



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

**Padronização de um Teste de Soroaglutinação Rápida em Látex para
Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**

Heitor Cândido de Souza

Novembro, 2014

Patos-PB

S729p

Souza, Heitor Cândido de

Padronização de um Teste de Soroaglutinação rápida em látex para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina/ Heitor Cândido de Souza. – Patos, 2014.

52f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

“Orientação: Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo”.

Referências.

1. Animal Doméstico.
2. Antígeno Recombinante.
3. Nordeste.
4. Prevalência.
5. Calazar. I. Título.

CDU 614

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

**Padronização de um Teste de Soroaglutinação Rápida em Látex para
Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**

Heitor Cândido de Souza
Graduando

Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo
Orientadora

Novembro, 2014

Patos-PB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA

Heitor Cândido de Souza

Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM: / /

MÉDIA:

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo
Examinador I

Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio
Examinador II

Dedico este trabalho a todos os animais que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação acadêmica, mas principalmente para Ponga, Lílca e Flora (minhas gatas de estimação) e Dasha, Negão e Samatha (cães do projeto LVC). Amei-vos muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por dar-me a oportunidade de sempre superar as dificuldades e por colocar pessoas maravilhosas que sempre se dispuseram em ajudar-me. E o retribuo, oferecendo verdadeiramente afeto, amizade, amor, atenção e respeito às pessoas que permitem minha aproximação sem interesses ou desconfianças.

Aos meus pais (Erivan e Júlia) e minhas irmãs (Isabella e Isadora) pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo durante toda a vida.

A minha enorme e tão querida família que sempre se dispuseram a ajudar de alguma forma desde caronas, recepção em suas casas, pelo incentivo financeiro e apoio moral. Um grande sentimento por Tia Marizita e família, Tia Ducineide e família, Tia Idel e família, Tio Artur e família, Tio Martins e família, Tio Kerginaldo e família, Tia Socorrinha e família e Tia Rosilene e família. Sinto-me muito grato por isso. Ao Átylla, por ser meu primo favorito, pelos teus conselhos construtivos e sempre por fazer esforço em permanecer perto, mesmo estando muito longe.

As amigas que sempre estiveram comigo, Letícia Milena, Suhellen, Taís Claudino, Isadora Limaverde, Nayara, Juliana Kaline e Daianna, pela reciprocidade dos sentimentos e por suportarem a saudade e a ausência.

Aos meus amigos do CSB, 3rão Pólos e EJC, lembrando com mais carinho de Jéssica Barreto, Madlene, Beatriz, Letícia, Luan, Thalysson, Aline Dias, Kelma, Mara Lanyce, Laildson, Cira Maria, Alanna e Alinne, por terem estados presentes nos estudos e maratonas pré-vestibulares e nos momentos de alegrias com os resultados alcançados. E a Tia Altina, por me ajudar sempre com carinho enquanto eu estudava e “morava” no Iguatu.

A minha orientadora Prof.^a Marcia Almeida, por permitir ingressar no grupo de pesquisa, por lapidar meus conhecimentos, pela oportunidade de aprendizado e pela paciência.

Aos meus amigos do Laboratório: Dani Luna, Expedito, Gilzane, Laysa, Raizza, Tereza, Werona e as amigas agregadas: Annielle, Marília e Vanessa, pelos conselhos, pelo intenso companheirismo, pelos ensinamentos durante os 4 anos de permanência no grupo, e auxílio nas atividades desenvolvidas. Agradeço infinitamente à Raizza, por ser uma supervisora, “co-orientadora” e amiga tão atenciosa e paciente.

A turma de Formandos 2014.2 pela amizade, pelo auxílio em trabalhos e provas, e pela descontração nos momentos mais difíceis do curso.

A Ivana, Milenna e Rayane, minhas conterrâneas e primeiras companhias em Duck City e aos muitos amigos que conheci nestes 5 anos, em especial para: Arthur e Roberta, Mariana, Túlio, Pretinha (Everlane), Amanda Araújo, Angélica, Jéssica Kária, Larissa Tabosa, Lari Souza, Dayanny, Melissa, Ovídio, Rafael, Júnior França, Manoel, Giulia, Draenne e Thayz pela amizade, por me ajudarem na época inicial ao curso, pela participação no movimento estudantil e por de alguma forma contribuir na melhoria dos dias tediosos.

Aos amigos biólogos e veterinários que conheci durante congressos e viagens, por sempre comutar ideias e conhecimentos e pelas conversas sempre extrovertidas, Atumi, Daniel, Natana e Nildo da UFAL; Helen e Jéssica da UEMA; e ao grupo Glasgow da UFF, Sântila, Tainá, Joylson, Victor, Regina e Beatriz. Sinto saudades de todos.

As melhores amigas do curso, Flaviana que és mais do que uma amiga, mas uma irmã atenciosa, adorável e está sempre me aconselhando da melhor forma; e Elisama, uma amiga que sempre está presente nas situações mais inusitadas, sempre estamos rindo ou chorando juntos, e discutimos, mas nunca perdemos nosso laço forte. Adoro tê-las em minha vida, por ter muito amor e humor envolvido.

Por fim, os melhores amigos, mas nunca serão os menos importantes, à Tavares (Tiago), por sempre oferecer apoio e amizade, até mesmo nas primeiras semanas do curso. Agradeço-te pelos ensinamentos e pelas horas de conversas. Confio muito em você, acredito em seu potencial e sempre estarei torcendo pelo seu sucesso. E à Gian, em que meio parágrafo é muito pouco para descrever nossa amizade. Sempre estamos juntos, apesar de nossas discussões e desentendimentos. Obrigado pelos momentos únicos, pelos conselhos e pela ajuda na época do projeto. Você é um prodígio na veterinária e desejaria muito se eu fosse um pouco como você. Mesmo quando esta fase da nossa vida concluir, aqui haverá sempre uma pessoa que você pode contar. Um abraço fraterno aos meus amigos-irmãos, os amo muito.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Epidemiologia	16
2.2 Agente, Vetor e CicloBiológico	18
2.3 Patogenia	21
2.4 Hospedeiros	22
2.5 Sinais Clínicos	23
2.6 Diagnóstico.....	24
2.6.1 Diagnóstico Clínico e Parasitológico	24
2.6.2 Diagnóstico Sorológico	25
2.6.3 Diagnóstico Molecular	28
2.7 Controle	29
2.8 AntígenosRecombinates	30
2.9 Métodos de Aglutinação.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Local de Atividade	33
3.2 Expressão da proteína recombinante HSP70.....	33
3.3 Dot-Blot.....	33
3.4 SDS-PAGE e Western Blot (WB).....	34
3.5 Sensibilização das pérolas de látex e execução da técnica.....	34
3.6 Soros	35
3.7 Ensaio Imunoenzimático	35
3.8 Análise Estatística.....	36

4.	RESUTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Expressão e Antigenicidade da Proteína Recombinante	37
4.2	Padronização da Soroaglutinação em Látex.....	38
4.3	Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do teste.....	39
5.	CONCLUSÃO.....	43
6.	REFERÊNCIAS	44
7.	ANEXO	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição mundial de áreas endêmicas de leishmaniose visceral (LV).	17
Figura 2.	O vetor (<i>Lutzomyia longipalpis</i>) responsável pela transmissão da leishmaniose visceral.	20
Figura 3.	Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	21
Figura 4.	Teste Imunocromatográfico Dual Path Plataform (DPP®).	27
Figura 5.	Resultado do <i>dot-blot</i> utilizando pool soros positivos e negativos diluídos 1:200, antígeno total e diluído 1:2 até 1:16 e conjugado diluído 1:5000.	37
Figura 6.	Gel de poliacrilamida a 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 das proteínas de <i>E. coli</i> selvagem (DH5 α), <i>L. chagasi</i> e <i>E. coli</i> clonada (HSP70) (10 μ l de proteína por poço).	38
Figura 7.	Resultado do western blot utilizando pool de soros positivos diluídos 1:200, antígeno total e conjugado proteína A peroxidase 1:5000.	38
Figura 8.	Resultado positivo e negativo da SAL.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sororreatividade simultaneamente à soroaglutinação em látex (SAL), amostras testadas na diluição 1:2, e ao ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.	39
Tabela 2 - Sororreatividade simultaneamente à soroaglutinação em látex (SAL), amostras testadas na diluição 1:5, e ao ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.	40
Tabela 3 - Sororreatividade simultaneamente à soroaglutinação em látex (SAL), amostras testadas na diluição 1:8, e ao ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.	40
Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade e valor kappa e suas respectivas concordâncias nas diluições 1:2, 1:5 e 1:8.	41

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência	PM - Peso Molecular
Adquirida	RIFI - Reação de Imunofluorescência
BSA - Soro Albumina Bovina	Indireta
CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças	RNA - cido Ribonucleico
CE - Ceará	rpm - Rotação por minuto
DAT - Teste de Aglutinação Direta	SAL - Soroaglutinação em Látex
DNA - cido Desoxirribonucleico	SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil-sulfato de Sódio
DPP - Dual Path Plataform	TG - Tampão Glicina
EIE-LVC – EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina - Bio-Manguinhos	TMB - Tetrametilbenzidina
ELISA - Ensaio Imunoenzimático	TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
<i>E. coli</i> - <i>Escherichia coli</i>	VN - Verdadeiro-Negativo
FAST - Teste de Triagem de Aglutinação Rápida	VP - Verdadeiro-positivo
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz	WHO - World Health Organization
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana	
HSP - Proteína de Choque Térmico	
IFN- γ - Interferon Gama	
IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactosídeo	
kDa - Quilodltons	
LAT - Teste de Aglutinação em Látex	
<i>L. donovani</i> - <i>Leishmania donovani</i>	
<i>L. chagasi</i> - <i>Leishmania chagasi</i>	
<i>L. infantum</i> - <i>Leishmania infantum</i>	
LPD - Leite em P Desnatado	
LVC - Leishmaniose Visceral Canina	
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade	
PB - Paraíba	
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase	
PE - Pernambuco	
pH - Potencial de Hidrognio	

RESUMO

SOUZA, HEITOR CÂNDIDO. Padronização de um teste de soroaglutinação rápida em látex para diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Patos/PB, UFCG, 2014, 52 pg. (Monografia do Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva).

