados neste trabalho podem ser adicionados a proteínas quiméricas para melhorar o desempenho. Testes com painéis maiores e mais bem caracterizados de amostras de soros caninos e humanos podem aumenatar a sensibilidade.	Brasil.	SANTOS <i>et al.</i> , 2019a.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B26	ELISA: Clonagem, expressão, purificação e testagem como marcador diagnóstico em ensaios ELISA da versão recombinante (rEF1b) da Proteína beta do fator-1 de alongamento eucariótico de Leishmania (EF1b), para diagnosticar LV e LT humana e canina. Também foi realizado o acompanhamento sorológico antes e depois do tratamento de pacientes humanos.	Soro humano e canino.	rEF1b.	100% .	100% .	Boa sensibilidade e especificidade para diagnosticar LV e LT humana, bem como LV canina sintomática e assintomática. Além disso, foi observada baixa reatividade cruzada quando testaram soro de indivíduos saudáveis ou com doenças relacionadas à leishmaniose. O estudo sugeriu ainda que a proteína recombinante poderia ser avaliada como marcador prognóstico para a Leishmaniose humana.	Não.	Tamanho da amostra reduzido, devido à ausência de maior painel sorológico composto por amostras humanas e caninas, como amostras com doenças relacionadas à ocorrência de reações cruzadas com LV e LT. Dessa forma, apesar de ainda ser necessário realizar estudos adicionais sobre o uso dessa proteína, o estudo traz que os dados preliminares mostrados sugerem que rEF1b pode ser considerado como antígeno candidato para o sorodiagnóstico de LV e LT humana e canina.	Brasil.	SANTOS <i>et al.</i> , 2019b.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B27	ELISA: Utilização da versão recombinante (rAmastin) da proteína Amastina de <i>Leishmania</i> (nº de identificação: XP_003392700.1) para avaliar sua eficácia no diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Além disso, um epítipo específico de célula B, derivado da sequência da Amastina foi sintetizado e avaliado como marcador diagnóstico. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> (SLA).	Soro humano e canino.	rAmastin e epítipo específico de célula B, derivado da sequência da Amastina.	LVH x pacientes saudáveis e LVH x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rAmastin), 100% (peptídeo). LVC x cães saudáveis e LVC x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rAmastin), 98% (peptídeo) .	LVH x pacientes saudáveis e LVH x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rAmastin), 100% (peptídeo). LVC x cães saudáveis e LVC x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rAmastin), 100% (peptídeo) .	No trabalho em questão, rAmastin mostrou boa sensibilidade e especificidade para o sorodiagnóstico de LVH e LVC. O peptídeo sintético mostrou alta sensibilidade e especificidade para detectar os positivos, mas, não, para negativos e com possibilidade de reação cruzada, mostrando sua viabilidade em relação à rAmastin. No estudo, a proteína foi testada usando um coorte de casos brasileiros de LV, cujos resultados corroboraram com os obtidos em um estudo anterior usando uma coorte baseada em soro de pacientes iranianos. Os resultados do estudo sugerem a ocorrência de uma ação imunogênica baseada no perfil Th1 quando células derivadas de pacientes com LV e indivíduos controle foram estimulados com a proteína Amastina, contribuindo para um possível marcador imunológico para a doença humana.	Não.	A ausência de um painel sorológico superior, bem como outras plataformas de diagnóstico para testar a proteína recombinante e o peptídeo sintético, podem ser considerados limitações do estudo. Entretanto, os resultados apresentados pelo estudo sugerem que a Amastina pode ser considerada como candidata para o diagnóstico de LVH e LVC, e sugerem um papel imunogênico dessa proteína quando foi usada para estimular células imunes derivadas de pacientes com LV e indivíduos saudáveis.	Brasil.	VALE <i>et al.</i> , 2019.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B28	ELISA: Clonagem, expressão e avaliação de um novo antígeno recombinante de rk39 de uma cepa iraniana de <i>Leishmania infantum</i> para diagnóstico de LVH e LVC, para desenvolver um teste diagnóstico local e para determinar a adequação deste antígeno no ELISA. Ferramentas utilizadas como controle: Antígeno bruto de <i>Leishmania infantum</i> e DAT (teste de aglutinação direta).	Soro humano e canino.	Novo antígeno recombinante de rk39 de uma cepa iraniana de <i>Leishmania infantum</i> .	85,7% (soro humano) 96,6% (soro canino).	86% (soro humano) 94,4% (soro canino).	O novo antígeno recombinante rk39 de uma cepa iraniana de <i>L. infantum</i> parece que pode ser usado para diagnóstico de LV em humanos e cães. Não foi observada reatividade cruzada para rK39-ELISA em ambos os hospedeiros.	Não.	Futuramente será projetado um estudo duplo cego para determinar a validade final do antígeno nas áreas endêmicas de LV no Irã, onde <i>L. infantum</i> é o principal agente causador desta doença.	Irã.	HOSSEINI FARASH <i>et al.</i> , 2020.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B29	ELISA: Utilização da versão recombinante (rLiHyC) da proteína LiHyC para avaliar sua eficácia no diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Além disso, um epítipo específico de célula B, derivado da sequência de LiHyC (PeptC) foi sintetizado e avaliado como marcador diagnóstico. Ferramentas utilizadas como controle: testes imunocromatográficos DPP (antígeno K26/K39) e IT-LEISH (antígeno K39). Também foi realizado o acompanhamento sorológico antes e depois do tratamento de pacientes humanos.	Soro humano e canino.	rLiHyC e epítipo específico de célula B, derivado da sequência de LiHyC (PeptC) .	100% em soro humano e canino.	100% em soro humano e canino.	rLiHyC e PeptC apresentaram alta sensibilidade e especificidade para a detecção de LVH e LVC. Além disso, não houve reatividade cruzada quando esses antígenos foram testados em soros de pacientes com doença de Chagas, Hanseníase, Malária, Tuberculose, bem como erliquiose e babesiose, no caso de cães, demonstrando uma performance satisfatória desses antígenos para o diagnóstico de LV.	Não.	Houve ausência de amostras de animais apresentando infecção subclínica e de pacientes com resistência à infecção e de avaliação por um período maior de tempo após o tratamento, sendo considerados limitações. Dessa forma, apesar da eficácia dos antígenos estudados, eles devem ser validados nessas condições, para que possam melhorar o diagnóstico de LV, bem como serem utilizados como biomarcadores pós-terapêuticos. Apesar de que os dois antígenos apresentaram alta sensibilidade e especificidade, os peptídeos sintéticos, comparados às proteínas recombinantes, são mais simples e baratos de se produzir. Assim, o PeptC pode ser considerado para estudos futuros para ser incorporado em outras plataformas de imunodiagnósticos.	Brasil.	MACHADO <i>et al.</i> , 2020a.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B30	ELISA: Utilização da versão recombinante (rLiHyG) da proteína LiHyG (XP_001467126.1) para diagnóstico de LVH e LVC. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> (SLA). Também foi avaliado o papel prognóstico de rLiHyG na LVH, com acompanhamento sorológico pós-terapêutico.	Soro humano e canino.	rLiHyG.	100% em soro humano e canino.	100% em soro humano e canino.	rLiHyG apresentou alta sensibilidade e especificidade para a detecção de LVH e LVC. Além disso, não houve reatividade cruzada quando esse antígeno foi testado em soros de pacientes com doença de Chagas, Hanseníase, Malária, Tuberculose, HIV, bem como no soro de cães experimentalmente infectado com <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia canis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> , demonstrando uma performance satisfatória desses antígenos para o diagnóstico de LV. No estudo, o antígeno se mostrou eficaz em diferenciar pacientes com doença ativa em relação ao tratados, com redução significativa de anticorpos anti-rLiHyG após o tratamento.	Não.	O perfil do anticorpo anti-rLiHyG mostrou uma predominância do isotipo IgG2, sugerindo a hipótese de que rLiHyG pode induzir uma resposta imune com perfil Th1 em pacientes tratados, e pode ser uma candidata para vacina contra LV, porém, ainda são necessários mais estudos. Como limitações, foi utilizado um painel sorológico limitado de amostras humanas e caninas, número baixo de amostras de soro de pacientes tratados, além de ausência de amostras de pacientes apresentando infecção subclínica, bem como de amostras humanas e caninas resistentes à infecção. Entretanto, os dados apresentados devem ser tomados como uma prova de conceito sobre o uso de rLiHyG como antígeno diagnóstico para LVH e LVC e como possível marcador prognóstico para a doença humana.	Brasil.	MACHADO <i>et al.</i> , 2020b.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B31	ELISA: Utilização da versão recombinante (rPK) da proteína <i>Leishmania infantum</i> pyridoxal kinase (PK) para avaliar sua eficácia no diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Além disso, um epítipo específico de célula B, derivado da sequência de PK foi sintetizado e avaliado como marcador diagnóstico. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> (SLA). Também foi avaliado os níveis específicos de anticorpo IgG antes e após o tratamento da Leishmaniose visceral em humanos.	Soro humano e canino.	rPK e peptídeo específico de célula B, derivado da sequência de PK.	LVH x pacientes saudáveis e LVH x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rPK), 100% (peptídeo). LVC x cães saudáveis e LVC x doenças que podem causar reação cruzada: 100% (rPK), 100% (peptídeo) .	LVH x pacientes saudáveis: 96% (rPK), 96% (peptídeo). LVH x doenças que podem causar reação cruzada: 99% (rPK), 98,8% (peptídeo) . LVC x cães saudáveis: 98,2% (rPK), 96,4% (peptídeo). LVC x doenças que podem causar reação cruzada: 97,8% (rPK), 97,8% (peptídeo) .	O trabalho apresentou boa sensibilidade e especificidade para identificar humanos e cães assintomáticos e sintomáticos infectados, quando comparado com os antígenos utilizados como controle. Além disso, também foi utilizado um peptídeo sintético, que comparados às proteínas recombinantes, são mais simples e baratos de se produzir. O estudo demonstrou uma reatividade cruzada mínima quando foi utilizado soro de pacientes com doenças relacionadas à Leishmaniose Visceral, como doença de Chagas e pacientes saudáveis moradores de áreas endêmicas, no caso de humanos, bem como soro de cães imunizados, e portadores de doenças como babesiose e erliquiose. Os resultados mostraram que os antígenos podem ser candidatos para avaliar o prognóstico da doença após o tratamento.	Não.	O painel sorológico utilizado não contém amostras de humanos e cães infectados com outras espécies de <i>Leishmania</i> , além da <i>Leishmania infantum</i> , o que o estudo considera como limitação. Além disso, houve uma reatividade cruzada inesperada e inexplicada em cães saudáveis moradores de áreas endêmicas, sendo necessário haver estudos adicionais empregando um painel sorológico maior com esses cães, a fim de responder essa questão. O estudo traz que os antígenos propostos devem ser tomados como uma prova de conceito da capacidade que eles têm de serem avaliados como marcadores diagnósticos para LV humana e canina, bem como uma sugestão para avaliar esses antígenos como marcadores prognósticos para o tratamento da LV.	Brasil.	OLIVEIRA-DA-SILVA <i>et al.</i> , 2020a.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B32	ELISA: Utilização da versão recombinante (rLiHyJ) da proteína LiHyJ e de epítipo específico de célula B (PeptJ), derivado da sequência da LiHyJ para diagnóstico de LVH e LVC. Antígenos utilizados como controle: proteína recombinante A2 (rA2) e o antígeno solúvel de Leishmania (SLA). Também foi avaliado o papel prognóstico de LiHyG na LVH, com acompanhamento sorológico pós-terapêutico. A imunogenicidade <i>in vitro</i> da proteína recombinante também foi avaliada.	Soro humano e canino.	rLiHyJ e peptídeo sintético de célula B (PeptJ), derivado da sequência de LiHyJ.	LVH: rLiHyJ: 100% PeptJ: 100% LVC: rLiHyJ: 100% PeptJ: 90%	LVH: rLiHyJ: 99,1% PeptJ: 99,1% LVC: rLiHyJ: 99% PeptJ: 99%	As amostras com soro de pacientes com LV foram capazes de identificar os antígenos com alta sensibilidade e especificidade, enquanto amostras com reação cruzada não foram capazes de identificar os antígenos. Nas amostras com soro canino, os resultados mostraram que rLiHyJ foi recinhecida por todas as amostras assintomáticas e sintomáticas, enquanto PeptJ foi recinhecido por todos os sintomáticos e pela maioria dos cães assintomáticos. A reatividade humoral específica de rLiHyJ foi avaliada antes e após o tratamento e houve uma redução significativa do nível de anticorpos após o tratamento (principalmente IgG2). Entretanto, um perfil humoral similar foi encontrado quando SLA foi utilizado como antígeno (principalmente IgG1). A linfoproliferação específica de rLiHyJ foi avaliada em culturas de PBMC de pacientes com LV e indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram uma alta resposta proliferativa.	Não.	Como limitações do estudo, utilizou-se um método controlado e limitado painel sorológico canino e humano. Além disso, não foram encontradas amostras de humanos apresentando infecção subclínica, bem como de cães e humanos resistentes à infecção ou apresentando outras doenças de reação cruzada. Embora preliminares, pode-se especular que a reatividade humoral específica de rLiHyJ poderia ser aplicada no monitoramento para o controle e cura da doença, como marcador prognóstico da LV, e que resultados sugerem que rLiHyJ também pode ser avaliada em estudos futuros como um imunógeno contra a infecção por <i>L. infantum</i>. Os dados apresentados podem ser considerados como uma prova de conceito de aplicabilidade de LiHyJ, utilizada como antígeno recombinante ou peptídeo sintético, para novos estudos visando avaliar sua ação profilática, eficácia diagnóstica e/ou prognóstica na LV.	Brasil.	OLIVEIRA-DA-SILVA <i>et al.</i> , 2020b.

