

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Padronização de um teste de soro-aglutinação em látex para diagnóstico do calazar
canino**

Aline Antas Cordeiro

2009

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

C794p
2009

Cordeiro, Aline Antas.

Padronização de um teste de soro-aglutinação em látex para diagnóstico do calazar canino. / Cordeiro, Aline Antas – Patos: CSTR/UFCG, 2009.

55 p.

Inclui bibliografia.

Orientador (a): Marcia Almeida de Melo.

Graduação (Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 - Diagnóstico de Laboratório em Medicina Veterinária - Monografia. 2 - Calazar canino - diagnóstico. I - Título.

CDU: 636.082:619



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Padronização de um teste de soro-aglutinação em látex para diagnóstico do calazar
canino**

Aline Antas Cordeiro
Graduanda

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

Patos
Outubro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ALINE ANTAS CORDEIRO
Graduanda

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

APROVADO EM 01/10/2009

EXAMINADORES:

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

Prof. Dr. Edísio Oliveira Azevedo
Examinador I

Prof.Dr. Sérgio Santos Azevedo
Examinador II

*Dedico este trabalho aos meus
amores, razões da minha vida:
Luciene, Francisco, Aran,
Alvan e Adônis, com muito
carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nosso Senhor, pelo dom da vida, pela saúde e pela família e amigos de quem tanto me orgulho.

A minha mãe por ter me dado uma boa educação, pela amizade, pelo carinho e pelo incentivo para que eu chegasse aonde cheguei. Eu a amo muito.

Ao meu pai pela força, por ter sempre primado pelos meus estudos, pelos bons conselhos e por está sempre ao meu lado.

Aos meus queridos irmãos Aran, Alvan e Adônis, por serem meus melhores amigos, pelo cuidado comigo e pelo carinho.

A todos meus familiares que contribuíram para a minha formatura.

Ao meu namorado Aldenir pela compreensão, pelo amor e por estar comigo nos bons e maus momentos.

A minha amiga Maria Kelly por todos os bons momentos vividos, pelos conselhos, pelo carinho e pela amizade de longas datas.

A minha orientadora Marcia Almeida de Melo por compartilhar o seu conhecimento, pelos bons conselhos, pela paciência e por ter sido mais que uma orientadora e sim uma segunda mãe.

Ao professor Paulo Paes de Andrade pelas sábias sugestões para o aprimoramento desse trabalho e pelo carinho.

A todos os professores da UFCG pela construção do conhecimento.

A equipe do laboratório, Daniele, Camila, Kamila, Gilzane, Tereza, Annielle, Arthur e Expedito pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

A Anielle Regina e Sâmya por me receberem de braços abertos, quando precisei, pelo prazer de suas companhias diariamente, e pela amizade compartilhada, sempre estarem em meu coração.

Aos meus colegas de turma Anielle, Aline Guedes, Kamila, Camila, Cristiane, Iácome, Ticiano e Adelman pelos cinco anos de convivência, apesar de alguns infortúnios, mas nunca esquecerei dos bons momentos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Histórico.....	12
2.2 Agente Etiológico, Vetor e Ciclo Biológico.....	13
2.3 Características Epidemiológicas.....	15
2.4 Patogenia e Imunologia.....	18
2.5 Sinais Clínicos.....	20
2.6 Diagnóstico.....	21
2.6.1 Diagnóstico Clínico e Parasitológico.....	21
2.6.2 Diagnóstico Sorológico.....	23
2.6.3 Diagnóstico Molecular.....	27
2.7 Tratamento.....	28
2.8 Controle e Profilaxia.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Expressão da proteína recombinante HSP70.....	31
3.2 Soros.....	32
3.3 SDS-PAGE e western blot (WB).....	32
3.4 Ensaio Imunoenzimático.....	33
3.5 Aglutinação em látex.....	34
3.6 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Expressão e antigenicidade da proteína recombinante.....	35
4.2 Aglutinação em látex e comparação de seus resultados com o ensaio imunoenzimático ELISA S7.....	36
4.2.1 Padronização preliminar.....	36
4.2.2 Avaliação de sensibilidade e especificidade do teste de aglutinação de látex.....	38
5 CONCLUSÃO.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7 ANEXOS.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	15
Figura 2 - Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Estado do Pará	17
Figura 3 - Mapa do vetor de clonagem e expressão pSport1	31
Figura 4 - Cuba de eletroforese vertical	33
Figura 5 - Cuba de eletroforese semi-dry	33
Figura 6 - Pérolas de látex de poliestireno a 10%	34
Figura 7 - Gel de SDS poliacrilamida e western blot de proteínas de <i>Leishmania chagasi</i>	36
Figura 8A - Reação de aglutinação em látex positiva.	37
Figura 8B - Reação de aglutinação em látex positiva em maior aumento	37
Figura 9A - Reação de aglutinação em látex negativa	37
Figura 9B - Reação de aglutinação em látex negativa em maior aumento	37

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Comparação do teste de aglutinação em látex e ELISA S7	Pág. 38
-------------------	---	--------------------------

RESUMO

CORDEIRO, ALINE ANTAS. Padronização do teste de aglutinação em látex para sorodiagnóstico do calazar canino. Patos, UFCG, 2009, 55 p. (Monografia do Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

O objetivo do presente trabalho foi padronizar um teste de soro-aglutinação em látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, baseado na detecção de anticorpos contra a proteína recombinante HSP70 e comparar seu desempenho como kit comercial ELISA S7. Dos 292 soros avaliados, 163 foram concordantes nos dois ensaios, 22 foram negativos no látex e positivos no ELISA S7 e 94 positivos no látex e negativos no ELISA S7. Foram retirados da análise 13 soros que produziram resultados inconclusivos no ELISA S7. A sensibilidade do teste de aglutinação em látex foi de 68,12% (95% CI: 0,5579-0,7883), a especificidade foi de 55,24% (95% CI: 0,4824-0,6208) e o valor do kappa foi de 0,173 (95% CI: 0,0740-0,2719) quando comparado com o teste de ELISA S7. Os resultados discordantes entre os dois testes não estão dentro da expectativa do acaso ($p < 0,0001$ – teste de McNemar). Quando os soros negativos na diluição escolhida para o teste de látex (1:2) foram retestados em duas diluições maiores, a sensibilidade aumentou para 98,55%. O teste apresenta bom potencial para ser usado no sorodiagnóstico do calazar canino, embora ainda precise de ajustes que melhorem principalmente a sua especificidade.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cão, diagnóstico, látex, aglutinação.

ABSTRACT

CORDEIRO, ALINE ANTAS. Standardization of a latex agglutination test for the serodiagnosis of canine kala-azar. Patos, UFCG, 2009, 55 p. (Monograph of the Veterinary Medicine Course, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health).

The aim of this work was to standardize a latex agglutination test for the diagnosis of canine kala-azar based on the detection of serum antibodies against the recombinant *Leishmania* HSP70 and to compare its performance with the commercially available ELISA S7. From a panel of 292 sera, 163 gave coincident results in both assays, 22 were positive in the latex test and negative in ELISA S7 and 94 were conversely positive in the latex assay and negative in ELISA S7. The latex test sensitivity was 68.12% (95% CI: 0.5579-0.7883), the specificity 55.24% (95% CI: 0.4824-0.6208), and the kappa value 0.173 (95% CI: 0,0740-0,2719), when the results were compared to those of ELISA S7. The conflicting results between the two tests are not within random expectation ($p < 0.0001$ – McNemar test). When the negative serum samples obtained in the standard serum dilution 1:2 were retested in higher dilutions, the sensitivity increased to 98.55%. The results suggest a promising potential for this new assay in the diagnosis of canine kala-azar, although some refinement is still needed, especially to increase the test specificity.

Keywords: visceral leishmaniasis, dog, diagnosis, latex, agglutination.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países do mundo, representando um grave problema de saúde pública. No Brasil, as formas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde continuam sendo o controle do vetor, diagnóstico e tratamento dos casos humanos e sacrifício dos cães soropositivos.

Os fatores relacionados com a sobrevivência da *Leishmania* dentro do organismo vertebrado estão relacionados com a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro. Assim, se há um estímulo à série LTh1 pela IL-12, haverá a produção de IFN- γ e IL-2, superativação de macrófagos e NK e destruição do parasito dentro do fagolisossomo. Esta resposta está relacionada com a resistência a infecção. Já se há uma proliferação da série LTh2, haverá a produção de IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, que mediam a resposta humoral, com a grande quantidade de anticorpos específicos contra o parasita, mas sem atividade protetora..

Como a leishmaniose é uma doença marcada pela grande produção de imunoglobulinas, o diagnóstico sorológico é facilitado, apesar dos riscos de reação cruzada com outras doenças quando antígenos totais são empregados; com o uso de antígenos recombinantes, esse problema diminuiu; entretanto, apenas duas proteínas recombinantes estão no mercado, K39 e HSP70. Os testes sorológicos são menos invasivos e mais sensíveis que o diagnóstico parasitológico e mais baratos que os testes moleculares. Entre os testes sorológicos utilizados citam-se a imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), DAT (Teste de Aglutinação Direta) e Western blot. No Brasil, os testes de referência para o diagnóstico do calazar são o RIFI e ELISA fornecidos pelo Ministério da Saúde para o Estado e municípios; entretanto, apresentam o inconveniente de serem menos específicos pelo uso de antígenos totais. A logística da coleta em campo e do diagnóstico centralizado nos trabalhos de saúde pública resulta em uma demora grande do diagnóstico.

Este trabalho teve como objetivo a padronização de um teste de soro-aglutinação em látex para o diagnóstico do calazar canino baseado na detecção de anticorpos anti-HSP70 de *Leishmania chagasi* de soros caninos, promovendo um diagnóstico rápido, específico e fácil, agilizando a entrega de resultados e a retirada dos animais positivos das áreas endêmicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Os primeiros casos de leishmaniose visceral aconteceram na Índia no ano de 1885 e, somente alguns anos mais tarde, em 1903, é que o agente causador desta enfermidade foi descoberto e descrito por William Boog Leishman e Charles Donovan. William B. Leishman descreveu o parasita, mas associando-o às formas de *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903). Charles Donovan encontrou o parasito em baço de uma criança hindu com febre irregular, mas o confundiu com outro protozoário, o *Trypanosoma brucei*. Após algumas descrições equivocadas, Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e batizou o agente causador do calazar de *Leishmania donovani*, em homenagem a William B. Leishman e Charles Donovan (PESSÔA & MARTINS, 1988; REY, 2001).

A possível participação dos cães no ciclo epidemiológico do calazar começou a ser aventada por Nicolle e Comte em 1908, na Tunísia, a partir da detecção, nos animais, do agente etiológico do calazar (NICOLLE & COMTE, 1908). A primeira demonstração de infecção natural de hamsters por picada de flebotomíneo ocorreu em 1931, após observação de que a distribuição do vetor *Phlebotomus argentipes* era coincidente com a distribuição da doença (ADLER & THEODOR, 1931).

