Camila Aparecida de Carvalho

Estudo da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da
Leishmaniose visceral

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade
Júnior

São Paulo

2012

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Camila Aparecida de

Estudo da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da Leishmaniose visceral / Camila Aparecida de Carvalho. – São Paulo, 2012.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Heitor Franco de Andrade Júnior

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: **Camila Aparecida de Carvalho**

Titulo da Dissertação: “Estudo da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da Leishmaniose visceral”

Orientador: **Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

(☐) APROVADO(A) (☐) REPROVADO(A)

Examinador(a)

Assinatura.....

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

Dedico este trabalho a todas as pessoas
que estiveram ao meu lado durante este período
(a toda minha família que é muito grande e aos raros e poucos
amigos), em especial:
aos meus pais Osvaír e Elíabeth pelo amor e estrutura fornecidos para
que eu me tornasse quem sou,
a minha irmã Carolíne e sobrinha Rafaella por todos os momentos de
felicidade trazidos a minha vida,
ao meu esposo Tiago pelo incentivo incondicional, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Heitor Franco de Andrade Jr. que possibilitou a realização deste trabalho me recebendo como aluna, por toda confiança, paciência e incentivo sempre, por sua dedicação, comprometimento e alegria, qualidades indispensáveis para uma excelente orientação, que originou uma relação de respeito e amizade.

A Dra. Nanci do Nascimento, Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, e sua aluna Anette Kelsei Partata pelo fornecimento de amostras humanas.

Ao Pesquisador do Laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz Roberto Mitsuyoshi Hiramoto pelo fornecimento de amostras de cães.

Aos Pesquisadores do Laboratório de Protozoologia Luciana Regina Meirelles e Andrés Jimenez Galisteo por todo suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Protozoologia do IMT: Rose, Silvia, Dona Fran (*in memorian*), Solange e Luciano, por todo auxílio e amizade desde o início.

As amigas Bruna, Juliana e Marina por todo apoio técnico, intelectual e emocional. Em especial a Juliana pela revisão deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Bárbara, Ivani, Maria, Samantha, Nahara, Andréa, Jaqueline, Felipe, Michel, Vanessa e Thalita, por toda ajuda e incentivo.

A todos os funcionários da Biblioteca do IMT pelo auxílio na formatação desta dissertação e a Secretaria de Pós-Graduação do IMT pela ajuda nas partes burocráticas.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se a ver a vida passar, é melhor tentar, ainda que em vão, que sentir-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver."

Martin Luther King

RESUMO

Carvalho CA. Estudo da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da Leishmaniose visceral (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

A Leishmaniose visceral é uma doença parasitária crônica em homens e cães, causada por protozoários da espécie *L. (Leishmania) chagasi*. O diagnóstico parasitológico é confirmado pelo achado do agente em aspirados de medula óssea, linfonodo, baço e fígado, enquanto que a sorologia IgG específica é usada em geral para estudos epidemiológicos, apesar dos altos níveis séricos de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Existem relatos anedóticos de resultados sorológicos negativos em doença ativa, atribuído à formação de imunocomplexos. Dado que imunocomplexos podem ser dissociados por tratamento ácido, nós buscamos a padronização de um teste simples de dissociação ácida dos imunocomplexos de amostras de soro, por tratamento ácido e neutralização em poços adsorvidos com antígenos de *Leishmania*, seguida de ELISA (ELISA dissociativo). A confirmação da presença de antígenos foi realizada pela detecção após adsorção ácida por DOT-ELISA, usando soro de coelho hiperimune anti-*Leishmania*. Amostras de hamsters infectados experimentalmente com *L. (L.) chagasi* mostraram a presença e interferência de imunocomplexos na sorologia principalmente nas fases iniciais da infecção, por ELISA dissociativo e DOT-ELISA. Em amostras maiores de áreas endêmicas, o ELISA dissociativo aumentou a soropositividade em 10% em amostras de cães negativas e 3,5% de amostras humanas negativas, com confirmação por DOT-ELISA. Os resultados mostram que este teste poderia ser usado no diagnóstico da LV, como abordagem alternativa para a identificação sorológica de casos assintomáticos e para indicação de métodos parasitológicos invasivos confirmatórios.

Descritores: Leishmaniose visceral; Complexo antígeno-anticorpo; ELISA.

ABSTRACT

Carvalho CA. Study of the presence and influence of parasite antigens in the serology of visceral leishmaniasis (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, is a chronic parasitic disease of humans and dogs. Confirmation of the protozoal agent in bone marrow, lymph node or spleen aspirate is diagnostic, while specific-IgG serology is used mainly for epidemiology despite the general presence of high levels of serum immunoglobulins. Anecdotal reports of false-negative serology in active disease cases are known and are ascribed to the formation of immune complexes. Because dissociation of immune complexes can be accomplished by acid treatment, we devised a simple, routine enzyme immunoassay (ELISA) for the dissociation of immune complexes in serum samples using acid treatment and neutralization in wells adsorbed with *Leishmania* antigen (dELISA). Confirmatory acid DOT-ELISA was also developed for antigen detection by anti-*Leishmania* rabbit antiserum. In experimental *L. (L.) chagasi* hamster models, immune complexes interfered with ELISA mostly in the early stages of infection, according to both dELISA and antigen DOT-ELISA results. In larger samples from endemic areas, dELISA increased seropositivity by 10% in negative dog samples (7/70) and 3.5% in negative human samples (3/85), showing that dELISA could be used in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Moreover, dELISA could be used as an alternative approach to screening asymptomatic visceral leishmaniasis patients, instead of invasive confirmatory testing.

Descriptors: Visceral leishmaniasis; Antigen-antibody complex; ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotos do parasita <i>L. (L.) chagasi</i> , exemplos das formas amastigotas intracelulares e formas promastigotas flageladas.....	25
Figura 2	Ciclo de transmissão de parasitas da espécie <i>Leishmania</i>	29
Figura 3	Curva padrão para detecção de antígeno em membrana por adsorção ácida. Detecção de concentrações entre 8 a 250 ng de antígeno por DOT.....	61
Figura 4	Exemplo de amostras negativa e positiva reveladas pelo sistema de DOT-ELISA ácido.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Evolução da IgG sérica anti- <i>Leishmania</i> . As barras representam a média e o erro padrão da média de cada tempo analisado. Cada ponto refere-se a uma medida de sorologia individual em um animal.....	64
Gráfico 2	Evolução da carga parasitária em hamsteres infectados experimentalmente com 5×10^7 formas de <i>L. (L.) chagasi</i> , em associação com valores médios de IgG específica. Símbolos redondos abertos e linha contínua mostram a evolução da carga parasitária em baço, enquanto que os pontos cheios e barras de desvio, unidos por linha tracejada mostram a evolução da sorologia para IgG.....	66
Gráfico 3	Comparação de resistência ao stress de pH em ELISA, utilizando amostra negativas, intermediárias e positivas. A relação entre a diluição sem e com stress está representada pelas linhas. A linha tracejada representa a diluição da amostra sem stress, em pH 7.5 e as linhas contínuas com seus diferentes símbolos representam a diluição de amostra submetida ao stress em pH 2.0, 2.5, 3.0 e 3.5.....	68
Gráfico 4	ELISA convencional e ELISA dissociativo em amostra de soro associada a quantidades crescentes de antígeno solúvel de <i>L. (L.) chagasi</i> . A linha preta contínua com pirâmide cheia representa o ELISA convencional e a linha preta contínua com círculo cheio representa o ELISA dissociativo. A linha tracejada com círculos abertos representa a porcentagem de imunocomplexos detectada nas diluições e a linha tracejada com pirâmide aberta representa a porcentagem de recuperação de IgG após dissociação em pH 2.5. A faixa cinza representa a média das absorbâncias da amostra testada. A maior concentração de antígeno adicionada (32μ) apresenta melhor proporção entre imunocomplexo associado e dissociado.....	70
Gráfico 5	Correlação de quantificação do ELISA convencional e ELISA dissociativo, mostrando a distribuição das amostras de hamsteres em relação aos dois tipos de ensaios, ELISA C ou convencional e ELISA D ou com dissociação de	

	imunocomplexos.....	72
Gráfico 6	<p>Evolução de anticorpos IgG anti-<i>Leishmania</i> em amostras de hamsteres experimentalmente infectados, onde os pontos representam os intervalos quinzenais e mensais (15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção). A linha preta com círculos representa a detecção de IgG em ELISA convencional e a linha preta com quadrado representa a detecção de IgG em ELISA dissociativo. A linha preta com losango mostra a porcentagem de incremento de IgG nas amostras.....</p>	73
Gráfico 7	<p>Análise individual das amostras que apresentaram incremento de IgG no ELISA dissociativo, aplicadas a valores de cutoff do ELISA convencional (linha contínua) e ELISA dissociativo (linha tracejada). Os pontos fechados representam as amostras quando aplicadas ao ELISA convencional e os pontos abertos representam as mesmas amostras quando aplicadas ao ELISA dissociativo, a ligação entre os dois pontos refere-se a quantidade de incremento de IgG sofrido por estas amostras.....</p>	77
Gráfico 8	<p>Comparação de resultados de ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D). Os círculos fechados representam a absorbâncias obtidas pelo ELISA convencional, os círculos abertos representam as absorbâncias obtidas pelo ELISA dissociativo. As linhas ligando aos dois pontos representam o incremento de IgG sofrido por cada amostra. A linha contínua representa o <i>cut-off</i> do ELISA convencional e a linha tracejada representa o <i>cut-off</i> do ELISA dissociativo.....</p>	82
Gráfico 9	<p>Os pontos fechados indicam as amostras negativas testadas pelo ELISA convencional e os pontos abertos representam as mesmas amostras testadas pelo ELISA dissociativo, a ligação entre os dois pontos representam o incremento de IgG sofrido pelas amostras.....</p>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de espécies de <i>Leishmania</i> segundo subgênero <i>Viannia</i> e <i>Leishmania</i> , presentes no Novo Mundo.....	23
Tabela 2	Drogas utilizadas nos procedimentos de sedação e eutanásia dos animais estudados.....	53
Tabela 3	Relação do número total de amostras em cada grupo e sua respectiva positividade para o ELISA convencional e ELISA, os resultados foram analisados dentro de um Intervalo de confiança de 95%.....	75
Tabela 4	Análise qualitativa da detecção de IgG anti- <i>L. (L.) chagasi</i> em amostras de hamster com infecção experimental pelo ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D).....	76
Tabela 5	Comparação entre resultados de RIFI, ELISA comercial (ELISA IAL), ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D). Os resultados de RIFI e ELISA comercial foram cedidos pelo IAL e os resultados de ELISA convencional e ELISA dissociativo foram obtidos após nossos experimentos.....	79
Tabela 6	Comparação entre resultados positivos e negativos obtidos pela utilização do ELISA convencional e ELISA dissociativo. Mostrando maior eficiência na detecção de positivos quando utilizado o método dissociativo.....	80
Tabela 7	Comparação entre resultados de RIFI e ELISA convencional e ELISA dissociativo. Os resultados mostram baixa concordância entre si.....	84

Tabela 8	Resultados qualitativos de DOT-ELISA ácido em amostras de hamster, cão e homem com incremento de IgG no ELISA Dissociativo.....	87
----------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Leishmanioses.....	19
2.2	Histórico.....	21
2.3	Classificação e aspectos taxonômicos.....	21
2.4	Parasitas.....	24
2.5	Vetores.....	25
2.6	Interação Parasita-Vetor.....	26
2.7	Reservatórios.....	27
2.8	Transmissão.....	28
2.9	Ciclo Evolutivo.....	28
2.10	Formas clínicas.....	30
2.10.1	Leishmaniose cutânea.....	30
2.10.2	Leishmaniose mucocutânea.....	31
2.10.3	Leishmaniose visceral.....	32
2.10.3.1	Leishmaniose visceral humana.....	32
2.10.3.2	Leishmaniose visceral canina.....	34
2.10.3.3	Leishmaniose visceral experimental.....	36
2.11	Epidemiologia.....	37
2.12	Tratamento.....	38
2.13	Medidas de Controle.....	39
2.14	Imunocomplexos na Leishmaniose visceral.....	41
2.15	Diagnóstico.....	43
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	Geral.....	50
3.2	Específicos.....	50