Tabela 2. Artigos contendo métodos diagnósticos sorológicos utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
B33	ELISA: descrição de novas proteínas quiméricas (D1, D2, D3, Q1SX, Q2SX, Q4SX, Q5), baseada em antígenos previamente descritos para diagnóstico sorológico de LV em humanos e cães.	Soro humano e canino.	Lci2 (para diagnóstico humano), Lci3 e Lci12 (para diagnóstico canino).	82% (soro humano) 100% (soro canino).	100% em soro humano e canino.	Disponibilidade de um único teste rápido e de baixo custo para detecção das formas humanas e caninas de LV.	Não.	O estudo ainda necessita de realização de validações posteriores em testes diagnósticos, utilizando principalmente a proteína Q5, empregando tanto o ELISA, como plataforma de teste rápido.	Brasil.	SANTOS <i>et al.</i> , 2020

Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
C34	PCR: Utilização do PCR, empregando os primers sense e uma mistura 1:1 de primers antisense, para o diagnóstico de LVH, que reçoem à origem de replicação de ambas as fitas da molécula do minicírculo de kDNA do parasita e amplificam uma região conservada de 120 pb. Ferramentas utilizadas como controle: aspirado de medula óssea microscopia corada com Giemsa e IFAT.	Sangue periférico humano.	Primers sense e uma mistura 1:1 de primers antisense que amplificam uma região de kDNA.	91%.	100%.	Os resultados mostraram uma alta sensibilidade e especificidade. Por se um procedimento não invasivo, e sem perder a sensibilidade e especificidade, pode-se dizer que a PCR é uma técnica eficiente para centros de saúde.	Não.	Em 5 amostras de sangue de casos confirmados de LV nenhum DNA foi detectado. Isso pode ser confirmado pelas limitações operacionais do ensaio e pelo tempo de armazenamento e condição das amostras. Devido à alta eficácia dos ensaios de PCR, seria interessante padronizá-los para avaliar sua importância no rotina atuais de diagnóstico de LV.	Brasil.	DISCH <i>et al.</i> , 2003.

Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
C35	PCR: Utilização do PCR, empregando os primers RV1/RV2, para o diagnóstico de LVH. O DNA de cinetoplasto (kDNA) foi escolhido como alvo molecular. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em Gel de agarose a 1,5% e uma banda de 145 pares de bases (pb) de kDNA que pertence a <i>Leishmania</i> foi detectado por ultravioleta transiluminação após coloração com brometo de etídio. Dez promastigotas do padrão <i>L. infantum</i> foram adicionados a urina de indivíduos saudáveis e usados como controle positivo.	Amostras humanas de urina.	Primers RV1 e RV2, que têm como alvo kDNA.	96,8%.	100%.	O estudo mostrou alta sensibilidade e especificidade para a detecção de LVH. Todas as amostras de pacientes saudáveis ou indivíduos com outras doenças (Leishmaniose cutânea, Brucelose, Malária e Hidatidose) foram negativas, não havendo reação cruzada.	Não.	Apesar da alta sensibilidade e especificidade, o sistema deve ser verificado em uma condição de campo maior com uma amostra populacional relativamente grande. O uso de amostra de urina para o diagnóstico de LV em pacientes imunocompetentes foi aplicado neste estudo pela primeira vez, e devido à sua alta sensibilidade e especificidade e, ainda, simplicidade, pode servir como uma ferramenta valiosa no diagnóstico de LV. Este teste também demonstrou a circulação de parasitas no trato urinário.	Irã.	MOTAZEDIAN <i>et al.</i> , 2008.

Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
C36	PCR em tempo real e PCR: Avaliação do PCR, empregando os primers RV1/RV2, e do PCR em tempo real(qPCR), utilizando os mesmos primers, como ferramentas para o diagnóstico de LVH. O DNA de cinetoplasto (kDNA) foi escolhido como alvo molecular. Em ambos os métodos moleculares foram gerados produtos de aproximadamente 145 pares de base (pb) e as reações foram padronizadas usando um controle de DNA: <i>Leishmania</i> (Leishmania) chagasi MHOM/BR/74/PP/75. Ferramenta utilizada como controle: aspirado de medula óssea.	Sangue periférico humano.	Primers RV1 e RV2, que têm como alvo kDNA.	qPCR: 91,3% PCR: 97,78%	qPCR: 29,6% PCR: 61,82%	Ambos os métodos apresentaram uma alta sensibilidade. A baixa especificidade encontrada neste estudo pode ser explicada pelo fato de que amostras negativas por observação direta foram positivas pela qPCR, demonstrando a maior sensibilidade do método qPCR e indicando que sua especificidade pode ter sido subestimada. Os primers RV1/RV2 proporcionaram maior sensibilidade e maiores taxas de resultados positivos do que o uso de esfregaço de aspirado de medula óssea para detecção de amastigotas de <i>Leishmania</i>.	Não.	Os primers RV1/RV2 permitem a detecção de menos de um parasita por amostra, mas não amplificam <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>, os agentes causadores de vários casos de leishmaniose no Brasil em geral. Dentre os métodos disponíveis, a PCR em tempo real é particularmente vantajosa, dada a sua eficácia para amostras contendo um pequeno número de parasitas e nos casos em que o diagnóstico diferencial pode ser crucial, tendo em vista a ampla gama de manifestações clínicas.	Brasil.	DA COSTA LIMA <i>et al.</i> , 2013.

Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
C37	qPCR: Utilização do PCR quantitativo em tempo real para detecção de DNA de cinetoplasto de <i>L. infantum</i> (kDNA), como ferramenta diagnóstica para LVH. Primers utilizados: Linf.1-23F e Linf.1-154R. O protocolo de extração selecionado foi empregado para extrair o DNA (cepa de referência de <i>L. infantum</i> MHOM/BR/1974/PP75). Ferramentas utilizadas como controle: Teste imunocromatográfico utilizando antígeno rK39, teste molecular empregando qPCR em amostras de sangue humano. Avaliou-se a utilização de quatro protocolos para a extração do DNA da urina.	Amostras humanas de urina.	Primers Linf.1-23F e Linf.1-154R, que têm como alvo kDNA.	96,08%.	Não calculado.	O estudo mostrou resultados promissores, incluindo um bom valor preditivo negativo em amostras de pacientes suspeitos não tratados. A detecção de DNA de <i>Leishmania</i> na urina por qPCR também foi possível em indivíduos com ou sem insuficiência renal sugestiva. A aplicação da qPCR usando urina como amostra pode atuar como um complemento diagnóstico confortável, prático e rápido em relação às técnicas convencionais de rotina e suas limitações. Após uma análise multifatorial que incluiu também laboriosidade, tempo de processamento e custo, optou-se pelo protocolo II (QIAamp® DNA Mini Kit) para otimização do ensaio qPCR para urina.	Não.	Depleção rápida do DNA do parasita na urina após o tratamento (a partir de uma dose de antimonio de meglumina) foi sugerido por resultados negativos de qPCR, indicando-o como uma possível amostra alternativa para acompanhar a eficácia da abordagem terapêutica, tornando este método uma abordagem importante para investigar a progressão da doença. O estudo busca trazer um aprimoramento para o diagnóstico molecular da LV, refletindo, assim, em benefícios para os profissionais de saúde e principalmente para os pacientes.	Brasil.	PESSOA-E-SILVA <i>et al.</i> , 2016.