O pesquisador Migone é o primeiro a descrever, em 1913, a ocorrência de um caso humano de leishmaniose visceral originário do Brasil quando, em Assunção do Paraguai, diagnóstica, em exame de necropsia, um caso proveniente do município de Boa Esperança, no Estado do Mato Grosso (MIGONE, 1913). Penna em 1934 encontrou pela primeira vez o parasita em lâminas histológicas de fígado de pacientes com febre amarela oriundos da região norte e nordeste (PENNA, 1934). Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (DEANE, 1956a). Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. Em 19 dos 27 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV. Nos últimos cinco anos, ocorreram em média 3.500 casos humanos novos, sendo a maioria na região Nordeste do país. A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região

Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (BRASIL, 2001).

No Brasil, uma das primeiras observações da infecção canina por *Leishmania* foi realizada por Evandro Chagas quando demonstrou a existência da doença no homem e no cão e a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*. O parasita foi classificado como *Leishmania chagasi* (CHAGAS, 1936; CHAGAS et al., 1938).

Em 1956, Deane incrimina o cão e a raposa como reservatórios naturais nas áreas de maior expressão da endemia, definindo a doença como uma zoonose (DEANE, 1956b). Em 1958, outros animais foram encontrados infectados com o parasita em florestas do sul do Brasil (DEANE & DEANE, 1962), dando início às primeiras campanhas governamentais sobre as áreas de ocorrência da doença e o controle da LV no Brasil.

Na década de 50, o Departamento Nacional de Endemias (DNERU) iniciou um trabalho de combate sistêmico ao calazar no Ceará e em outros Estados. Esta primeira iniciativa de controle combate da doença no Brasil teve seus trabalhos interrompidos em 1964. Apenas em 1980, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) retornou os trabalhos de controle ao calazar (BRASIL, 2006).

2.2 Agente Etiológico, Vektor e Ciclo Biológico

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade causada por protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (RIBEIRO, 1997). No Brasil, o agente etiológico é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (LAINSON et al., 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO et al., 2000).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, que apresenta uma forma flagelada ou promastigota, encontrado no tubo

digestivo do vetor, e outra forma flagelada ou amastigota, que é encontrada nos tecidos dos vertebrados (ACHA e SZYFRES, 1989; VOIGT e KLEINE, 1975).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil. As espécies *L. cruzi* (SANTOS et al., 1998) e *L. forattinii* (PITA-PEREIRA et al., 2008) foram incriminadas como vetores no estado de Mato Grosso do Sul. A espécie *L. longipalpis* está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, homem e outros animais silvestres ou domésticos (MONTEIRO et al., 2005).

É um inseto pequeno de 2 a 3 mm, seus vôos são curtos e baixos, conferindo um comportamento saltitante e uma dispersão não superior a 200 m. Os flebotomos colonizam os pés de serra, boqueirões, vales de rios, matas virgens, capoeiras, domicílios (habitações humanas) e peridomicílios (abrigo de animais). Podem se adaptar a baixos graus de umidade e elevadas temperaturas. Abrigam-se durante o dia em esconderijos úmidos e escuros, ao abrigo dos ventos, como reentrâncias de rochas, frestas de paredes ou de tronco de árvores (GONÇALVES et al., 1986; MARZOCHI, 1992).

Sherlock (1996) relata que existem flutuações na densidade de *L. longipalpis*. O aumento da população desta espécie de vetor é a associada ao aumento da umidade relativa do ar e a precipitação pluviométrica (MORRISON et al., 1995; FERRO et al., 1995).

O flebotomo da espécie *L. longipalpis* geralmente inicia suas atividades ao anoitecer, sendo hematófagas somente as fêmeas. Estas necessitam de alimentação sanguínea para a maturação dos ovos, que se processa em sete dias, durante os quais ficam em repouso (ciclo gonadotrófico). No solo rico em húmus, com relativo grau de umidade, a fêmea põe os ovos. O ciclo evolutivo, do ovo ao adulto, dura em média, 30 a 90 dias, conforme as condições ambientais. Os adultos tem vida relativamente curta, de 15 a 30 dias (GONÇALVES et al., 1986; MARZOCHI, 1992).

O ciclo da *Leishmania* começa com o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado pelo flebotomíneo, onde ele ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas do parasito. Estas sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo biológico completa-se com a picada do

flebótomo infectado e subseqüente inoculação de formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2004).

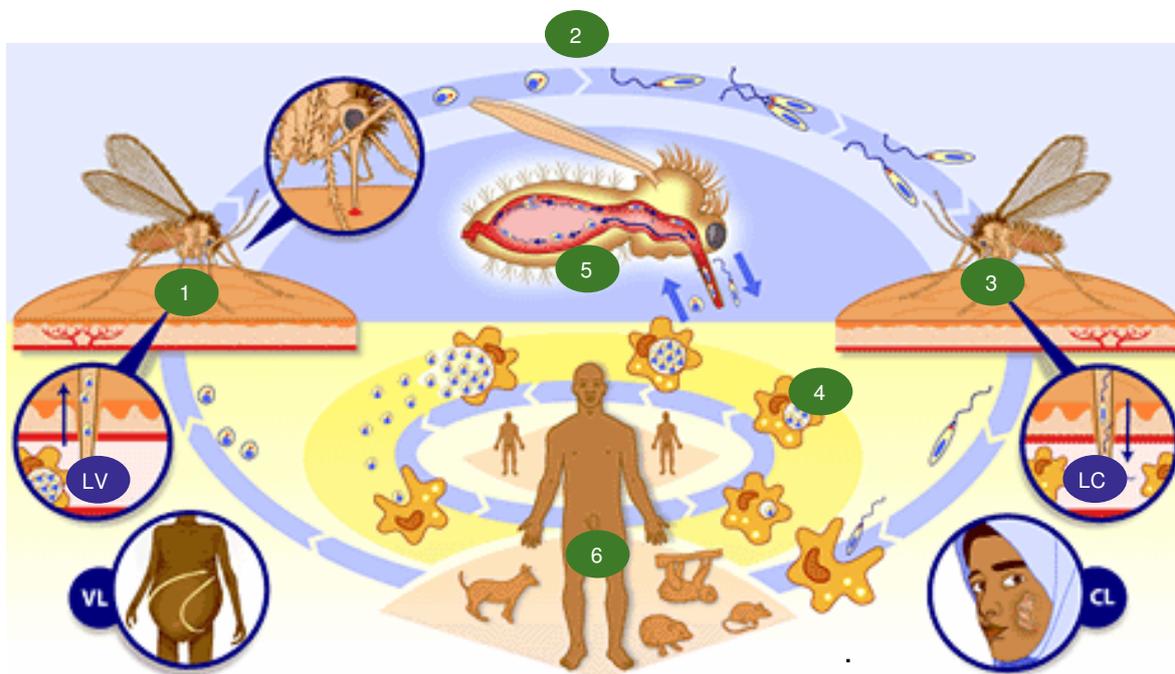


Fig. 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*. 1. O flebótomo ingere macrófagos contendo amastigotas ao se alimentar num mamífero infectado; 2. As formas amastigotas, uma vez liberadas do macrófago no interior do tubo digestivo do inseto, transformam-se em formas promastigotas procíclicas, que se multiplicam intensamente, aderidas ao epitélio de revestimento do trato digestivo. Após 7 a 15 dias, formas metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado aparecem na luz do tubo digestivo; 3. Ao se alimentar em outro mamífero, o flebótomo infectado regurgita parte do conteúdo do trato digestivo na lesão recém causada, inoculando assim as formas metacíclicas na pele do hospedeiro; 4. Estas são fagocitadas, transformam-se de volta em amastigotas e proliferam intensamente no fagolisossomo da célula fagocítica; 5. O rompimento das células infectadas libera amastigotas, que vão infectar novas células. O processo lentamente leva a uma infecção sistêmica; 6. O homem e vários outros mamíferos participam do ciclo das leishmanioses, incluindo roedores, edentados, marsupiais e canídeos. Adaptado da página indicada na figura.

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>

2.3 Características Epidemiológicas

Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2001). A doença atinge principalmente as populações pobres desses países. Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específicos, grande parte da população não tem acesso a estes procedimentos, elevando os índices de mortalidade. Nos países endêmicos, a LV continua negligenciada pelo setor privado da economia e tem cabido ao setor público, apesar dos

recursos escassos e infraestrutura inadequada, investir no desenvolvimento de novas drogas e métodos de diagnóstico mais eficientes (GONTIJO & MELO, 2004).

Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que cerca de 90% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (GRIMALDI et al., 1989). A LV apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, podendo apresentar-se como zoonose, antroponose ou antropozoonose, estas duas últimas, quando o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (PASSOS et al., 1993).

Deane (1956b) trabalhando no Ceará abordava a expansão e o fenômeno de urbanização da LV, fato hoje consolidado, com a doença instalada definitivamente em cidades capitais e cidades do interior, como São Luís/MA, Teresina/PI, Natal/RN, Rio de Janeiro/RJ, Belo Horizonte/MG, Januária/MG, Montes Claros/MG e Caicó/RN (BATISTA, 2008; CUNHA et al., 1995; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MONTEIRO et al., 1994; PASSOS et al., 1993).

Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (DEANE, 1956b); e *Cerdocyon thous* no Pará (LAINSON et al., 1990; COURTEUAY et al., 1996) e em Minas Gerais (SILVA et al., 2000a; CURI et al., 2006). *L. chagasi* foi isolada em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* na Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico (GONTIJO & MELO, 2004).

No ambiente silvestre, no Pará, de acordo com a figura 2, o ciclo biológico do parasito é mantido em raposas (*Cerdocyon thous*) e, possivelmente, em outros animais silvestres (roedores e edentados), e a transmissão é realizada pela *Lutzomyia longipalpis*. A presença do vetor no peridomicílio estabelece a infecção no homem e no cão, esta última se torna a principal fonte de infecção para o homem. O ciclo é semelhante em outras regiões, com a mudança de alguns elementos da fauna (LAISON e RANGEL, 2005, apud MELO, 2006).