A leishmaniose é uma doença parasitária, de caráter zoonótico, e por isso de grande importância para a Saúde Pública. Os testes de diagnósticos utilizados pelo Ministério da Saúde apresentavam reações cruzadas e exigia um tempo longo de espera entre a coleta do material, entrega dos resultados e a retirada dos animais positivos, favorecendo a disseminação da doença entre os cães e humanos. O presente trabalho teve como objetivo principal a padronização de um teste de Soroaglutinação Rápida em Látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, baseado na detecção de anticorpos específicos contra a proteína recombinante HSP70 e comparando a eficiência do teste com o kit comercial ELISA S7. Foram coletadas 416 amostras de soro canino e 66 (15,9%) cães foram positivos para LVC pelo teste ELISA S7. Desses foram selecionadas 14 amostras positivas e 13 negativas, confirmadas por PCR. Os soros selecionados foram testados no ensaio de soroaglutinação em látex nas diluições de 1:2, 1:5, 1:8. A sensibilidade e a especificidade do teste foram determinadas pelas três diluições e resultaram respectivamente em: Diluição 1:2, sensibilidade 71,0%, especificidade 69,0% e valor Kappa de 0,4066; Diluição 1:5, sensibilidade 50,0%, especificidade 92,0% e valor Kappa de 0,4162; Diluição 1:8, sensibilidade 57,0%, especificidade 67,0% e valor Kappa de 0,3379. Assim houve uma moderada sororreatividade nas diluições 1:2 e 1:5. Os resultados demonstram que a proteína recombinante HSP70 de *Leishmania chagasi* pode ser utilizada no teste de soroaglutinação em látex por ser antigênica, mas o ensaio necessita de ajustes na sensibilização do látex para melhorar a sensibilidade.

Palavras-chave: animal doméstico; antígeno recombinante; Nordeste; prevalência; calazar

ABSTRACT

SOUZA, HEITOR CÂNDIDO. Standardization of a test serum fast agglutination in latex of for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Patos/PB, UFCG, 2014, 51 pg. (Monograph of the Veterinary Medicine Course, Preventive Veterinary Medicine).

Leishmaniasis is a parasitic disease, zoonotic, and therefore of great importance for public health. The diagnostic tests used by the Ministry of Health showed cross-reactivity and required a long wait time between sample collection, delivery of results and the removal of positive animals, favoring the spread of the disease among dogs and humans. This study aimed to standardize a Rapid Agglutination Test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, based on the detection of specific antibodies against the recombinant protein HSP70 and comparing the test efficiency with the commercial ELISA kit S7. 416 serum samples were collected and 66 (15.9%) dogs were positive for LVC by ELISA S7. From these were selected 14 positive and 13 negative samples, confirmed by PCR. Selected sera were tested in the latex agglutination assay at dilutions of 1:2, 1:5, 1:8. The sensitivity and specificity was determined by those dilutions and the resulted were: 1:2 dilution, sensitivity 71.0%, specificity 69.0% and the Kappa value of 0.4066; 1:5 dilution, sensitivity 50.0%, specificity 92.0% and the Kappa value of 0.4162; 1:8 dilution, sensitivity 57.0%, specificity 67.0% and the Kappa value of 0.3379. Therefore there was a moderate seroreactivity in the dilutions 1:2 and 1:5. The results demonstrate that the recombinant HSP70 protein of *Leishmania chagasi* can be used in latex agglutination test because is antigenic, but requires adjustments in the latex sensitization to enhance sensitivity.

Keywords: domestic animal; recombinant antigen; Northeast; prevalence; kala-azar

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. É uma doença parasitária, de caráter zoonótico e, por isto, de grande importância para a Saúde Pública (AGUIAR et al, 2007). A leishmaniose visceral está presente nos quatro continentes e a Organização Mundial de Saúde a considera uma das sete endemias mundiais mais importantes (WHO, 2013). Por ser uma doença caracterizada pela grande produção de anticorpos devido ao estímulo de linfócitos B policlonais, é indicada a utilização de técnicas sorológicas como forma de diagnósticos (GONTIJO e MELO 2004).

Por muitos anos, o Ministério da Saúde preconizou o diagnóstico de LV canina através de um teste de triagem, a RIFI, e confirmação dos positivos através do ELISA. Os cães positivos pelos dois testes sorológicos deveriam ser eutanasiados. Ambos os testes apresentavam reações cruzada e exigiam um tempo longo de espera entre a coleta do material, entrega dos resultados e a retirada dos animais positivos, favorecendo a disseminação da doença entre os animais e humanos. Em 2001, através da Nota Técnica Conjunta 01/2011, o Ministério da Saúde estabeleceu o teste DPP® para triagem e EIE-LVC como teste confirmatório, produzidos por Bio-Manguinhos. Estes testes tem como antígeno a proteína rK39.

Atualmente, há apenas três kits de diagnóstico que utilizam proteínas recombinantes para diagnóstico da LVC: o DPP®, o EIE-LVC e o ELISA S7®, sendo que apenas o último é comercializado para atendimento da demanda de diagnóstico em laboratórios veterinários particulares ou mesmo para atender os sediados nas universidades.

O presente trabalho teve como objetivo principal a padronização de um teste de Soroaglutinação Rápida em Látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, baseado na detecção de anticorpos contra a proteína recombinante HSP70, e deve agilizar a retirada dos cães positivos do contato com o ambiente, evitando a disseminação da doença entre outros animais e humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

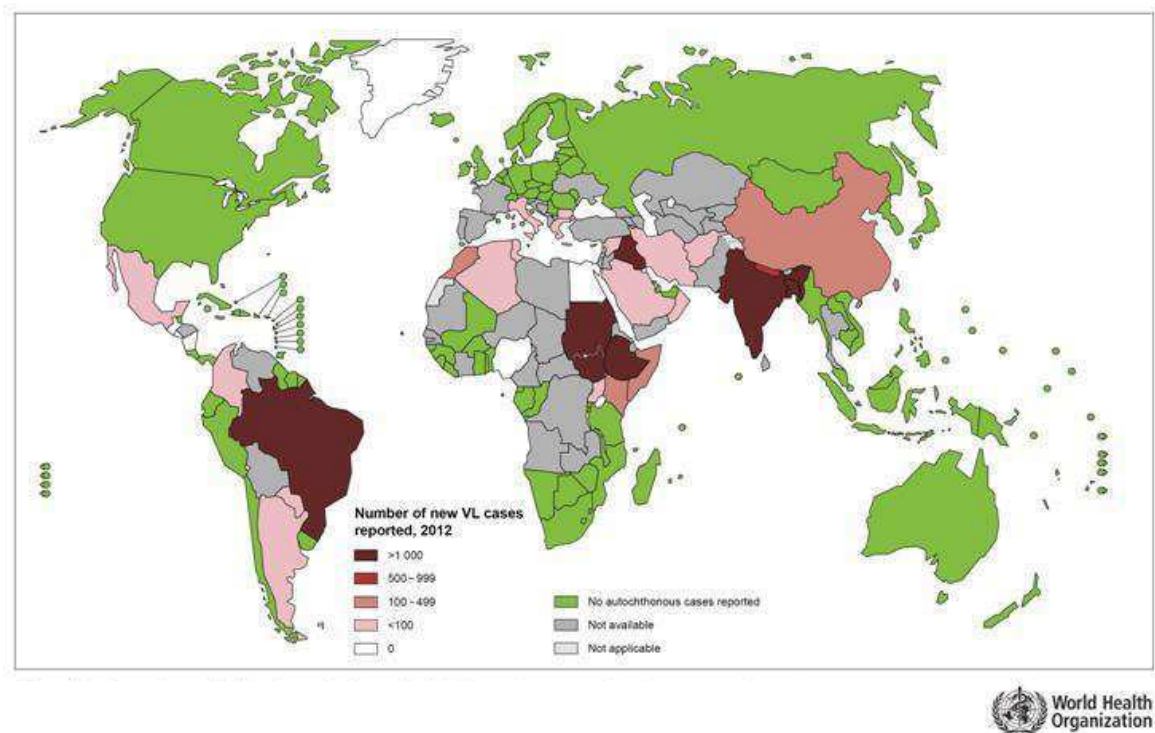
A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. É uma doença parasitária, de caráter zoonótico e, por isso, de grande importância para a Saúde Pública (AGUIAR et al, 2007). Pode apresentar-se nas formas cutânea, mucocutânea e visceral em humanos, canídeos e outros mamíferos (NELSON e COUTO, 2001). No Brasil, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é causada pela *L. chagasi* espécie semelhante à *L. infantum*, encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (RIBEIRO, 1997). É uma doença relacionada com a pobreza associada com desnutrição, debilidade do sistema imunológico e condições precárias de habitação (WHO, 2011a).

As leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas, juntamente com a Dengue, Doença de Chagas, Tuberculose, Esquistossomose, Malária e Hanseníase. Considera-se negligenciada, as doenças fatais ou muito graves, quando as opções de tratamento são ineficazes ou inexistentes no mercado e quando há um déficit de políticas públicas (SÁ, 2006). São doenças de ocorrência predominante em populações mais pobres e vulneráveis, contribuindo para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, principalmente em razão de impactos na saúde infantil, na redução de produtividade da população trabalhadora e na promoção do estigma social (WERNECK et al, 2011). Em rigor, as leishmanioses não mereceriam ter a qualificação de infecções tropicais e nem de doenças de populações marginalizadas, pois não incidem somente na região tropical, mas também um pouco mais ao norte, incluindo países mediterrâneos e regiões desenvolvidas do mundo como a Península Ibérica e a Itália, a Grécia e a Turquia (CAMARGO, 2008).

A leishmaniose visceral está presente nos quatro continentes e a Organização Mundial de Saúde a considera uma das sete endemias mundiais mais importantes, podendo ser classificada como doença de ampla abrangência geográfica. Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV humana ocorrem no mundo a cada ano, sendo que, mais de 90% destes novos casos são relatados em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (SÁ, 2006; WHO, 2013). Há uma população de aproximadamente 360 milhões de pessoas que estejam expostas ao risco de infecção, o que fez desta doença uma

enfermidade de notificação obrigatória em 27 países do Novo Mundo e 67 países do Velho Mundo (AMÓRA, 2004).

Figura 1. Distribuição mundial de áreas endêmicas de LV, 2012.



Fonte: < http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png>.

No Brasil, a LV humana e canina (LVC) continuam em crescimento e a região Nordeste é a que tem a mais alta prevalência (BAVIA et al, 2005). Entretanto, nos últimos anos, as regiões sudeste e norte assumiram uma proporção significativa desses casos. Recentemente ocorreram relatos de LVC no Paraná e no Rio Grande do Sul, anteriormente consideradas áreas livres da doença (JÚNIOR, 2011).