Tabela 3. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando apenas amostras humanas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
C38	Immunoblotting: Utilização de Immunoblotting (Western blot) para diagnóstico de LVH e Leishmaniose cutânea (LC) e comparação com métodos moleculares de rotina. Ferramenta utilizada como controle: PCR.	Amostras humanas de urina e soro.	Proteínas específicas para cada espécie de <i>Leishmania</i> ; Extrato bruto de <i>L. infantum</i> .	Urina: 83,7% LVH: 92,8% LC: 78,2% Soro: 97,2% LVH: 100% LC: 95,6%	Não calculado.	Pela possibilidade de visualizar o antígeno alvo em pacientes que sofrem de leishmaniose, esta metodologia permite identificar biomarcadores específicos, indicativos da espécie infectante de <i>Leishmania</i> . O antígeno padrão de reconhecimento por anticorpo presente no soro ou urina dos pacientes apresentaram algumas homologias, mas alguns antígenos são reconhecidos apenas por anticorpos liberados na urina.	Não.	Houve reatividade cruzada do antígeno de <i>L. infantum</i> , especificamente com o anticorpo encontrado nas amostras de urina de LC e pacientes com LHV. Assim, esse achado requer mais estudos com maior número de amostras. O método oferece uma potencial oportunidade para desenvolver uma nova ferramenta de diagnóstico não invasiva e específica para cada espécie.	França.	MIRZAEI <i>et al.</i> , 2018.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D39	PCR: Utilização de PCR para identificação de <i>Leishmania donovani</i> na LVH e LVC, através de amplificação de um fragmento presente nos minicírculos de kDNA. Primers utilizados: I e II. Ferramenta utilizada como controle: microscopia em lâmina de medula óssea.	Amostras de aspirado de medula óssea e amostras inteiras de sangue e soro humano e amostras de aspirado de medula óssea e amostras de baço canino.	Primers I e II, tendo como alvo kDNA.	LVH: Medula + sangue: 95,5% Medula: 91% Sangue: 68,8% Soro: 29,4% LVC: 83,3%.	LVH: Medula: 100% Sangue: 100% Soro: 100% LVC: 100%.	A amplificação do kDNA de <i>L. donovani</i> por PCR é um método rápido e altamente sensível para diagnóstico, pois níveis baixos como 1-10 fg de kDNA pode ser detectado. Os primers I e II foram altamente específicos. Nenhum produto de amplificação foi visto em amostras de controle de humanos ou cães. Também, nos cães, não houve amplificação de produtos das espécies que causam Leishmaniose cutânea.	Não.	Os resultados sugerem que a PCR pode ser útil na detecção de kDNA na medula óssea e sangue de pacientes com leishmaniose visceral. Na coleta de amostras para análise, é mais fácil e conveniente obter sangue do que coleta de amostras de medula óssea. Também é mais fácil obter volumes maiores de sangue do que amostras de medula óssea, por isso este método é muito mais aceitável para os pacientes.	China.	HU <i>et al.</i> , 2000.
D40	PCR: Avaliação da utilização do PCR, para diagnóstico de Leishmaniose e identificação de espécies, empregando os primers R221 e R332, tendo como alvo molecular o ssu rDNA, e primers LITSR e L5.8S, tendo como alvo ITS1-DNA. A sensibilidade do ssu rDNA- e ITS1-PCR foi comparado usando amostras de sangue enriquecidas com promastigotas de <i>L. donovani</i> DD8 ou <i>L. infantum</i> LRC-L639.	Amostras de aspirado de medula óssea e de sangue periférico humano e canino.	Primers R221 e R332, tendo como alvo ssu rDNA. Primers LITSR e L5.8S, tendo como alvo ITS1-DNA.	Não calculado.	Não calculado.	O ssu-rDNA-PCR mostrou-se mais sensível que ITS1-PCR. No entanto, a identificação das espécies não foi possível pela primeira abordagem. Ambos os ensaios de PCR, ssu rDNA- e ITS1-PCR, deram os melhores e quase idênticos resultados quando as amostras de sangue semeadas foram manchadas em papel de filtro normal, em vez de lâminas de vidro.	Não.	Este método é aplicável em áreas não endêmicas, bem como em regiões onde espécies de parasitas são etiológicamente relevantes.	Alemanha	SCHÖNIAN <i>et al.</i> , 2003.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D41	PCR: Avaliação da utilização do PCR, para diagnóstico de Leishmaniose e identificação de espécies, empregando os primers MC1 e MC2 e AJS1/DB8, que foram projetados a partir da sequência completa do minicírculo de kDNA de <i>L. infantum</i> . os resultados de PCR foram comparados com dados de culturas <i>in vitro</i> .	Amostras de aspirado de medula óssea e de sangue periférico humano e canino.	Primers MC1/MC2 e AJS1/DB8, que têm como alvo kDNA.	LVH: o artigo não traz essa informação. MC1/MC2: 14/22(total) AJS1/DB8: 10/22 LVC: MC1/MC2: 100%	O artigo não traz essa informação. (Nenhuma amplificação foi obtida para as amostras de controle negativo. Culturas de hospedeiros saudáveis foram negativas.)	Os resultados mostram que os primers são altamente específicos, detectando apenas DNA <i>L. donovani</i> s.l., e sensível para a detecção de DNA do parasita em amostras biológicas de três diferentes regiões geográficas de Portugal (norte, centro e sul) e do Brasil. Das 14 amostras positivas de humanos com primers MC, 4 foram negativas com o conjunto AJS1/DB8, sugerindo uma maior sensibilidade do conjunto MC.	Não.	Em amostras caninas, apenas PCR com primers MC foi capaz de detectar todos os cães comprovadamente infectados, correspondendo a 100% de sensibilidade, enquanto AJS1/DB8 não produziu bons resultados. Uma maior diversidade de cepas de diferentes regiões geográficas terão que ser testadas antes que o PCR possa ser usado com os primers MC como método de diagnóstico padronizado para infecções por <i>L. infantum</i> .	Portugal.	CORTES <i>et al.</i> , 2004.
D42	PCR-RFLP: Utilização de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) para identificação de <i>Leishmania infantum</i> na LVH e LVC, através de amplificação de um fragmento presente nos minicírculos altamente reiterados de kDNA. Primers utilizados: RV1/RV2. Enzimas de restrição utilizadas para a digestão de produtos de PCR: <i>Bsi</i> YI -3 e <i>Mlu</i> NI.	Amostras de sangue periférico humano e canino.	Primers RV1/RV2, que têm como alvo kDNA.	Não calculado.	Não calculado.	A alta sensibilidade deste protocolo permite o diagnóstico de infecção e caracterização da cepa em humanos e cães assintomáticos. Os resultados do estudo também permitem classificar diferentes cepas de acordo com o padrão associado à região geográfica.	Não.	Mais pesquisas são necessárias para avaliar a utilidade do protocolo PCR-RFLP descrito em áreas em que coexistem diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .	Itália.	FERROGLIO <i>et al.</i> , 2006.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D43	PCR: Utilização de PCR para detecção e identificação de <i>Leishmania</i> na LVH e LVC, através de amplificação de um fragmento presente região do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) do gene de rRNA. Além disso, seguido pelo polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), o PCR-ITS1 permitiu a identificação de espécies de <i>Leishmania</i> . Primers utilizados: LITSR e L5.8S .	Amostras de sangue humano e canino.	Primers LITSR e L5.8S, que têm como alvo ITS1.	0,1 parasitas por reação de PCR.	Não calculado.	Este estudo emprega a já estabelecida PCR do Sequência ITS-1 modificada pelo método de análise usando o SSCP e, não, RFLP. É um método barato, não muito exigente tecnicamente falando e disponível para um laboratório clínico para detecção e tipagem de <i>Leishmania</i> diretamente de amostras clínicas, além de poder identificar amostras de cultura negativas ou contaminadas.	Não.	A análise de produtos de PCR por SSCP de cepas de referência provaram a especificidade do ITS1 no nível de espécie.	Tunísia.	CHARGUI <i>et al.</i> , 2012.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D44	PCR em tempo real e PCR: Avaliação do PCR, empregando os primers RV1 e RV2, tendo como alvo molecular o DNA de cinetoplasto (kDNA), primers LITSR e L5.8S, tendo como alvo ITS1-DNA e do PCR em tempo real (qPCR), utilizando os primers RV forward e reverse e sondas de hidrólise TaqMan, tendo como alvo kDNA, como ferramentas para o diagnóstico de LVH, identificando <i>L. infantum</i>. Ferramenta utilizada como controle: teste de aglutinação direta (DAT).	Amostras de sangue humano e canino.	Primers RV1/RV2 e RV forward e reverse, que têm como alvo kDNA. Primers LITSR e L5.8S, que têm como alvo ITS1-DNA.	LVH: qPCR: 93,9% kDNA-PCR: 75,6% ITS-PCR: 53,7% LVC: qPCR: 100% kDNA-PCR: 88,9% ITS-PCR: 72,2%	LVH: qPCR: 100% kDNA-PCR: 100% ITS-PCR: 88,9% LVC: qPCR: 96,4% kDNA-PCR: 94,6% ITS-PCR: 89,3%	Por PCR convencional, PCR baseado em kDNA foi mais sensível do que a PCR baseada em ITS. Um alto nível de concordância foi obtido entre o DAT (que foi considerado como teste base e padrão para cálculo de sensibilidade, especificidade) e PCR em tempo real.	Não.	Como a PCR em tempo real é um ensaio rápido, sensível, reprodutível e quantitativo para detecção de infecção por <i>L. infantum</i> em cães e humanos, constitui uma alternativa não invasiva à aspiração de medula óssea para diagnóstico inicial da doença.	Irã.	MOHAMMADI HA <i>et al.</i> , 2013.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D45	PCR:Utilização de PCR para identificação de espécies e diagnóstico de LVH e LVC, através de amplificação de um fragmento presente na região do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) . Primers utilizados: LITSR e ITS1R-TR1. Também foram utilizados duas probes: Probe1 : CCGTTTATACAAAA AATATACGGCGTTT CCGTTT—FL; Probe 2: LC640 GCGGGGTGGGTGC GTGTGTG—PH.	Amostras de medula óssea e de sangue e soro humano e amostras de sangue canino.	Primers LITSR e ITS1R-TR1, tendo como alvo ITS1.	O artigo não traz essa informação.	O artigo não traz essa informação.	O método proposto apresenta uma sensibilidade para o diagnóstico rápido e correto da leishmaniose em todos os tipos de amostras clínicas.	Não.	O método para identificação de espécies ainda é limitado e precisa de mais análises. Variações genotípicas baseadas na região ITS1 de parasitas de <i>Leishmania</i> na Turquia dentro de espécies e intraespécies foram determinadas. Os achados deste estudo mostraram que <i>L. tropica</i> é um dos agentes causadores de infecções humanas e caninas leishmaniose visceral na Turquia.	Turquia.	TOZ <i>et al.</i> , 2013.