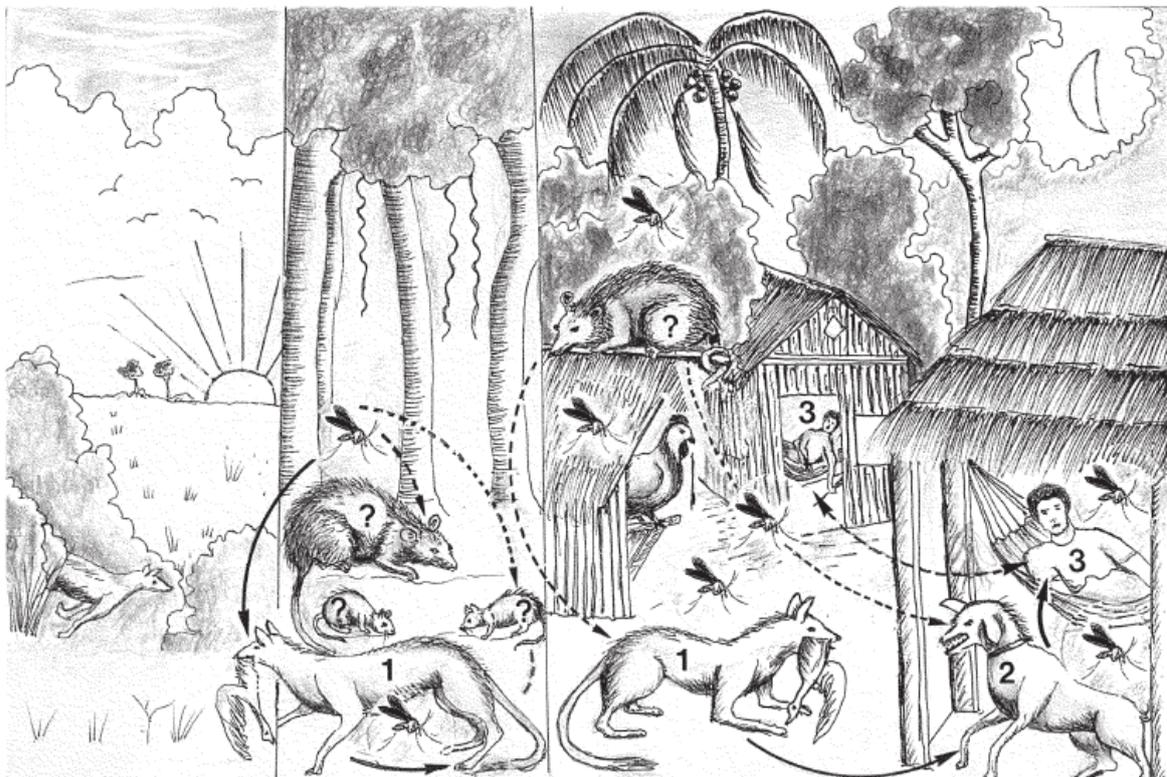


Fig. 2 - Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Estado do Pará: 1. o parasita se mantém no ciclo enzoótico silvestre em raposas e possivelmente em outros animais por uma população silvestre do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*; 2,3. A invasão pelo vetor das moradias localizadas na proximidade da floresta estabelece a infecção no cão e no homem. Linhas contínuas indicam a rota de transmissão definida e as linhas descontínuas representam uma possível transmissão entre outros animais silvestres, e provavelmente o homem também serve de fonte de infecção para o flebótomo (Modificado de Lainson, 1989).

A leishmaniose visceral canina (LVC), do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, sintomáticos ou assintomáticos (CABRAL et al., 1998), que serve como fonte de infecção para os insetos vetores. Essas características tornam o cão doméstico o principal reservatório do parasito (ASHFORD, 1996).

A LV é uma doença caracteristicamente rural e associada a condições precárias de vida, que encontra no espaço urbano ambiente favorável para se estabelecer, ressurgindo com grande impacto e diferentes perfis de morbi-mortalidades daqueles já conhecidos (BEVILACQUA et al., 2001).

Os principais determinantes dos níveis epidêmicos da LV nos grandes centros são: convívio muito próximo homem/reservatório (cão), aumento da densidade do vetor, desmatamento acentuado e o constante processo migratório (MARZOCHI, 1989). Estudos da dinâmica de transmissão da LV, enfatizam duas variáveis a serem consideradas nos

programas de controle: a sazonalidade da variação da população de flebotomíneos e o número de cães infectados (DYE et al., 1993).

Nas cidades brasileiras, diversos fatores servem de estímulo para a domiciliação do flebótomo, contribuindo para a ocorrência de transmissão ativa urbana: pobreza, desnutrição, grande número de cães infectados, oferta de fontes alimentares humanas e animais, arborização abundante em quintais, potenciais criadouros de insetos e acúmulo de lixo, presença de abrigos de animais silvestres no perímetro urbano, revelando que o calazar é uma doença de íntimas relações com as condições sociais as quais os indivíduos estão submetidos (OLIVEIRA, 1960; COSTA et al., 1995; FERRO et al., 1995; MORRISON et al., 1995; NASCIMENTO et al., 1996).

2.4 Patogenia e Imunologia

Após a picada do flebótomo infectado, as formas promastigotas são liberadas na epiderme do hospedeiro e fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dos macrófagos diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos, repletos de amastigotas, tornam-se desvitalizados e rompem-se liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Ocorre então a disseminação hemotogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2004).

Apesar da imunidade celular ser o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a *Leishmania*, anticorpos e complemento podem destruir a *Leishmania in vitro*. As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção (WOODMAN et al., 1998) e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico (MURRAY et al., 1983; PEARSON & STEIGBIGEL, 1981). Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos ativados por interferon-gama (IFN- γ) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão relacionados com resistência à infecção (LIEW et al., 1991).

Mosmann et al. (1986) obtiveram clones de células T CD4⁺ que podiam ser subdivididas em subpopulações baseadas na produção de citocinas após estimulação *in vitro*. As células T “helper” tipo 1 (Th1) produzem IFN- γ e interleucina-2 (IL-2), fator

estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e linfotóxina (TNF- β), e são responsáveis pela imunidade mediada por células, pelas reações inflamatórias, além de estimular, também, a produção de anticorpos da classe IgG2a. Células T “helper” tipo 2 (Th2) produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), e mediam a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4; e a IL-5 é importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Recentemente, mostrou-se a *Leishmania donovani* estimula a diferenciação de células Th17, que produzem IL-17, IL-22 e IFN- γ , associadas à proteção contra o calazar, desempenhando funções complementares as células Th1 (PITTA et al., 2009).

Uma citocina importante na resposta imune à *Leishmania* é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por IL-12. O IFN- γ ativa a óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação do IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II (DING et al., 1990).

A interleucina-10 (IL-10) é uma outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da *Leishmania* nessas células. A IL-10 inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (WAAL MALEFYT et al., 1991a) e inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II (WAAL MALEFYT et al., 1991b). Um outro efeito importante da IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação (BOGDAN et al., 1991). Esses efeitos, associados à capacidade dessa citocina de suprimir a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ tipo Th1, fazem com que a IL-10 interfira na atividade leishmanicida do macrófago (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

A interleucina-12 (IL-12) é um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela *Leishmania*. A IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células “natural killer” (NK), nas quais ela estimula

a produção de citocinas, principalmente IFN- γ , proliferação celular e citotoxicidade (TRINCHIERI & GEROSA, 1996). A IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4⁺ do tipo Th1 e é importante para o padrão de resistência a infecção (SCHARTON & SCOTT, 1993; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995).

A resposta imune na infecção causada por *Leishmania chagasi* está intimamente relacionada com o controle ou o desenvolvimento da doença, assim como as manifestações clínicas observadas na leishmaniose visceral. A incapacidade de ativar macrófagos para destruir a *Leishmania* é o principal defeito nessa doença e essa anormalidade se associa com a multiplicação e disseminação do parasito e o envolvimento de múltiplos órgãos como medula óssea, linfonodos, baço e fígado (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

Pacientes com leishmaniose visceral apresentam níveis séricos altos de TNF- α (BARRAL-NETTO et al., 1991) e de IL-6 (CENINI et al., 1993), que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e o TNF- α , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

A ativação policlonal de linfócitos B leva a um quadro de hiperglobulinemia e complexos imunes circulantes podem ser adsorvidos às hemácias contribuindo para uma menor sobrevivência das mesmas favorecendo a anemia observada na leishmaniose visceral (CARVALHO et al., 1986).

Níveis elevados de TGF- β , biologicamente ativos, também foram documentados no plasma e medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral; esses níveis diminuem após a cura da doença. Sabe-se que essa citocina está associada com a inibição da proliferação celular e pode ter papel importante na redução da produção de hemácias, neutrófilos e plaquetas pela medula óssea e, dessa forma, também contribuir para a patogênese da leishmaniose visceral (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

2.5 Sinais Clínicos

Em humanos, a infecção por *Leishmania* pode se manifestar de forma grave, assintomática ou com sintomas leves, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. O período de incubação da doença é bastante variável, 10 dias a 24 meses, com média entre dois a seis meses e, geralmente, apresentando evolução insidiosa. O primeiro sinal de

visceralização é febre baixa recorrente, com dois ou três picos diários, que persiste com remissões durante toda infecção. A enfermidade se caracteriza por esplenomegalia e, mais tarde, por hepatomegalia, além de linfadenomegalia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia, tosse, edema, dor abdominal, escurecimento da pele e emaciação. O abdome pode estar protuberante devido à esplenomegalia e hepatomegalia. Em pacientes não tratados, ocorre progressiva desnutrição multifatorial devido à inapetência, presença de vômitos, diarreia e o próprio catabolismo decorrente da doença, sendo causa importante do aumento da susceptibilidade a infecções secundárias (ACHA & SZYFRES, 1989; ANDRADE et al., 1990; SEAMAN et al., 1996).

De acordo com Almeida et al. (2006), os cães acometidos podem ser divididos em três grupos de acordo com os sinais clínicos manifestados: os assintomáticos (não apresentam sinais), os oligossintomáticos (apresentam apenas alguns sintomas) e os sintomáticos (manifestam diversos sintomas). Os animais podem se manter assintomáticos por até sete anos.

Em cães, período de incubação pode variar de 3 a 7 meses (ACHA & SZYFRES, 1989; VOIGT & KLEINE, 1975). Os sinais clínicos mais comumente observados são lesões cutâneas (alopecia, lesões crostosas, descamação furfurácea, dermatites, úlceras cutâneas, onicogribose), sinais oculares (conjuntivites, ceratoconjuntivites, blefarites, uveítes) e afecção visceral (febre, linfadenopatia local ou generalizada, perda de peso progressiva, poliúria, polidipsia, indisposição, anemia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrites e falência renal crônica) (GÁLLEGO, 2004; IKEDA et al., 2005). As lesões observadas na necropsia consistem em ausência de tecido adiposo, esplenomegalia, hepatomegalia, medula óssea de consistência gelatinosa e de coloração vermelho intenso, linfadenopatia e, na maioria das vezes, ulcerações nos intestinos (VOIGT & KLEINE, 1975).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Diagnóstico Clínico e Parasitológico

Nos casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes nas

áreas onde incide a LV, como, por exemplo, Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose (GONTIJO & MELO, 2004). O diagnóstico definitivo requer, por vezes, a demonstração da presença da *Leishmania* através de métodos parasitológicos ou a evidênciação de uma resposta imune específica contra o parasito por ensaios laboratoriais.

O diagnóstico clínico da LV canina é também frequentemente um problema complexo para o veterinário (BANETH & AROCH, 2008). Há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Nos cães, a doença é sistêmica crônica e pode levar o animal à morte. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, especificamente o poplíteo. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (SUNDAR & RAI, 2002). Estes métodos permitem a identificação direta das formas amastigota e promastigota do parasito. As amastigotas apresentam forma elíptica ou arredondada (3 a 4 µm), com núcleo acidofílico e cinetoplasto basofílico, no interior de macrófagos ou livres entre as células. O exame citológico de raspado de lesões ulcerativas cutâneas pode evidenciar o parasito, porém com menor frequência. Uma comparação entre a sensibilidade do exame direto a partir de vários tecidos e órgãos do cão para o diagnóstico do calazar mostrou que a punção de linfonodo poplíteo tende a dar melhores resultados (MOREIRA et al., 2007), embora recentemente Madeira et al. (2009) tenham sugerido que o exame histológico de pele intacta pode resultar em elevada sensibilidade no diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral canina.