4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	Animais.....	52
4.2	Parasitas.....	53
4.3	Produção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	54
4.4	Infecção experimental.....	54
4.5	Determinação de carga parasitária em hamster.....	55
4.6	Amostras suspeitas para Leishmaniose visceral (Infecção natural).....	55
4.6.1	Amostras de cães.....	55
4.6.2	Amostras humanas.....	56
4.7	Padronização de ensaio imunoenzimático (ELISA).....	56
4.7.1	Produção de antígeno solúvel de <i>L. (L.) chagasi</i>	56
4.7.2	ELISA convencional para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i>	57
4.7.3	ELISA dissociativo para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i>	58
4.7.4	Produção artificial de imunocomplexos.....	59
4.8	Análise de incremento de IgG em amostras testadas pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo.....	60
4.9	Padronização de ensaio por adsorção ácida em membranas e imunomarcacão para detecção de antígeno circulante (DOT-ELISA).....	61
4.9.1	Dissociação ácida de amostras de soro com incremento de IgG anti- <i>Leishmania</i> para DOT-ELISA.....	62
4.9.2	Detecção de antígeno de <i>Leishmania</i> por DOT-ELISA.....	62
4.10	Análise estatística.....	63
5	RESULTADOS.....	64
5.1	Infecção experimental em hamsteres.....	64
5.2	ELISA Dissociativo.....	66
5.2.1	Padronização de pH para dissociação de imunocomplexos circulantes.....	66
5.2.2	Avaliação de ELISA dissociativo sobre imunocomplexos artificiais.....	69
5.3	Detecção de imunocomplexos em amostras experimentais por ELISA dissociativo.....	71

5.3.1	ELISA dissociativo em amostras de hamsteres.....	71
5.3.2	Análise individual de amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo em infecção experimental.....	74
5.4	Avaliação de ELISA dissociativo em amostras caninas negativas suspeitas.....	78
5.4.1	Validação de ELISA convencional e dissociativo através de resultados de RIFI e ELISA comercial em amostras de cães.....	78
5.4.2	Avaliação de ELISA dissociativo em amostras caninas negativas testadas por ELISA convencional.....	79
5.4.3	Análise individual de amostras caninas negativas com incremento de IgG no ELISA dissociativo.....	81
5.5	Avaliação de ELISA dissociativo em amostras humanas negativas suspeitas.....	82
5.5.1	Validação de ELISA convencional e dissociativo através de resultados de RIFI em amostras humanas.....	83
5.5.2	Análise individual de amostras humanas negativas com incremento de IgG no ELISA dissociativo.....	84
5.6	Detecção de antígeno circulante por DOT-ELISA em amostras de hamster, cão e homem com incremento de IgG no ELISA dissociativo.....	86
6	DISCUSSÃO.....	88
7	CONCLUSÕES.....	97
7.1	Geral.....	97
7.2	Específicas.....	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE	109
	ANEXO – A.....	110
	ANEXO – B.....	111

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por um protozoário da espécie *L. (L.) chagasi*, pertencente ao gênero *Leishmania* e pode ser encontrada em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sua presença relaciona-se a aspectos socioeconômicos apresentando altas taxas de incidência em países em desenvolvimento, anualmente cerca de 500 mil pessoas são infectadas (WHO, 2012). O desenvolvimento de métodos de diagnóstico laboratoriais diferenciados para o diagnóstico da LV permite o estabelecimento de medidas de controles mais eficazes no combate a esta enfermidade.

O diagnóstico da LV é considerado complexo, porque tanto na doença humana, como na canina a sintomatologia não é específica, sendo necessária uma avaliação abrangente, que compreenda aspectos como o diagnóstico clínico, patológico e laboratorial, sendo ainda importante a realização de uma pesquisa do histórico do doente, para posterior associação com uma área endêmica já conhecida ou a identificação de novas áreas de transmissão (Solano-Gallego et al., 2009). A complexidade no diagnóstico deve-se em parte ao fato de seus sintomas e características clínicas serem compartilhados por uma série de doenças comumente encontradas em áreas endêmicas para LV, como por exemplo, a malária, a esquistossomose e a tuberculose, onde como na LV o agente causal da doença pode ser encontrado em órgãos como baço, fígado e linfonodo (Sundar e Rai, 2002).

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser realizado através de diferentes metodologias, podendo a técnica ser direta (detecção do parasita) ou indireta

(detecção de anticorpos), a escolha de um dos métodos deve considerar aspectos como as diferentes formas de execução, parâmetros como sensibilidade e especificidade, presença de sintomas e condição física do doente (Maia e Campino, 2008). O diagnóstico considerado “Padrão Ouro” é a parasitologia, método fundamentado na observação visual de formas amastigotas em aspirados de baço, fígado, linfonodo e medula óssea, essa técnica apresenta alta especificidade, porém é considerada invasiva e necessita de profissional qualificado para sua execução, apresentando como desvantagem a possibilidade da ocorrência de eventuais episódios hemorrágicos (Chappuis et al., 2007). O avanço tecnológico vem contribuindo significativamente para o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas, que podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV, evidenciando aspectos como aplicabilidade e rapidez das técnicas, atualmente os métodos mais utilizados são os sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência (RIFI) (Tavora et al., 2007; Srividya et al., 2011).

A LV se caracteriza pela persistência do parasita no hospedeiro e sua presença na circulação desencadeia diversos mecanismos de defesa, entre os quais se destaca o processo de formação de imunocomplexos circulantes através da interação entre anticorpos e antígenos (Lambert et al., 1981). A formação de imunocomplexos circulantes em fluídos biológicos é dependente das concentrações de anticorpos e antígenos e de uma possível associação entre os mesmos, sua presença pode mascarar a verdadeira proporção de antígeno e anticorpos presentes em uma amostra sorológica, dificultando assim sua detecção em testes sorológicos convencionais (Gustaw et al., 2008). Em condições que permitem dissociação do imunocomplexo, a interação antígeno-anticorpo é interrompida, permitindo uma maior exatidão na detecção de suas concentrações (Gustaw et al., 2008). A identificação de imunocomplexos circulantes em amostras sorológicas

indica a presença de antígeno circulante, tendo como consequência um diagnóstico mais preciso e que pode elucidar resultados sorológicos conflitantes, nos quais a sintomatologia da doença é evidente, porém devido à interferência de imunocomplexos os testes podem se mostrar indeterminados ou negativos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, sua transmissão ocorre através da picada de mosquitos flebotomíneos contaminados, presentes em áreas com baixos índices de desenvolvimento, onde a falta de estrutura social e as péssimas condições de habitação, fornecem condições favoráveis à presença e multiplicação do vetor, tendo como consequência altas taxas de infecção nestas populações (WHO, 2012).

Esta infecção apresenta grande importância médica e veterinária, sendo considerada uma antropozoonose pertencente ao grupo de doenças negligenciadas. Entre os possíveis hospedeiros para a Leishmaniose, o cão doméstico tem papel de destaque no ciclo de transmissão, como o principal reservatório e responsável pela disseminação da doença em áreas que sofreram intensa atividade migratória, onde a associação de fatores como a presença do cão doméstico e a realização de processos como o desmatamento contribuem diretamente para a transmissão e disseminação da doença (Alves e Bevilacqua, 2004).

A relativa falta de importância das Leishmanioses quando comparada a outras doenças infecciosas vem gerando ao longo dos últimos anos frequentes discussões entre estudiosos e autoridades em saúde, onde a busca do

entendimento de aspectos determinantes ao crescimento de casos é abordada, tendo como consequência o questionamento da falta de investimento relacionados a medidas preventivas, a aspectos como resistência ao tratamento convencional utilizado em alguns países, o desenvolvimento de um método diagnóstico seguro, rápido, menos invasivo e aplicável a mínimas condições estruturais encontradas em países com altas taxas de incidência da doença e realização de estudos voltados para a melhor compreensão da imunologia das Leishmanioses em suas diferentes manifestações clínicas, todos esses aspectos e o recente crescimento da co-infecção HIV-*Leishmania*, contribuem diretamente para a atual dificuldade na erradicação da doença no mundo (Piscopo e Azzopardi, 2006).

O crescimento de casos de Leishmaniose em países não endêmicos vem cada vez mais se destacando, estes casos são importados e limitam-se a indivíduos que se submetem a viagens internacionais relacionadas a atividades militares e ao ecoturismo em países endêmicos (Pavli e Maltezou, 2010).

A maioria dos casos importados de Leishmaniose é de manifestação cutânea, casos de Leishmaniose visceral são raros e restritos a pacientes com algum tipo de comprometimento do sistema imunológico e em crianças (Pavli e Maltezou, 2010). Em muitos casos o diagnóstico é realizado tardiamente em consequência da falta de familiaridade com os sintomas da doença e a semelhança com sintomas de outras doenças infecciosas, determinando a importância da realização do histórico do paciente e exclusão de outras infecções através do diagnóstico diferencial (Pavli e Maltezou, 2010).

2.2 Histórico

A Leishmaniose visceral foi descrita pela primeira vez em 1903 por Leishman e Donovan (Herwaldt, 1999). Leishman descreveu o parasita após estudar a necropsia de um soldado britânico que havia apresentado febre, esplenomegalia e caquexia, ele observou em cortes histológicos a presença de numerosos corpúsculos arredondados e alguns meses depois Donovan descreveu um parasita com as mesmas características em material de punção esplênica de um jovem com quadro clínico semelhante ao do paciente descrito por Leishman, neste mesmo ano o gênero do parasita foi nomeado *Leishmania* por Ross, com ocorrência nos chamados velho e novo mundo (Laison e Shaw, 2010).

2.3 Classificação e aspectos taxonômicos

Os parasitas do complexo *Leishmania* pertencem ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Tripanossomatida, família Trypanomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, espécies *Leishmania spp.*

A classificação das diferentes espécies de *Leishmania* é assunto conflituoso entre os estudiosos, pois desde sua descoberta ocorreram várias classificações com bases em diferentes modelos propostos por diferentes autores, isto se deve ao fato do complexo ciclo evolutivo deste parasita e das inúmeras espécies conhecidas (Laison e Shaw, 2010). A classificação mais aceita é a de Ross em 1903 e Lainson e Shaw em 1987, que se baseia no local de desenvolvimento do parasita no trato

alimentar do inseto vetor, classificando assim o gênero *Leishmania* e dividindo-o em dois subgêneros, a saber: o *Leishmania* com reprodução nos intestinos médio e anterior e o *Viannia* com reprodução nos intestinos médio, anterior e posterior (Laison e Shaw, 2010). As espécies pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, podem ou não ser patogênicas ao homem e são encontradas em países pertencentes ao chamado novo mundo, como Argentina, Belize, Brasil, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Estados Unidos e Venezuela, estão representadas na Tabela 1 (Laison e Shaw, 2010).

Tabela 1 – Classificação de espécies de *Leishmania* segundo subgênero *Viannia* e *Leishmania*, presentes no novo mundo (Laison e Shaw, 2010).

Gênero <i>Leishmania</i> (Novo Mundo)	
Subgênero <i>Viannia</i>	Subgênero <i>Leishmania</i>
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>	<i>L. (L.) enrietti</i>
<i>L. (V.) peruviana</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) pifanoi</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>L. (L.) hertigi</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>L. (L.) deanei</i>
<i>L. (V.) colombiensis</i>	<i>L. (L.) aristidesi</i>
<i>L. (V.) equatorensis</i>	<i>L. (L.) garnhami</i>
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	<i>L. (L.) venezuelensis</i>
<i>L. (V.) utigensis</i>	<i>L. (L.) forattinii</i>

Alguns autores descrevem separadamente as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, enquanto outros consideram as duas como sendo a mesma espécie por serem praticamente indistinguíveis (Hommel, 1998), ao longo do trabalho usou-se a denominação *L. (L.) chagasi* para a descrição da espécie utilizada.

Entre as espécies encontradas em países como a Índia, África e Ásia, pertencentes ao chamado velho mundo, destaca-se a espécie *L. (L.) donovani*, causadora da LV e responsável por altas taxas de mortalidade, fato relacionado a extremas condições de desenvolvimento que podem ser encontradas nestes países (Guerin et al., 2002).

2.4 Parasitas

Os protozoários do gênero *Leishmania* podem se apresentar de duas formas principais, a promastigota e a amastigota, exemplificadas pela da Figura 1. A transformação morfológica do parasita é determinada diretamente por condições ambientais encontradas nos hospedeiros infectados (Herwaldt, 1999).

As formas promastigotas apresentam um corpo alongado medindo aproximadamente 15,0 a 20,0 μm de comprimento e 1,5 a 3,5 μm de largura e um flagelo medindo de 15 a 28 μm , estas formas são observadas ao longo do trato gastrointestinal do inseto vetor. Sua viabilidade mantém-se compatível a uma temperatura de aproximadamente 24°C, são amplamente utilizadas em laboratório para culturas (Herwaldt, 1999).

As formas amastigotas são arredondadas e medem cerca de 2 a 4 μm , são obrigatoriamente intracelulares e podem ser encontradas em células do sistema fagocítico, os macrófagos, em órgãos como baço, fígado, linfonodo e medula óssea nos hospedeiros infectados, com multiplicação através do processo de divisão binária, podendo ainda ser cultivadas em culturas celulares comumente utilizadas em experimentos com fármacos (Herwaldt, 1999).

Figura 1 – Fotos do parasita *L. (L) chagasi*, exemplos das formas amastigotas intracelular e formas promastigotas flageladas. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.