Tabela 4. Artigos contendo métodos diagnósticos moleculares utilizando amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
D46	PCR: avaliar a eficácia da isoforma CPA de sequências semelhantes à catepsina L como alvo para diagnóstico molecular de LVH e LVC e como marcador filogenético da variabilidade intraespecífica de <i>L. infantum</i>. As sequências de genes CPA semelhantes a catepsina L alinhadas foram usadas para procurar regiões de consenso e projetar primers específicos. Foi utilizado o CatLeish-PCR para amplificar DNA de isolados de <i>L. infantum</i>. Primers utilizados: CatLeishF e CatLeishR.	Amostras de sangue humano e amostras de sangue, swab conjutival e amostras de urina canina.	Primers CatLeishF e CatLeishR, tendo como alvo DNA de isolados de <i>L. infantum</i>.	Medição de sensibilidade demonstrou que os marcadores foram eficientes em amplificar o DNA alvo e formaram bandas detectáveis em concentrações de até 10⁻¹¹ ng/μl.	100%.	Diferentes espécies de <i>Leishmania</i> foram testadas e não houve amplificação cruzada com nenhuma das espécies associadas ao complexo da leishmaniose tegumentar no Brasil. Quando o CatLeish-PCR foi testado contra hemoparasitas pertencentes à gêneros <i>Babesia</i>, <i>Ehrlichia</i> e <i>Trypanosoma</i>, não houve amplificação.	Não.	Houve baixos níveis de positividade nas amostras biológicas utilizadas como modelo. Ainda assim, há indicação do uso de CatLeish-PCR para diagnóstico por PCR, pois mesmo em amostras biológicas onde o material genético dos parasitas é escasso ou danificado, foram obtidos resultados satisfatórios de amplificações. CatLeish-PCR pode ter potencial para monitorar a remissão da infecção na LVH e como indicador de eficácia de possíveis abordagens terapêuticas.	Brasil.	DA SILVA <i>et al.</i>, 2019.

Tabela 5. Artigos contendo métodos diagnósticos parasitológicos utilizando apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas.

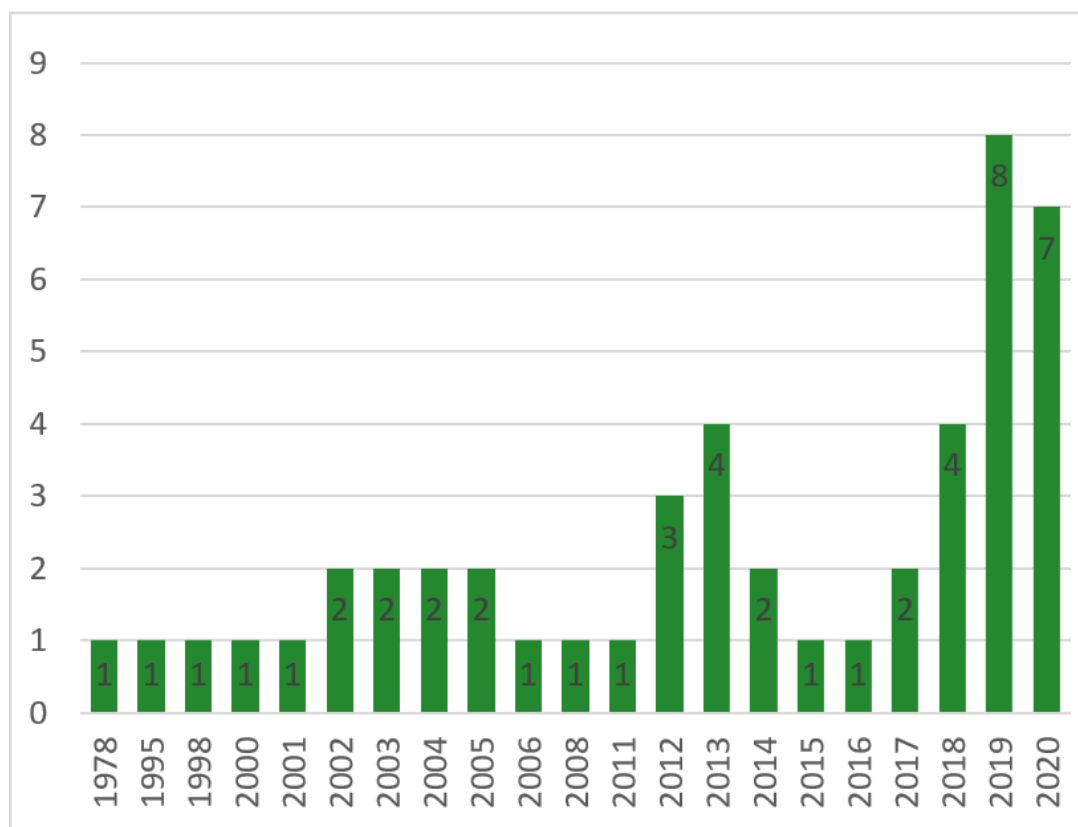
Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
E48	Microscopia: Utilização de quantitativo de buffy coat (BC) para diagnóstico de LVH e LVC. Para isso, foi avaliado o padrão de fluorescência dos núcleos de <i>L. chagasi</i> e cinetoplasto em QBC® de promastigotas foi observado e caracterizado.	Amostras de sangue periférico humano.	Corpos de <i>Leishmania donovani</i> e antígeno recombinante rK39.	Microscopia de BC: 54,3%. rK39: 71,6%. Combinação dos dois testes: 96,3%.	Microscopia de BC: 100%. rK39: 82,9%. Combinação dos dois testes: 90%.	Microscopia de BC, quando avaliada unicamente, mostrou concordância aceitável com a microscopia de aspirado de linfonodos e com o PCR. Os achados deste estudo apoiaram o uso de microscopia de BC em combinação com teste com rK39, que usam amostras não invasivas de sangue periférico, que são testes de beira de leito simples, sem riscos e fáceis, produzindo diagnóstico preciso de LHV em laboratórios de comunidades e hospitais de áreas rurais.	Não.	A microscopia de BC é um teste que tem especificidade perfeita (100%) e graus de parasitemia, mas com sensibilidade limitada, enquanto o rK39 é um teste rápido, fácil e mais sensível. Esse combinação aprimora o desempenho diagnóstico final.	Arábia Saudita.	EL-AMIN; KHALID; EL-BADRY, 2020

Tabela 5. Artigos contendo métodos diagnósticos parasitológicos utilizando apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas.

Nº	BASE DO MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO/ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	PONTOS POSITIVOS	JÁ ESTÁ EM USO COMERCIAL?	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	PAÍS DE ORIGEM DO ESTUDO	REFERÊNCIAS
E47	Teste de esfregaço de buffy coat e imunoensaio: Utilização em conjunto de microscopia de buffy coat (BC) e teste imunocromatográfico com rK39 para diagnóstico de LVH. Como comparação foi utilizado a técnica de microscopia de aspirado de linfonodos e como teste confirmatório e teste padrão de referência foi utilizado PCR.	Amostras de medula óssea e sangue periférico humano e canino.	Núcleos de <i>L. chagasi</i> e cinetoplasto.	LVH: Medula óssea: 100%. Sangue periférico: 81,8%. LVC: 100%.	LVH: Medula óssea: 83,3%. Sangue periférico: 100%. LVC: Como nenhum estudo foi projetado para isso, a especificidade do QBC® para LVC não foi avaliada neste estudo.	Microscopia de BC, quando avaliada unicamente, mostrou concordância aceitável com a microscopia de aspirado de linfonodos e com o PCR. Os achados deste estudo apoiaram o uso de microscopia de BC em combinação com teste com rK39, que usam amostras não invasivas de sangue periférico, que são testes de beira de leito simples, sem riscos e fáceis, produzindo diagnóstico preciso de LHV em laboratórios de comunidades e hospitais de áreas rurais.	Não.	Um simples corpo fluorescente no QBC® pode não representar os núcleos de amastigotas extracelulares, como as altas taxas iniciais de falsos positivos têm mostrado. Quando o padrão de fluorescência, o tamanho da os núcleos e a presença do cinetoplasto foram considerados, a proporção de testes falso-positivos foi significativamente reduzida.	Brasil.	LIARTE <i>et al.</i> , 2001.

5.2.1. Ano de publicação

Gráfico 2. Gráfico representando os anos das publicações dos artigos elegíveis e quantidade de trabalho publicado em cada ano.