Até 1970, a doença foi considerada essencialmente rural, de transmissão doméstica e peridoméstica. Nos últimos anos, a epidemiologia da leishmaniose visceral vem mudando constantemente ocorrendo uma expansão, tanto em magnitude como geograficamente, tornando-se um grave problema de saúde pública nas áreas urbanas das grandes cidades (CEARÁ, 2012; ALVES et al, 1998). Antigamente, a LV era transmitida em ambientes silvestres e em comunidade rurais, passando posteriormente para as áreas urbanas. As alterações ecológicas e a constante urbanização contribuíram para o progresso rápido e

descontrolado da enfermidade nos grandes e médios centros urbanos do Nordeste brasileiro, infectando desta forma um enorme número de pessoas (ALVES et al, 1998).

Entre os anos de 1990 e 2000, o comportamento epidemiológico da LVC foi cíclico, com elevação dos casos em períodos médios a cada cinco anos, além de uma tendência crescente. Após 2003, alguns trabalhos apontaram que este comportamento poderia estar associado às variações climáticas caracterizadas pelo fenômeno El Nino (CEARÁ, 2012).

Werneck (2010) relatou como aconteceu gradualmente a modificação na epidemiologia entre a década de 80 até os dias atuais.

“O panorama epidemiológico não deixa dúvidas sobre a gravidade da situação e a franca expansão geográfica da LV. De 1980 a 2008, foram notificados mais de 70 mil casos de LV no país, levando mais de 3.800 pessoas à morte. O número médio de casos registrados anualmente cresceu de 1.601 (1985-1989), para 3.630 (2000-2004), estabilizando-se a partir de então. Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da Região Nordeste, mas em 2007, esta cifra chegou a 50% dos casos. Entre os anos de 2006 e 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 Unidades Federadas.”

Na Paraíba, foram registrados 16 casos de leishmaniose visceral em humanos no ano de 2009 e em 2010; este número subiu para 29 notificações, segundo o Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2011a). Em Patos - PB, também foi verificado aumento da prevalência em caninos em inquéritos sorológicos realizados em 2000 e 2010 de 1,4% para 7,2%, respectivamente (PORTO, 2010).

2.2 Agente, Vetor e Ciclo Biológico

Os protozoários flagelados do gênero *Leishmania* são causadores de enfermidades zoonóticas que acometem o sistema fagocítico mononuclear. Por suas características clínicas e epidemiológicas, a enfermidade pode ser classificada como leishmaniose cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (AMÓRA, 2004).

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral estão agrupados no chamado Complexo Donovanii, e são reconhecidas, atualmente, três espécies como agentes etiológicos da doença: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. No Novo Mundo, a *L. chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com leishmaniose visceral (BRASIL, 2003).

Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo, se foi introduzida recentemente, na época da colonização europeia e causada pela espécie *L.*

infantum, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, então devendo a espécie estar sendo classificada como *L. chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos silvestres sugerem a origem autóctone. Entretanto, alguns pesquisadores utilizando técnicas moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (GONTIJO e MELO 2004).

A principal forma de transmissão do protozoário para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de insetos dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. O *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil, conhecido popularmente como mosquito-palha (Fig.1). Recentemente incriminou-se a *Lutzomyia cruzi* como vetor em foco no estado de Mato Grosso do Sul. Admite-se a hipótese da transmissão entre a população canina pelo repasto sanguíneo de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* infectados e transmissão venérea (GONTIJO e MELO 2004; JUNIOR, 2011; RIBEIRO, 1997).

Nas regiões Norte e Nordeste, a *Lutzomyia longipalpis* era encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente, houve a adaptação desse inseto no ambiente rural, a qual foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos. Estes vetores são encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol entre outros ambientes e também no intradomicílio (AMÓRA, 2004).

A infecção do vetor acontece quando a fêmea suga o sangue do mamífero contaminado ingerindo macrófagos, que contém as formas amastigotas (sem flagelo) de *Leishmania* spp. no seu interior. No tubo digestivo do inseto, as amastigotas se reproduzem por divisão binária, transformam-se em promastigotas (flagelada) e estas se multiplicam rapidamente até originarem a forma infectante, as promastigotas metacíclicas (HARHAY et al, 2011).

Há um processo detalhado que auxilia a permanência das leishmanias no vetor díptero, durante a digestão do sangue infectado ingerido pelo flebotomíneo, acontece à formação de uma matriz química, formada principalmente por quitina, conhecida como matriz peritrófica, cuja função é proteger o epitélio intestinal do inseto. Porém, essa matriz peritrófica protege as formas amastigotas do parasita, da ação de enzimas digestivas, por tempo suficiente para que os parasitas se diferenciem em formas mais resistentes, as formas promastigotas (KAMHAWI et al., 2006; PIMENTA et al., 1997). Após resistirem à ação das enzimas, as leishmanias escapam da matriz peritrófica, através da excreção da enzima quitinase, aderem ao epitélio intestinal onde completam o seu ciclo de vida dentro do inseto vetor, se desenvolvendo e se diferenciando até darem origem às formas infectantes (LEHANE et al., 1997).

Vale ressaltar que o crescimento parasitário no vetor só será abundante se, após o repasto sanguíneo infectante, a fêmea vier a alimentar-se de sucos vegetais ou de substâncias açucaradas. Se, em lugar disso, houver novo repasto sanguíneo, por volta do quarto ou quinto dia, os flagelados se degeneram ou a infecção torna-se leve. Assim, será improvável que os parasitos possam ser inoculados em novos hospedeiros pela picada dos insetos (REY, 2008).

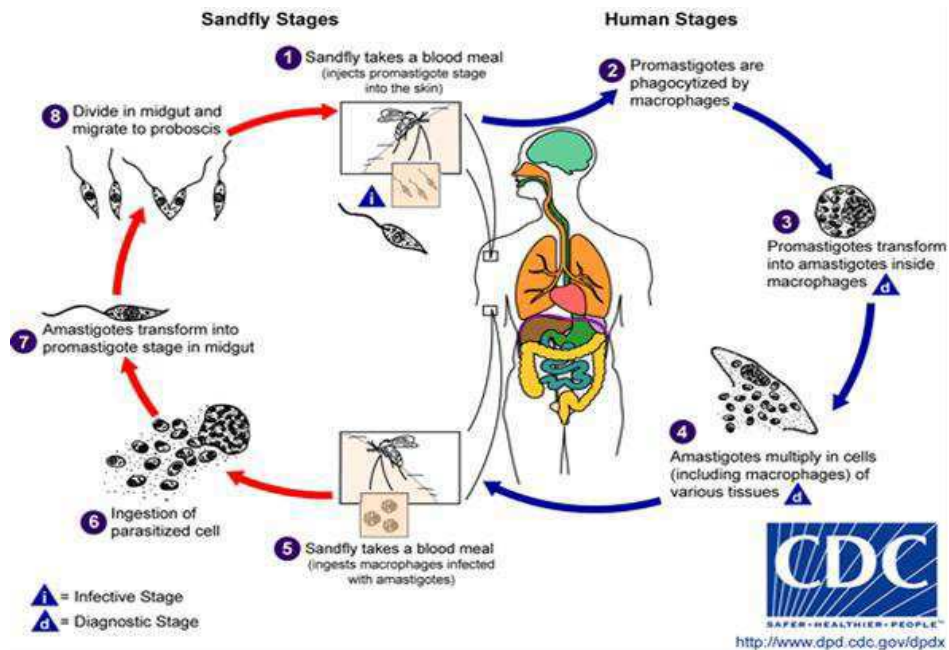
As promastigotas metacíclicas migram para a faringe do flebotomíneo, e alguns dias depois elas atingem o hipostômio, bloqueando a capacidade do inseto de se alimentar. O curso da infecção leva cerca de uma semana, para que assim o flebotomíneo possa ter a condição de infectar um novo hospedeiro. Na próxima vez que o flebótomo picar, injetará certa quantidade de promastigotas infectantes, mas devido à dificuldade de se alimentar, permanecerá faminto, o que o leva a realizar hematofagia mais vezes do que se não estivesse infectado (BOWMAN, 2010).

Através de um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas em um novo hospedeiro junto com a saliva do flebotomíneo. Na epiderme do hospedeiro estas formas são fagocitadas pelos macrófagos e, no interior destes, transformam-se em amastigotas, multiplicando-se até rompê-los, As amastigotas liberadas são fagocitadas por novos macrófagos em um ciclo contínuo e ocorre a disseminação hematogênica para os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (URQUHART et al, 1998; HARHAY et al, 2011).

Figura 2. O vetor (*Lutzomyia longipalpis*) responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral.



Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia_longipalpis-sandfly.jpg>.

Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania spp.*.

1- As formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro; 2- Promastigotas são fagocitadas por macrófagos; 3- Promastigotas se transformam em amastigotas; 4- Amastigotas se replicam em novos macrófagos e em células de vários tecidos; 5- O vetor suga o sangue do hospedeiro com macrófagos infectados pela *Leishmania spp.*; 6- As formas amastigotas são liberadas no tubo digestivo do vetor; 7- Se transformam nas formas promastigotas; 8- Os parasitas se multiplicam intensamente e se transformam na forma infectante (promastigotas metacíclicas).
 Fonte: <www.dpd.cdc.gov/dpdx>

2.3 Patogenia

Após a fagocitose pelos macrófagos, os parasitas ativam múltiplos mecanismos que os fazem resistir à destruição intracelular, dentre eles estão o impedimento da produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, inibição de muitas respostas dos macrófagos às citocinas e supressão da expressão do MHC classe II, eliminando a habilidade de apresentação de antígenos. Tais mecanismos resultam na persistência do agente, desencadeando uma infecção crônica (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al, 2006).

Um aspecto interessante do parasitismo da leishmania é, justamente, atacar a célula que tem a função de proteger o organismo contra seres patogênicos. Poucas espécies conseguem sobreviver no interior dos macrófagos. As leishmanias, entretanto, não só sobrevivem como também se diferenciam e se reproduzem dentro dessas células (CUNHA, 2001).

Quando os cães apresentam resposta mediada por células, com predominância das células T helper tipo 1 (Th1), observa-se um padrão de resistência à infecção mediada por interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas IL-2 e IL-12; fatores com características protetoras em relação à doença, por ativarem macrófagos

responsáveis pela eliminação dos parasitas. O animal permanece saudável ou desenvolve uma infecção branda e autolimitante, pois há prevalência de linfócitos T com destruição intracelular dos parasitas. Em cães susceptíveis, a resposta é predominantemente do tipo humoral, com ativação de linfócitos B, proliferação de linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) e produção de interleucina-4, há uma elevada produção de anticorpos e uma evolução clínica da doença com quadros severos devido à deposição de imunocomplexos (BARBIÉRI, 2006; CARRILLO e MORENO, 2009; CIARAMELLA; CORONA, 2003; MOSMANN e COFFMAN, 1989).