2.5 Vetores

A transmissão das Leishmanioses depende da presença de um inseto vetor, estima-se que cerca de 50 espécies de mosquitos tenham essa capacidade (Kamhawi, 2006). As espécies de mosquitos transmissores diferenciam-se em relação aos continentes que habitam, a espécie *Phlebotomus* tem ocorrência em países do velho mundo e a espécie *Lutzomia* com ocorrência em países do novo mundo (Sacks e Kamhawi, 2001).

Estes insetos medem de 1 a 3 mm de comprimento e possuem coloração clara, originando um dos nomes populares, “mosquito palha”, são de fácil adaptação a diferentes tipos de ambientes, podendo ser facilmente encontrados

após o período chuvoso, apresentando atividade noturna e crepuscular, no Brasil as espécies transmissoras da LV são *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya cruzi* (Ministério da Saúde, 2006).

Em geral o habitat destes vetores baseia-se em áreas de peridomicílio, sendo as fêmeas responsáveis pela transmissão da doença (Sharma e Singh, 2008).

2.6 Interação parasita-vetor

A infecção no vetor inicia-se por meio da ingestão de sangue contaminado com formas amastigotas, iniciando o ciclo através da migração de formas flageladas da parte anterior para a parte posterior do intestino médio do vetor (Kamhawi, 2006).

Formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas no interior do trato gastrointestinal do vetor, passando por vários estágios, cada qual com uma denominação específica, relacionada às principais características formológicas e funcionais de cada estágio, a mudança inicia-se através da transformação das formas amastigotas em formas promastigotas procíclicas confinadas na matriz peritrófica, estas formas iniciam um processo interno de digestão da matriz peritrófica por meio da liberação e ação de uma enzima digestiva, a quitinase e se multiplicam, estabelecendo assim um estágio de infecção inicial, o estágio da próxima fase é denominado promastigota nectomona, que após a saída da matriz peritrófica iniciam a migração pelo intestino, com fixação do flagelo no epitélio do intestino médio anterior, este processo evita a expulsão do parasita através da

defecação, a etapa seguinte ocorre na região da válvula estomodeal com transformação morfológica na forma promastigota leptomona, que são responsáveis pela secreção de gel (promastigote secretory gel – PSG), originando uma matriz proteica que participa do processo de transmissão e transformação da fase seguinte, denominada promastigota haptomona que fechando o ciclo, se transforma em promastigota metacíclica, considerada a forma infectante, este processo é chamado metaciclogênese (Bates, 2007).

2.7 Reservatórios

Alguns mamíferos encontrados em áreas rurais são considerados reservatórios do parasita do gênero *Leishmania*, dentre os quais se destacam as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*), denominados como reservatórios silvestres da doença, no Brasil as raposas são encontradas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica e os marsupiais em todo território nacional (Ministério da Saúde, 2006).

Em áreas urbanas com ocorrência de casos de LV, o principal reservatório do parasita *L. (L.) chagasi* é o cão doméstico (*Canis familiaris*), com altas taxas de incidência entre esta população, casos caninos podem preceder casos humanos da doença (Ministério da Saúde, 2006).

2.8 Transmissão

O inseto vetor adquire em seu repasto sanguíneo formas amastigotas do parasita presente na circulação periférica de um hospedeiro contaminado e em um novo repasto sanguíneo ocorre a transmissão das formas infectantes do parasita a um novo hospedeiro (Sacks e Kamhawi, 2001).

No Brasil a transmissão das Leishmanioses está atribuída às espécies *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya cruzi*, sendo a espécie *Lutzomya longipalpis* considerada a principal, com ocorrência nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, já a espécie *Lutzomya cruzi* foi relacionada a surto ocorrido no estado de Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2006).

2.9 Ciclo Evolutivo

O ciclo de transmissão de parasitas da espécie *Leishmania* é considerado complexo, pois pode envolver diferentes espécies deste protozoário, compreendendo ainda as diferentes espécies de mosquitos transmissores distribuídas mundialmente e aspectos ecológicos e epidemiológicos (Sharma e Singh, 2008). As principais etapas envolvidas no ciclo de transmissão das várias espécies de *Leishmania* estão demonstradas pela Figura 2.

Figura 2 – Ciclo de transmissão de parasitas da espécie *Leishmania*. Fonte: Center for Diseases Control (CDC), 2012.

A transmissão ocorre quando fêmeas de *Phlebotomus spp* ou *Lutzomyia spp* adquirem macrófagos contaminados com parasitas da espécie *Leishmania* no repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos infectados, no interior do trato digestório do inseto vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e sequente liberação das formas amastigotas, que se diferenciam em formas promastigotas e passam por vários estágios até se transformarem em formas infectantes (Bates, 2007).

Em um novo repasto sanguíneo o inseto vetor libera junto à saliva, formas promastigotas infectantes e na epiderme do hospedeiro estas formas são fagocitadas por macrófagos, e interior celular, no vacúolo parasitóforo, ocorre à diferenciação em formas amastigotas, com intensa multiplicação por divisão binária até o rompimento da célula, iniciando um novo processo de fagocitose por macrófagos (Sharma e Singh, 2008). A disseminação parasitária no organismo infectado ocorre através do sistema vascular e linfático, onde os parasitas localizam-se em tecidos com alta densidade populacional de macrófagos (Chappuis et al., 2007).

2.10 Formas Clínicas

As leishmanioses se caracterizam pela diversidade e complexidade das várias espécies conhecidas, onde a manifestação dos sintomas e sinais clínicos estão relacionados a espécie de *Leishmania* adquirida (Herwaldt, 1999).

2.10.1 Leishmaniose cutânea

A Leishmaniose cutânea ou tegumentar pode apresentar diferentes tipos de manifestações clínicas relacionadas a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro e em geral o desenvolvimento de lesões acontece semanas ou meses após a transmissão em consequência de picadas do inseto vetor a áreas expostas do corpo, como face, braços e pernas, as lesões podem ser única ou numerosas e

em casos raros, a manifestação pode ser disseminada ou difusa (Huiras et al., 2009).

A forma difusa e disseminada da Leishmaniose cutânea é rara e frequentemente confundida com a Lepra, devido a semelhantes características clínicas compartilhadas entre estas doenças (David e Craft, 2009). Na Leishmaniose cutânea localizada, a lesão apresenta-se como úlcera indolor, com bordas elevadas e fundo granuloso, já na Leishmaniose cutânea disseminada ou difusa, as lesões são numerosas e pequenas, resultantes da disseminação hematogênica ou linfática e estão associadas à imunodepressão desencadeada por diferentes fatores (Herwaldt, 1999). As espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são responsáveis por casos de Leishmaniose cutânea no Brasil (Lessa et al., 2007).

2.10.2 Leishmaniose mucocutânea

A Leishmaniose mucocutânea caracteriza-se pela presença de lesões ulcerativas graves nas mucosas da região nasofaríngea, tendo como consequência uma desfiguração total ou parcial da área afetada (Herwaldt, 1999). Uma pequena parcela de indivíduos com Leishmaniose cutânea infectados pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*, desenvolvem a forma mucocutânea da doença, a progressão clínica para esta forma clínica depende da combinação entre o estado imunológico do hospedeiro e a virulência parasitária (David e Craft, 2003). Esta forma clínica é caracterizada pela predileção dos parasitas por regiões de mucosa bucal, da faringe e laringe, porém a localização preferencial é na mucosa do septo nasal cartilaginoso e fossas nasais,

com 90% de casos localizados no nariz, gerando destruição tecidual e graves lesões desfigurantes (Lessa et al., 2007).

2.10.3 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) caracteriza-se pelo tropismo do parasita por órgãos como baço, fígado, linfonodo e medula óssea, evoluindo para quadros de hepatoesplenomegalia (Murray et al., 2005). Assim como nas outras manifestações clínicas da Leishmaniose a evolução da infecção está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro e da virulência parasitária, podendo ou não evoluir para cronicidade, e em casos não tratados pode ser fatal, principalmente em crianças com desnutrição e pacientes HIV positivos (Neuber, 2008).

2.10.3.1 Leishmaniose Visceral Humana

A Leishmaniose visceral humana (LVH) também conhecida como Kalazar pode se manifestar de forma fulminante em alguns casos, a forma grave da doença está relacionada a uma falha rede que compreende desde seu diagnóstico até seu tratamento, esta enfermidade acomete populações de baixa renda, residentes em áreas pobres e em desenvolvimento, onde na maioria dos casos os sistemas de saúde disponíveis trabalham em mínimas condições estruturais, incluindo sua cobertura territorial e ainda o despreparo com o diagnóstico (Harhay et al., 2011). Embora a infecção tenha caráter rural por ser mais evidente em estados afastados

dos grandes centros urbanos, este quadro muda a cada dia com base na expansão geográfica das populações em geral, e outro fato relevante no aumento de casos é a presença do principal hospedeiro, o cão doméstico em áreas de peridomicílio (Harhay et al., 2011). No Brasil o agente etiológico da LVH é a espécie *L. (L.) chagasi* e em países do velho mundo o agente etiológico da LVH é a espécie *L. (L.) donovani* (Hommel et al., 1998). O evidente crescimento mundial desta doença é caracterizado como um grave problema de saúde pública, principalmente em países onde programas de controle não estão bem estabelecidos, envolvendo aspectos éticos nas medidas de controle e prevenção adotadas, que nem sempre se apresentam eficazes (Davies et al., 2003). No Brasil o programa de controle de Leishmanioses estabelece que cães com diagnóstico positivo para leishmaniose sejam sacrificados, o que gera polêmica tanto da comunidade científica, como da população em geral (Ministério da Saúde, 2006).

A resposta imune frente à infecção por *L. (L.) chagasi* é caracterizada pela ativação de células B no combate aos antígenos de *Leishmania*, concomitantemente surgem altos níveis de anticorpos-parasita específicos (Evans e Pearson, 1988). Em mamíferos, os macrófagos são os principais hospedeiros de formas amastigotas e também são responsáveis pela ativação de células que agem na eliminação de patógenos intracelulares, na LVH as promastigotas sofrem um processo de fagocitose pelo macrófago e em seu interior sofrem mudanças bioquímicas e metabólicas significantes, resultando na forma intracelular obrigatória do parasita, a forma amastigota (Handman e Bullen, 2002).

Durante a LVH ativa ocorre um processo de imunossupressão, o sistema imune se mantém altamente ativado, desencadeando a produção de citocinas como INF- γ e TNF- α e desativando citocinas como IL-10 e TGF- β pela ação de macrófagos, esta desativação ocorre principalmente em órgãos como baço e

fígado, e provavelmente células mononucleares do sangue periférico respondam pobremente aos antígenos de *Leishmania*, porque os linfócitos envolvidos estão presos em órgãos linfóides (Goto e Prianti, 2009).

A infecção é caracterizada por meio da disseminação dos parasitas através do sistema reticulo endotelial e após o período de incubação, que pode variar de 1 mês a 2 anos, o hospedeiro apresenta sintomas clássicos da doença como emagrecimento, febre e hepatoesplenomegalia (Roberts, 2006). Além da sintomatologia clássica, podem ainda estar presentes sintomas como palidez, dor abdominal, hiporexia, astenia, tosse, edema, fenômenos hemorrágicos, náusea, vômito, diarreia, mialgia, icterícia, sudorese e calafrios (Pastorino et al., 2002).

Exames laboratoriais evidenciam condições desencadeadas pela LVH, entre os facilmente associados à doença estão a plaquetopenia, leucopenia, diminuição nos índices de hemoglobina, diminuição de níveis séricos de ferro e aumento de albumina e gamaglobulina (Oliveira et al., 2010).

2.10.3.2 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada uma severa enfermidade que afeta milhões de cães em regiões da Europa, África e América, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) considerado o principal reservatório da LV e responsável por sua disseminação entre a população humana (Baneth et al., 2008). Estima-se que a taxa de infecção canina atinja milhões de cães na América do Sul, aumentando assim o risco de transmissão e ocorrência de surtos entre a população humana, voltando à atenção das autoridades para a identificação de

novos casos caninos da doença, fornecendo dados importantes para o estabelecimento das vias de transmissão, expansão geográfica, identificação de áreas endêmicas e ainda possibilitando a implantação de medidas de controle (Harhay et al., 2011). A infecção canina pode ser sintomática ou assintomática, característica que pode dificultar a identificação de cães positivos (Baneth et al., 2008).

A resposta imunológica na LVC é caracterizada por uma acentuada produção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, que podem ser detectados em sorologia de cães sintomáticos e assintomáticos, considerando que a presença de sintomas é critério para investigação de LVC, a identificação e investigação de casos através de exames sorológicos pode ser prejudicada em fase assintomática, podendo ter como consequência uma falha nas medidas para contenção de casos da doença entre esta população (Reis et al., 2006).