O isolamento do parasito em meios especiais (NNN e RPMI) pode ser utilizado como meio de diagnóstico, porém o crescimento de promastigota é lento e sua sensibilidade é baixa, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no tecido, especialmente nos estágios iniciais da doença. Esse método não é aplicado na rotina diagnóstica, embora o

cultivo seja um procedimento necessário para identificar e classificar as espécies de *Leishmania* (LUZ et al., 2005). A especificidade é de 100% e sensibilidade de 98% é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala, e muitas vezes são também inadequados para diagnósticos individuais (SUNDAR & RAI, 2002). A pesquisa de parasitas no sangue periférico pode ser utilizada, sobretudo em pacientes infectados com HIV (DEREURE et al., 1998a). Nos cães parasitas podem ser cultivados a partir de vários tecidos, mas os aspirados de medula óssea e linfonodo têm sido preferencialmente utilizados, com resultados satisfatórios (BARROUIN-MELO et al., 2006; MAIA et al., 2009).

2.6.2 Diagnóstico Sorológico

A marcada estimulação policlonal de linfócitos B resulta em hipergamaglobulinemia, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos evitando os métodos parasitológicos invasivos. Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina que diferem em sensibilidade e especificidade, na aplicação prática em condições de campo e na disponibilidade de reagentes. O homem pode permanecer positivo durante longo tempo após o tratamento, não permitindo avaliação do efeito da terapia e ocorrência de reações cruzadas com outras doenças. Como há infecções sub-clínicas, um teste positivo necessariamente não indica doença ativa (GONTIJO & MELO, 2004).

Os antígenos utilizados em 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 mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes (SUNDAR & RAI, 2002), devendo-se sempre considerar o diagnóstico diferencial da LV com outras doenças (GONTIJO & MELO, 2004).

Atualmente, os ensaios mais frequentemente empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral, tanto humana como canina, são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) (SUNDAR & RAI, 2002).

O DAT tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. A técnica apresentava originalmente dificuldade na produção do antígeno (suspensão de promastigotas fixados com formalina e corados com azul de Comassier) (BOELAERT et al., 1999), mas este problema parece ter sido resolvido na última década, tendo sido o ensaio repetido por muitos laboratórios e mesmo comercializado, na forma de suspensão ou como antígeno liofilizado. Uma variação da DAT, o FAST (*Fast Agglutination Screening Test* – Teste Rápido de Aglutinação para Triagem), vem sendo testada em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (SCHOONE et al., 2001). O DAT pode ser empregado para o diagnóstico canino, inclusive na versão liofilizada (OSKAM et al., 1996; FERREIRA et al., 2007).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (GONTIJO & MELO, 2004). A RIFI apresenta menor especificidade que o ELISA, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica para o calazar humano é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (SUNDAR & RAI, 2002). Isto dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição da LV, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas (GONTIJO & MELO, 2004). A RIFI pode, em condições experimentais adequadas, apresentar sensibilidade e especificidade equivalentes ao ELISA e ser tão eficiente no diagnóstico do calazar canino como o TRALd, baseado no antígeno recombinante rK39 (ROMERO et al., 2009).

O teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EL-AMIN et al., 1986). Funciona igualmente bem para o diagnóstico da LV canina (EVANS et al., 1990).

Vários antígenos têm sido identificados como candidatos ao desenvolvimento de ensaios diagnósticos molecularmente definidos. Um teste imunocromatográfico simples e rápido, utilizando soro ou sangue do paciente, foi desenvolvido com o antígeno rK39 fixado em nitrocelulose (Teste Rápido Anticorpo de *Leishmania donovani* – TRALd)

(REED et al., 1990). O teste mostrou 100% de sensibilidade quando aplicado na Índia (SUNDAR et al., 2002) e 67% no Sudão (ZIJLSTRA et al., 2001). O TRALd pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose. No Brasil, quando aplicado em cães de área endêmica, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5%. Entretanto, o teste não foi capaz de detectar infecção nos animais com títulos de RIFI baixos de 1:40 até 1:320 (GENARO et al., 1997). Apesar das limitações apresentadas, o teste parece ser promissor para uso em programas de saúde pública, pois requer pequena quantidade de sangue periférico, é de rápida execução e leitura (10 minutos) e pode ser utilizado em condições de campo. Em 2003, o teste foi modificado sendo acrescido do antígeno recombinante rK26 do complexo *L. donovani*, que também reconhece anticorpos específicos para espécies deste complexo, ampliando a sensibilidade uma vez que indivíduos assintomáticos negativos ao rK39 mostraram-se positivos com o rK26 (NAKATANI et al., 2001; TAVARES et al., 2003).

O rK39, quando empregado no ELISA, mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade (BURNS et al., 1993) no diagnóstico do calazar humano. A proteína rK39 é apenas reconhecida em cães e humanos na fase aguda da doença e não nos casos assintomáticos ou de cura espontânea (BADARÓ et al., 1996), assim o teste pode ser utilizado tanto para diagnóstico quanto para avaliar a progressão e cura da doença (BRAZ et al., 2002).

O complexo antigênico de superfície fucose-manose ligante (FM-ELISA), descrito para o complexo *Leishmania donovani*, foi testado no diagnóstico e prognóstico do calazar humano e canino. O maior componente do antígeno, uma glicoproteína de 36KDa (GP36), permite obter 100% de sensibilidade e 96% de especificidade quando usado no teste de ELISA (PALATINICK DE SOUZA et al., 1995).

O antígeno recombinante A2, uma família de proteínas expressa em amastigotas, foi testado na Índia e no Sudão, com 60% e 82% de reatividade com soros humanos, respectivamente. No Brasil mostrou 77% de reatividade em pacientes com LV e 87% em cães com teste de RIFI positivo (CARVALHO et al., 2002).

Em meados da década de 80, a importância das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins – HSP*) como antígenos majoritários em várias infecções parasitárias e bacterianas começou a ser revelada. Adicionalmente, ficou evidenciada uma variação importante da expressão quantitativa e qualitativa das HSP's durante a diferenciação de diversos parasitos, no estresse provocado no momento em que o parasito se instala no vetor

(ou é cultivado em meio de cultura) ou quando é exposto ao aumento de temperatura após inoculação nos hospedeiros vertebrados (FEDER & HOFMAN, 1999). Andrade et al. (1992), após *immunoscreening* de uma biblioteca de cDNA de *L. donovani*, identificaram que 70% dos clones selecionados com soro de humanos com leishmaniose visceral codificavam HSP70 e HSP90. Ao usar as proteínas recombinantes representando a parte carboxi-terminal da HSP70 como antígeno para o teste de ELISA, não foi observada reação cruzada com *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii*. Para a HSP70, a região mais divergente estava localizada na região carboxi-terminal, desta forma, as reações cruzadas com outros organismos devem ocorrer devido à epitopos conservados da região amino-terminal. O emprego da fração carboxi-terminal para o diagnóstico do calazar humano e canino levou a elevadas sensibilidade e especificidade (ANDRADE & ANDRADE, 1996). Este antígeno é comercialmente empregado no kit ELISA S7, aprovado para diagnóstico do calazar canino no Brasil.

A técnica de western blotting (WB) é mais sensível e precoce, quando comparado com a RIFI e ELISA, sugerindo a possibilidade da sua utilização como preditora da doença e do parasitismo no cão (AISA et al., 1998), entretanto é mais laboriosa e não apropriada para avaliação de grande número de amostras.

O emprego de aglutinação de partículas de poliestireno sensibilizadas com antígeno específico tem facilitado o diagnóstico de algumas doenças infecciosas. Mayrink et al. (1972) realizou um teste de aglutinação de partículas de látex de poliestireno, previamente sensibilizadas com antígeno heterólogo (BCG), com soros de pacientes portadores de leishmaniose visceral americana, obtendo 100% de sensibilidade e especificidade. Os antígenos utilizados para sensibilizar o látex são complexos, ao invés de proteínas recombinantes purificadas específicas de *Leishmania*. Apesar do excelente resultado obtido, não houve novas publicações com esta técnica durante mais de 20 anos. 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 & El-Safi (1996) obtiveram resultados satisfatórios no sorodiagnóstico humano na Índia e no Sudão. Por fim, Dereure et al. (1998b) empregaram essencialmente a mesma técnica para o diagnóstico do calazar canino na França, com elevada sensibilidade e especificidade. Não houve, contudo, continuação dos trabalhos, nem no sorodiagnóstico canino nem no humano.

Attar et al. (2001) desenvolveram um teste de aglutinação rápida, 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.

O antígeno de urina detectado pelo KAtex é a base de um carboidrato de 5-20 kDa (SARKARI et al., 2002). 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). Outros estudos reportaram diferentes sensibilidades e especificidades para KAtex, incluindo: 95,2 e 100% no Sudão (EL-SAFI et al., 2003), 73,9 e 82,4% na Etiópia (DIRO et al., 2007), e 82,7 e 98,9% no Iran (MALAEI et al., 2006). No Nepal foram feitos dois estudos com o KAtex, obtendo sensibilidade e especificidade de 57 e acima de 90% e 47,7 e 98,7%, respectivamente (RIJAL et al., 2004). Na Índia, os dois trabalhos com o teste, mostraram sensibilidade e especificidade de 67 e 99% (BOELAERT et al., 2008) e 87 e 99% (SUNDAR et al., 2005), respectivamente. Em dois estudos da Espanha com 49 e 12 pacientes coinfectados com HIV/LV, a sensibilidade do KAtex foi de 85,7% e 100%, respectivamente (RIERA et al., 2004; VILAPLANA et al., 2004), e a especificidade de um destes testes estudos foi de 96% (VILAPLANA et al., 2004).

2.6.3 Diagnóstico Molecular

Na era genômica, há um número crescente de seqüências de nucleotídeos de *Leishmania*, obtidos não só no projeto genoma, mas também de trabalhos individuais. Esses dados podem ser utilizados para estudar a função de diversos genes, podendo esclarecer aspectos da relação hospedeiro/parasito e eventualmente ser utilizados como instrumento de diagnóstico e ainda indicar possíveis alvos quimioterápicos (GONTIJO & MELO, 2004).

Técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção de *Leishmania*, entre elas pode-se citar a PCR, associada ou não com hibridização com sondas específicas e com RFLP, e, mais recentemente, o Real Time PCR (PCR em Tempo Real) que é quantitativo, mais sensível e não apresenta a desvantagem da contaminação. Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, papa leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro,

podem ser utilizados como fonte de material para as reações, mas até então não há um consenso sobre a melhor associação entre a técnica e o tecido que proporcione melhor sensibilidade e especificidade (FERREIRA et al., 2008; GONTIJO & MELO, 2004; SILVA et al., 2001; TAVARES et al., 2003).