Dentre os artigos considerados elegíveis, o trabalho mais antigo (B07) foi publicado em 1978, que avaliou a técnica de micro-ELISA, utilizando soro humano e canino. Em relação aos artigos mais recentes, 6 utilizaram amostras de soro humano e canino e empregaram ELISA como teste diagnóstico, avaliando como antígenos, proteínas recombinantes (B28; B30; B33) e proteínas recombinantes e epítopos específicos de célula B (B29; B31; B32). O sétimo artigo mais recente, utilizou microscopia de buffy coat em conjunto com teste imunocromatográfico em amostras de sangue periférico humano (E48).

Ainda, dos 48 artigos incluídos, mais da metade, 32 artigos (66,67%), foram publicados nos últimos 10 anos, a partir de 2012.

5.2.2. Países de origem dos artigos

Figura 3. Mapa representando os países de origem dos estudos e a quantidade de trabalho publicado por cada país.



Dos 48 artigos incluídos na revisão (Apêndice 1), 29 foram publicados no Brasil (61,22%). Nesse conjunto estão incluídos artigos que abordaram métodos moleculares, sorológicos e parasitológicos, que avaliaram apenas amostras humanas e amostras humanas e caninas, um teste avaliado por artigo, testes avaliados em conjunto com outros testes, bem como antígenos/alvos únicos e em conjunto com outros antígenos, alvos.

Além disso, alguns estudos publicados em um certo país também utilizaram amostras de outros países, como em SCHÖNIAN *et al.*, 2003 (D40), que além de amostras da Alemanha, utilizaram amostras testadas em Jerusalém e em MIRZAEI *et al.*, 2018 (C38), que utilizaram apenas amostras oriundas do Irã, mas o autor correspondente do trabalho está vinculado à uma Universidade na França.

5.2.3. Base dos métodos utilizados

Tabela 6. Tipo de testes avaliados e a quantidade de artigos por cada teste.

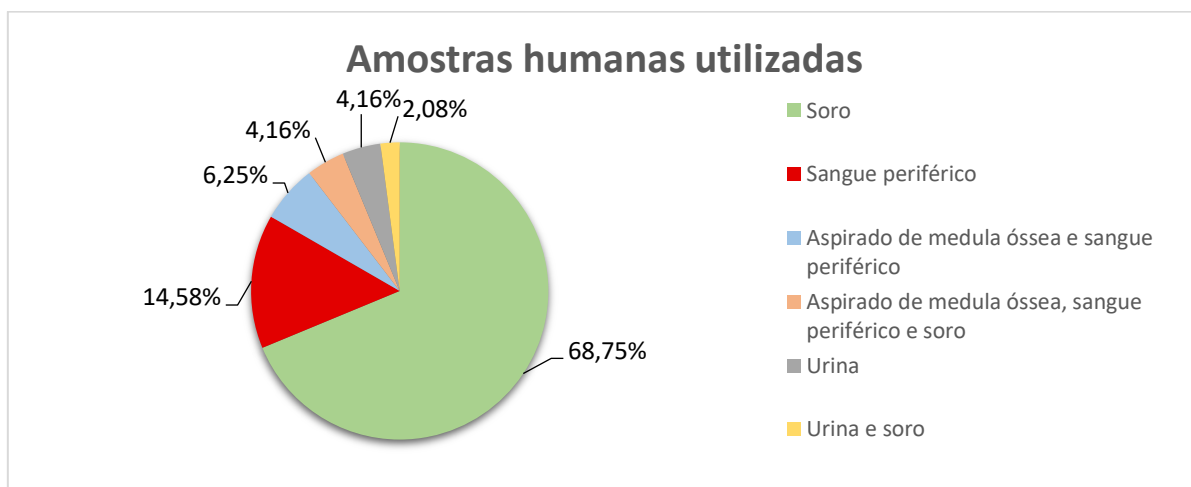
Base do Método	Quantidade de artigos
ELISA	27
ELISA + Immunoblotting	1
Immunoblotting	1
ELISA + ICT	1
ICT	1
Microscopia de buffy coat + ICT	1
Microscopia de buffy coat	1
Teste rápido com vareta	1
Teste de aglutinação em látex	1
Teste de aglutinação direta	1
PCR	8
PCR-RFLP	1
PCR + qPCR	2
qPCR	1

ELISA foi o tipo de teste mais utilizado para avaliar métodos diagnósticos na LVH (56,25%). PCR foi o segundo método mais utilizado (16,66%), seguido de PCR em conjunto com qPCR (4,16%).

Nos artigos que utilizaram mais de um método, a classificação para definir o tipo de método, se sorológico, molecular ou parasitológico, foi feita de acordo com o primeiro teste, dentro do conjunto, considerado como teste principal.

5.2.4. Amostras utilizadas

Gráfico 3. Representação gráfica dos tipos de amostras utilizadas pelos artigos para a realização de testes para diagnóstico de LV.



A amostra mais utilizada foi o soro, presente em 33 artigos (68,75%). Em seguida, o sangue periférico, que foi utilizado em 7 artigos (14,58%). O conjunto de amostras aspirado de medula óssea e sangue periférico foi utilizado em 3 artigos (6,25%). O agrupamento de amostras aspirado de medula óssea, soro e sangue periférico foi avaliado em 2 artigos (4,16%). Houve utilização de amostras de urina em 2 artigos (4,16%) e o conjunto de amostras urina e soro foi utilizado em 1 artigo (2,08%).

5.2.5. Antígenos/alvos utilizados

Nos artigos que utilizaram métodos sorológicos, houve uma grande diversidade de antígenos avaliados para o diagnóstico de LVH. Em 18, apenas um antígeno, do tipo proteína recombinante ou outros tipos de proteína, foi avaliado em cada trabalho (A01; A05; A06; B07; B08; B09; B10; B13; B16; B19; B21; B22; B23; B24; B26; B28; B30; B33). Em 4 trabalhos (A3; B6; B15; B25), avaliou-se a utilização de várias proteínas separadamente, incluindo proteínas recombinantes e outros tipos de proteína como antígenos em cada estudo. Em 2 artigos, (B11 e B20), avaliou-se a utilização de um mix de proteínas e uma proteína quimérica como antígenos. Em outros 9 artigos, (A02; A04; B14; B17; B18; B27; B29; B31; B32) realizou-se a avaliação de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos derivados de célula B.

Nos testes sorológicos, a proteína mais utilizada foi a K39, incluindo sua forma

recombinante, rK39, e peptídeos sintéticos. Foram 5 artigos que utilizaram o antígeno (B10; B11; B14; B24; B28). O segundo antígeno mais utilizado foi o A2, aparecendo em 4 trabalhos, em sua forma recombinante e em peptídeos sintéticos (B09; B14; B15; B25). A proteína A2 foi muito utilizada, em outros trabalhos de testes sorológicos, como antígeno de controle. O terceiro antígeno mais utilizado foi a proteína recombinante rLiHys, sendo avaliada em 2 artigos (B21; B22).

Em relação aos trabalhos que utilizam métodos moleculares, os Primers mais utilizados foram RV1/RV2 e LITSR. RV1 e RV2 foram utilizados em 4 artigos (C35; C36; D42; D44). LITSR, em conjunto com o Primer L5.8S, foram avaliados em 3 artigos (D40; D43; D44). LITSR, em conjunto com o primer ITS1R-TR1, foram avaliados em 1 artigo (D45). kDNA foi o alvo molecular mais utilizado nos estudos, e, de um total de 13 artigos, apenas não foi utilizado em 5 trabalhos (C38; D40; D43; D45; D46).

Nos artigos que avaliaram métodos parasitológicos, foram utilizados formas do parasito *Leishmania donovani* e antígeno recombinante rK39 (E48) e Núcleos de *Leishmania chagasi* e cinetoplasto (E47).

5.2.6. Sensibilidade e especificidade

As menores porcentagens de sensibilidades encontradas foram: 26-52% em estudo que avaliou a utilização de ELISA com marcadores com poli-histidina como antígenos, em amostras de soro humano (B20); 29,4% onde foi avaliado a utilização do PCR, empregando os primers I e II, tendo como alvo molecular kDNA, em amostras de sangue periférico humano (D39); 53,7%, onde foi avaliado a utilização do PCR, empregando os primers LITSR e L5.85, tendo como alvo molecular ITS1-DNA, em amostras de soro humano (D44); 54,3% em estudo que utilizou a microscopia de buffy coat para visualizar corpos de *L. donovani* em amostras de sangue periférico humano (E48). As porcentagens de sensibilidade dos outros artigos variaram entre 66,7% e 100%.

As menores porcentagens de especificidades encontradas foram: 29,6% onde foi avaliado a utilização do qPCR, empregando os primers RV1 e RV2, tendo como alvo molecular kDNA, em amostras de sangue periférico humano (C36); 66,67% em estudo que avaliou a utilização de ELISA com peptídeo sintético previsto por célula B, derivado da proteína LinJ.27.0980 como antígeno, em amostras de soro humano (A04); 67% em trabalho que avaliou a utilização de ELISA e ICT com proteína recombinante rC9 como antígeno, em amostras de soro humano (B25). As porcentagens de especificidade dos outros artigos variaram entre 76,1%

e 100%.

Da totalidade de artigos, 8 apresentaram sensibilidade e especificidade com valor de 100%, todos utilizando o método ELISA. 6 testaram apenas proteínas recombinantes (A05; A06; B19; B22; B26; B30) e 2 avaliaram o uso de proteínas recombinantes em conjunto com peptídeos sintéticos derivados de célula B (B27; B27) . No entanto, apesar da alta sensibilidade e especificidade, os estudos ressaltam que foi testado um número baixo de amostras de soro e com diversidade limitada, fazendo-se necessário a realização de mais pesquisas para que seja possível concluir sobre a utilização dos antígenos.

5.2.7. Pontos positivos e limitações

Tanto nos artigos que utilizaram métodos sorológicos, como nos trabalhos que utilizaram métodos moleculares ou parasitológicos, os principais pontos positivos descritos e analisados foram a presença de alta sensibilidade e especificidade e a baixa reatividade cruzada com amostras de indivíduos saudáveis, moradores de áreas endêmicas ou que possuíam doenças com chance de gerar reatividade cruzada com a LV, como Doença de Chagas, Hanseníase, Malária, HIV, Toxoplasmose.

Nos métodos moleculares, além do diagnóstico de LVH, um dos objetivos dos estudos foi o de identificar diferentes cepas de *Leishmania*.