São relatados que em zonas endêmicas, que casos de leishmaniose visceral podem surgir secundariamente a fatores que provocam imunossupressão, como várias parasitoses, infecções, medicamentos e doenças crônicas. Todos esses fatores levam à ruptura do equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita, alterando o tipo de resposta imune que o animal desenvolve (JUNIOR, 2011).

2.4 Hospedeiros

A *Leishmania* é um parasito heteróxico, que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida: um vertebrado mamífero, como (canídeos silvestres, gambás, roedores, cães domésticos e humanos) e o outro invertebrado (SILVA, 2009). Os hospedeiros da leishmaniose se dividem em dois grupos: o primário e o secundário. O hospedeiro primário são os animais silvestres, tais como ratos selvagens, preguiças e tamanduás. O hospedeiro secundário são os animais que convivem diretamente com o homem, e que contribuem para o ciclo da doença humana (CUNHA, 2001).

Os importantes reservatórios ou hospedeiros do agente da Leishmaniose Visceral no Brasil são: o cão (*Canis familiares*) e a raposa (*Lycalopex vetulus*). Mas há ocorrências em outros animais domésticos atípicos como é o caso dos gatos (COSTA et al, 2010), dos equinos e asininos (SOARES, 2012). Existem também relatos indicando mais reservatórios silvestres albergando *Leishmania chagasi* como: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), gambá (*Didelphis albiventris*) (ALVES et al, 1998), preguiça (*Bradypus variegatus*), e tamanduá (*Myrmecophaga tridactyla*) (BAIÃO, 2010).

Nos reservatórios silvestres a infecção tende a ser benigna, tendendo para o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro, sendo que muitas vezes a infecção é inaparente. Estabeleceu-se o conceito de que nestes hospedeiros ocorre um grande equilíbrio por ser uma associação muito antiga entre o parasito e o hospedeiro, enquanto que no caso do homem e de animais

domésticos esta associação é muito mais recente. Neste último caso o parasito aparece como virulento, provocando grandes danos ao hospedeiro e levando até mesmo à morte (FIOCRUZ, 1997).

Desde o início do século 20, durante as primeiras investigações sobre a leishmaniose já se especulava sobre o papel dos felinos domésticos na epidemiologia dessa zoonose, quando casos de leishmaniose felina foram diagnosticados entre outras espécies animais. Assim, investigações epidemiológicas foram realizadas em gatos. Porém, resultados incertos levaram ao abandono desses estudos. No entanto, ao final do século 20, um maior número de casos de leishmaniose felina foi diagnosticado, o que levou a alguns investigadores especular novamente o papel de gatos como reservatórios da leishmaniose em focos endêmicos (AMÓRA, 2004).

2.5 Sinais Clínicos

As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dependem de vários fatores, dentre eles a espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e aspectos relacionados ao hospedeiro, como seu estado imunológico e nutricional (SILVA, 2013).

Na forma visceral, as amastigotas migram para as vísceras, onde passam a serem encontradas dentro de macrófagos residentes nos órgãos, ou raramente, livres nos espaços entre os tecidos. Os órgãos ricos em macrófagos são os mais densamente parasitados, tais como a medula óssea, baço, fígado e linfonodos, embora macrófagos infectados possam ser encontrados em todos os tecidos como sangue, pele, pulmões, rins, testículos e meninges (CUNHA, 2001).

Sabe-se que os sinais clínicos da leishmaniose estão relacionados com a resposta imune do hospedeiro, podendo ser assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. A LVC pode apresentar-se com uma gama variada de sinais clínicos, desde uma simples alteração de pele até uma infecção generalizada. A sintomatologia inclui linfadenopatia generalizada, perda de pelos ao redor dos olhos, nariz, boca e orelhas; lesões de pele com ou sem descamações e às vezes úlceras; perda de apetite ocasionando depressão e emagrecimento progressivo; onicogrifose; febre, distúrbios de coagulação, lesões renais, hepáticas e oculares por deposição de imunocomplexos (AGUIAR et al, 2007; CIARAMELLA e CORONA, 2003; SILVA, 2007). Devido a esta variedade de sinais e sintomas nos cães, o diagnóstico clínico pode ser confundido com outras enfermidades.

Os responsáveis pela grande variedade de sinais clínicos presentes na LVC são os complexos imunes que se depositam em vários órgãos e tecidos dos vertebrados, como pele, vasos sanguíneos, tecidos oculares e em várias articulações, o que conduz ao aparecimento de diversos sintomas, como úlceras cutâneas e das pontas das orelhas, epistaxe, uveíte, conjuntivite e episclerite imunomediada e claudicação por poliartrite (CIARAMELLA e CORONA, 2003; JUNIOR, 2011).

A LV é comumente fatal quando não tratada, especialmente nos grupos mais susceptíveis descritos anteriormente. Assim, o diagnóstico e tratamento precoce da doença são de extrema importância para a redução das taxas de letalidade e do grau de morbidade da doença. (CHAPPUIS et al. 2007 apud, WHO, 2011b).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da LV humana e canina se faz necessário por se tratar de uma doença que pode ser fatal para o ser humano, se não tratada corretamente, e por ser imprescindível à adoção de medidas de controle específicas sobre o reservatório doméstico, o cão, incluindo seu sacrifício quando este é diagnosticado positivo (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

2.6.1 Diagnóstico Clínico e Parasitológico

Muitas doenças clínicas podem ser confundidas com a leishmaniose visceral, destacando-se, a esquistossomose, brucelose, erliquiose, anaplasiose, malária, doença de Chagas, toxoplasmose, babesiose, tuberculose e giardíase. Em humanos, pode haver divergências clínicas ainda entre: leucemia, linfoma, histoplasmose, endocardite, sarcoidose, AIDS/HIV. Em muitas situações, esse diagnóstico diferencial só pode ser concluído por provas laboratoriais, já que as áreas endêmicas se superpõem em grandes faixas do território brasileiro (BAIÃO, 2012; BRASIL, 2010).

Normalmente o diagnóstico é realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. No entanto, para um diagnóstico definitivo é necessário à complementação por exames laboratoriais, especialmente parasitológicos que exigem a demonstração dos parasitos (SILVA, 2013). O diagnóstico parasitológico é necessário para a confirmação da doença e se dá através do isolamento e da identificação do parasita a partir de biópsias

(linfonodo, fígado, baço e aspirado de medula óssea). Esfregaços do material da biópsia são corados com Giemsa e examinados microscopicamente, podendo também, o material ser cultivado em meios apropriados a 22-26 °C ou inoculados em animais de laboratórios (OIE, 2008).

A especificidade desses métodos parasitológicos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, em torno de 60% a 85%, em punção de medula óssea, e 95% em punção esplênica. Essas duas punções são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, portanto não são consideradas adequadas para estudos epidemiológicos em larga escala (DOURADO, 2007).

2.6.2 Diagnósticos Sorológicos

Por a leishmaniose visceral ser uma doença caracterizada pela grande produção de anticorpos, devido ao estímulo de linfócitos B policlonais, é indicado a utilização de técnicas sorológicas para o seu diagnóstico, evitando os métodos parasitológicos, que são invasivos e levam riscos aos pacientes (GONTIJO e MELO, 2004). Dentre as sorologias preconizadas pelo Ministério da Saúde estão: o Teste Imunocromatográfico Rápido (DPP) para triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA-indireto) como confirmatório (BRASIL, 2011b). Outros testes sorológicos, como o teste de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos, também são empregados, só que em menor frequência.

A RIFI era o teste de eleição utilizado em inquéritos epidemiológicos pelo Ministério da Saúde. O resultado é considerado positivo quando a amostra possui título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40 (GONTIJO e MELO, 2004). É uma técnica que exige pessoal treinado, mas por outro lado, reúne uma série de vantagens, como fácil execução, rapidez no resultado e custo baixo. A sensibilidade varia de 90-100% e a especificidade fica em torno de 80% para amostras de soro (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

O ELISA possibilita a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo, sendo um teste mais rápido e de fácil execução quando comparado com a RIFI. Detecta baixos títulos de anticorpos, porém pouco acurado na identificação de casos assintomáticos (EL-AMIN et al., 1986). Existem algumas variações de ELISA, que surgiram a partir da necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, como Dot-ELISA, fucose manose ligante-ELISA, bovine submaxillary mucin-ELISA, Fast-ELISA, entre outras (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

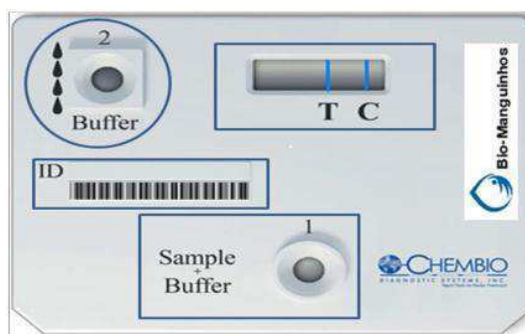
Na técnica de ELISA, as proteínas do parasito são aderidas em placas de poliestireno e os soros a serem testados são adicionados às placas para a formação de complexos imunes. As ligações antígeno-anticorpo, que serão revelados por uma solução contendo uma enzima, capaz de produzir reação colorida quando se adiciona ao substrato adequado (CUNHA, 2001).

Na última década, o DAT tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. Esta técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno, apresenta ponto de corte variável. As diluições utilizadas partem de 1:400 e sua leitura é feita em 12 a 18 horas. Uma variação do DAT, o FAST (*Fast Agglutination Screening Test*), vem sendo testado para aplicação em episódios epidêmicos e para inquéritos populacionais. Este utiliza uma única diluição de soro (1:100) e uma concentração de Antígeno quatro vezes superior à do DAT (2 x 10⁸ promastigotas/mL versus 5 x 10⁷ promastigotas/mL), realiza-se a sua leitura em 2 a 4 horas. Apresenta sensibilidade de 90% a 100% e especificidade de 80% a 100% (SOUZA, 2009; DIETZE, 2005).