Entretanto, o melhor alvo para PCR e para as sondas de DNA tem sido o DNA mitocondrial (kDNA), formado por minicírculos e maxicírculos. Considerando que o parasito possui 10000 cópias de minicírculos, a presença de uma única *Leishmania* na amostra corresponde ao mesmo número de genes alvos iniciais para o PCR, o que melhora a sensibilidade das técnicas para este patógeno.

2.7 Tratamento

Por mais de sessenta anos, o tratamento da leishmaniose visceral humana vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime[®] e estibogluconato de sódio-Pentostan[®], que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento humano. Estas drogas, além de tóxicas, nem sempre são efetivas, e na LV são usadas em esquemas prolongados. O principal efeito colateral do glucantime é sua ação sobre o aparelho cardiovascular e a administração é desaconselhada durante os dois primeiros trimestres de gestação. Como tratamentos alternativos no Brasil, são utilizados a anfotericina B e as pentamidinas. A utilização destas drogas só deve ser realizada em hospitais de referência. O miltefosine, uma droga desenvolvida como um agente antitumoral, mostrou 95% de cura efetiva em estudo no calazar indiano. Esta droga apresenta a vantagem de ser de uso oral e bem tolerada, embora seja potencialmente teratogênica, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrizes (BRASIL, 2006).

Em 1998, realizou-se um estudo com o tratamento para leishmaniose visceral em cães experimentalmente infectados, utilizando o glucantime em associação com um imunoterápico e observou-se que não houve negatização nos testes sorológicos e parasitológicos, o que indicava não haver cura efetiva (MELO, 1998).

O tratamento de cães não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de drogas utilizadas para humanos tem tido baixa eficácia. Com relação ao antimoniato de N-metil glucamina, a dosagem utilizada para o tratamento canino é aproximadamente 10 vezes maior que o recomendado para o

tratamento humano. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotômíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (BRASIL, 2006).

Considerando todos os problemas apontados acima, em 2008 entrou em vigor a Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, art. 1º, que proíbe, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); aplicando-se ao Médico Veterinário infrator as infrações e penalidades do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, o artigo n. 268 do Código Penal e as infrações e penalidades previstas na Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977, e no Decreto-Lei n. 467, de 13 de fevereiro de 1969.

2.8 Controle e Profilaxia

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose visceral, as estratégias de controle ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotômíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde. Vale destacar, que as ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos e atividades educativas, devem ser priorizadas, lembrando que as demais medidas de controle devem estar integradas para que possam ser efetivas (BRASIL, 2006).

Ao longo dos anos, a execução, muitas vezes parcial, dessas ações de controle não proporcionou a desejada redução da incidência de LVA no Brasil. 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 a 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) sorologicamente positivos, 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).

Os Ministérios da Saúde e da Agricultura preconizam que vacinas contra a LV canina devem ser capazes de reduzir os sintomas, o parasitismo tecidual e, conseqüentemente, a transmissão ao inseto vetor. Além disso, após a imunização deve ser possível distinguir sorologicamente cães imunizados daqueles infectados. Embora, as atuais medidas de controle adotadas tenham se apresentado dispendiosas, pouco práticas e de efeito temporário, a adoção de uma vacina, como medida de controle adicional, não deve interferir nas medidas de controle vigentes (FERNANDES, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registrou em 2003 uma vacina canina para leishmaniose visceral, a Leishmune® produzida pela Fort Dodge Saúde Animal Ltda. (BRASIL, 2005). A vacina Leishmune® é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico Ligante de Fucose e Manose (FML) de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina. Os resultados obtidos e publicados a colocam como a primeira ocorrência no mundo de uma vacina que promove longo e significativo efeito protetor em cães contra LVC (SILVA et al., 2000b). Os resultados obtidos por meio do uso da vacina Leishmune demonstraram uma eficácia vacinal de 76% a 80% (BORJA-CABRERA et al., 2002). A formulação da Leishmune® não tem como base um antígeno recombinante, mas uma fração enriquecida com a proteína NH36 que tem função de FML no parasito. Esta fração, entretanto, pode conter outros antígenos como a proteína LACK, que tem massa molecular de 36 kDa (MELO, 2006).

Em 2008, foi lançada uma nova vacina contra a LVC, a Leish-Tec® desenvolvida pela Hertape Calier Saúde Animal S/A. A vacina Leish-Tec® é composta pelo antígeno recombinante A2 de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina. A proteína A2 é um fator de virulência do parasito, associado à capacidade de visceralização dos parasitas. Ela é atualmente considerada o antígeno de *Leishmania* melhor caracterizado, capaz de induzir uma resposta imune protetora contra leishmaniose visceral canina. A imunização com o antígeno A2 foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção por *L. donovani* e *L. amazonensis* e *L. chagasi* em camundongos e em cães (HERMONT, 2008).

Apesar dos ensaios obtidos com as vacinas serem promissores, o custo da vacinação por animal ainda é muito caro impedindo a adoção por proprietários de baixa renda ou em campanhas públicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos - PB.

3.1 Expressão da proteína recombinante HSP70

O clone que expressava a fração carboxi-terminal da proteína HSP70 foi proveniente da biblioteca de cDNA do Programa Genoma Nordeste (ProGeNE). Resumidamente o RNA mensageiro isolado da *Leishmania chagasi* foi usado no kit *SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning*¹ e o gene clonado no plasmídeo pSPORT 1. A clonagem foi realizada nos sítios *Sal* I e *Not* I. O gene clonado tem 918 pares de base, correspondente a região carboxi-terminal da HSP70 do aminoácido 306 ao 653.

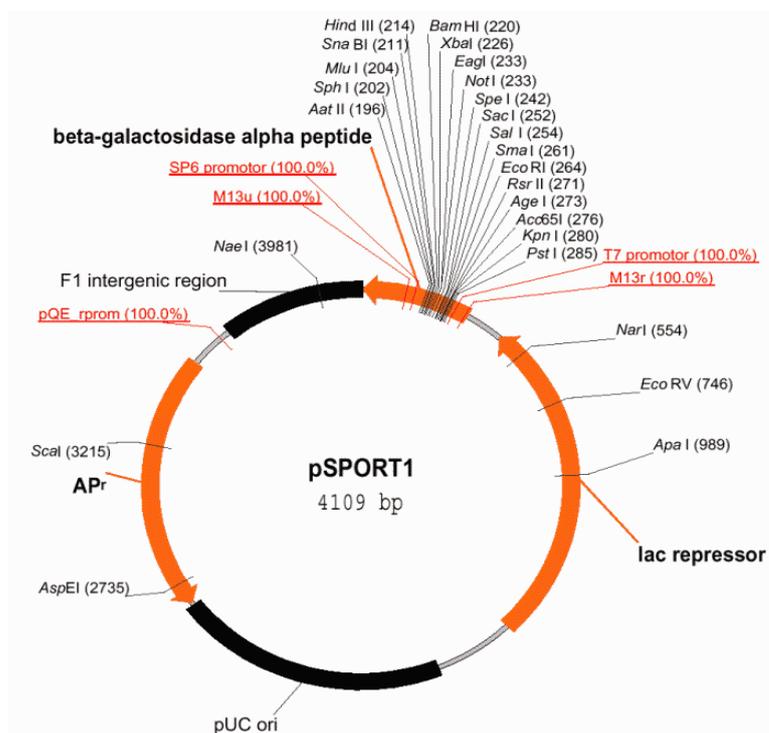


Figura 3 - Mapa do vetor de clonagem e expressão pSport 1 (Invitrogen , USA). A clonagem do cDNA foi feita entre os sítios *Sal* I e *Not* I do poly-linker, representado no alto da figura.

¹ Invitrogen

A bactéria transformada foi cultivada em meio LB (Luria Bertani) por 18 horas e depois repicada em meio ágar LB com ampicilina (concentração final de 100 µg/mL), pois o plasmídeo apresenta um gene de resistência a este antibiótico. Para induzir a expressão do inserto na bactéria, adicionou-se ao meio IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 0,5M, um análogo da lactose que inativa o repressor lacZ, induzindo a transcrição do operon *lac*.

3.2 Soros

Foram testadas 292 amostras do banco de soros caninos do Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido, provenientes de João Pessoa - PB, Patos - PB, Sousa - PB, Caicó - RN, Vitória de Santo Antão - PE, Olinda - PE, Brasília – DF e Campinas – SP, incluindo 29 soros de cães experimentalmente infectados (cedidos por MELO, M. A.).

Todos os soros foram adsorvidos com solução de coleta preparada com sonicação de *E. coli* DH10B, objetivando neutralizar os anticorpos anti- *E. coli*. A adsorção foi realizada por 4 horas a temperatura ambiente (TA) ou 12 horas a 4° C.

As amostras de soro foram avaliadas no ensaio de aglutinação de látex nas diluições 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. Os soros foram diluídos com solução de imunoadsorção (solução de coleta).

3.3 SDS-PAGE e western blot (WB)

Após 18 h de crescimento, a cultura foi centrifugada em microtubos de 1,5 mL, o sobrenadante descartado, o sedimento lisado com tampão de amostra para proteína (Anexos) por 30 min a temperatura ambiente e depois mantido a 100°C por 5 min, sendo imediatamente empregado ou estocado a -20° C. Foram preparados dois géis de poliacrilamida a 12% (Anexo), sendo um para verificar a eficiência da clonagem e expressão do gene da HSP70 e um outro para avaliar a antigenicidade da proteína, através do western blot.

Para análise da expressão de proteínas pela bactéria transformada, comparativamente à linhagem parental não transformada, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida a base de Tris-glicina (Anexo) e coradas com azul de Comassier (Anexos). Um padrão de peso molecular foi empregado para gerar bandas de referência no gel.

Para análise da antigenicidade do segmento da HSP70, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose² utilizando cuba de transferência horizontal semi-seca (Figura 5), com posterior neutralização da membrana com PBS/leite desnatado³ 2% por 30 minutos.

A membrana foi incubada a 37°C por 30 min com um pool de soros caninos positivos na diluição 1/400, seguida de 3 lavagens de 5 min, sob agitação, com PBS Tween 0,05%. Prosseguiu-se com a adição de conjugado proteína A peroxidase, diluída 1/10000, seguida da revelação com solução de TMB, tampão citrato e água oxigenada (Anexo).

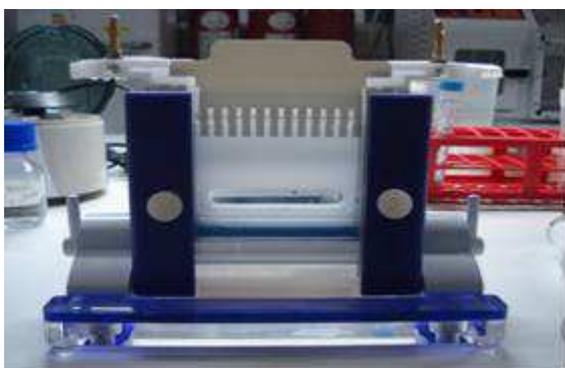


Figura 4 - Cuba de eletroforese vertical.