Além disso, 7 estudos que utilizaram ELISA também avaliaram a efetividade dos antígenos como marcadores prognósticos da doença, após o tratamento, apresentando bons resultados (A03; A06; B08; B22; B26; B30; B31) e 5 avaliaram a atividade imunogênica dos antígenos, com bons resultados (A06; B19; B22; B27; B32).

Nos estudos que utilizaram métodos sorológicos, as principais limitações foram o número reduzido e pouco diversificado de amostras de soro, o que poderia comprometer os resultados. Nos outros métodos, parasitológicos e moleculares, as principais limitações também foram o número limitado de amostras que poderiam comprometer os resultados.

5.2.8 Perspectivas futuras e progressos científicos

Tabela 7. Os 10 artigos com os melhores resultados, dentre o total de artigos avaliados.

Nº	MÉTODO	TIPO DE AMOSTRA	ANTÍGENO / ALVO	SENS.	ESPEC.	VANTAGENS	REFERÊNCIAS
A05	ELISA: produção de nova proteína recombinante.	Soro humano.	Lbk39.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, reatividade cruzada muito reduzida.	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2019.
A06	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína.	Soro humano.	rLiHyL.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, sem reatividade cruzada, bons resultados como marcador prognóstico e boa atividade imunogênica. Estudos futuros são necessários para incorporação em outras plataformas de imunodiagnósticos	LAGE <i>et al.</i> , 2019.
B19	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína.	Soro humano e canino.	rSGT.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, sem reatividade cruzada e boa atividade imunogênica. Estudos futuros são necessários para incorporação em outras plataformas de imunodiagnósticos.	DIAS <i>et al.</i> , 2017.
B22	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína.	Soro humano e canino.	rLiHyS.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, bons resultados como marcador prognóstico e boa atividade imunogênica. Estudos futuros são necessários para incorporação em outras plataformas de imunodiagnósticos.	DIAS <i>et al.</i> , 2018b.
B26	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína.	Soro humano e canino.	rEF1b.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, baixa reatividade cruzada e bons resultados como marcador prognóstico após o tratamento.	SANTOS <i>et al.</i> , 2019b.
B27	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína e peptídeo sintético derivado de célula B.	Soro humano e canino.	rAmastin e epítipo específico de célula B, derivado da sequência de Amastina.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, baixa reatividade cruzada e boa atividade imunogênica. Peptídeo é mais barato e simples de se produzir.	VALE <i>et al.</i> , 2019.
B29	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína e peptídeo sintético derivado de célula B.	Soro humano e canino.	rLiHyC e epítipo específico de célula B, derivado da sequência de LiHyC.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, sem reatividade cruzada. Peptídeo é mais barato e simples de se produzir. Estudos futuros são necessários para incorporação em outras plataformas de imunodiagnósticos.	MACHADO <i>et al.</i> , 2020a.
B30	ELISA: utilização de versão recombinante de proteína.	Soro humano e canino.	rLiHyG.	100%.	100%.	Alta sensibilidade e especificidade, sem reatividade cruzada e bons resultados como marcador prognóstico após o tratamento.	MACHADO <i>et al.</i> , 2020b.
C37	qPCR.	Amostras humanas de urina.	Primers Linf.1-23F e Linf.1-154R, que têm como alvo kDNA.	96,08%.	Não calculado.	Complemento diagnóstico confortável, prático e rápido em relação às técnicas convencionais de rotina.	PESSOA-E-SILVA <i>et al.</i> , 2016.
D43	PCR.	Amostras de sangue humano e canino.	Primers LITSR e L5.8S, que têm como alvo ITS1.	0,1 parasitas por reação de PCR.	Não calculado.	Método barato, não muito exigente em termos de técnica e disponível para detectar <i>Leishmania</i> diretamente de amostras clínicas.	CHARGUI <i>et al.</i> , 2012.

Sens.: sensibilidade em amostras humanas; Espec.: especificidade em amostras humanas.

Após a análise dos 48 artigos individualmente, foram selecionados os 10 trabalhos (marcados com a cor verde nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7) que mais se destacaram em termos de melhor sensibilidade e especificidade, pontos positivos relevantes, boas perspectivas futuras e bons progressos científicos, evidenciados na coluna “vantagens”. Dos 10 artigos (Tabela 7), 8 abordaram métodos sorológicos, especificamente o ELISA, com sensibilidade e especificidade de 100%, com pouca ou nenhuma reatividade cruzada, baixo custo e simplicidade de produção, como no caso dos artigos que utilizaram como antígeno os peptídeos sintéticos de célula B. Os outros 2 artigos abordaram métodos moleculares que se destacaram por possuírem menor complexidade de produção e execução.

Devido à gravidade da doença, é importante ter bons métodos que sejam baratos, rápidos e fáceis de serem usados, bem como tenham especificidades e sensibilidades boas.

6. DISCUSSÃO

A LV é uma zoonose caracterizada por evolução crônica, abrangência sistêmica e por possuir alta morbimortalidade. Ainda assim, é uma doença negligenciada, que afeta predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis de países em desenvolvimento, contribuindo para a perpetuação de ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2016; WHO, 2015). Dessa maneira, é importante que haja bons métodos diagnósticos para a identificação de indivíduos infectados, a fim de que seja possível fazer um direcionamento estratégico das medidas de controle e de uma conduta terapêutica efetiva (TRAVI *et al.*, 2018). Em vista disso, esta revisão se propôs a trazer um panorama sobre os métodos utilizados para o diagnóstico de LVH, através da exposição e análise de especificidades encontradas em cada tipo de teste, como a base do método utilizada, antígenos e alvos testados, valores de sensibilidade e especificidade, pontos positivos, limitações, perspectivas futuras e progressos científicos, para possível contribuição com dados que auxiliem na redução dos impactos da doença na saúde humana.

Na América Latina, cerca de 90% dos casos de LV humana ocorrem no Brasil. Também, o país lidera o ranking de países com o maior volume de pesquisas sobre diagnóstico de LV por *L. infamtum*, além de ser sede da principal instituição que financia pesquisas de diagnóstico de LV por *L. infamtum* no mundo, o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) (BONNEY, 2016; BRASIL, 2019; LINDOSO *et al.*, 2018; REGO; JUNIOR, 2021). Em consonância com tais informações, de acordo com os artigos analisados nessa revisão, o Brasil foi o país de origem de 29 (60,42%) trabalhos incluídos, o que confere ao país uma grande representação nos resultados aqui discutidos. Além disso, no Brasil, a eutanásia de cães soropositivos é ainda tida como uma medida de tratamento precoce dos casos de LVH e de redução dos riscos de transmissão da doença. Assim, no país, estudos são realizados para que ocorra o desenvolvimento de testes que sejam capazes de identificar de fato os cães soropositivos para a LV (MACHADO; SILVA; VILANI, 2016).

A fim de contribuir com informações que fossem úteis para o controle da doença, analisou-se artigos acerca dos métodos diagnósticos na LV, cujos testes são baseados em técnicas sorológicas, moleculares e parasitológicas. O principal objetivo dos testes sorológicos é realizar a pesquisa de anticorpos anti-leishmania, sendo a escolha do antígeno que vai ser usado na técnica um aspecto importante que limita ou possibilita a alta eficácia na performance dos testes sorológicos (FRAGA *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017; ZANETTE *et al.*, 2014). Dentro do conjunto de variedade de testes sorológicos existentes, o ELISA é o teste

mais realizado para o imunodiagnóstico de LV, sendo o padrão ouro de acordo com o Ministério da Saúde (EVANS *et al.*, 1990; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; PEDRAS *et al.*, 2008). Nessa revisão, dos 48 trabalhos incluídos, 33 (68,75%) utilizaram testes sorológicos para avaliar os métodos diagnósticos utilizados na LVH. Desse total de trabalhos utilizando métodos sorológicos, 27 (81,82%) avaliaram a utilização do teste ELISA isoladamente e 2 (6,06%), do teste ELISA em associação com outros tipos de testes, o immunoblotting e ICT.

Frequentemente, o antígeno mais utilizado na técnica de ELISA é o solúvel bruto preparado a partir de suspensão de promastigotas em solução salina tamponada com fosfato (EVANS *et al.*, 1990; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008; PEDRAS *et al.*, 2008). Nos artigos analisados nesse trabalho, entretanto, houve uma grande variedade de antígenos testados, com utilização de proteínas recombinantes isoladamente, proteína quimérica, mix de proteínas e peptídeos sintéticos derivados de célula B. Tanto a proteína recombinante como o peptídeo sintético costumam apresentar sensibilidade e especificidade superiores, em relação às preparações brutas comumente usadas para outros antígenos (SOUZA *et al.*, 2013). Fazendo uma comparação entre proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos derivados de célula B, antígenos que apresentaram os melhores resultados entre os artigos que utilizaram métodos sorológicos analisados nessa revisão, todos dois obtiveram valores de sensibilidade e especificidade semelhantes e baixa reatividade cruzada quando foram testados em soros de indivíduos saudáveis ou com doenças relacionadas à Leishmaniose. No entanto, os peptídeos sintéticos derivados de célula B, são mais simples e mais baratos de se produzir, quando comparados às proteínas recombinantes (COSTA *et al.*, 2017; SALLES *et al.*, 2019). A utilização de uma proteína quimérica e de mix de proteínas como um sistema único para detecção de LVH apresentaram boas sensibilidades e especificidades, porém, inferiores às obtidas com o uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos derivados de célula B.