A suscetibilidade em cães é marcada por acentuada resposta humoral não protetora e depressão da imunidade medida por células e em geral a progressão da doença ou cura está relacionada a balanço entre os tipos de resposta Th1 e Th2, sendo evidente que na predominância do perfil Th1 ocorre uma tendência à proteção e resistência ao parasita por intermédio de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , que agem na ativação de macrófagos para eliminação do parasita, já no perfil Th2 ocorre a produção de citocinas como IL-10, IL-4 e TGF- β , que estão envolvidas na disseminação parasitária associada aos processos de ativação de células B e hipergamaglobulinemia (Santos-Gomes et al., 2002).

Os sintomas e gravidade da LVC relacionam-se ao estado imunológico do cão afetado e em geral a doença mostra-se fatal após 2 à 6 meses do início dos

sintomas e os animais que não evoluem para morte se apresentam assintomáticos em aproximadamente 1 ano após o início da infecção (Travi et al., 2009).

A LVC é caracterizada por sintomas como a perda de peso, aumento dos gânglios linfáticos, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, onicogrifose, alopecia, dermatite, úlceras de pele, infecções bacterianas secundárias, coagulopatia e anemia evidenciada por meio de sangramento natural dos orifícios (Baneth et al., 2008).

2.10.3.4 Leishmaniose Visceral Experimental

Camundongos podem ser utilizados como modelo na Leishmaniose visceral experimental (LVE) principalmente em estudos de reprodução parasitária, porém após algumas semanas ocorre o controle da infecção, através da mediação da produção de INF- γ por células esplênicas, direcionando a resposta para o tipo Th1, tendo como consequência o controle da reprodução parasitária e consequente controle da infecção (Melby et al., 2001; Tumang et al., 1994). Estes animais são comumente utilizados como modelos para estudos relacionados à imunidade nas Leishmanioses cutâneas, onde linhagens resistentes desenvolvem resposta Th1 com produção de INF- γ e linhagens suscetíveis desenvolvem resposta Th2 com tendência a alta parasitemia e produção de IL-10 (Miles et al., 2005).

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é frequentemente utilizado como modelo para o estudo da LV, relacionados a observação e avaliação da progressão da doença, sendo este modelo o que melhor reproduz as características da infecção humana, com altos níveis de reprodução e desenvolvimento parasitário,

desencadeando quadros de hepatomegalia e esplenomegalia, a progressão da doença ocorre na presença de resposta Th1, em órgãos como baço, fígado e medula óssea, com a expressão de TGF- β e IL-10 agindo na supressão da atividade dos macrófagos e desencadeando a produção de Óxido Nítrico (NO) na tentativa de controle da atividade parasitária (Melby et al., 2001).

2.11 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde as Leishmanioses destacam-se entre as doenças ditas negligenciadas, apresentando cerca de 2 milhões de notificações de casos a cada ano em todo mundo, sendo que 500 mil pessoas apresentam a forma visceral da doença (WHO, 2012). A LV é endêmica em 88 países e cerca de 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, a maioria dos casos de Leishmaniose mucocutânea ocorre no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorre no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2012).

Os fatores de risco para aquisição e desenvolvimento da LV estão associados principalmente ao estado nutricional e imunológico das pessoas, como exemplo crescente deste quadro pode ser citada a co-infecção Leishmania – HIV, onde indivíduos infectados com o vírus HIV e que, em sua maioria, não foram submetidos a um tratamento adequado com anti-retrovirais ou em consequência da imunossupressão causada pelo vírus HIV, podem apresentar recidivas da infecção parasitária em algum momento da vida (Alvar et al., 1997; Lindoso e Lindoso, 2009).

No Brasil a LV pode ser considerada como uma doença endêmica e encontra-se em franca expansão geográfica, caracterizando a urbanização da doença, sendo encontrada nas 5 regiões brasileiras, porém a maior concentração de casos é na região nordeste do país, atingindo principalmente crianças abaixo de 10 anos, este fato está relacionado a imaturidade do sistema imunológico deste grupo e da presença da desnutrição (Ministério da Saúde, 2009).

A urbanização da LV está relacionada a fatores como a antropofilia do vetor, essa condição mantém altos níveis endêmicos da doença, outros fatos relevantes a serem considerados é o crescimento da virulência do parasita e o desenvolvimento de resistência a drogas e inseticidas pelo vetor (Werneck, 2007).

2.12 Tratamento

A LV é potencialmente fatal e exige atenção na escolha da conduta terapêutica em doentes, principalmente na escolha da droga para o tratamento, considerando aspectos como resistência, co-infecções e resposta (Olliaro e Croft, 2011).

Existem inúmeras drogas disponíveis que apresentam atividade anti-*Leishmania*, porém o uso das mesmas é limitado por características como toxicidade e resistência, a droga mais utilizada, ou seja, o medicamento de primeira escolha para o tratamento da LV é o Antimônio Pentavalente como o antimoniato de Meglumina (Glucantime®), o Estibogluconato de Sódio (Pentostam®) é utilizado como droga de segunda escolha, uma alternativa de tratamento em casos de

resistência e toxicidade pode ser emprego de antibióticos como a Anfotericina B, Pentamidinas e alguns antifúngicos (Briones et al., 2008).

As pesquisas e o desenvolvimento de novas drogas para tratamento da LV estão atualmente focados em aspectos biológicos do parasita, visando benefícios voltados para a necessidade de resolução deste problema de saúde pública mundial (den Boer et al., 2009).

2.13 Medidas de Controle

A combinação de aspectos relacionados ao vetor, parasita, reservatórios, sintomas, condições ecológicas, epidemiologia e práticas culturais contribuem diretamente para a transmissão das Leishmanioses, sendo que o principal foco de prevenção deve ser direcionado para eliminação de populações de espécies de mosquitos transmissores (Alexander e Maroli, 2003).

O crescente número de casos de LV observados no Brasil e a expansão da transmissão em áreas anteriormente não afetadas sugerem que as medidas de controle atualmente utilizadas podem não exercer impacto significativo para o controle da disseminação da doença, este fato pode estar relacionado com a má compreensão de mecanismos envolvidos nas infecções humanas e caninas e ainda ao papel de casos assintomáticos no ciclo de transmissão (Romero e Boelaert, 2010). As estratégias de controle devem ser baseadas na compreensão de características ecológicas, geográficas, aspectos epidemiológicos e identificação de reservatórios antroponóticos ou zoonóticos de parasitas (Guerin et al., 2002).

O sucesso de métodos de controle aplicados a vetores da LV depende em geral de aspectos relacionados a infraestrutura de órgãos de saúde pública, eliminação de locais que facilitem a reprodução de insetos, utilização de mosquiteiros tratados ou não com inseticida, borrifação de inseticida para diminuição da população de mosquitos em áreas suscetíveis e uso de coleiras impregnadas com inseticidas para a população canina (Alexander e Maroli, 2003).

A eutanásia de cães soropositivos para Leishmaniose é realizada pelo governo brasileiro como ação de controle e mesmo sem evidências de diminuição dos casos de LV em cães, esta medida continua sendo aplicada como controle, tendo como consequência o questionamento ético e científico deste processo (Costa, 2011). A aplicação de um teste diagnóstico totalmente seguro poderia influenciar diretamente no controle e prevenção da Leishmaniose visceral canina.

O Ministério da Saúde fundamenta o programa de controle nacional de Leishmanioses em medidas que têm como alvo as populações humana, canina e vetorial (Ministério da Saúde, 2006). As principais medidas de controle são:

- a) **População humana:** saneamento ambiental, diagnóstico precoce, tratamento adequado e educação em saúde;

- b) **População canina:** controle da população canina errante, vacina anti-*Leishmania*, uso de tela em canis, coleiras impregnadas com Deltametrina 4%, eutanásia de cães com exame sorológico e/ou parasitológico positivos;

c) **Controle do vetor:** controle químico (borrifação de inseticida) e levantamento entomológico.

2.14 Imunocomplexos na Leishmaniose visceral

Várias doenças infecciosas podem desencadear a formação de imunocomplexos formados por imunoglobulinas IgG, a presença destes complexos está frequentemente associada ao agravamento da doença através do comprometimento renal por meio da deposição glomerular, o papel de imunocomplexos na progressão da doença é exemplificado em infecções causadas por parasitas como *Leishmania spp* e *Schistosoma mansoni* (Carvalho et al., 1983), bactérias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella spp* e *Shigella spp* (Halstead et al., 2010), vírus como o dengue (Koraka et al., 2003) e HIV (Lewis et al., 1995), e fungos (Durkin et al., 2009). A presença de imunocomplexos circulantes foi também associada à Amiloidose secundária e doenças vasculares (de Vallière et al., 2009).

A formação de imunocomplexos circulantes acontece através da interação entre anticorpos específicos produzidos como um mecanismo de defesa do sistema imune e antígenos, estes anticorpos agem na tentativa de neutralização e eliminação de microorganismos. Estudos recentes vêm tentando elucidar o papel do imunocomplexo na patologia da LV, entretanto a maioria é direcionada para a importância dos imunocomplexos na progressão e instalação da doença (Miles et al., 2005), evidenciando o papel de citocinas neste processo (Elshafie et al., 2007).

Ensaio desenvolvidos para detecção e quantificação de imunocomplexos são raros (Soares et al., 2001), não sendo aplicáveis a grandes rotinas, pela forma trabalhosa de preparo das amostras (Evans et al., 1988). O papel dos imunocomplexos em testes sorológicos utilizados na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* é raramente abordado na literatura.

Na infecção por *Leishmania spp*, os parasitas desenvolvem medidas adaptativas para sua sobrevivência, essas medidas envolvem a inibição de enzimas hidrolíticas e produtos metabólicos tóxicos, alteração da sinalização celular e produção de citocinas, entre outros eventos que incluem alta produção de imunoglobulinas (Cunningham, 2002).

Após transmissão via intradérmica, as formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* se evadem da lise mediada pelo complemento, aderindo-se aos macrófagos, tendo como consequência sua fagocitose, uma vez no interior celular as promastigotas sofrem mudanças bioquímicas transformando-se em formas amastigotas, com intensa multiplicação no interior do vacúolo parasitóforo, a instalação e evolução da infecção está relacionada a eventos relacionados à suscetibilidade do hospedeiro humano ou animal, que podem comprometer a habilidade fagocítica do macrófago originando uma formação de imunocomplexos circulantes (Rittig e Bogdan, 2000). Em hospedeiros suscetíveis como tentativa de controle da infecção e neutralização do parasita, ocorre uma ativação de linfócitos B com alta produção de IgG, porém mesmo em concentrações elevadas, a presença desta imunoglobulina não confere proteção contra infecção, a falha no controle e a hipergamaglobulinemia, podem desencadear a formação de imunocomplexos, que por sua vez podem gerar agravamento da doença através da deposição em vários órgãos e tecidos (Galvão-Castro et al., 1984).

2.15 Diagnóstico

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis para detecção de infecções parasitárias podem ser realizados através da visualização do parasita por meio de microscopia, utilizando materiais biológicos como sangue, urina, tecidos e fluídos corporais, onde a visualização do parasita confere um resultado positivo ao exame, este tipo de diagnóstico é considerado padrão ouro (Nyame et al., 2004).

Como a sintomatologia da LV pode em alguns casos ser confusa devido à semelhança com sintomas presentes em outras infecções, é importante a realização do diagnóstico diferencial, que deve ser baseado principalmente no local de aquisição da doença (Pavli e Maltezou, 2010). O diagnóstico diferencial da LV é realizado através da exclusão de outras infecções como, por exemplo, podendo ser citados como exemplo a febre tifoide, brucelose, endocardite bacteriana, tuberculose, mononucleose, malária, histoplasmosse, esquistossomose, doença de chagas, leucemia e linfoma (Pavli e Maltezou, 2010).

Um diagnóstico preciso para a LV mostra-se ainda como um problema para a comunidade médica e coordenadores de programas de saúde, o método estabelecido como referência para diagnóstico é a parasitologia com demonstração do parasita em amostras obtidas através de punção de órgãos suscetíveis a presença do parasita, porém este método apresenta algumas desvantagens em sua realização, obrigando a procura e utilização de métodos alternativos menos invasivos, como por exemplo, o diagnóstico fundamentado na detecção de anticorpos específicos ou totais, através da utilização de antígenos totais, específicos e antígenos recombinantes como o rK39, porém a indicação de positividade pode estar associada a doença presente ou passada em indivíduos

saudáveis após cura, estes testes apresentam bons valores preditivos quando associados a presença de sintomas e sinais clínicos característicos (Srivastava et al., 2011).

O exame parasitológico direto é realizado através da observação de formas amastigotas coradas por Giemsa, isoladas em aspirados de linfonodo, baço, fígado e medula óssea por meio de punção, se a presença de parasitas for confirmada estes podem ser isolados em culturas *in vitro* ou *in vivo*, este exame é considerado altamente específico (Chappuis et al., 2007). Apesar da alta especificidade, os índices de sensibilidade mostram-se variáveis e dependem diretamente do tipo de aspirado ou tecido utilizado, o procedimento pode conferir risco ao paciente e deve ser recomendado pelo médico após a avaliação de histórico do paciente e avaliação de exames laboratoriais paralelamente, como por exemplo, o coagulograma (Srividya et al., 2012). As biópsias e aspirados de baço e fígado mostram-se melhores para a parasitologia e isolamento para cultivo *in vitro*, permitindo avaliação da reprodução parasitária, motilidade das formas promastigotas e identificação de espécie por métodos moleculares (Rosenblatt, 2009).