Estes dois testes têm como vantagem não necessitarem de refrigeração para armazenagem e possuem possibilidades de utilização em áreas com pouca infraestrutura laboratorial. Os testes de aglutinação direta, DATTM e FASTTM, utilizam como antígeno formas promastigotas de *L. donovani* e são produzidos pela empresa KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen) da Holanda (SOUZA, 2009; DIETZE, 2005).

O teste imunocromatográfico DPP® (Bio-Manguinhos®) é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26). Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*). A presença de anticorpos anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado à reatividade com outros tripanossomatídeos (BISUGO et al., 2007; FARIA e ANDRADE, 2012).

Figura 4. Teste imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®).



Fonte: JÚNIOR, 2011.

Esse teste imunocromatográfico tinha uma perspectiva bastante promissora, mas na validação de Júnior (2011) realizada no Estado do Ceará, o DPP® apresentou os seguintes índices:

“O DPP® sobre o total das amostras, independente de sinais, mostrou sensibilidade de 56,1% e especificidade de 100% quando comparado ao IFI®. Quando o DPP® foi usado no diagnóstico de cães assintomáticos, a sensibilidade foi de 12% e a especificidade de 100%. Examinando cães oligossintomáticos, a sensibilidade foi de 52,4% e especificidade de 100%. Para cães sintomáticos, a sensibilidade e a especificidade do DPP® foram de 88,9% e 100%, respectivamente.”

O Western Blot é outra técnica sorológica utilizada para determinar a quantidade relativa e o peso molecular de uma proteína dentro de uma mistura de proteínas ou de outras moléculas. A mistura é primeiramente submetida a uma separação analítica, geralmente por SDS-PAGE, de modo que as posições finais das diferentes proteínas no gel sejam uma função do tamanho molecular. O espectro de proteínas separadas é, então, transferido do gel de separação de poliácridamida para uma membrana de suporte, por ação de capilaridade ou por eletroforese, de forma que a membrana adquira uma réplica do espectro das macromoléculas separadas presentes no gel. A sensibilidade e a especificidade dessa técnica podem ser aumentadas caso ela seja iniciada com proteínas imunoprecipitadas, em vez de proteínas brutas. Essa técnica sequencial é particularmente útil para a detecção de interações entre proteínas (ABBAS, 2008).

Para visualizar a ligação antígeno-anticorpo, adiciona-se um substrato específico que, sob a ação da enzima, origina um precipitado colorido. A revelação produz uma série de traços ou bandas na membrana de nitrocelulose que correspondem às proteínas imunogênicas reativas com o soro utilizado. Um padrão de peso molecular permite a identificação de cada

antígeno e o conjunto de bandas e seus pesos caracterizam um padrão imunológico, ou perfil, específico para cada parasita frente ao soro analisado. O Western Blot é capaz, portanto, de distinguir entre reatividade cruzada e um resultado específico para a doença (CUNHA, 2001).

Os resultados dos testes sorológicos se agrupam em quatro categorias, que são de acordo com a existência ou não da doença e a positividade ou não do teste. Soros com resultados positivos ao teste e provenientes de pacientes nos quais o diagnóstico correto era positivo, denominam-se verdadeiro-positivos. Soros com resultados negativos obtidos de controles normais são chamados verdadeiro-negativos. Soros com resultados negativos provenientes de pacientes infectados são denominados falso-negativos e aqueles com resultado positivo ao teste sorológico, porém obtidos de controles normais, são os falso-positivos (MOLINARO et al, 2010).

Apesar dos testes sorológicos serem realizados em larga escala para triagem em cães, estes apresentam limitações podendo gerar falso-positivos devido à reatividade cruzada ou a coinfeção com outras enfermidades (FERREIRA, 2012). O reconhecimento de reações cruzadas entre diferentes infecções nos diagnósticos sorológicos é clássico e é muito importante considerar o diagnóstico diferencial da Leishmaniose Visceral, pois os antígenos utilizados nos diagnósticos sorológicos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis, que apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae e outros micro-organismos, prejudicando na interpretação dos resultados (LUCIANO et al, 2009; CORDEIRO, 2009).

Os resultados da sorologia devem ser analisados com critério, visto que os baixos títulos podem levar a falso-negativos e, principalmente, os falso-positivos por reações cruzadas. Diagnósticos sorológicos para LVC realizados em cães apresentam reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* spp., *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. No ser humano, pode haver reações cruzadas com as seguintes enfermidades: doença de Chagas, malária, hanseníase, tuberculose, febre tifoide, pênfigo foliáceo sul-americano, blastomicose sul-americana, esporotricose, esquistossomose e outras leishmanioses (SOARES, 2012; OLIVEIRA et al, 2008; BAIÃO, 2010).

2.6.3 Diagnóstico Molecular

Praticamente qualquer microrganismo pode ser pesquisado pela técnica da PCR. Agentes como vírus, bactérias, fungos e protozoários podem ser identificados nos mais diferentes tipos de amostras e líquidos biológicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é

uma técnica razoavelmente rápida, com elevado grau de sensibilidade e especificidade, utilizando quantidades mínimas de DNA ou RNA. Para esta reação são necessárias algumas enzimas como a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação de uma região específica do ácido nucleico pesquisado, nucleotídeos, dentre outros reagentes, além de equipamentos, como o termociclador (MOLINARO et al, 2010). O método consiste na extração do DNA contido na amostra, na maioria das vezes em biópsias, e a amplificação específica de segmentos gênicos do parasito, direcionada por pares de primers complementares ao DNA do mesmo. Este teste pode ser utilizado também na determinação da espécie envolvida (TANNUS et al, 2007).

Segundo Iniesta et al (2002), apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, ao redor de 100%, não se indica para o uso em inquéritos epidemiológicos devido ao seu alto custo e necessidade de pessoal treinado, sendo bastante utilizado como ferramenta de controle no pós-tratamento, já que a sorologia positiva pode permanecer durante vários anos após a resolução da doença. A PCR também tem se mostrado eficiente quando se deseja distinguir portadores assintomáticos dos não infectados.

A PCR quando aplicada ao diagnóstico da LVC, visa à amplificação de fragmentos de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* e apresenta sensibilidade variável de 70-100% e especificidade em torno de 95-100%. Entretanto, sua sensibilidade e especificidade estão relacionadas a diversos fatores como os iniciadores utilizados, número de ciclos, métodos de extração e escolha dos tecidos para realização da técnica e, portanto, ainda são necessários mais estudos sobre esta técnica de modo a facilitar sua aplicação na rotina laboratorial (KER, 2012).

2.7 Controle

As características epidemiológicas e o conhecimento insuficiente sobre os elementos que compõe a cadeia de transmissão da LV fazem com que as estratégias de controle desta doença sejam pouco efetivas. Atualmente essas estratégias se baseiam no diagnóstico e tratamento precoce dos doentes, redução da população de flebotomíneos através do uso de inseticidas nas casas, eliminação dos cães soropositivos e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006).

O controle do reservatório canino tem sido um dos temas mais controversos quanto a sua contribuição na redução da incidência da LV em humanos e cães. A ineficiência dessas

ações é atribuída à baixa sensibilidade do teste de imunofluorescência indireta, agravada pelo antigo uso de papel filtro na colheita de sangue nos inquéritos sorológicos caninos, demora no retorno dos resultados, atrasando a retirada dos cães (eutanásia) com sorologia positiva, reposição dos cães eutanasiados no âmbito das ações de controle, ausência de técnica que avalie *in locu* a infectividade dos cães em inquéritos caninos (JULIÃO et al., 2007).

Para o sucesso das ações de controle da LV, a vigilância deve abranger todos os elementos da cadeia de transmissão. Para tanto, é fundamental que haja um permanente controle sobre a população canina, com a realização de inquéritos sorológicos de frequência e abrangência compatível com a classificação epidemiológica do município (SILVA, 2005).

Além disso, são requeridas melhorias na resolutividade diagnóstica dos municípios, com capacitação dos profissionais de saúde e apoio logístico, essencial para o diagnóstico precoce dos casos humanos. Por fim, destaca-se o controle entomológico, com a identificação da distribuição e da densidade vetorial em diferentes áreas, direcionando a aplicação de inseticidas de efeito residual no ambiente domiciliar e em seus anexos, tais como galinheiros, chiqueiros, currais e outros (SILVA, 2005).

2.8 Antígenos Recombinantes

A identificação de antígenos recombinantes ou purificados tem contribuído para melhorar a sensibilidade e a especificidade dos métodos sorológicos, diminuindo as reações inespecíficas, pois detecta anticorpos específicos nos testes sorológicos (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Vários antígenos recombinantes já foram identificados com potencial para o desenvolvimento de testes sorodiagnósticos para o calazar, porém apenas a rK39, que é um fragmento da quinesina K39, e a S7, que representa um fragmento da HSP70 de *L. chagasi* chegaram ao mercado (CORDEIRO, 2009).

Campos (2007) descreveu as proteínas antigênicas existentes com potencial uso no controle e profilaxia das leishmanioses:

“A partir de abordagens moleculares como o rastreamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* com soros de animais e de humanos infectados, diferentes moléculas antigênicas foram identificadas. Algumas dessas moléculas são antígenos proteicos, lipídicos e/ou glicídicos como, por exemplo, a GP63, a LACK, o LPG, a GP46/M-2, a D13 ou p80, a K9 e a K26, a proteína de leishmania homóloga à proteína ribossomal eucariótica – LeiF (do inglês “Leishmanial eucaryotic ribossomal protein”), as cisteínas proteinases (CPa e CPb), as HASPs, a proteína antioxidante específica de tiol – TSA (do inglês “Thiol-

Specific Antioxidant protein”), a proteína induzível por estresse e temperatura – STI1 (do inglês, “Stress and Temperature Inducible proteine aquelas estágio–específicas como a proteína A2 específica de amastigota. Cada uma dessas moléculas antigênicas tem características particulares que as tornam capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro.”

As proteínas de choque térmico formam um grupo proteico de elevado interesse para estudos de diferentes doenças infecciosas. São as mais abundantes proteínas intracelulares e estão presentes em todos os compartimentos celulares (núcleo, mitocôndria, cloroplasto, retículo endoplasmático, citoplasma) de todos os tipos celulares, procaríotos e eucariotos (CAMPOS, 2007).

As proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins – HSP) atuam no dobramento, transporte e secreção de proteínas recém-sintetizadas, bem como na montagem e dissociação de complexos multiprotéicos (KIANG e TSOKOS, 1998) e são expressas durante a diferenciação de diversos parasitas, no estresse provocado no momento em que o mesmo se instala no vetor ou quando é exposto ao aumento de temperatura após inoculação nos hospedeiros vertebrados (FEDER e HOFMAN, 1999).