Figura 5 - Cuba de transferência vertical *semi-dry* (semi-seca).

3.4 Ensaio Imunoenzimático

O teste ouro para a sorologia, neste trabalho, foi o ELISA⁴ (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), que é baseado no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. A reação é visualizada por adição de conjugado proteína A peroxidase. O kit utilizado foi o ELISA S7, 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). Os soros foram diluídos 1:100 em solução de coleta e incubados por pelo menos 4 horas a T. A. ou 12 horas na geladeira.

² PROTRAN® BA & OPTITRAN® BA Nitrocellulose and Reinforced Nitrocellulose Transfer Membranes, Schleicher & Schuell.

³ Molico® desnatado – Nestlé.

⁴ Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7, Biogene.

3.5 Aglutinação em látex

Pérolas de látex de 0,8 μm de diâmetro, fornecidas em suspensão a 10%⁵, foram diluídas 1:10 com PBS 1X (pH 7.4). 500 μL do látex diluído 1/10 e 500 μL da proteína recombinante HSP70 foram homogeneizadas e mantidas em agitação a TA por duas horas, a fim de recobrir as pérolas de látex com a proteína. Em seguida, lavou-se o látex sensibilizado por quatro vezes para retirar o excesso de proteína. O látex foi ressuspensão em PBS 1X para volume final de 1 mL. Utilizou-se azida sódica 0.05% para conservação do látex sensibilizado que foi mantido refrigerado. No momento da reação, o reagente era mantido em temperatura ambiente. Para a reação de aglutinação, o látex estoque foi testado nas diluições 1:20 e 1:40.

Para verificar a eficiência da adsorção, o látex também foi sensibilizado apenas com proteínas de *E. coli* e 20 soros foram testados.

Para a aglutinação 20 μL de látex sensibilizado e 20 μL de soro adsorvido foram pipetados em placa de vidro e homogeneizado por 2 min.



Figura 6 - Pérolas de látex de poliestireno a 10%.

3.6 Análise estatística

Utilizou-se o programa DAG Stat, disponível gratuitamente na internet, para calcular a especificidade, sensibilidade e o valor kappa, o teste de aglutinação em látex comparado com o ELISA S7 (MACKINNON, 2000). O teste de hipóteses foi efetuado com o teste de McNemar para amostras relacionadas.

⁵ Sigma-Aldrich USA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e antigenicidade da proteína recombinante

A expressão de uma proteína heteróloga a partir de um segmento de gene clonado num plasmídeo pode frequentemente ser identificada pela análise das bandas protéicas obtidas por eletroforese em gel de SDS poliacrilamida: a super-expressão do gene clonado pode ser vista como uma banda intensa, inexistente na bactéria sem o plasmídeo, e com o peso molecular esperado pela construção recombinante. Através da coloração do gel foi possível verificar que houve expressão do gene correspondente a região carboxi-terminal da HSP70 com um peso molecular aproximado de 50 kDa (Figura 7, canaleta E, seta). A banda não está presente na bactéria sem plasmídeo (Fig. 7, canaleta D). Como controle adicional, promastigotas de *L. chagasi* solubilizadas em tampão de amostra foram adicionados à canaleta C. Os resultados mostram que o material estava muito concentrado e a separação das proteínas não foi alcançada.

A antigenicidade de proteínas pode ser verificada pelo *western blot*. Os resultados mostrados para os blots das canaletas C, D e E indicam que o pool de soros foi adsorvido adequadamente, uma vez que não foi observada a presença de bandas na canaleta D₁, correspondentes às proteínas de *E. coli* sem plasmídeo e que, conseqüentemente, não expressa antígenos de *Leishmania*. Através do WB também verificou-se que a proteína recombinante é antigênica, tendo sido reconhecida pelos soros dos cães com calazar (Fig.7, canaleta E₁, seta), características anteriormente comprovadas por Andrade et al. (1992). Embora a revelação do WB tenha sido prolongada em demasia, é possível distinguir várias bandas abaixo e mesmo acima daquela indicada pela seta, que tem o peso molecular esperado pela construção. Estas bandas extras foram observadas anteriormente não apenas para o caso da HSP70, mas para várias outras proteínas heterólogas expressas em *E. coli*. Não há ainda uma explicação satisfatória para este fenômeno. Poucas bandas protéicas de *Leishmania* puderam ser evidenciadas no WB (Fig. 7, canaleta E₁), o que se deve provavelmente à separação inadequada dos antígenos do parasito na eletroforese.

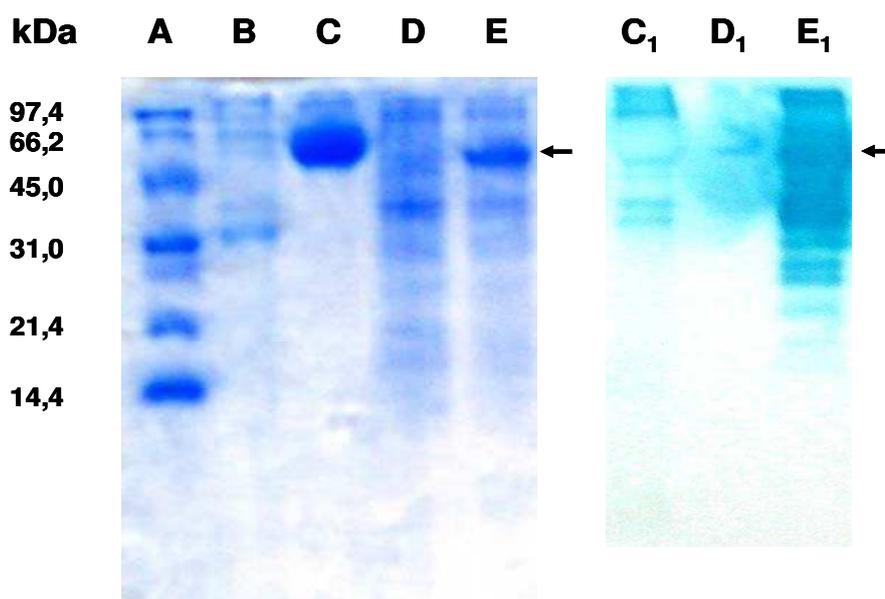


Figura 7 - Gel de SDS poliacrilamida (lado esquerdo) e western blot (lado direito) de proteínas de *Leishmania chagasi* (C e C₁) e *Escherichia coli* sem plasmídeo (D e D₁) ou com plasmídeo (E e E₁) permitindo a expressão da fração carboxi-terminal da HSP70 de *L. chagasi*. A seta indica a banda correspondente à fração carboxi-terminal da HSP70 (denominada S7). Os marcadores de peso molecular estão nas canaletas A e B.

4.2 Aglutinação em látex e comparação de seus resultados com o ensaio imunoenzimático ELISA S7

4.2.1 Padronização preliminar

Inicialmente procurou-se verificar a melhor diluição de trabalho dos soros e do látex. Para tal foram selecionados 20 soros com diferentes níveis de reatividade no ELISA S7, que foram imunoabsorvidos e diluídos 1:20 e foi empregado o látex na diluição 1:20. Comparando os resultados obtidos com o ELISA S7, observou-se que havia aglutinação apenas nos soros com títulos altos no ensaio imunoenzimático, concluindo-se assim que a diluição dos soros deveria ser menor.

Em seguida, os mesmos soros foram empregados nas diluições 1:2, 1:5 e 1:10 com o látex na diluição 1:40. Nas diluições 1:5 e 1:10, a aglutinação manteve-se apenas nos soros com altos títulos de anticorpos. Quando o soro foi diluído 1:2, houve uma melhor concordância entre os resultados do ELISA e da aglutinação em látex. A partir deste resultado, optou-se por testar as amostras com os soros diluídos 1:2 e o látex 1:40. Não foi possível avaliar os soros não diluídos porque o antígeno não é purificado e a amostra deve

ser, necessariamente, imunoadsorvida com antígenos de *E. coli* para evitar que anticorpos anti-*E. coli* aglutinem o látex sensibilizado com o sonicado de *E. coli* recombinante.

Em relação à eficiência da imunoadsorção, todas as amostras foram negativas quando a aglutinação foi realizada com o látex sensibilizado apenas com antígenos de *E. coli* DH10B. Ressalte-se que estes mesmos soros, previamente à imunoadsorção, eram pouco aglutinantes, e apenas dois foram claramente aglutinantes, comprovando-se assim que os anticorpos anti-*E. coli* foram neutralizados e indicando que os resultados positivos observados com látex recoberto com *E. coli* recombinante eram aglutinações causadas pelos anticorpos anti-HSP70. As figuras 8A/8B e 9A/9B mostram aglutinações positivas e negativas, respectivamente.



Figura 8A - Reação de aglutinação em látex positiva. Há a formação de grumos



Figura 8B - Reação de aglutinação em látex positiva em maior aumento

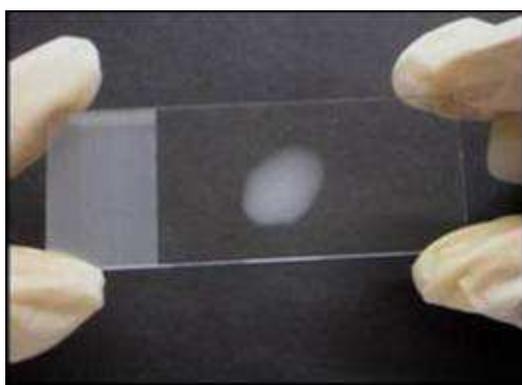


Figura 9A - Reação de aglutinação em látex negativa. A suspensão permanece homogênea.



Figura 9B - Reação de aglutinação em látex negativa em maior aumento

4.2.2 Avaliação de sensibilidade e especificidade do teste de aglutinação de látex

O painel de 292 soros foi inicialmente avaliado pelo ensaio ELISA S7, tendo 13 amostras resultados indeterminados (ou zona cinza, como designado pelo fabricante do kit). Estes soros foram retirados do painel para fins deste estudo.

Dos 279 soros restantes, 163 apresentaram resultados concordantes nos ensaios de aglutinação em látex e no ELISA S7, e 116 tiveram resultados discordantes, sendo 22 negativos na aglutinação de látex e positivos no ELISA e, ao contrário, 94 positivos na aglutinação de látex e negativos no ELISA (Tabela 1).

Para verificar se o resultado negativo na aglutinação de látex era devido ao efeito prozona, os 22 soros discordantes foram testados nas diluições 1:4 e 1:8, e apenas 1 (um) manteve-se negativo, indicando que um resultado falso negativo pode ocorrer em soros com títulos altos. A amostra que não aglutinou pode ter majoritariamente imunoglobulinas não aglutinantes, já que sua reatividade em ELISA S7 foi semelhante às das demais amostras positivas (O.D. 0,210-0,520).

De acordo com o programa DAG Stat, a sensibilidade do teste de aglutinação em látex para os resultados mostrados na Tabela 1 foi de 68,12% (95% CI: 0,5579-0,7883), a especificidade de 55,24% (95% CI: 0,4824-0,6208) e valor do kappa de 0,173 (95% CI: 0,0740-0,2719), quando comparado com o ensaio imunoenzimático.