Sobre os métodos moleculares, o principal objetivo é a amplificação do DNA do parasito. Dentro dessa categoria, PCR é a técnica mais utilizada (ASSIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013; VASOO; PRITT, 2013). Nos trabalhos analisados nessa revisão, além do PCR (reação em cadeia de polimerase), principal teste utilizado nos artigos incluídos nessa revisão de métodos moleculares, foi utilizado também o PCR em tempo real e o PCR-RFLP. Além disso, utilizou-se outra técnica molecular, o immunoblotting, ou Western blot. O teste de PCR pode ser aplicado em uma grande variedade de amostras biológicas, desde as menos invasivas, como sangue comum periférico, como as estratégias mais invasivas, como pelo uso de aspirado de medula óssea, baço e linfonodos (CRUZ *et al.*, 2002; CUPOLILLO *et al.*, 2003; LACHAUD *et al.*, 2001). Nos artigos aqui analisados, as amostras utilizadas foram

sangue periférico, urina, soro e aspirado de medula óssea. Além do mais, a PCR pode ser realizada em muitos alvos moleculares, sendo o DNA de cinetoplasto (kDNA) o alvo mais aplicado (PIZZUTO *et al.*, 2001; SREENIVAS *et al.*, 2004). Tal informação está de acordo com o que foi encontrado neste trabalho, pois de um total de 13 artigos analisados que utilizaram métodos moleculares, 8 testaram o kDNA como alvo molecular. No que se refere à efetividade do método, a técnica possui alto desempenho e resultados confiáveis, e é descrita como um método sensível para a detecção do parasito, independente da imunocompetência ou história clínica do paciente. Por outro lado, o uso dessa técnica costuma estar restrito aos centros de referência e laboratórios de pesquisa, além de ser mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina, devido à sua complexidade e alto custo operacional (SREENIVAS *et al.*, 2004; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; VASOO; PRITT, 2013). Conforme o esperado, no geral, os artigos que utilizaram PCR e suas variações, apresentaram boa sensibilidade e especificidade e muitos foram capazes de fazer o diagnóstico mesmo em amostras biológicas onde o material genético dos parasitas estava escasso, além de serem eficazes em detectar diferentes cepas de *Leishmania*. Alguns trabalhos, inclusive, trouxeram a informação de que suas técnicas poderiam ser utilizadas em laboratórios clínicos e centros de saúde. Em CHARGUI *et al.*, 2012, o teste de PCR utilizado foi considerado como um método barato, não muito exigente tecnicamente falando e diretamente disponível para detecção e tipagem de *Leishmania* direto de amostras clínicas e em PESSOA-E-SILVA *et al.*, 2016, o teste de qPCR foi avaliado como um complemento diagnóstico confortável, prático e rápido.

No que tange os métodos parasitológicos, são considerados exames de referência no diagnóstico da LV e baseiam-se na visualização direta do parasito e no seu isolamento em cultivo (MOREIRA *et al.*, 2007; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; SOUSA, 2017; SUNDAR; RAI, 2002). Entretanto, mesmo sendo considerado método de referência, nesta revisão, utilizando as estratégias de busca previamente descritas e após triagem por título e resumo utilizando os critérios de inclusão e exclusão, foram encontrados apenas 13 trabalhos que testaram métodos parasitológicos para o diagnóstico de LV, sendo 1 apenas com amostras humanas, 1 com amostras humanas e caninas e 11 apenas com amostras caninas, em que esses últimos foram retirados desse trabalho e não fizeram parte da etapa de realização de leitura na íntegra e seleção de dados. Além disso, nesse método, a demonstração do parasito normalmente é feita em materiais obtidos por técnicas invasivas, como por biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. A especificidade costuma ser alta e a sensibilidade variável, sendo maior quando se utiliza amostras de baço (MOREIRA *et al.*, 2007; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; SOUSA, 2017; SUNDAR; RAI, 2002). Nos trabalhos

analisados, além de amostra de medula óssea, também foi utilizado sangue comum periférico, considerado menos invasivo. Os artigos trouxeram estudos de testes com alta especificidade e sensibilidade limitada.

Neste trabalho, boas perspectivas futuras foram verificadas, dado que há a possibilidade de incorporação de algumas proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos de célula B em outras plataformas de imunodiagnóstico além do ELISA, como em testes imunocromatográficos, principalmente pelo baixo custo em relação à sua aplicação, sendo necessário, no entanto, que hajam estudos futuros para assegurar, de fato, a eficácia desses testes. Conjuntamente, mesmo que mais estudos ainda precisem ser realizados, dos 8 trabalhos destacados por apresentarem 100% de sensibilidade e especificidade, quase todos os antígenos que se mostraram eficazes em diagnosticar LV, também se mostraram úteis como marcadores prognósticos da doença após o tratamento e/ou como alvos para a utilização em vacinas. No que tange aos artigos que utilizaram métodos moleculares, esses igualmente precisam de mais estudos que garantam a eficácia das melhorias observadas, em relação às técnicas moleculares de rotina.

Bons progressos científicos foram observados, como pela existência de estudos para diagnóstico sorológico de LV que apresentaram resultados de antígenos altamente sensíveis e específicos, sem a ocorrência de reações cruzadas, que ao mesmo tempo conseguem ser baratos e simples de se produzir e podem ser utilizados em plataformas de imunodiagnóstico com custos mais baixos e de fácil execução. Além disso, alguns testes moleculares que foram destacados podem ser realizados com despesas menores, praticidade e rapidez em relação à execução, mantendo a efetividade e a possibilidade de serem aplicados em outros locais, que não apenas centros de referência e laboratórios de pesquisa.

Desse modo, nota-se que muitos esforços têm sido concentrados para a melhoria dos antígenos para ELISA, por ser um teste com custos mais baixos para ser produzido e menos complexo para ser aplicado, tendo como destaque, dentro dessa categoria, os artigos que utilizaram como antígenos os peptídeos sintéticos de célula B, alvos importantes para estudos futuros. Dessa maneira, percebe-se que existe uma grande variedade de possibilidades de testes para diagnóstico de LVH e muitos estudos de testes diagnósticos que trazem resultados promissores e com custos cada vez mais baixos. No entanto, para que todo esse empenho tenha, de fato, repercussões positivas na redução da incidência e morbimortalidade da doença, é necessário que haja recursos financeiros suficientes e compatíveis com as demandas existentes, por parte da iniciativa pública e privada.

7. CONCLUSÃO

Nos estudos avaliados nesta revisão, os artigos que utilizaram métodos sorológicos, especificamente o ELISA, foram os que mais se destacaram, tanto em relação à quantidade de vezes em que foram estudados, pois foram os testes mais frequentes, quanto em relação à efetividade, pois dos 8 artigos que apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%, todos utilizaram ELISA. O teste sorológico de ELISA utilizando peptídeos sintéticos de célula B mostrou-se muito efetivo, com resultados que apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%, ausência de reações cruzadas, baixo custo e simplicidade de produção. A utilização de proteínas recombinantes também apresentou resultados satisfatórios, com sensibilidade e especificidade de 100%, sendo, porém, mais caros e complexos que os primeiros. Além desses, os estudos que utilizaram PCR também apresentaram boas sensibilidades e especificidades para o diagnóstico de LVH, sendo que alguns se mostraram métodos baratos e tecnicamente pouco exigentes. Os artigos que avaliaram o uso de métodos parasitológicos mostraram-se os mais distantes do conceito de método diagnóstico ideal, pois quando os resultados não apresentaram sensibilidade limitada, foi utilizada um tipo de amostra cuja coleta é invasiva, como foi o caso do trabalho que utilizou medula óssea.

Os testes apresentaram limitações, mesmo com bons resultados e menor complexidade de utilização de muitos testes analisados nessa revisão, como número reduzido de amostras avaliadas nos estudos e pouca diversificação de amostras, e por isso ainda devem passar por mais pesquisas e análises aprofundadas.

Como perspectivas futuras, tem-se a possibilidade de incorporação de algumas proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos de célula B em outras plataformas de imunodiagnóstico além do ELISA, utilização desses antígenos como marcadores prognósticos após o tratamento e fabricação de vacinas e a realização de estudos futuros adicionais que assegurem a eficácia que alguns testes moleculares mostraram em relação às técnicas comumente usadas.

Sobre os progressos científicos, este trabalho pode constatar que há métodos altamente sensíveis e específicos, sem reatividade cruzada, que são simples e baratos de se produzir e com aplicação cada vez menos complexa.

REFERÊNCIAS

- Adler S, Theodor O. Investigations on mediterranean kala-azar. VI. canine visceral leishmaniasis. **Proc R Soc Lond**, 110:402-12, 1932.
- AGUIAR, G. M. DE *et al.* Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I - A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, n. 2, p. 195–206, 1996.
- AKHOUNDI, B. *et al.* Preparation and evaluation of a glycerol-preserved direct agglutination antigen for long-term preservation: A comparative study of the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in human and dog. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 2, p. 117–120, fev. 2012.
- AKHOUNDI, B. *et al.* Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of Leishmania infantum. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 3, p. 307–313, mar. 2013.
- ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C.(2008). Validação do teste Imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. e Serv. Saúde**, nº17.v.2. p.107-116, 2008.
- ATHANASIOU, L. V. *et al.* Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against Leishmania spp. in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 2, p. 286–290, 25 Mar. 2014.
- BADARÓ, R. *et al.* rK39: A cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–761, 1996.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Ed. Guanabara Koogan, 1996.
- BAHIA. Secretaria de saúde do estado da Bahia. Superintendência de Vigilância e Proteção da saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico**. Situação da leishmaniose visceral. Estado da Bahia, 2020.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14–15, 2008.
- BARBOSA-DE-DEUS, R. *et al.* Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 6, p. 1361–1366, nov. 2002.
- BARBOSA, I. R.; COSTA, Í. DO C. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 5, 2013.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology** **Int J Parasitol**, , Aug. 2007.

BAVIA, M. E. *et al.* Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parassitologia**, v. 47, n. 1, p. 165–169, 2005.

BAVIA, M. E. Geotecnologias na identificação de fatores ambientais relacionados à ocorrência da leishmaniose visceral americana em Conde, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, 2011.

BERRAHAL, F. *et al.* Canine leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–277, 1996.

BOARINO, A. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 5, p. 647–653, maio 2005.

BRANDÃO, Paulo Roberto Baqueiro. Barreiras e Luís Eduardo Magalhães: uma aglomeração embrionária no Oeste Baiano? In: DIAS, P.; SANTOS, J. (Org.), Cidades médias e pequenas: contradições, mudanças e permanências nos espaços urbanos. Salvador: **Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia**, 2012, p. 183-195

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1ª edição. 5ª reimpressão. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.00 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Coef-Incid-ncia.pdf> . Acesso em: 22 de Abril de 2021.

BOELAERT, M. *et al.* Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 1, p. 31–37, 1999.

BURNS, J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, p. 775–779, 15 Jan. 1993.