O diagnóstico molecular utiliza a técnica de PCR, considerada tecnologia promissora para a detecção, caracterização genética e quantificação de protozoários (Antinori et al., 2009). Esta técnica permite a utilização de amostras como sangue periférico, soro, pele, urina, tecidos, e materiais arquivados já processados e fixados quimicamente (Srividya et al., 2012), apresentando alta sensibilidade e especificidade, porém apresenta como desvantagem a necessidade de equipamentos e profissional treinado, ficando restrito a hospitais e grandes centros de pesquisa, não sendo útil na pesquisa de campo (Chappuis et al., 2007). Métodos moleculares como a técnica de PCR oferecem um conjunto de vantagens

em sua aplicação, como por exemplo, o fato de ser uma técnica minimamente invasiva e a capacidade de identificação de pacientes com infecção presente ou passada, atuando ainda no monitoramento de tratamento na LV (Schönian et al., 2006).

Os exames mais utilizados em rotinas laboratoriais para diagnóstico da LV são os exames indiretos para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, entre os quais se destacam os métodos de RIFI e ELISA, sendo estas técnicas indicados pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006). A interpretação de um exame reagente associado à presença de sintomatologia característica indica doença e permite início de tratamento para humanos ou indicação de eutanásia para cães (Ministério da Saúde, 2006). Os testes imunoenzimáticos são comumente utilizados no diagnóstico da LV e podem ser diretos para detecção de antígenos circulantes, indiretos para detecção de anticorpos totais ou específicos anti-*Leishmania* e para a detecção de imunocomplexos circulantes (Kar, 1995).

O ELISA é um teste imunoenzimático utilizado na detecção de anticorpos e antígenos em amostras sorológicas e seu resultado é expresso quantitativamente, através da leitura da densidade ótica da amostra analisada, classificando amostras como negativas, indeterminadas e positivas, através do estabelecimento de faixas e limites de reatividade calculados a partir da padronização específica para cada conjunto diagnóstico produzido e comercializado (Solano-Galeno et al., 2009). O ELISA é considerado uma valiosa ferramenta no diagnóstico da LV, pois possui alta sensibilidade e pode ser aplicado a grandes rotinas laboratoriais, tendo como vantagem sua aplicabilidade a um grande número de amostras, podendo ainda ser adaptado a rotinas semi-automáticas e automáticas e ser adaptável a diferentes antígenos, característica que atribui vantagens a parâmetros como sensibilidade e especificidade do teste (Singh, 2006).

Devido a sua alta sensibilidade, os testes imunoenzimáticos podem apresentar reatividade cruzada com outros parasitas da família Trypanosomatidae, principalmente com o parasita *Trypanosoma cruzi*, situação frequente em áreas endêmicas para as duas espécies. Na América do Sul a reatividade cruzada entre parasitas da mesma família vem sendo estudada através da utilização de antígenos recombinantes, estes antígenos apresentam epítomos específicos, o mais estudado e evidenciado nos últimos anos é o rK39 (Porrozi et al., 2007).

Estudos comparativos indicam diferença entre sensibilidade em testes ELISA, este fenômeno está relacionado ao tipo de extrato de antígeno escolhido para a base de detecção de anticorpos, a utilização de derivados de amastigotas ou promastigotas mostra maior sensibilidade de detecção de anticorpos em comparação ao ELISA com antígeno recombinante rK39, principalmente quando testados em amostras assintomáticas (Mettler et al., 2005). As variações relacionadas a parâmetros de sensibilidade e especificidade podem estar relacionadas à escolha do conjugado, de diluições de amostra e ainda à fase da doença, indicando que a interpretação de um resultado sorológico deve ser fundamentada na análise de diferentes aspectos, considerando dados epidemiológicos (Kumar et al., 2001).

O diagnóstico da LV baseado somente na detecção de anticorpos pode ser questionável, principalmente quando um resultado positivo não está associado a presença de sintomas, já que a presença de altos níveis de anticorpos podem ser detectados em indivíduos curados e por esta razão a detecção de antígeno circulante mostra-se mais segura para o diagnóstico da doença (Davies et al., 2003).

Em geral a amostra utilizada em testes sorológicos para a LV é o sangue periférico para obtenção de soro, uma alternativa para a utilização de amostras sanguíneas é a utilização de urina, este material pode conter antígenos, os quais podem ser detectados por teste de aglutinação por látex, apresentando como vantagem a utilização de um material biológico com relativa facilidade em sua obtenção, podendo ser um método alternativo em casos de impossibilidade de detecção de antígeno ou anticorpo, devido a imunocomplexos presentes em doenças reumáticas ou autoimunes, quadros que podem gerar competição na reação antígeno-anticorpo no teste (Attar et al., 2001; Ferrua et al., 2009).

O teste de imunofluorescência indireta para a LV consiste na detecção de anticorpos através de conjugado marcado com fluoresceína ligado a uma imunoglobulina espécie-específica, é amplamente utilizado no Brasil e seu resultado é expresso em títulos determinados pela diluição da amostra, sua interpretação recomenda que na presença de títulos baixos seja realizado um novo exame após 30 dias, este teste pode apresentar problemas com a especificidade tendo como consequência reações cruzadas com parasitas da família *Tripanossomatidae*, podendo acusar resultados falsos positivos (Ministério da Saúde, 2006). A reação de imunofluorescência indireta pode ser utilizada ainda como um teste confirmatório servindo como contraprova para o teste de ELISA positivo, já que os dois testes são baseados em princípios distintos (Tavora et al., 2007; Gontijo e Melo, 2004).

A utilização da RIFI no diagnóstico da LV vem sendo constantemente questionada em relação a sua capacidade real de diagnóstico, ou seja, na identificação e separação de resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, esta falsa detecção de resultados pode estar atribuída à utilização de antígeno não específico (*L. (L.) major*) e reatividade cruzada com outras zoonoses

(Alves e Bevilacqua, 2004). A aplicação da RIFI no diagnóstico da LV deve basear-se em aspectos como as variáveis do teste de escolha, como por exemplo, o ponto de corte utilizado e os valores preditivos do teste em questão, definindo inicialmente o objetivo final a ser elucidado, considerando aspectos como sensibilidade e especificidade, eliminando a presença de falsos positivos ou negativos (Silva et al., 2009). A RIFI assim como outros métodos sorológicos indica indiretamente a presença da doença ou contato passado, por isso o aprimoramento de aspectos como sensibilidade e especificidade desta técnica se faz necessário para o estabelecimento de medidas mais eficientes para o diagnóstico e controle da doença, tanto na população humana como na canina, já que o teste de RIFI faz parte do esquema diagnóstico estabelecido pelo programa de controle nacional da LV (Ministério da Saúde, 2006).

A imunocromatografia, também conhecida como teste rápido é baseada na detecção de anticorpos em amostras de soro em membrana, tendo como vantagem sua aplicação em estudos de campo e áreas que apresentam limitações estruturais, seu resultado é expresso qualitativamente dispensando o uso de equipamentos, sendo obtido por meio de visualização de bandas em membrana de nitrocelulose e o principal antígeno utilizado neste teste disponível comercialmente é o rK39 (Singh, 2006).

Outro teste utilizado na detecção de anticorpos na LV é o teste de aglutinação direta (DAT) que consiste na incubação de amostras de soro com promastigotas de *Leishmania* marcadas com corante e incubação por pelo menos 16 horas, este período possibilita a reação antígeno-anticorpo, identificando o processo pela presença ou ausência de aglutinação, este teste tem como vantagem em sua utilização alta sensibilidade e especificidade, porém tem a desvantagem de

longo período de incubação e o fato de a técnica ser relativamente dispendiosa (Srivastava et al., 2011).

A combinação de estudos relacionados à exploração de aspectos já utilizados em técnicas diagnósticas para LV, associados ao entendimento das condições imunológicas relacionadas a casos sintomáticos e assintomáticos, podem fornecer condições para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas que possam identificar casos assintomáticos e casos de cura, aspectos que contribuem diretamente para orientação no tratamento, com influência direta em ações para eliminação desta doença (Srividya et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho teve como principal objetivo padronizar e avaliar um teste ELISA para a detecção de IgG anti-*Leishmania*, que fosse livre da interferência de imunocomplexos circulantes, através da introdução de uma fase dissociativa através de pH ácido.

3.2 Específicos

- a) Definir o pH ideal para a dissociação de imunocomplexos em amostras de soros, em um teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*;
- b) Produzir *in vitro* um soro experimental com quantidades variáveis de imunocomplexos para avaliação da capacidade dissociativa do ELISA;
- c) Avaliar a detecção de IgG por ELISA dissociativo em soros de hamsteres infectados experimentalmente com *L. (L.) chagasi*;

- d)** Comparar a reatividade de amostras de soros humanos e caninos de áreas endêmicas no ELISA dissociativo;

- e)** Desenvolver e padronizar uma reação de DOT-ELISA ácido, como teste confirmatório para detecção de antígeno circulante em amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Em nossos experimentos foram utilizados 108 hamsteres dourado (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados, sendo 91 animais utilizados na infecção experimental e 17 animais utilizados como controles negativos. Para a obtenção de anticorpos anti-*Leishmania* através de imunização, foram utilizados 2 coelhos da raça New Zealand. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP e mantidos no biotério do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em estantes ventiladas, com ar estéril e ventilação forçada, sendo alojados de forma adequada, recebendo ração comercial própria para cada espécie e água *ad libidum*. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com os “Princípios éticos em experimentação animal” preconizado pela Sociedade Brasileira de Ciência para Animais de Laboratório. Todos os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical (no. CE-IMT/002/29042008).

Os grupos de hamsteres foram eutanasiados por narcose em câmara de CO₂ e a eutanásia dos coelhos foi realizada com sedação e anestesia adequada, como descrita na Tabela 2. A obtenção das amostras de coelho foi realizada através de punção intracardíaca realizada até a completa exsanguinação do animal.

Tabela 2 - Drogas utilizadas nos procedimentos de sedação e eutanásia dos animais estudados.

Sedação e Eutanásia
Clorpromazina: 0,75 mg/Kg (IM)
Midazolan: 0,2 mg/Kg (IM)
Atropina: 0,044 mg/Kg (IM)
Cloridrato de cetamina: 35 mg/Kg (IM)
Xilazina: 5 mg/Kg (IM)

4.2 Parasitas

Foram utilizados parasitas *Leishmania (L.) chagasi* CEPA (MHOM/BR/1972/LD), mantidos pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Para a realização de nossos experimentos os parasitas foram mantidos *in vivo* através de infecção experimental em hamster e *in vitro* em culturas.

Para a manutenção *in vitro* dos parasitas, os mesmos foram mantidos em culturas com meio M199 com adição de 10% de soro fetal bovino e 5% de urina humana filtrada, mais suplementos. As culturas foram incubadas em uma temperatura média de 24°C em estufa tipo B.O.D, para manutenção das formas promastigotas, com repiques para uma nova cultura acontecendo a cada 4 dias.

4.3 Produção de anticorpos anti-*Leishmania*

Os coelhos receberam no momento da imunização 250µg/dose de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* mais Adjuvante de Freund completo (1º dose) e Adjuvante de Freund incompleto (demais doses) via subcutânea, totalizando 5 doses com intervalos quinzenais. O acompanhamento da resposta frente a imunização aconteceu através da detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* por ELISA, onde verificou-se a presença de altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* após a última imunização (título >10.000). A eutanásia foi realizada com os animais devidamente sedados e anestesiados, seguida de punção intracardíaca para obtenção de sangue. As amostras de sangue foram armazenadas e centrifugadas a 2.500 RPM por 10 minutos para a obtenção de soro. As amostras de soro foram alíquotadas, identificadas e estocadas a - 20°C até uso.

4.4 Infecção experimental

Grupos de hamsteres foram inoculados por via intraperitoneal com 5×10^7 formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* em solução salina, obtidas de homogenatos de baços de animais anteriormente infectados e com doença confirmada. Estes animais foram sacrificados aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção, resultando em grupos de amostras de soros de 5 períodos de infecção distintos, as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca após eutanásia. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 RPM por 10 minutos para a obtenção do soro, as mesmas foram identificadas, alíquotadas e estocadas a - 20°C até uso. Após a

coleta de sangue em cada animal, o mesmo teve baço e fígado retirados e pesados, os órgãos foram usados para estimar a carga parasitária em cada animal.