Tabela 1 - Comparação do teste de aglutinação em látex e ELISA S7.

		ELISA S7		Total
		Positivo	Negativo	
Aglutinação em látex	Positivo	47	94	141
	Negativo	22	116	138
Total		69	210	279

A sensibilidade e especificidade do teste de aglutinação de látex foram baixas, quando comparadas a outros ensaios sorodiagnósticos (DIETZE et al., 1995; OSKAM et al., 1996; BISUGO et al., 2007; ANDRADE et al., 2009) mostrando que o teste ainda precisa de ajustes. O kappa apresentou concordância fraca, entre 0 e 0,2, de acordo com Thrusfield (2004), com o teste ELISA S7. Os resultados discordantes entre os dois testes não estão dentro da expectativa do acaso ($p < 0,0001$ – teste de McNemar).

A baixa sensibilidade observada no ensaio empregando soros diluídos 1:2 pode ser em parte atribuída ao excesso de anticorpos no ensaio, demonstrado pela retomada de aglutinação nas mesmas amostras, quando mais diluídas. Quando os 21 soros que converteram para reatividade após diluição são transportados na tabela para a célula de concordância ELISA/látex, a sensibilidade do ensaio passa a 98,55% (95% CI: 0,9219-0,9996) e o valor de kappa se eleva para 0,3703, apresentando concordância razoável (0,21 a 0,4) com o ELISA S7. Entretanto, para fins práticos, não é conveniente o emprego de diferentes diluições na aglutinação de látex e a repetição de ensaios com soros, pois dificulta a padronização e encarece o ensaio.

Há apenas um relato na literatura sobre o uso de ensaios de aglutinação em látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, Dereure et al. (1998b) relatam 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. Nos experimentos descritos o ponto de corte da imunofluorescência foi 1:160, duas diluições acima daquele adotado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Ainda assim, a concordância entre os dois testes foi excelente, com kappa = 0,883. A sensibilidade máxima alcançada no teste de aglutinação de látex com antígeno recombinante, relatada no presente estudo, está próxima à descrita por Dereure et al. (1998b) para um ensaio similar baseado na sensibilização de microesferas de látex com antígeno solúvel de *Leishmania*. A especificidade, contudo, foi muito inferior, apesar do uso de um antígeno único de *Leishmania*, a HSP70, na sensibilização do látex.

A sensibilidade e a especificidade alcançadas pelo teste de aglutinação de látex do presente estudo foram inferiores também às descritas por Mayrink et al. (1972), que obtiveram 100% de especificidade e sensibilidade no sorodiagnóstico do calazar humano ao utilizar antígeno a base de extrato metílico de BCG, o mesmo utilizado na reação de fixação do complemento, para sensibilizar o látex. Não houve reação cruzada com doença de Chagas e leishmaniose tegumentar e nem mesmo com tuberculose ou com hanseníase. Os soros humanos utilizados, inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos 1:10, foram todos previamente positivos na reação de fixação do complemento para o diagnóstico do calazar, e depois diluídos. Em soros não diluídos observaram-se reações falsas positivas, assim como no teste de látex em estudo.

Cummins et al. (1994) desenvolveram um ensaio de aglutinação de látex com antígenos de *Leishmania* e logo em seguida Bagchi et al. (1998) e Moody & El-Safi (1996)

avaliaram o ensaio para o diagnóstico do calazar humano na Índia e no Sudão, respectivamente. Embora ambos tenham obtido elevada sensibilidade, apenas Moody & El-Safi obtiveram uma especificidade elevada. A diferença entre os resultados não pode ser estabelecida com clareza, mas pode estar relacionada ao congelamento de soros ou à resposta particular de anticorpos das duas populações humanas.

Uma causa possível para a ocorrência de reações falso-positivas no presente ensaio é a aglutinação inespecífica causada por algum fator sérico ou pela presença de sítios residuais de ligação no látex, não saturados pelo processo de sensibilização. De fato, na maior parte dos ensaios com látex, a sensibilização é seguida de uma etapa de neutralização do látex com albumina sérica bovina (DEREURE et al., 1998b), procedimento que não foi empregado aqui.

Outro ensaio de aglutinação em látex para o diagnóstico do calazar humano, o KAtex, foi descrito há cerca de 10 anos e sua utilidade no diagnóstico do calazar humano tem sido bastante investigada. Houve uma grande variação da sensibilidade e especificidade do ensaio, com valores entre 47,7-100% e 82,4-100%, respectivamente. A baixa sensibilidade (47,7%) do KAtex em um estudo no Nepal foi devido ao uso da urina gelada ao invés da urina fresca (RIJAL et al., 2004). A comparação com os resultados obtidos no presente estudo, contudo, é pouco informativa, já que o KAtex visa detectar antígeno de urina a base de carboidrato em humanos, diferenciando do teste de látex utilizado no estudo, que visa detectar anticorpos anti-HSP70 no soro de cães.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que o teste da aglutinação em látex empregando a HSP70 recombinante de *Leishmania chagasi* tem um potencial claro para triagem no sorodiagnóstico canino, por ser um teste rápido e fácil, mas são ainda necessários ajustes que otimizem, sobretudo, sua especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leishmaniasis Cutânea y Visceral. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. Publicacion Organizacion Panamericana de la Salud. 2 ed., Washington – EUA..., p. 615-633, 1989.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-azar. II - *Leishmania infantum*. **Proceedings of Royal Society of London**, v. 108, p. 453-502, 1931.
- AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, M. C.; DE COLMENARES, M. et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 2, p.154-159, 1998.
- ALMEIDA, J. F.; CARVALHO, C. C.; SILVA, L. A.; GARCIA, A. M.; GOMES, R. B. B.; COSTA, D. J.; SOUSA, S. M.; LEITE, R. M. J.; MARTINS, S. R.; REBELO, J. M. M.; BARRAL, A.; NASCIMENTO, F. R. F. Caracterização das fases clínicas da leishmaniose visceral em cães da localidade de Vila Nova do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Teresina, v. 39, p. 120, 2006.
- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 162, n. 6, p. 1354- 1359, 1990.
- ANDRADE, C. R., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E., OTSU, K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas disease patients. **J Clin Microbiol**, v. 30, n.2, p. 330-335, 1992.
- 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.
- ANDRADE, R. A.; SILVA ARAÚJO, M. S.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 128, n. 1-3, p. 79-86, 2009.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinic in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.
- ATTAR, Z. J.; CHANCE, M. L.; EL-SAFI, S.; CARNEY, J.; AZAZY, A.; EL-HADI, M.; DOURADO, C.; HOMMEL, M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 78, n. 1, p.11-16, 2001.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 24-34, 2005.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.;

DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 173, p.758-61, 1996.

BAGCHI, A. K.; TIWARI, S.; GUPTA, S.; KATIYAR, J. C. 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.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Vet J**, v. 175, n. 1, p. 14-15, 2008.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R. P.; SANTOS, S. B.; BADARÓ, F.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; FALCOFF, E.; FALCOFF, R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 853-857, 1991.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Vet J**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BATISTA, M. G. N. **Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência, fatores de risco e isolamento do agente**. Patos, UFCG, 2008, 44p. (Especialização em Saúde Pública Animal).

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

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. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.

BOELAERT, M.; EL-SAFI, S.; MOUSA, H.; GITHURE, J.; MBATI, P.; GURUBACHARYA, V. et al. Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v. 4, p. 31-38, 1999.

BOELAERT, M.; EL-SAFI, S.; HAILU, A. et al. Diagnostic tests for kala-azar: A multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2008.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1549-1555, 1991.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B.; In: Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, (São Gonçalo do Amarante, RN), v. 20, p. 3277-3284, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Boletim Epidemiológico**, v. 6, p. 1-11, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas Técnicas. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2004, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishmune®. Nota técnica. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006, 120 p.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Imprensa Nacional. **Ministério da Saúde**. Gabinete do Ministro.

BRAZ, R. F. S.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R. A.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. B. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, n.4, p.344–348, 2002.

BURNS, J. M. J.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARÓ, R.; REED, S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 775-779, 1993.

CABRAL, M.; OGRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine Leishmaniasis: strong evidence of a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p.173-180, 1998.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev Inst Trop S Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CARVALHO, L. C. P.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; LANNES-VIEIRA, J.; VINHAES, L.; ORGE, G.; MARSOCHI, M. C.; GALVÃO-CASTRO, B. Nature and incidence of erythrocyte-bound IgG and some aspects of the physiopathogenesis of anaemia in American visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**, v. 64, n. 3, p. 495–502, 1986.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A. P.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, p. 289-295, 2002.

CENINI, P.; BERHE, N.; HAILU, A.; MCGINNES, K.; FROMMEL, D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 986-993, 1993.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 189-229, 1938.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R. et al. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 321-324, 1995.

COURTEUAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 498-502, 1996.

CUMMINS, A. J.; MOODY, A. H.; LALLOO, K.; CHIODINI, P. L. 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.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTÓVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W. D.; REED, S. G.; BADARO, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 155-158, 1995.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil**. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956a.

- DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956b, 162p.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.
- DEREURE, J.; PRATLONG, F.; REYNES, J.; BASSET, D.; BASTIEN, P.; DEDET, J. P. Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. **Bull World Health Organ**, v. 76, p. 203-209, 1998a.
- DEREURE, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; GOUVERNET, 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, 1998b.
- DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C.; RODRIQUES, T. P.; BOULOS, M.; COREY, R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 53, n. 1, p. 40-42, 1995.
- DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 940-944, 1990.
- DIRO, E.; TECHANE, Y.; TEFERA, T. et al. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATex (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n.9, p. 908-914, 2007.
- DYE, C.; VIDOR, E.; DEANE, M. P. Serological diagnosis of Leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v.110, p. 647-657, 1993.
- EL-AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P. RAHMAN, A. M. A.; KOLKA, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. 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.; ABDEL-HALEEM, A.; HAMMAD, A.; EL-BASHA, I.; OMER, A.; KAREEM, H. G.; BOELAERT, M.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. **East Mediterr Health J.**, v. 9, n. 4, p. 844-855, 2003.
- EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J. B.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; LOPES, U. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. **Am J Trop Med Hyg**, v. 42, p. 118-141, 1990.

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

FERNANDES, A. P. Imunidade a Vacinas na Leishmaniose Visceral Canina. In: Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina, 1, 2006. Jaboticabal (SP). **Anais... UNESP**, p. 32-36, 2006.

FERREIRA, E. D. E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol.**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, 2007.

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257-263, 2008.

FERRO, C.; MORRISON, A. C.; TORRES, M. et al. Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol.**, v. 32, n. 4, p. 527-37, 1995.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: los leishmaniosis. **Revista Sci. Tach. Off. Int. Epiz**, Espanha, p. 661-676, 2004.

GENARO, O.; COSTA, R. T.; SILVA, J. C. F.; REIS, A. B.; VIEIRA, E. P. ARIAS, J. R. et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Acta Parasitol Turcica**, Suplemento 1, v. 21, p. 93, 1997.