CARDIM, M. F. M. *et al.* Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 4, p. 1–9, 2013.

CARVALHO, A. M. R. S. *et al.* New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2018.

CARVALHO, F. A. A. *et al.* Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289–295, ago. 2002.

CHARGUI, N. *et al.* Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples. **Pathologie-biologie**, v. 60, n. 6, p. e75-9, dez. 2012.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

COELHO JÚNIOR, L. G. *et al.* Coinfecção Por Leishmaniose Visceral E Vírus Da Imunodeficiência Humana: Uma Evolução Clínica Desfavorável. **Revista de Patologia Tropical**, v. 45, n. 2, p. 233, 2016.

CORTES, S. *et al.* PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12–17, jan. 2004.

COSTA, L. E. *et al.* Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 14–22, set. 2017.

COSTA, M. M. *et al.* Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1622, 2012.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–6, 2014.

CRUZ, I. *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. SUPPL. 1, p. S185, 2002.

CUPOLILLO, E. *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126–3132, 1 Jul. 2003.

DA COSTA, C. A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 21–25, 1991.

DA COSTA LIMA, M. S. *et al.* Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. 10–15, 2013.

DA SILVA, R. E. *et al.* Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 28 out. 2019.

DE SOUZA, L. M. B. *et al.* Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, 1 dez. 2019.

DHOM-LEMOES, L. *et al.* *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 2019.

DIAS, D. S. *et al.* Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. **Molecular immunology**, v. 91, p. 272–281, nov. 2017.

- DIAS, D. S. *et al.* Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved Leishmania hypothetical protein against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 145, n. 6, p. 740–751, maio 2018a.
- DIAS, D. S. *et al.* Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved Leishmania hypothetical protein. **Parasitology international**, v. 67, n. 3, p. 344–350, jun. 2018b.
- DISCH, J. *et al.* Detection of circulating Leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391–395, jul. 2003.
- EL-AMIN, L. M.; KHALID, K. E.; EL-BADRY, A. A. Risk-free point-of-care visceral leishmaniasis diagnostics: combining buffy coat microscopy and immunoassay in tertiary rural hospitals in Sudan. **Acta Tropica**, v. 211, n. March, p. 1–5, 2020.
- EL SAFI, S. H.; EVANS, D. A. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 334–337, May 1989.
- EVANS, T. G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 2, p. 118–123, 1990.
- FERROGLIO, E. *et al.* Characterization of Leishmania infantum strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 636–641, 2006.
- FRAGA, D. B. M. *et al.* The Rapid Test Based on Leishmania infantum Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2016.
- FREITAS, J. C. C. DE *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012.
- GENARO O. Leishmaniose visceral. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, organizadores. **Parasitologia humana**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 2000. p. 56-72.
- GOMES, Y. M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.
- GUSMÃO, J. D.; BRITO, P. A. DE; LEITE, M. T. DE S. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no norte de Minas Gerais, Brasil, no período de 2007 a 2011. **Revista Baiana Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 615–624, 2014.
- HARITH, A. E. *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 583–586, 1 Jan. 1986.
- HERRERA, G. *et al.* Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 747, ago. 2019.
- HOMMEL, M. *et al.* The micro-elisa technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, n. 3, p. 213–218, 1978.
- HOSSEINI FARASH, B. R. *et al.* The rK39 Antigen from an Iranian Strain of Leishmania

infantum: Detection of Anti-Leishmania Antibodies in Humans and Dogs. **Iranian journal of parasitology**, v. 15, n. 1, p. 48–56, 2020.

HU, X. S. *et al.* Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 4, p. 822–826, ago. 2000.

JAFFE, C. L.; ZALIS, M.; JAFFE, C. L. Use of purified parasite proteins from *leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 6, p. 1212–1220, 1988.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 613–617, 1 Feb. 2001.

LAGE, D. P. *et al.* A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 477–484, 1 jul. 2019.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LAURENTI, M. D. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LIARTE, D. B. *et al.* QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 577–581, 2001.

LINDOSO, J. A. L. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193–201, 2018.

LONGONI, S. S. *et al.* Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 469–476, 2012.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. Use of an instrument of controversial public health policy: Euthanasia of dogs contaminated by leishmaniasis in Brazil. **Saude e Sociedade**, v. 25, n. 1, p. 247–258, 2016.

MACHADO, A. S. *et al.* A *Leishmania infantum* hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 203, p. 105318, mar. 2020a.

MACHADO, A. S. *et al.* A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. **Experimental parasitology**, v. 216, p. 107941, set. 2020b.

MAGALHÃES, F. B. *et al.* Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184867, 2017.

MALAQUIAS, L. C. C. *et al.* Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas

Gerais, Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 233–239, 2007.

MARCILI, A. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis in São Paulo, Brazil, the Most Populous City of South America: Isolation, Molecular Diagnosis, and Phylogenetic Inferences. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 10, p. 768–772, 2020.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99216, 2014a.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 21, n. 7, p. 949–959, jul. 2014b.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

MIRZAEI, A. *et al.* Immunodetection and molecular determination of visceral and cutaneous *Leishmania* infection using patients' urine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 257–268, 1 set. 2018.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Spatial distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 337–340, 2006.

MOHAMMADIHA, A. *et al.* Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 1, p. 89–94, jan. 2013.

MOHAMMED AR, WRIGHT EP, ABDEL RAHMAN AM, KOLK A, LAARMAN JJ, PONDMAN KW. Seroadignosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparision of Elisa-imunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 80:p. 271-274, 1986.

MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–252, 30 Apr. 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

MOTAZEDIAN, M. *et al.* A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 2, p. 151–154, fev. 2008.

NUNES, C. M. *et al.* Testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em estudo longitudinal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 4, p. 402–409, 2015.

NUSSENZWEIG V, NUSSENWEIG RS, ALENCAR JE. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. **O Hospital**, v. 52, p. 47-69, 1957

OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A. *et al.* Evaluation of *Leishmania infantum* pyridoxal kinase

protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 220, p. 11–20, abr. 2020a.

OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A. *et al.* Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, 1 out. 2020b.

OLIVEIRA, G. G. S. *et al.* Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034, dez. 2011.

OMS. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the OMS Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva**. OMS Tech. Rep. P. 949 Ser. 2010.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020.

OZENSOY, S. *et al.* Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 363–369, 1 Sep. 1998.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *et al.* *Leishmania donovani*: Titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 390–393, 1995.

PEDRAS, M. J. *et al.* Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 172–178, 2008.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. v. 107, n. November, p. 951–952, 2012.

PESSOA-E-SILVA, R. *et al.* Evaluation of urine for *Leishmania infantum* DNA detection by real-time quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 131, p. 34–41, 1 dez. 2016.

PESSOA-E-SILVA, R. *et al.* The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. November 2018, p. 9–16, 2019.

PIZZUTO, M. *et al.* Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 357–361, 1 Jan. 2001.

QUIJADA, L. *et al.* Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: Design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 63, n. 3, p. 169–174, out. 1998.

REGO, M. E. O.; JUNIOR, A. G. DE M. Perfil científico e tecnológico do diagnóstico, tratamento e proteção vacinal para leishmaniose visceral / Scientific and technological profile of diagnosis, treatment and vaccine protection for visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 40376–40391, 2021.

REITHINGER, R. *et al.* Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (viannia)* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and**

Hygiene, v. 97, n. 2, p. 141–145, 1 Mar. 2003.

REY, L. O complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral. In.: **Parasitologia. parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES, R. D.; DE SOUZA, R. R.; GOMES, L. R.; DA SILVA JÚNIOR, L. M.; DAHER APRÍGIO DA SILVA, A. L.; MEDEIROS, A. A. Leishmaniose visceral canina - diagnóstico parasitológico: relato de caso. **Veterinária Notícias**, v. 19, n. 1, 19 dez. 2013.

SALLES, B. C. S. *et al.* Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 224, n. 1, p. 163–171, jan. 2019.

SANTARÉM, N. *et al.* Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. **Immunology Letters**, v. 101, n. 1, p. 18–23, 15 out. 2005.

SANTOS, A. R. R. DOS *et al.* Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180405, fev. 2019a.

SANTOS, T. T. O. *et al.* Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: A potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. **Microbial pathogenesis**, v. 137, p. 103783, dez. 2019b.

SANTOS, W. J. T. *et al.* Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008488, jul. 2020a.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. *et al.* Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 82–86, 1 Jul. 2005.

SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, 1 set. 2003.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.;PACHECO, R.S.; FIUZA,V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** .2001; vol.3. p.285-91.

SILVA, R. B. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico 1. **Pesq. Vet. Bras**, v. 36, n. 7, p. 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 111, 24 Mar. 2014.

SOLANO-GALLEGOS, L. *et al.* **Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines** *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 1 Sep. 2017.

SOUZA, A. P. DE. Gingras, Yves (2014), Les dérives de l'évaluation de la recherche. Du bon usage de la bibliométrie. **Revista Crítica de Ciências Sociais**, n. 113, p. 176–179, 1 Sep. 2017.

SOUZA, A. P. *et al.* Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using Leishmania Recombinant Proteins. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66110, 12 jun. 2013.

SOUZA, C. DA S. F. DE; SILVA, V. L.; LABARTHE, N. Evaluation of DPP® and SNAP® Rapid Tests for diagnosis of Leishmania infantum canine infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20190154, jul. 2019.

SREENIVAS, G. *et al.* Nested PCR Assay for Detection of Leishmania donovani in Slit Aspirates from Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1777–1778, 1 Apr. 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, Sep. 2002.

TOZ, S. O. *et al.* Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1484–1486, dez. 2004.

TOZ, S. O. *et al.* A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2205, 2013.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.

VALE, D. L. *et al.* Diagnostic evaluation of the amastin protein from Leishmania infantum in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 95, n. 2, p. 134–143, out. 2019.

VASOO, S.; PRITT, B. S. **Molecular diagnostics and parasitic disease** *Clinics in Laboratory Medicine* Clin Lab Med, , Sep. 2013.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 113–130, 1995.

WERNECK, G. L.; MAGUIRE, J. H. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 633–637, 2002.

ZANETTE, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.

SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico, São Paulo**, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.

World Health Organization Global Health Observatory (GHO) - Neglected tropical diseases. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglecteddiseases/en>. Acesso em: 24/03/2021.