4.5 Determinação de carga parasitária em hamster

Para estimativa de carga parasitária em cada animal, foi utilizado o método de Stauber e colaboradores em cada animal sacrificado nos diferentes tempos de infecção (Ott et al., 1967). Para determinação da carga parasitária em cada órgão foram realizados imprints (marcações do órgão em lâminas de vidro), as lâminas foram fixadas em Metanol e coradas com Solução de Giemsa em Tampão Borato de Sódio 0.1M. A contagem do número de amastigotas e células nucleadas foi realizada em microscópio óptico, de acordo com o seguinte cálculo:

$$\left(\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{1000 \text{ células nucleadas}} \right) \times \text{peso órgão (g)}$$

4.6 Amostras suspeitas para Leishmaniose visceral (Infecção natural)

4.6.1 Amostras de cães

Amostras de soros de cães foram fornecidas pelo laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Estas amostras são provenientes de inquéritos sorológicos realizados em cães de diferentes cidades do estado de São Paulo. Foram fornecidas 203 amostras de soro canino, com armazenamento

em freezer à -20°C até o uso. As amostras foram escolhidas de forma aleatória sem o conhecimento prévio dos resultados obtidos pelo laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz. Na padronização e validação do teste imunoenzimático foram utilizados como controles amostras negativas e positivas. Inicialmente foram analisadas todas as amostras fornecidas, onde as mesmas foram aplicadas ao ELISA convencional e ao ELISA dissociativo, posteriormente a análise foi centralizada nas amostras negativas.

4.6.2 Amostras humanas

Amostras de soros humanos foram gentilmente fornecidas por A. Partatta, provenientes da cidade de Araguaína – Tocantins, área considerada endêmica para LV. Foram utilizadas 200 amostras previamente testadas por RIFI, classificadas em 100 amostras negativas e 100 amostras positivas, todas as amostras foram testadas pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo, porém assim como estabelecido para amostras de cães a análise foi centralizada nas amostras negativas.

4.7 Padronização de Ensaio imunoenzimático (ELISA)

4.7.1 Produção de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi*

Para obtenção de antígeno de *L. (L.) chagasi* foram utilizadas formas promastigotas mantidas em meio M199. As culturas foram mantidas em garrafas

estéreis em um volume final de 20 ml, com repiques a cada 4 dias. Para obtenção de antígeno as formas promastigotas mantidas em culturas foram concentradas por centrifugação a 2.500 RPM por 10 minutos e as suspensões obtidas foram imediatamente congeladas e mantidas a -80°C. Para o preparo de antígeno solúvel as promastigotas foram ressuspendidas em 10 volumes de tampão lisante (TRIS-HCL 0,05M pH 6,0, Uréia 4M, EDTA 5mM, PMSF 0,5mM, KCL 0,1M e SDS 0,5%), aquecidas a 65°C por 15 minutos e clareados por centrifugação a 10.000 RPM, com utilização do sobrenadante. As amostras de antígeno solúvel preparadas foram submetidas a determinação proteica pelo método de Bradford (Bradford, 1976), após quantificação de proteínas as amostras de extrato antigênico total foram aliquotadas e mantidas a -80°C até o uso.

4.7.2 ELISA convencional para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*

O teste ELISA em amostras de soro (hamster, cão e humano) para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foi realizado de acordo com protocolo descrito na literatura (Venkatesan e Wakelin, 1993), a este ensaio ELISA foi atribuído a denominação convencional. Placas de poliestireno com 96 poços para microtitulação (Costar®), foram sensibilizadas com antígeno de *L. (L.) chagasi* com 10µg/ml, em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5. Após 16hs a 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,01M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico®) em PBSTL durante uma hora em estufa a 37°C. Após o bloqueio e entre as fases de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com PBSTL. As amostras de soros de hamster foram diluídas 1:100 e as de cães e humanos foram diluídas

1:200 em PBS 1x e distribuídas em duplicata na placa. Após o tempo de incubação foram adicionados 100µL de conjugado imunoenzimático espécie-específico (anti-hamster IgG, anti-cão IgG e anti-humano IgG – Sigma, St. Louis) marcado com peroxidase por poço, com incubação por 1 hora a 37°C. As reações foram reveladas através da adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8, com OPD 0,4 mg/ml e H₂O₂ 0,03% por 30 minutos, com interrupção, pela adição de HCL 4N. A leitura da densidade óptica (DO) das amostras foi realizada em filtro 492 nm e realizada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

4.7.3 ELISA dissociativo para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*

O ELISA com fase dissociativa foi realizado de acordo com protocolo descrito na literatura (Venkatesan e Wakelin, 1993), com modificações. As amostras avaliadas pelo ELISA convencional foram aplicadas ao ELISA com fase dissociativa para imunocomplexos, teste por nós denominado como ELISA dissociativo. Os soros foram submetidos à técnica dissociativa de ELISA para detecção de IgG anti-*Leishmania* após dissociação ácida. Placas de poliestireno com 96 poços para microtitulação (Costar®), foram sensibilizadas com antígeno de *L. (L.) chagasi* com 10µg/ml, em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5. Após 16hs a 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,01M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico®) em PBSTL durante uma hora em estufa a 37°C. Após o bloqueio e entre as fases de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com PBSTL. As amostras de soros de hamster foram diluídas 1:50 e as de cães e humanos foram diluídas 1:100 em PBS 1x e distribuídas em duplicata na

placa, após a aplicação das amostras na placa (100µl/poço) as amostras receberam 25µl de solução de Glicina 0,1M pH 2,5, contendo Bromophenol Blue como indicador, após período de incubação de 5 minutos com agitação ocasional, a confirmação de queda de pH ocorria com a coloração amarela das amostras no poços, a reação foi neutralizada com 25µl de TRIS/HCL pH 8,8 0,25M, em consequência da neutralização a cor em cada poço se modificava para rosa, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após o tempo de incubação foram adicionados 100µL de conjugado imunoenzimático espécie-específico (anti-hamster IgG, anti-cão IgG e anti-humano IgG – Sigma, St. Louis) marcado com peroxidase por poço, com uma incubação por 1 hora a 37°C. As reações foram reveladas através da adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8, com OPD 0,4 mg/ml e H₂O₂ 0,03% por 30 minutos, com interrupção, pela adição de HCL 4N. A leitura da densidade óptica (DO) das amostras foi realizada em filtro 492 nm e realizada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

As amostras foram aplicadas em duplicata tanto no ELISA convencional e ELISA dissociativo na mesma placa, tendo ao final 4 poços com a mesma amostra. Este procedimento foi realizado a fim de minimizar o tempo total da reação, facilitar o manuseio de amostras e possibilitar a comparação entre os resultados dos diferentes métodos padronizados.

4.7.4 Produção artificial de imunocomplexos

Uma amostra de soro de coelho com alta quantidade de IgG anti-*Leishmania* em diluição 1:100, foi incubada por 1 hora a 37°C com quantidades crescentes de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* (1, 2, 4, 8, 16 e 32µg/ml), após o período de

incubação foram adicionados a cada amostra 500µl de PEG 7,5% a 4°C, as amostras foram novamente incubadas por um período de 16 horas, após este período de precipitação pela ação do PEG 7,5%, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM a 4°C por 10 minutos e os sobrenadantes desprezados, seguiu-se mais uma etapa de centrifugação a 10.000 RPM por 10 minutos a 4°C, utilizando solução de lavagem em PEG 7,5% e PBS (v/v) à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as amostras ressuspensas em PBS, respeitando o volume inicial da diluição utilizada. Estas amostras foram testadas pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo.

4.8 Análise de incremento de IgG em amostras testadas pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo

As amostras de soro foram ensaiadas 4 vezes em uma mesma placa, sendo uma duplicata destinada ao ELISA convencional e outra duplicata destinada ao ELISA dissociativo. O confronto dos resultados obtidos ao final da reação possibilita a comparação entre as leituras e verificação de mudança entre os resultados. Através de determinação das médias das duplicatas em cada amostra no ELISA convencional e ELISA dissociativo é possível determinar a quantidade de incremento sofrida por uma amostra após tratamento ácido, através da seguinte cálculo:

$$\text{(DO 492nm ELISA dissociativo - DO 492nm ELISA convencional = Incremento de IgG)}$$

4.9 Padronização de ensaio por adsorção ácida em membranas e imunomarcação para detecção de antígeno circulante (DOT-ELISA)

Para confirmação independente da presença de antígenos circulantes em amostras de soros, procedemos ao ensaio de adsorção ácida em membranas, seguido de imunomarcação. Brevemente, optamos por adsorver em membranas de alta capacidade amostras de soro em meio ácido (pH 2.5) contendo quantidades crescentes de antígeno de *L. (L.) chagasi*. Este processo permitiu a separação dos imunocomplexos formados e possibilitou a ligação independente do antígeno presente na amostra à membrana de suporte. Após a ligação do anticorpo a membrana e sequente lavagem, a presença de antígeno foi revelada por imunomarcação com anticorpo de coelho IgG anti-*Leishmania*, revelado com conjugado anti-IgG de coelho. Dessa forma, caso houvesse antígeno livre ou complexado no soro, o meio ácido permite sua ligação à membrana de suporte com consequente reação positiva subsequente a imunomarcação. A padronização deste teste pode ser visualizada na figura 3. A resolução encontrada mostra a capacidade de identificação de crescentes quantidades de antígeno de *Leishmania* entre 8 a 250 ng. Concentrações menores não eram identificáveis na membrana e concentrações maiores foram semelhantes a apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Curva padrão para detecção de antígeno em membrana por adsorção ácida. Detecção de concentrações entre 8 a 250 ng de antígeno por DOT.

4.9.1 Dissociação ácida de amostras de soro com incremento de IgG anti-*Leishmania* para aplicação em DOT-ELISA

As amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo foram diluídas 1:100 para soro de hamster e 1:200 para soro humano e canino, em seguida submetidas a precipitação pela ação de PEG 7,5% a 4°C (v/v), após período de incubação por 16 horas a 4°C, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos a 4°C, o pellet foi ressuspenso em Glicina 0,1M pH 2,5, respeitando o volume inicial da diluição.

4.9.2 Detecção de antígeno de *Leishmania* por DOT-ELISA

As amostras que apresentaram incremento de IgG foram preparadas e aplicadas em membranas Immobilon P (100µl/poço), em sistema de vácuo (Bio-Dot, BioRad, Hercules, Ca). Após o processo de adsorção ácida a membrana foi bloqueada em solução com 5% de leite desnatado (Molico®) em PBS por 1 hora em agitação pendular a 4°C. A membrana foi lavada 5 vezes em PBS e imersa em amostra com alta concentração de IgG anti-*Leishmania* produzida em coelho em diluição 1:200 por 1 hora a 4°C, com 5 lavagens subsequentes em PBS. A reação foi revelada por incubação em conjugado anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma, St. Louis), por 1 hora a temperatura ambiente, com 5 lavagens subsequentes em PBS. A membrana foi revelada com DAB e a revelação de resultados foi realizada através da comparação visual das amostras e os controles positivos e negativos. As membranas foram digitalizadas e a determinação de positividade e negatividade pelo DOT-ELISA foi realizada através de análise visual da intensidade de cor em

cada amostra testada, sendo consideradas positivas as amostras com maior intensidade de cor e negativas as amostras que não apresentaram cor após o processo de revelação, como exemplificado na Figura 4.

Figura 4 – Exemplo de amostras negativa e positiva reveladas pelo sistema de DOT-ELISA ácido.

4.10 Análise estatística

A correlação entre os resultados quantitativos do ELISA convencional e ELISA dissociativo, está expressa através dos resultados de r^2 . A análise qualitativa para comparações de proporções foi estabelecida pelo teste de Chi-Quadrado, usando GraphPad Prisma 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, California USA).

5 RESULTADOS

5.1 Infecção experimental em hamsteres

Foram utilizados 91 hamsteres na infecção experimental, divididos em grupos conforme o tempo determinado para a eutanásia. A infecção experimental foi realizada como descrito em métodos e acompanhada por até 90 dias pós-infecção através da detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no soro dos animais por ELISA, como demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Evolução da IgG sérica anti-*Leishmania*. As barras representam à média e o erro padrão da média de cada tempo analisado. Cada ponto refere-se a uma medida de sorologia individual em um animal.

A sorologia indica que aos 15 dias de infecção os níveis séricos de IgG específica detectado por ELISA convencional são relativamente baixos. Aos 30 dias de infecção ocorreu a detecção de níveis de IgG sérica na maioria das amostras, sendo evidente amostras com níveis considerados altos e amostras com níveis considerados intermediários, já nos períodos seguintes foi evidente o aumento gradual de amostras positivas até o momento de sacrifício dos animais. Interessante notar que mesmo nos tempos superiores de infecção, amostras com níveis baixos de IgG por este ensaio não foram infrequentes.