As HSP70s de *Leishmania* spp. possuem um alto poder de estimulação da resposta imune, já que podem sinalizar ao sistema imunológico a infecção, logo, são potentes antígenos indutores da produção de anticorpos específicos para o diagnóstico em pacientes infectados (BLACKWELL, 1992; COSTA et al, 1999).

Ao usar a proteína recombinante representando a parte carboxi-terminal da HSP70 como antígeno para o teste de ELISA, não foi observada reação cruzada com *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*. Para a HSP70, a região mais divergente está localizada na região carboxi-terminal, desta forma, as reações cruzadas com outros organismos devem ocorrer devido à epitopos conservados da região amino-terminal (ANDRADE e ANDRADE, 1996).

2.8 Métodos de Aglutinação

O emprego de aglutinação de partículas de poliestireno sensibilizadas com antígeno específico tem facilitado o diagnóstico de algumas doenças infecciosas (CORDEIRO, 2009). Cummins et al (1994) desenvolveram a partir de antígenos de *Leishmania infantum*, um ensaio de aglutinação de látex para o sorodiagnóstico do calazar humano, e o aplicaram na África, com bons resultados. Empregando o mesmo protocolo, Bagchi et al (1998) e Moody e

El-Safi (1996) obtiveram resultados satisfatórios no sorodiagnóstico humano na Índia e no Sudão. Dereure et al (1998) empregaram a mesma técnica para o diagnóstico do calazar canino na França, com elevada sensibilidade e especificidade.

Attar et al (2001) desenvolveram um teste de aglutinação rápida, o KAtex, que detecta antígeno de *Leishmania* na urina de humanos através de látex ligado a uma IgG anti-promastigota produzida em coelho, mostrando 100% de especificidade e 68-100% de sensibilidade, usando urina coletada de casos confirmados e controles do Brasil, Yêmen e Nepal. Posteriormente, o KAtex foi empregado em vários outros estudos demonstrando, no geral, uma boa sensibilidade e especificidade (EL-SAFI et al, 2003; SUNDAR et al, 2005). O antígeno de urina detectado pelo KAtex para o diagnóstico da LV é o rK39 (CHAPPUIS et al, 2006). A principal desvantagem são os resultados falso-positivos que pode ser diminuída pela fervura da amostra de urina por 5 minutos antes do teste (HATAM et al, 2009).

Mais recentemente, Akhouni et al (2013) formularam um teste de aglutinação em látex (LAT) para a detecção rápida de anticorpos anti-*Leishmania* contra o antígeno A2 derivado da forma amastigota, bem como aqueles contra antígenos brutos derivados da forma promastigota de uma cepa iraniana de *Leishmania infantum*, que apresentou elevada sensibilidade e especificidade, e um bom grau de concordância entre o LAT e DAT, tanto no diagnóstico humano quanto no canino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Atividade

Os testes sorológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos - PB.

3.2 Expressão da Proteína Recombinante HSP70

O gene que codifica a fração carboxi-terminal da proteína HSP70 foi clonado no plasmídeo p-bluescript com posterior transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5 α .

A bactéria transformada foi cultivada em meio Luria Bertani (LB) por 18 horas, com ampicilina (concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pois o plasmídeo possui resistência a esse antibiótico. Após esse período, para induzir a expressão da proteína, foi adicionado ao meio IPTG 0,5M (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) um análogo da lactose que inativa o repressor lacZ, induzindo a transcrição do operon lac.

3.3 Dot-Blot

Uma amostra de 1,0 mL dos cultivos bacterianos foi centrifugado a 5000 rpm por cinco minutos, com posterior descarte do sobrenadante e o pellet foi lavado com TBS 1X e repetida a centrifugação.

Foram utilizadas membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μm cortadas em tiras e adsorvidas com antígeno total de *E. coli* clonada (HSP70) e selvagem (DH5 α) em tampão de lise (duas tiras para cada antígeno).

Após secagem por 15 minutos a temperatura ambiente, as fitas foram lavadas por cinco minutos com TBS, pH 7,4 e bloqueadas com solução de bloqueio (TBS-T 0,1% [TBS pH 7,4, 0,1% Tween 20(v/v)], 5% de leite em pó desnatado [LPD] (p/v)) por 30 minutos à 37°C. Posteriormente, as tiras foram lavadas três vezes em TBS-T 0,1% por cinco minutos e imersas em um pool de soros positivos e negativos, diluídos 1:200 em solução de imunoabsorção, incubados a 37°C durante 45 minutos. Repetida a etapa de lavagem, o conjugado proteína A peroxidase foi diluído 1/5000 e distribuído nas tiras e incubadas como descrito anteriormente.

Em seguida, as tiras foram lavadas cinco vezes por cinco minutos e depois imersas no substrato (3'-3'-5'-5'-Tetrametilbenzidina, tampão citrato pH 5.0 e água oxigenada). Após a revelação, a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.4 SDS-PAGE e Western Blot (WB)

A separação das proteínas bacterianas foi obtida por SDS-PAGE a 12%. Para estimar o peso molecular das proteínas, foi utilizado marcador de peso molecular (14,4 a 212 kDa) e a transferência para membranas de nitrocelulose realizada pelo sistema semiúmido (AUSUBEL, 2002).

Para avaliação da expressão da proteína, antes da sensibilização das pérolas de látex, foi realizado à técnica de Western Blot (WB). As condições para realização do WB foram determinadas a partir do dot-blot. Para a realização da reação foi acrescentado o antígeno total da *Leishmania chagasi* provenientes de meios de cultivo e então foi seguido o mesmo protocolo do dot-blot, como descrito anteriormente.

3.5 Sensibilização das Pérolas de Látex e execução da técnica

O protocolo para sensibilização do látex foi de acordo com Dereure et al. (1998). Pérolas de látex de 1,0 µm de diâmetro¹, fornecidas em suspensão a 2,6%, foram diluídas com Tampão Glicina (TG) (pH 8,2) para ficar na concentração de 1% e então centrifugado a 4500 rpm por 10 minutos e descartado o sobrenadante.

Foram adicionados 2,5 mL do antígeno (sonicado de *E. coli* expressando a proteína recombinante HSP70) para cada 500 µL do látex centrifugado, homogeneizados e mantido em banho-maria à 37°C por três horas com agitação intermitente, com a finalidade de recobrir as pérolas de látex com a proteína. Em seguida, o látex sensibilizado foi centrifugado e lavado com TG para retirar o excesso de proteína. O látex foi ressuspensão em TG para volume final de 1 mL para cada 500µL inicial de látex. Foram adicionados 0,001g de soro albumina bovina por litro, com o fim de saturar os locais não revestidos pelo antígeno e bloquear a reação. Utilizou-se azida sódica 0.1g para conservação do látex sensibilizado que foi mantido refrigerado a 4°C.

¹ Polybead® Carboxylate Red Dyed Microspheres 1.00µm. Polysciences, Inc.

No momento da realização do teste, o material foi deixado previamente em temperatura ambiente, 10 µL de látex sensibilizado e 10 µL de soro diluído e adsorvido foram pipetados em placa de vidro (limpa e desengordurada) e homogeneizados por até 5 minutos em movimentos circulares e, posteriormente foi realizada a leitura. A cada série de reações utilizava-se um controle negativo, para justamente distinguir reações não reagentes das reagentes. O avaliador teve apenas 3 minutos para avaliar cada amostra, após estas serem homogeneizadas, assim evitar o ressecamento do conteúdo e o aparecimento de aglutinação inespecífica tardia. O soro que apresentou grumos em qualquer intensidade foi considerado positivo e o que permaneceu homogêneo foi considerado negativo para calazar canino. O surgimento de reações duvidosas na amostra foi considerado como diagnóstico negativo.

3.6 Soros

A fim de montar um banco de soros e conseguir soros positivos e negativos para padronização do teste de soroaglutinação em látex (SAL) foram coletadas e testadas no ELISA-S7, 416 amostras de soro de cães domiciliados provenientes dos municípios de Aroeiras - PB, Brejo do Cruz - PB, Patos - PB, Santa Teresinha - PB, São José de Espinharas - PB e Icó - CE. Todos os soros testados foram adsorvidos com sonicação de *E. coli* DH5α nas diluições 1:2, 1:5 e 1:8, objetivando neutralizar os anticorpos anti- *E. coli*. A adsorção foi realizada por 4 horas a temperatura ambiente ou 12 horas a 4° C.

3.7 Ensaio Imunoenzimático.

O teste ouro utilizado foi o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), que é baseado no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico.

O kit empregado foi o ELISA S7 recombinante®, que usa a proteína HSP70 recombinante e autorizado pelo Ministério da Agricultura para diagnóstico do calazar canino, com protocolo realizado de acordo com as instruções do fabricante (Biogene Ind. Com. Ltda, Recife, PE).

3.8 Análise Estatística

Para calcular a especificidade, sensibilidade e o valor kappa, do Teste de Soroaglutinação em Látex comparado com o ELISA S7 foi utilizado o programa gratuito DAG_Stat (http://www.biostats.com.au/DAG_Stat/).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e Antigenicidade da Proteína Recombinante

Através do Dot blot (Figura 5), observa-se a funcionalidade do protocolo, a antigenicidade da região carboxi-terminal da HSP70 e a eficiência da adsorção dos soros, visto que não houve reação com DH5 α , posteriormente comprovado no WB (Figura 7). Através do WB, verificou-se que a proteína recombinante é bastante antigênica, sendo reconhecida pelo pool dos soros de cães positivos para calazar.

Figura 5. Resultado do *dot-blot* utilizando pool soros positivos e negativos diluídos 1:200, antígeno total e diluído 1:2 até 1:16 e conjugado diluído 1:5000.



A expressão de uma proteína heteróloga a partir de um segmento de gene clonado num plasmídeo pode frequentemente ser identificada pela análise das bandas proteicas obtidas por eletroforese em gel de SDS poliacrilamida. Uma expressão perceptível do gene clonado pode ser vista como uma banda intensa, inexistente na bactéria sem o plasmídeo, e com o peso molecular (PM) esperado pela construção recombinante. Com isso, através da coloração do gel por Coomassie Brilliant Blue foi possível verificar que houve expressão do gene correspondente à região carboxi-terminal da HSP70 com um peso molecular entre 66,2 e 97,4 kDa (Figura 6).

Figura 6. Gel de poliacrilamida a 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 das proteínas de *E. coli* selvagem (DH5 α), *L. chagasi* e *E. coli* clonada (HSP70) (10 μ l de proteína por poço). O peso molecular (PM) está indicado em kDa.