GONÇALVES, A. J. R.; ROZEMBAUM, R.; CUNHA, R. Q. et al. Calazar: relato de três pacientes adultos internados no HSE/INAMPS (RJ). Considerações sobre esta endemia de grande importância no nosso território. **Arq. Bras. Med.**, v. 60, n. 5, p. 369-376, 1986.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmanis in the New World. **Am J Med Hyg**, v. 41, p. 687-725, 1989.

HATAM, G. R.; GHATEE, M. A.; HOSSINI, S. M. H.; SARKARI, B. Improvement of the Newly Developed Latex Agglutination Test (KAtex) for Diagnosis of Visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 202-205, 2009.

HERMONT, V. J. Leish-Tec® - Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico**, 1ª ed., Juatuba – MG, outubro, 2008.

IKEDA, F. A.; FEITOSA, M. M.; CIARLINI, P. C.; MACHADO, G. F.; LIMA, V. M. F.

Criptococose e toxoplasmose associadas à leishmaniose visceral canina – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, ano X, n. 56, Rio de Janeiro, p. 28-32, 2005.

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, p. 319-324, 2007.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In M Service, **Demography and Vector Borne Diseases**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 85-106, 1989.

LAINSON, R., SHAW, J. J., SILVEIRA, F. T., BRAGA, R. R. American visceral *Leishmaniasis*: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, p. 517, 1987.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. A Amazonian visceral leishmaniasis – Distributions of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) in relation to the *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, ed. 85, p. 135-137, 1990.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in Índia. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1252-1254, 1903.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 21, p. 3009-3014, 1991.

LUZ, K. G.; RIBEIRO, V. M.; SOUSA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; SBARDELINI, I. M. E.; PARRA, L.; PAPA, T. Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico de Leishmaniose Visceral Canina – LEISHMUNE**, Campinas, SP, p. 8-29, 2005.

MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computers in Biology and Medicine**, v. 30, n. 3, p. 127-134, 2000.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet J.**, v. 179, n. 1, p. 142-4, 2009.

MALAEI, S.; MOHEBALI, M.; AKHOUNDI, B.; ZAREI, Z. Evaluation of latex agglutination test (KAtex) for the detection of urinary antigens in human visceral leishmaniasis. **J Tehran Un Med Sci**, v. 4, p. 101-108, 2006.

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; DE PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M.

- C.; BESSA, A. M.; PASSOS, S. R. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res Vet Sci.**, v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.
- MARZOCHI M. C. A. A leishmaniose tegumentar no Brasil. **In: Grandes Endemias Brasileiras.** Universidade de Brasília, Brasília. 1989.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **JBM Curso**, v. 63, n. 5-6, p. 82-104, 1992.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.
- MAURICIO, I. L., STOHARD, J. R., MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.
- MAYRINK, W.; CHIARI, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; COSTA, C. A. Teste do Látex no Diagnóstico do Calazar Americano. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 273-276, 1972.
- MELO, M. A. **Isolamento de clones imunorreativos e caracterização *in silico* de novos antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*.** Tese de Doutorado. Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2006. 169 p.
- MELO, M. A. **Ensaio Clínico-Terapêutico na Leishmaniose Visceral Canina, Imunoquimioterapia em Animais Assintomáticos.** Dissertação. Medicina Veterinária Preventiva, UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 1998, 74 p.
- MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.
- MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 67-72, 1994.
- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.
- 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.
- MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol.**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

- MORRISON, A. C.; FERRO, C.; PARDO, R. et al. Seasonal abundance of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol.**, v. 32, n. 4, p. 538-548, 1995.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p. 1506-1510, 1983.
- NAKATANI, M.; MIRANDA-BADARÓ, R.; MEIRELES, A.; TRIGO, J.; NETTO, E. M.; BADARÓ, R. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com o novo antígeno k26 adicionado ao k39. **Rev Bras Med Trop**, Suplemento 10, 2001.
- NASCIMENTO, M. D. S. B.; COSTA, J. M. L.; FIORI, B. I. P. et al. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no estado do Maranhão - Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 219-228, 1996.
- NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. **Academy of Science**, v. 146, p. 789, 1908.
- OLIVEIRA, H. Epidemiologia do Calazar. **Revista brasileira de Medicina**, v. 17, n. 1, p. 56-58, 1960.
- OSKAM, L.; SLAPPENDEL, R. J.; BEIJER, E. G.; KROON, N. C.; VAN INGEN, C. W.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; TERPSTRA, W. J. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 16, n. 3-4, p. 235-239, 1996.
- PALATINICK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; PALATINICK, M.; LUZ, K.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, N. 4, p. 390-393, 1995.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATINICK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PASSOS, V. M.A.; FALCÃO, A.L.; MARZOCHI, M. C. A.; GONTIJO, C. M. F.; DIAS, E. S.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; GUERRA, H. L.; KATZ, N. Epidemiological aspects of american cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 103-110, 1993.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras. Méd.**, ed. 48, p. 949-950, 1934.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 872, 1988.

PITTA, M. G. R.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; KHEIR, M. E.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, 2009.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, p. 66-69, 2008.

REED, S. G.; SHREFFLER, W. G.; BURNS, J. M.; SCOTT, J. M.; ORGE, M. G.; GHALIB, H. W. et al. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 6, p. 632-639, 1990.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349, 2001.

RIERA, C.; FISA, R.; LOPEZ, P.; RIBERA, E.; CARRIO, J.; FALCO, V.; MOLINA, I.; GALLEGO, M.; PORTUS, M. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 23, n. 12, p. 899-904, 2004.

RIJAL, S.; BOELAERT, M.; REGMI, S.; KARKI, B.M.; JACQUET, D.; SINGH, R.; CHANCE, M.L.; CHAPPUIS, F.; HOMMEL, M.; DESJEUX, P.; VAN DER STUYFT, P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. **Trop Med Int Health.**, v. 9, n. 6, p. 724-729, 2004.

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

ROMERO, H. D.; SILVA, L. A.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES, V.; COSTA, R. T.; GUIMARÃES, S. F.; ALECRIM, W.; MORAES-SOUZA, H.; PRATA, A. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 27-33, 2009.

SANTOS, S. O., ARIAS, J., RIBEIRO, A. A., DE PAIVA HOFFMANN, M., DE FREITAS, R. A., MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**; v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SARKARI, B.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: Detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **Acta Trop**, v. 82, p. 339-348, 2002.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental Leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995.

SCHOONE, G. J.; HAILU, A.; KROON, C. C.; NIEUENHUYNS, J. L.; SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAM, L. A fast agglutination screening test (FAST) for detection of anti-*Leishmania* antibodies. **Trans R S Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p. 400-401, 2001.

SEAMAN, J. et al. Epidemia visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Ann Intern Med**, v. 124, n. 7, p. 664-672, 1996.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI Jr., G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVA, E. S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C. M. F.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet. Rec.**, v. 147, n. 15, p. 421-422, 2000a.

SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N.N.C.; SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATINICK, M.; SOUZA, C.B.P.; In: A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, (São Gonçalo do Amarante, RN), v. 19, n. 9-10, p.1082-1092, 2000b.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples

from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 896-898, 2001.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, S.; PAI, K.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. 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.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2^a ed., Ed. Roca, São Paulo, 1995, 556 p.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 505-511, 1996.

VILAPLANA, C.; BLANCO, S.; DOMINGUEZ, J.; GIMENEZ, M.; AUSINA, V.; TURAL, C.; MUNOZ, C. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 4, p.1853-1854, 2004.

VOIGT, A.; KLEINE, F. D. **Leishmaniasis Visceral y Cutanea, Kala-Azar o Botón de Oriente**. ZOONOSIS, Descripción Sinóptica Orientativa. Editorial Acribia. Zaragoza - España, p. 257-259, 1975.

WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; VRIES, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991a.

WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M. G.; VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991b.

WHO. The world health report 2001. Geneva; 2001.

WOODMAN, R. C; JOHNSTON, B.; HICKEY, M. J.; TEOH, D.; REINHARDT, P. POON, B. Y.; KUBES, P. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. **Journal Experimental Medicine**, v. 188, n. 11, p. 2181-2186, 1998.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALII, E. A.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from the Sudan. **Trop Med Int Health**, v. 6, n. 2, p. 108-113, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1 Soluções

Solução acrilamida/bis-acrilamida, 29:1

Adicionar 50 mL de água em 29 g de acrilamida ultrapura. Adicionar 1 g de bis-acrilamida e misturar até dissolver. Aquecer, se desejável, mas não acima de 55°C. Completar o volume para 100 mL e filtrar em papel de filtro Whatman nº 5 ou membrana de 0,22 a 0,45 µm. Estocar por até 1 mês em vidro âmbar com tampa. Descartar se aparecer cheiro de amônia.

Tampão de corrida eletroforética – Tampão Tris Glicina (pH = 8,5 ± 0,1)

Tris 6,0 g
 Glicina 28,8 g
 SDS 1,0 g
 H₂O dest 1,0 L

Tampão de Transferência – Blotting – Tampão Tris Glicina (pH = 8,5 ± 0,1)

Tris 3,0 g
 Glicina 14,4 g
 H₂O dest 0,8 L
 Metanol 0,2 L

PBS	1L (1X concentrado)	1L (10X concentrado)
NaCl	8 g	80 g
KCl	0,2 g	2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	14,4 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g	2,4 g

PBS 0.05% de tween 20 (Tampão de lavagem)

Ao PBS, adicionar metade do volume a ser preparado (em mL) de Tween 20 (em µL)
 Exemplo: para 500 ml de PBS adicionar 250 µL de Tween 20.

Tampão Citrato para TMB

Na₂HPO₄ 8,063 g
 Ácido cítrico 2,625 g
 H₂O dest 250 mL
 NaOH Acertar o pH para 5,0

Tampão de amostra para proteínas (6,5 mL)

Tris/HCl (pH = 6,8)	1,0 mL	⇒	Solução estoque Tris/HCl (pH = 8,5)
Glicerol 50%	2,0 mL		- 5,0 mL H ₂ Odest + 0,37 g Tris
Azul de Bomofenol 0,1%	1,0 mL		- Acertar o pH com HCl para 6,8
β-mercaptoetanol	0,5 mL		
SDS	0,65 g		

Corante para eletroforese – Comassier Blue

Comassier Blue	0,125 g	OBS ₁ .: Para preparar o descorante
Ácido acético	17,5 mL	não se adiciona o Comassier blue.
Metanol	62,5 mL	OBS ₂ .: O corante deve ser filtrado
H ₂ O dest	170,0 mL	antes do uso.

TMB Solução estoque

TMB	0,048 g
DONS	0,160 g
Etanol	20,0 mL

OBS.: Dissolver no banho-maria a 56°C por 1 hora

Solução reveladora para Proteína A peroxidase

TMB/ DONS/ Etanol	1,0 mL (da solução estoque)
Tampão citrato para TMB	7,0 mL
H ₂ O ₂	30 µL

Tampão de bloqueio para ELISA e WB

PBS leite desnatado 2%. Pode ser estocado a 4°C.