Os grupos experimentais foram submetidos a confirmação da infecção por *L. (L.) chagasi* através de exame parasitológico nos diferentes tempos de infecção (15, 30, 45, 60 e 90 dias), com estimativa de carga parasitária em baço e fígado, sendo quantificado em baço pela metodologia de Stauber, como descrito em métodos. Apresentamos a progressão da infecção através da comparação entre a média da carga parasitária em baço e média da sorologia dos animais para cada período analisado, sendo evidente a boa correlação entre os dois métodos através da gradual evolução quantitativa dos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e da carga parasitária (amastigotas em baço), como demonstrado no Gráfico 2. As amostras sorológicas foram posteriormente utilizadas para determinação da presença de imunocomplexos circulantes em ELISA dissociativo.

Gráfico 2 – Evolução da carga parasitária em hamsteres infectados experimentalmente com 5×10^7 formas de *L. (L.) chagasi*, em associação com valores médios de IgG específica. Símbolos redondos abertos e linha contínua mostram a evolução da carga parasitária em baço, enquanto que os pontos cheios e barras de desvio, unidos por linha tracejada mostram a evolução da sorologia para IgG.

5.2 ELISA Dissociativo

5.2.1 Padronização de pH para dissociação de imunocomplexos circulantes

Em nossa proposta o estabelecimento de pH para dissociação de imunocomplexos no ELISA ocorreu através da exposição de amostras de soro provenientes de infecção experimental com *L. (L.) chagasi* em hamster a diferentes

pHs ácidos, sendo testados os pHs 2.0, 2.5, 3.0 e 3.5, a reação ácida foi seguida de neutralização, esta fase foi utilizada para possibilitar a ligação de anticorpos anteriormente complexados, com o vasto excesso de antígeno adsorvido na placa de ELISA. A padronização de um pH ácido considerado ideal para dissociação de imunocomplexos foi realizada através da aplicação de amostras de hamsteres previamente testadas e determinadas como negativas, fracamente positivas (intermediárias) e fortemente positivas aos pHs ácidos, tendo como finalidade a verificação da estabilidade das mesmas em sua aplicação em ELISA convencional utilizando pH neutro e quando submetidas a meio ácido com stress de pH, este experimento possibilitou o confronto dos resultados nos diferentes métodos, como demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Comparação de resistência ao stress de pH em ELISA, utilizando amostra negativas, intermediárias e positivas. A relação entre a diluição sem e com stress está representada pelas linhas. A linha tracejada representa a diluição da amostra sem stress, em pH 7.5 e as linhas contínuas com seus diferentes símbolos representam a diluição de amostra submetida ao stress em pH 2.0, 2.5, 3.0 e 3.5.

Os pHs 2.5, 3.0 e 3.5, apresentaram ótima correlação (r^2 0,99) com a diluição das amostras sem stress de pH, representadas pelo pH 7.5, como não houve diferença estatística significante entre os pH 2.5, 3.0 e 3.5, optamos pela escolha do menor pH que não apresentou interferência nos resultados do ELISA dissociativo, quando comparado aos resultados de ELISA convencional, sendo este o pH 2.5. Este experimento indicou que um pH muito ácido (2.0) pode gerar precipitação inespecífica no ELISA, podendo desta forma induzir a uma interpretação errônea de resultados, onde a precipitação pode ser interpretada como um resultado positivo em amostras negativas, este pH apresentou menor

estabilidade (r^2 0,88) da diluição em comparação a diluição pura e as demais diluições submetidas aos pHs 2.5, 3.0 e 3.5.

Este experimento representa a interferência do stress de pH em nossos ensaios de ELISA, o pH 7.5 é utilizado em ELISA convencional e os pHs ácidos, com exceção do pH 2.0, podem ser empregados na dissociação de imunocomplexos, representando assim a técnica de ELISA por nós modificada e chamada de ELISA dissociativo.

5.2.2 Avaliação do ELISA dissociativo sobre imunocomplexos artificiais

Para testar a eficiência do método de dissociação proposto em pH 2.5, um controle de imunocomplexos foi criado. Brevemente a uma diluição conhecida de anticorpo de coelho policlonal anti-*Leishmania* foi adsorvido com quantidade crescente de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi* (1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg). A seguir, a mistura foi submetida à purificação de imunocomplexos por precipitação por PEG 7.5%, como descrito em métodos. A concentração de IgG específica anti-*Leishmania* no precipitado foi determinada por ELISA convencional e ELISA dissociativo, tendo os valores de reatividade da diluição pura da amostra em DO 492 comparados.

Os valores detectados pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo foram comparados, possibilitando a determinação da porcentagem de imunocomplexo formado, relacionando a quantidade de IgG recuperada após dissociação na ausência de antígeno. A comparação da amostra associada e dissociada, aplicadas ao ELISA convencional e ELISA dissociativo está representada pelo Gráfico 4.

Gráfico 4 – ELISA convencional e ELISA dissociativo em amostra de soro associada a quantidades crescentes de antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi*. A linha preta contínua com pirâmide cheia representa o ELISA convencional e a linha preta contínua com círculo cheio representa o ELISA dissociativo. A linha tracejada com círculos abertos representa a porcentagem de imunocomplexos detectada nas diluições e a linha tracejada com pirâmide aberta representa a porcentagem de recuperação de IgG após dissociação em pH 2.5. A faixa cinza representa a média das absorvâncias da amostra testada. A maior concentração de antígeno adicionada (32µ) apresenta melhor proporção entre imunocomplexo associado e dissociado.

Este experimento evidenciou uma relação bastante significativa entre os processos de associação e dissociação, mostrando a interferência de imunocomplexos em ELISA convencional e o aumento na reatividade da amostra após dissociação em pH 2.5 em ELISA dissociativo, indicando que a concentração de IgG complexada mostrou-se proporcional a concentração de IgG livre detectada

após dissociação. Os níveis entre associação e dissociação de IgG apresentaram-se semelhantes, embora com melhor relação nas maiores concentrações de antígeno adicionado a por ml de diluição.

5.3 Detecção de imunocomplexos em amostras experimentais por ELISA dissociativo

5.3.1 ELISA dissociativo em amostras de hamsteres

Foram utilizadas 91 amostras de soro de hamsteres com infecção experimental por *L. (L.) chagasi*, cuja parasitologia também foi positiva no baço. Para maior cobertura da condição sorológica dos animais em início de infecção optou-se por eutanásia quinzenal (15, 30 e 45 dias pós-infecção), após verificação do estabelecimento de resposta humoral através da detecção níveis crescentes de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, os intervalos de eutanásia foram realizados com intervalos mensais (60 e 90 dias pós-infecção). As amostras de soro foram aplicadas ao ELISA convencional e ELISA dissociativo, permitindo assim a comparação entre os métodos. A fim de verificar a correlação entre os resultados de ELISA convencional e ELISA dissociativo, os dados obtidos foram analisados através de regressão linear, apresentando uma correlação de Pearson direta entre as duas reações com $r^2 = 0,69$ e alta significância ($p < 0.0001$), representado pelo Gráfico 5. Observando o gráfico, fica evidente a dispersão de pontos significativos, estas amostras representam o incremento de IgG sofrido na reação após dissociação de imunocomplexos.

Gráfico 5 – Correlação de quantificação do ELISA convencional e ELISA dissociativo, mostrando a distribuição das amostras de hamsteres em relação aos dois tipos de ensaios, ELISA C ou convencional e ELISA D ou com dissociação de imunocomplexos.

Das 91 amostras testadas, 31 apresentaram diferença entre os resultados do ELISA convencional e ELISA dissociativo, esta diferença indica a detecção de incremento de IgG após dissociação ácida no ELISA dissociativo, a média da leitura destas amostras e a média da percentagem de imunocomplexo para cada período de infecção estão representadas pelo Gráfico 6.

Gráfico 6 – Evolução de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em amostras de hamsteres experimentalmente infectados, onde os pontos representam os intervalos quinzenais e mensais (15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção). A linha preta com círculos representa a detecção de IgG em ELISA convencional e a linha preta com quadrado representa a detecção de IgG em ELISA dissociativo. A linha preta com losango mostra a porcentagem de incremento de IgG nas amostras.

Como esperado as amostras apresentaram evolução quantitativa na detecção de IgG sérica anti-*Leishmania* nos períodos testados nas duas técnicas utilizadas, porém a análise dos resultados do ELISA dissociativo indicaram diferença entre os resultados do ELISA convencional, indicando a ocorrência de incremento de IgG em algumas amostras. Nota-se que aos 15 dias de infecção a interferência por imunocomplexos mostrou-se mínima, concordando assim com a sorologia não significativa no período, que tem como característica o início de resposta, a detecção de IgG e porcentagem de incremento evoluiu

quantitativamente quando analisados os períodos de 30 e 60 dias de infecção e aos 90 dias de infecção notou-se uma queda na porcentagem de incremento de IgG. Esta análise sugere que a interferência por imunocomplexos na sorologia convencional ocorreu em todos os períodos pós-infecção, exceto aos 45 dias e com maior significância aos 30 e 60 dias. As amostras foram classificadas como positivas e negativas, utilizando um intervalo de confiança de 95% em ELISA convencional e dissociativo e a porcentagem de incremento de IgG foi estabelecida através da diferença entre as absorbâncias das amostras no ELISA convencional e ELISA dissociativo, como descrito em métodos.

5.3.2 Análise individual de amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo em infecção experimental

O aumento de reatividade em algumas amostras no ELISA dissociativo quando comparado aos mesmos resultados de ELISA convencional foi considerado como interferência direta devido à presença de imunocomplexos circulantes. O incremento de IgG foi analisado individualmente em cada amostra que o apresentou, esta análise mostrou-se importante, pois a condição de incremento de IgG sofrido pela ação do ELISA dissociativo, pode ou não desencadear mudança de resultado na condição inicial de uma determinada amostra (ELISA convencional), este fato relaciona-se a aplicação dos resultados a valores de *cut-off* estabelecidos para cada método padronizado. Os valores de *cut-off* utilizados foram calculados utilizando um intervalo de confiança de 95%, para o cálculo foram utilizadas absorbâncias obtidas a partir da aplicação das mesmas amostras ao ELISA convencional e ao ELISA dissociativo. Notou-se que em consequência da dissociação ácida as absorbâncias do ELISA dissociativo mostraram-se

ligeiramente aumentadas, fato relacionado a uma provável precipitação inespecífica, porém sem alteração significativa nos resultados das amostras testadas.

A comparação entre os resultados de positividade obtidos pelo ELISA convencional e pelo ELISA dissociativo nos diferentes tempos de infecção pode ser vista na Tabela 3. Os resultados confirmam maior eficiência na detecção de IgG pelo ELISA dissociativo, indicando que uma pequena proporção das amostras sofreram incremento de IgG, confirmando a interferência na sorologia convencional devido a presença de imunocomplexos circulantes. Foram consideradas amostras positivas para imunocomplexos aquelas que tiveram suas leituras iniciais abaixo do valor de *cut-off* do ELISA convencional e após dissociação ácida, suas leituras foram superiores ao valor de *cut-off* determinado para o ELISA dissociativo. As amostras com incremento de IgG que apresentaram mudança em sua condição inicial passando de negativas a positivas, foram identificadas nos períodos de 30 e 60 dias de infecção.

Tabela 3 – Relação do número total de amostras em cada grupo e sua respectiva positividade para o ELISA convencional e ELISA, os resultados foram analisados dentro de um Intervalo de confiança de 95%.

	Dias após infecção				
	15	30	45	60	90
ELISA C	6/10(60%)	18/23(78,2%)	10/10(100%)	21/25(84,0%)	23/23(95,6%)
ELISA D	0/10(0%)	22/23(95,6%)	10/10(100%)	23/25(92,0%)	23/23(100%)

A análise geral comparativa de todas as amostras testadas indica total concordância entre os resultados obtidos pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo entre as amostras positivas, porém uma parcela significativa das amostras negativas 6/16 (37,5%), mostrou reatividade quando testadas pelo ELISA dissociativo, tornando amostras negativas em positivas após dissociação ácida, a comparação geral entre positividade e negatividade entre os métodos está demonstrada pela Tabela 4.

Tabela 4 – Análise qualitativa da detecção de IgG anti- *L. (L.) chagasi* em amostras de hamster com infecção experimental pelo ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D).

ELISA convencional (n = 91)		ELISA dissociativo (n = 91)		Concordância ELISA C/D	Revelados pelo ELISA Dissociativo
Positivo	75	Positivo	75	100%	0
	(82.5%)	Negativo	0		
Negativo	16	Positivo	6	10/16	6/16
	(17.5%)	Negativo	10	(62.5%)	(37,5%)

Como abordado anteriormente as amostras com infecção experimental que apresentaram incremento de IgG no ELISA dissociativo foram analisadas individualmente e suas leituras foram aplicadas a diferentes valores de *cut-off*, determinados para o ELISA convencional e ELISA dissociativo, esta abordagem dos resultados permitiu a determinação de positividade e negatividade, como representado pelo Gráfico 7. O incremento de IgG foi observado em várias amostras presentes em todos os períodos pós-infecção, exceto aos 45 dias como

citado e observado anteriormente, porém na maioria das amostras o incremento de IgG não determinou mudança na condição inicial e estas amostras permaneceram negativas ou positivas, a total alteração de resultado foi identificada aos 30 e 60 dias de infecção.