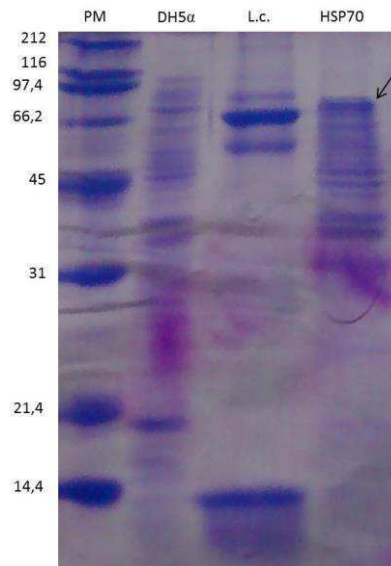
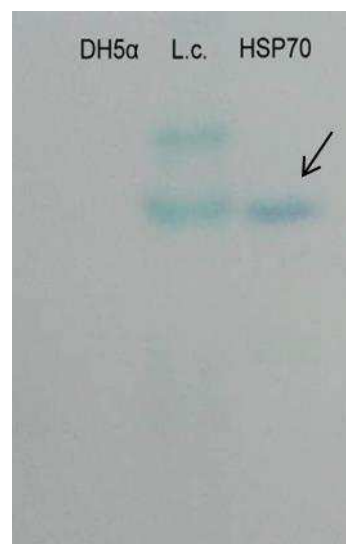


Figura 7. Resultado do western blot utilizando pool de soros positivos diluídos 1:200, antígeno total e conjugado proteína A Peroxidase 1:5000. Seta: banda antigênica da HSP70.

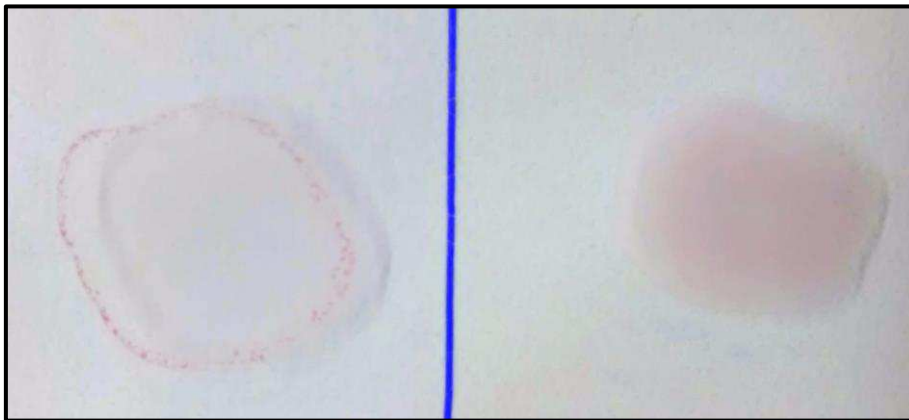


4.2 Padronização da Soroaglutinação em Látex

Foram selecionadas 14 amostras positivas e 13 negativas de 416 amostras testadas pelo ELISA S7 e confirmadas posteriormente por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os soros selecionados foram testados no SAL nas diluições de 1:2, 1:5, 1:8. Não foi possível

incluir os soros não diluídos no teste, pois o antígeno não é purificado e a amostra devia estar adsorvida para evitar que anticorpos anti-*E. coli* aglutinem o látex sensibilizado com o sonicado de HSP70 recombinante. Na figura 8, observa-se a aglutinação em um soro positivo pelo ELISA S7® e a ausência de aglutinação em um soro negativo pelo mesmo ensaio.

Figura 8. Resultado positivo e negativo da SAL.



4.3 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do teste

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram os resultados do SAL e do ELISA S7® quando os soros foram diluídos 1/2, 1/5 e 1/8, respectivamente. Na diluição 1/2, ocorreram 10 verdadeiro-positivos (VP) e 9 verdadeiro-negativos (VN); na diluição 1/5, 7 VP e 12 VN e na 1/8, obteve-se 8 VP e 10 VN.

Tabela 1. Resultado da Soroaglutinação em látex (SAL) nas amostras diluídas 1:2 e do Ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

		SAL - Diluição 1/2		Total
		Reagente (%)	Não Reagente (%)	
ELISA S7	Positivo	10 (71,42%)	4 (28,58%)	14
	Negativo	4 (30,76%)	9 (69,24%)	13
Total		14	13	27

Tabela 2. Resultado da Soroaglutinação em látex (SAL) nas amostras diluídas 1:5 e do Ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

		SAL - Diluição 1/5		Total
		Reagente (%)	Não Reagente (%)	
ELISA S7	Positivo	7 (50%)	7 (50%)	14
	Negativo	1 (7,70%)	12 (92,30%)	13
Total		8	19	27

Tabela 3. Resultado da Soroaglutinação em látex (SAL) nas amostras diluídas 1:8 e do Ensaio imunoenzimático (ELISA S7) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

		SAL - Diluição 1/8		Total
		Reagente (%)	Não Reagente (%)	
ELISA S7	Positivo	8 (57,14%)	6 (42,86%)	14
	Negativo	3 (23,07%)	10 (76,93%)	13
Total		11	16	27

A determinação da sensibilidade implica na probabilidade de que o ensaio será positivo quando a infecção está presente e a especificidade quando a probabilidade de que o ensaio será negativo quando a infecção está ausente.

Quando os resultados foram analisados pelo programa DAG_Stat, as sensibilidades e especificidades do teste de aglutinação em látex nas diferentes diluições foram: na diluição 1:2, a sensibilidades foi de 71,0% (95% CI: 0,42 - 0,92) e especificidade de 69,0% (95% CI: 0,39 - 0,91); Na diluição 1:5, a sensibilidades foi de 50,0% (95% CI 0,23 - 0,77) e especificidade de 92,0% (95% CI: 0,64 - 1,00); Na diluição 1:8, a sensibilidades foi de 57,0% (95% CI 0,29 - 0,82) e especificidade de 67,0% (95% CI: 0,46 - 0,95). Os valores de Kappa foram respectivamente, 0,4066; 0,4162; 0,3379, quando comparado com o ensaio imunoenzimático, obtendo resultado moderado (0,41 a 0,60) nas diluições 1:2 e 1:5 e razoável (0,21 a 0,40) na diluição 1:8, segundo a classificação de Thursfield (2007) (Tabela 4). A baixa sensibilidade e especificidade, e a grande variância nas amplitudes do Índice de Confiança foram obtidas em função do reduzido número de amostras analisadas pelo teste de soroaglutinação em látex.

Tabela 4. Sensibilidade, Especificidade e Valor Kappa e suas respectivas concordâncias nas diluições 1:2, 1:5 e 1:8.

Diluição das Amostras	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor Kappa	Conclusão da Replicabilidade
1:2	71,0	69,0	0,4066	Moderada
1:5	50,0	92,0	0,4162	Moderada
1:8	57,0	67,0	0.3379	Razoável

Com o objetivo de padronizar um teste rápido e de triagem no diagnóstico do calazar humano, vários autores têm procurado padronizar um teste de soroprecipitação rápida em látex. O KAtex desenvolvido em Bangladesh, na Índia, detecta antígenos de *Leishmania donovani* na urina dos pacientes enfermos SALAM (2010). As esferas de látex foram sensibilizadas com anticorpos produzidos contra os antígenos de *L. donovani* e então misturadas com a amostra em lâmina de vidro. O ensaio apresentou sensibilidade de 94,64% e especificidade de 95%, com intervalo de confiança [IC] = 95 a 100%. A detecção de antígeno é considerada mais específica do que os testes baseados na identificação de anticorpos uma vez que a infecção está ativa.

Cordeiro (2009) sensibilizou o látex com a proteína recombinante HSP70 e comparou o desempenho do teste com o kit comercial ELISA S7® em um banco de soro de 279 cães. Na diluição 1:2 obtiveram-se os valores de sensibilidade de 68,12% (95% CI: 0,55 - 0,78), de especificidade de 55,24% (95% CI: 0,48 - 0,62) e o valor Kappa de 0,173 (95% CI: 0,074 - 0,272). Na mesma diluição, os nossos resultados foram superiores, que pode ter ocorrido pela utilização da soro albumina bovina no bloqueio da pérola de látex. Cordeiro (2009) relatou também que houve uma grande discordância dos resultados comparativos entre o ensaio e o ELISA S7, indicando a ocorrência de reações falso-positivas causadas por algum fator sérico ou pela presença de sítios residuais de ligação no látex.

Sabe-se que o revestimento da superfície do látex não é absoluto, assim algumas regiões permanecem livres de ligação. Como descrito por MOLINARO et al. (2010), os espaços livres devem ser ocupados com qualquer molécula alheia ao sistema reacional, no sentido de evitar a ligação inespecífica de componentes da amostra e reduzir reações indesejáveis que acarretam falsas interpretações. A cobertura destes espaços vazios é chamada de bloqueio.

Entre as proteínas mais empregadas nesta etapa destacam-se a soro albumina bovina (BSA), o soro fetal bovino, a ovalbumina e a caseína.

Dereure et al. (1998) relataram uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 98,9%, calculadas a partir da análise da reatividade de 1035 soros caninos, tomando-se como padrão o teste de imunofluorescência indireta. A concordância entre os dois testes foi excelente, com kappa = 0,883. O antígeno era composto de um extrato bruto de *L. infantum*, que pode influenciar na sensibilidade do teste.

Por outro lado, Akhoundi et al. (2013), utilizando antígeno A2 purificado, relataram uma sensibilidade de 95,2% (95% CI: 95,0 – 95,4%) e especificidade de 100% (95% CI: 100%), comparando com o DAT na diluição 1:320. Fatores que contribuíram para um melhor rendimento do teste foram: a ativação da pérola de látex com EDC (1ethyl-3-dimethylamino propyl carbodiimide) e o tipo do antígeno.

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a proteína recombinante HSP70 de *Leishmania chagasi* pode ser utilizada no teste de soroaglutinação em látex por ser antigênica, uma vez que animais infectados produzem uma forte resposta humoral contra a proteína de choque térmico. O ensaio ainda necessita de ajustes na sensibilização do látex para melhorar a sensibilidade.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Edit. Elsevier, ed. 6. Rio de Janeiro, 2008.

AGUIAR, P. H. P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica de estado da Bahia, Brasil. **Em. Bras. Saúde Prod. Em.**, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.

AKHOUNDI, B. 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*. **Experim. Parasitol.**, v. 133, p. 307–313. 2013.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVES, A. L.; BEVILACQUA, C. M. L.; MORAES, N. B.; FRANCO, S. O. Levantamento Epidemiológico da Leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**. Fortaleza, 1998.

AMÓRA, S. S. A. **Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza – Ceará, Julho de 2004.

ANDRADE, C. R. & ANDRADE, P. P. **Heat shock proteins in visceral leishmaniasis**. In Eden W, org. *Stress proteins in Medicine*. (NY- EUA) Marcel Dekker Publ, p.308-326, 1996.

ATTAR, Z. J. et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 78, n. 1, p.11-16, 2001.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 5th Edition, 2 Volume Set, Cap. 10, p. 1 - 145, November 2002.

BAGCHI, A. K. et al. The latex agglutination test: standardization and comparison with direct agglutination and dot-ELISA in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92, n. 2, p.159-163, 1998.

BAIÃO, A. M. **Leishmaniose Visceral Canina**. Trabalho de Conclusão do Curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pelo Instituto Brasileiro de Pós-Graduação Qualittas, apresentado à UCB como requisito para obtenção do título de Especialista. Florianópolis, 2010.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of Canine leishmaniosis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BAVIA, M. E. et al. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parasitol.**, Cambridge, v. 47, p.165-169, 2005.

BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; TANIGUCHI, H. H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A. A.; SPESSOTO, J. R. M.; KANETO, C. N.; CARMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. **Em. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007

BLACKWELL, J. M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. **Parasitol.**, v.104, p.19–34, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, MANEJO CLÍNICO E ASPECTOS LABORATORIAIS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**. Versão I. Secretária de Estado da Saúde, Santa Catarina, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação**: Paraíba – 5. Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 35 p., 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2011b.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BOWMAN, D. D. *Georgis – Parasitologia Veterinária*. Edit. Elsevier, ed. 9. Rio de Janeiro, 2010.

CAMARGO, E. P. Doenças Tropicais. **Estudos Avançados**. Vol. 22, Nº64. São Paulo, Dezembro de 2008.

CAMPOS, R. M. **Caracterização Molecular de Antígenos de *Leishmania chagasi* Potencialmente Úteis no Controle da Leishmaniose Visceral**. Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2007.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. And Immunopathol.**, v. 128, p. 67–70, 2009.

CEARÁ, Governo do Estado do. Secretária Estadual da Saúde. **Informe Epidemiológico: Leishmaniose Visceral**. Fortaleza – CE, Setembro de 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Trop. Med. And Internat. Health.**, v. 11, n. 1, p. 31–40, 2006.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects, **Compend.**, v. 25, p. 358-368, 2003.

CORDEIRO, Aline Antas. Padronização de um teste de soro-aglutinação em látex para diagnóstico do calazar canino. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária). Patos: CSTR/UFCG, 55 p. 2009.

COSTA, S. R. et al. T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infected Subjects to Recombinant *Leishmania* Antigens. **Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n.3, p. 367–370, 1999.

COSTA, T. A. C.; ROSSI, C. N.; LAURENTINO, M. D.; GOMES, A. A. D.; VIDES, J. P.; SOBRINHO, L. S. V.; MARCONDES, M. Ocorrência de Leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V.47, n.3. São Paulo, 2010.

CUNHA, D. E. S. **Análise do uso de frações antigênicas de *Leishmania sp* no diagnóstico imunológico da Leishmaniose Visceral e Diagnóstico imunológico da leishmaniose visceral utilizando antígeno recombinante K39 através das técnicas de ELISA e *Particle gel immunoassay - PaGIA (DiaMed)***. PROVOC-FIOCRUZ. Belo Horizonte, 2001.

CUMMINS, A. J. et al. Development of a rapid latex agglutination test for the detection of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 3, p. 300, 1994.

DEREURE, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; GOVERNET, J.; MAJHOUR, J.; BELAZZOUG, S.; KHIAMI, A.; RAGEH, H. A.; JARRY, D.; PERIERES, J.; RIOUX, J. A. Leishmaniose canina à *Leishmania infantum*: intérêt et réalisation du test au latex. Applications en éco-épidémiologie. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 91, n. 4, p. 300-305, 1998.

DIETZE, R. **Diagnóstico Sorológico e Parasitológico da Leishmaniose Visceral**. Consulta de Expertos OPM/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe Final. OPM/OMS, Ministerio da Salud de Brasil. Brasília, Noviembre de 2005.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 36, Nº3. Dezembro, 2007.

EL-AMIN, E. R. et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal Leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 271-275, 1986.

EL-SAFI, S. H. et al. Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. **East Medit. Health J.**, v. 9, n. 4, p. 844-855, 2003.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saúde*, Vol. 3, Nº2, p 47-57. 2012.

FEDER, M. E.; HOFMAN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. **Ann. Em. Physiol.**, v. 61, p. 243-325, 1999.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR**. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, UFMG. P.86, Belo Horizonte, 2012.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. **As Leishmanioses**. Laboratório de Imunomodulação – Departamento de Protozoologia/ IOC. 1997.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Em. Bras. Epidemiol.** V. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Parasitol.**, v. 27, n. 9, 2011.

HATAM, G. R et al. Improvement of the Newly Developed Latex Agglutination Test (Katex) for Diagnosis of Visceral leishmaniasis. **J. of Clin. Laborat. Anal.**, v. 23, p. 202-205, 2009.

INIESTA, L.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GÓMEZ, M.T.; PIARRROUX, R.; GÁLLECO, M.; ALUNDA, J.; PORTÚS, M.; Diagnostic Techniques to Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Vol. 9, Nº5. 2002.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARAJEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; JJUNIOR, E. D. M.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, 2007.

JÚNIOR, E.M.Q. **Validação do Teste Imunocromatográfico Rápido DUAL PATH PLATFORM para o Diagnóstico da Leishmaníase Visceral Canina**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza - Ceará, 2011.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, 2006.

KER, H. G. **Desenvolvimento de um Protótipo de Kit para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina Empregando a Citometria de Fluxo**. Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto - MG, 2012.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacol. And therapeut.**, v. 80, n. 2, p 183–201, 1998.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42. 1997.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V. 46, n. 3, p. 181-187, São Paulo, 2009.

PIMENTA, P. F. P.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. A **Ovel Role for the Peritrophic Matrix in Protecting Leishmania from the Hydrolitic Activities of the Sandfly Midgut**. *Parasitol.* 1997.

PORTO, M. L. Soroprevalência e fatores de risco para Leishmaniose Visceral Canina em Patos, Paraíba, Brasil. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) Patos: CSTR/UFCG, 46 p. 2010.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R R. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Volume 4, Cap 1. Rio de Janeiro, 2010.

MOODY, A. H.; EL-SAFI, S. H. A latex agglutination test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 5, p. 522, 1996.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Em. Of Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1037-1038, 2001.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OIE. **Terrestrial Manual**. Leishmaniosis. Cap.2.1.8, p. 240-250, 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2013.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano III, n. 11, p. 13-14, 1997.

REIS, L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana **Em. Patol. Trop.**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SÁ, L. E. M. **Profilaxia da Leishmaniose Visceral**. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Gestão da Qualidade de Alimentos e Vigilância Sanitária. Campo Grande – MS, 2006.

SALAM, M. A; MONDAL, D; KABIR, M; HAQUE, R. Detection of urinary leishmanial antigen by latex agglutination test (*Katex*) in kala-azar patients. **Bangladesh Journal of Medical Science**. Vol.09 N° 4. Bangladesh, Julho 2010.

SILVA, M. V. **Avaliação de Testes Sorológicos para Leishmaniose Visceral Canina Utilizando Coleta de Amostra Sanguínea em Papel de Filtro**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto – MG, 2005.

SILVA, F. S. Patologia e Patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V.1, n.1. Chapadinha/MA, 2007.

SILVA, B. C. **Alterações Clínicas e Patológicas da Leishmaniose Visceral Canina**. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Betim, 2009.

SILVA, T. A. M. **Estudo da Variabilidade Genética Intraespecífica de Leishmania (Leishmania) infantum em Amostras de Cães e Humanos**. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Belo Horizonte, 2013.

SOARES, I. R. **Avaliação Clínica e Laboratorial de Equinos Sororreagentes para Leishmania sp. No município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação apresentada à UFMG, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Belo Horizonte, 2012.

SOUZA, C. M. **Isolamento, Purificação e Caracterização de duas Proteínas Recombinantes de *Leishmania chagasi*, Visando à Padronização de um Ensaio Imunodiagnóstico para Leishmaniose Canina**. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, IOC-FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2009.

SUNDAR, S. et al. Detection of Leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n.2, p. 269-271, 2005.

TANNUS, M. M.; RODRIGUES, F. H.; MASTRABTONIO, E. C.; ROCHA, F. A.; PEREIRA, C. G.; SILVA, A. L. N.; SOUZA, M. A. 2007. **Reatividade Sorológica de Cães Frente a Antígenos de três espécies de *Leishmania***. Horizonte Científico, Março de 2007.

THURSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Wiley-Blackwell Publishing, Edição: 3rd, 610 pg. Oxford, 2007.

URQUHART, G.M. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara **Koogan**, **292 p. 1998**.

WERNECK, G. L. **Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil**. *Cad. Saúde Pública*. Vol.26, n.4, pp 644-645. Rio de Janeiro, 2010.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos Estudos sobre Nutrição e Doenças Negligenciadas no Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**. Vol.16, Nº1. Rio de Janeiro, Janeiro de 2011.

WHO. World Health Organization. **Visceral Leishmaniasis - Rapid Diagnostics Test Performance**. Diagnostics Evaluation Series Nº 4, 2011a.

WHO. World Health Organization – 2011b. Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso: 10 de Novembro de 2014.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

7. ANEXO



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3057



A: S^{ra}. Márcia Almeida de Melo (Coordenadora)

Sr^a. Melo;

Protocolo CEP nº 104-2013

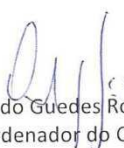
CERTIDÃO

ASSUNTO: Padronização de um teste de soro aglutinação rápida em látex para o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina”.

Cientificamos a V.Sa. que seu projeto teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno desta comissão e foi aprovado em Reunião Extraordinária nº 04/2013, em 30 de julho de 2013, nas dependências da Universidade Federal de Campina Grande, com sede em Patos – PB e estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações no uso de animais para fins científicos e didáticos.

Secretaria da Comissão de Ética o Uso de Animais – CEUA da UFCC.

Patos, 31 de julho de 2013.


Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador do CEUA