Gráfico 7 – Análise individual das amostras que apresentaram incremento de IgG no ELISA dissociativo, aplicadas a valores de *cut-off* do ELISA convencional (linha contínua) e ELISA dissociativo (linha tracejada). Os pontos fechados representam as amostras quando aplicadas ao ELISA convencional e os pontos abertos representam as mesmas amostras quando aplicadas ao ELISA dissociativo, a ligação entre os dois pontos refere-se a quantidade de incremento de IgG sofrido por estas amostras.

5.4 Avaliação de ELISA dissociativo em amostras caninas negativas suspeitas

Inicialmente foram testados 203 soros de cães de áreas suspeitas para LV no estado de São Paulo por ELISA como descrito em métodos, utilizando conjugado espécie-específico. Todas as amostras foram testadas pela metodologia convencional e dissociativa e os dados obtidos foram aplicados a uma análise de regressão linear, onde se obteve uma correlação de Pearson direta entre os métodos com $r^2 = 0,96$ e alta significância entre os dados ($p < 0,0001$). Essa análise inicial permitiu a triagem e determinação dos grupos de amostras negativas, indeterminadas e positivas.

5.4.1 Validação de ELISA convencional e dissociativo através de resultados de RIFI e ELISA comercial em amostras de cães

Para avaliação da padronização do ELISA convencional e ELISA dissociativo, foram utilizados como referência para validação os resultados de RIFI e ELISA comerciais, previamente obtidos pelo Laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz. Para o estabelecimento de parâmetros como concordância e reprodutibilidade, foi utilizado um grupo de 64 amostras com resultados para as duas metodologias (RIFI e ELISA comercial).

A análise comparativa entre os resultados de RIFI e ELISA comercial, ELISA convencional e ELISA dissociativo, indica resultados conflitantes, confirmados pela não concordância entre os mesmos, onde a maioria das amostras negativas na RIFI apresentaram-se positivas quando analisadas pelas diferentes metodologias do ELISA (convencional, dissociativo e comercial). A validação dos métodos

padronizados utilizou como referência os resultados do teste ELISA comercial. A alta concordância entre os resultados de ELISA comercial, ELISA convencional e ELISA dissociativo e a discordância com os resultados de RIFI, estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação entre resultados de RIFI, ELISA comercial (ELISA IAL), ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D). Os resultados de RIFI e ELISA comercial foram cedidos pelo IAL e os resultados de ELISA convencional e ELISA dissociativo foram obtidos após nossos experimentos.

RIFI	64	ELISA IAL	64	ELISA C	64	ELISA D	64
Positiva	27	Positivo	25	Positivo	25	Positivo	22
		Indeterminado	01	Indeterminado	02	Indeterminado	05
		Negativo	01	Negativo	00	Negativo	00
Negativa	37	Positivo	32	Positivo	33	Positivo	31
		Indeterminado	03	Indeterminado	03	Indeterminado	05
		Negativo	02	Negativo	01	Negativo	01

5.4.2 Avaliação de ELISA dissociativo em amostras caninas negativas testadas por ELISA convencional

As 203 amostras analisadas foram submetidas a valores de *cut-off* e zona de indeterminação, calculados em um intervalo de confiança de 95%, sendo seus resultados determinados como positivo, negativo e indeterminado. Uma parcela das amostras (32) apresentou leitura muito próxima ao valor de *cut-off*, sendo classificadas como indeterminadas, levando em consideração o fato de que a

dissociação ácida não afetou os resultados e que não foi observado qualquer mudança na condição inicial das mesmas, estas amostras foram excluídas porque o ELISA comercial testado previamente pelo Instituto Adolfo Lutz forneceu somente dados de positividade e negatividade, não sendo possível a comparação das amostras classificadas por nós como indeterminas. Das 171 amostras que puderam ser classificadas como positivas ou negativas, quando aplicadas a valores de *cut-off* para ELISA convencional e ELISA dissociativo, uma pequena parcela mostrou mudança em sua condição inicial. A classificação das amostras e o desempenho dos testes ELISA convencional e ELISA dissociativo podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparação entre resultados positivos e negativos obtidos pela utilização do ELISA convencional e ELISA dissociativo. Mostrando maior eficiência na detecção de positivos quando utilizado o método dissociativo.

ELISA Convencional (n = 171)		ELISA Dissociativo (n = 171)		Concordância ELISA C/D	Revelados pelo ELISA Dissociativo
Positivas	101	Positivas	101	100%	0
	(59%)	Negativas	0		
Negativas	70	Positivas	7	63/70	7/70
	(41%)	Negativas	63	90%	10%

A concordância entre resultados positivos entre o ELISA convencional e o ELISA dissociativo foi total, porém como observado anteriormente nas amostras com infecção experimental, uma pequena parcela das amostras negativas

7/70(10%) apresentou reatividade no ELISA dissociativo, apresentando incremento de IgG após dissociação ácida.

5.4.3 Análise individual de amostras caninas negativas com incremento de IgG no ELISA dissociativo

Das 203 amostras testadas, 63 mostraram-se negativas, sendo que 14 amostras apresentaram incremento de IgG pelo ELISA dissociativo, estes resultados foram aplicados a valores de *cut-off* no ELISA convencional e no ELISA dissociativo, calculados utilizando o mesmo grupo de amostras para os 2 métodos em um intervalo de confiança de 95%, permitindo assim a definição destas amostras como negativas ou positivas, como demonstrado no Gráfico 8. Das 14 amostras negativas que sofreram incremento de IgG, 7/203 (3,4%) mostraram mudança em seus resultados, tornando-se positivas quando testadas pelo ELISA dissociativo, indicando assim a interferência de imunocomplexos circulantes, esta limitação da sorologia convencional mostra a incapacidade da detecção real da quantidade de IgG em uma amostra com imunocomplexos.

Gráfico 8 – Comparação de resultados de ELISA convencional (ELISA C) e ELISA dissociativo (ELISA D). Os círculos fechados representam a absorvâncias obtidas pelo ELISA convencional, os círculos abertos representam as absorvâncias obtidas pelo ELISA dissociativo. As linhas ligando aos dois pontos representam o incremento de IgG sofrido por cada amostra. A linha contínua representa o *cut-off* do ELISA convencional e a linha tracejada representa o *cut-off* do ELISA dissociativo.

5.5 Avaliação de ELISA dissociativo em amostras humanas negativas suspeitas

Foram testadas 200 amostras humanas provenientes de área endêmica para LVH na cidade de Araguaína, no estado de Tocantins. Assim como as amostras caninas, as amostras humanas foram previamente testadas pela RIFI

comercial, sendo determinadas como negativas (100) e positivas (100), as amostras positivas apresentaram títulos na RIFI de 1:80 e 1:160.

Em uma avaliação geral as amostras negativas e positivas pela RIFI dos foram submetidas ao ELISA convencional e ao ELISA dissociativo, onde a metodologia seguiu como descrito em métodos, utilizando conjugado peroxidase espécie-específico. Os resultados foram analisados por regressão linear, apresentando uma correlação com $r^2=0,66$ e alta significância entre os dados com $p < 0,0001$, confirmando os dados obtidos nas amostras de hamsteres e cães.

5.5.1 Validação de ELISA convencional e dissociativo através de resultados de RIFI em amostras humanas

Como validação para o teste de ELISA dissociativo optamos por testar o grupo pré-estabelecido como negativos segundo os resultados de RIFI, já que este grupo representa as amostras alvo para aplicação do ELISA dissociativo. Os resultados de sorológicos foram aplicados a valores de *cut-off* para o ELISA convencional e para o ELISA dissociativo, utilizando um intervalo de confiança de 95%, como descrito anteriormente para os grupos já analisados. A comparação entre os resultados pode ser visualizada na Tabela 7, onde a comparação entre os resultados de RIFI e ELISA convencional e ELISA dissociativo, indicam baixa concordância entre os mesmos.

Tabela 7 – Comparação entre resultados de RIFI e ELISA convencional e ELISA dissociativo. Os resultados mostram baixa concordância entre si.

RIFI (n = 100)	Elisa Convencional (n = 100)	Elisa Dissociativo (n = 100)	Concordância Elisa D/ELISA C	Revelados pelo ELISA D
Negativas	Positivas 12 (12%)	Positivas 12 Negativas 0	100%	0
	Negativas 88 (88%)	Positivas 3 Negativas 85	85/88 96,5%	3/85 3,5%

A análise comparativa entre os resultados de RIFI e ELISA convencional e ELISA dissociativo, mostra discordância entre os resultados, pois apresenta uma parcela considerável de amostras positivas 12/100 (12%) pelo ELISA convencional e dissociativo, sendo as mesmas previamente definidas como negativas pela RIFI. Como observado anteriormente para os grupos já analisados, entre os resultados negativos no ELISA convencional, uma pequena parcela das amostras negativas 3/85 (3,5%) apresentou reatividade no ELISA dissociativo, indicando interferência na sorologia convencional devido a presença de imunocomplexos circulantes.

5.5.2 Análise individual de amostras humanas negativas com incremento de IgG no ELISA dissociativo

A análise individual das amostras com incremento de IgG está representada pelo Gráfico 9, indicando que 15 amostras apresentaram significativo incremento de IgG no ELISA dissociativo. Esta análise indica que 3/100 (3%) das amostras sofreram interferência de imunocomplexos na sorologia convencional e

consequentemente apresentaram mudança em seu resultado inicial, deixando uma zona de negatividade ou indeterminação, passando a ser definida como uma amostra positiva. Esta análise realizada com a utilização de valores específicos de *cut-off* para cada método fornece maior segurança na indicação da presença de imunocomplexos, evitando assim a detecção de falsos resultados positivos em consequência da precipitação inespecífica causada pela ação da dissociação ácida.

Gráfico 9 – Os pontos fechados indicam as amostras negativas testadas pelo ELISA convencional e os pontos abertos representam as mesmas amostras testadas pelo ELISA dissociativo, a ligação entre os dois pontos representam o incremento de IgG sofrido pelas amostras.

5.6 Detecção de antígeno circulante por DOT-ELISA em amostras de hamster, cão e homem com incremento de IgG no ELISA dissociativo

O teste DOT-ELISA ácido foi padronizado utilizando como princípio básico uma solução ácida que age diretamente na dissociação de imunocomplexos, permitindo assim a ligação de proteínas presentes nas amostras de soro na membrana, como descrito em métodos, tendo como finalidade a confirmação da presença de antígeno circulante nestas amostras, com consequente confirmação da presença de imunocomplexos em amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo.

Foram testadas todas as amostras que apresentaram resultados negativos no ELISA convencional e positivos no ELISA dissociativo, após a completa reação do teste de DOT-ELISA ácido, os resultados foram definidos através de análise visual, onde as amostras positivas foram identificadas através da presença de forte coloração e as amostras negativas por meio da ausência ou fraca presença de cor, utilizando como referência os controles positivo e negativo, como exemplificado em métodos. A definição de positividade relaciona-se a presença de antígeno na amostra e a definição de negatividade a ausência de antígeno na amostra, estas definições foram qualitativas. Os resultados qualitativos das amostras avaliadas podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados qualitativos de DOT-ELISA ácido em amostras de hamster, cão e homem com incremento de IgG no ELISA dissociativo.

Amostras	ELISA convencional negativo/ELISA dissociativo positivo	DOT-ELISA Positivo
Hamster	6	6/6(100%)
Cão	7	6/7(85.7%)
Humano	3	3/3(100%)
Total	16	15/16(93.7%)

A maioria das amostras 15/16 (93.7%) foi classificada como positiva no teste de DOT-ELISA ácido, confirmando a presença de antígeno circulante e a ocorrência de dissociação de imunocomplexos. A presença de uma única amostra negativa pode estar associada a uma baixa reatividade da amostra devido aos baixos níveis de antígeno, não sendo detectado pelo nosso sistema.

6 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho padronizamos uma reação de ELISA com etapa dissociativa para imunocomplexos que permite a detecção de anticorpo IgG anti-*Leishmania* complexados a antígenos e não detectados em ELISA convencional. O procedimento envolve a dissociação ácida de imunocomplexos, com seguinte reassociação dos anticorpos ao vasto excesso de antígeno presente em fase sólida, eliminando assim a interferência de imunocomplexos na sorologia convencional através da utilização de um teste que dispensa fase de preparo da amostra, minimizando assim o tempo total da reação.

O preparo de amostras de soros para a obtenção da dissociação de imunocomplexos está bem estabelecido por alguns autores em estudos com Tuberculose (Imaz et al., 2008), Alzheimer (Gustaw et al., 2008), Histoplasmose (Swartzentruber et al., 2009), Esquistossomose (Galvão-Castro et al., 1981), doenças alérgicas (Paganelli et al., 1981), Amebíase (Vinayak et al., 1986) e Streptococose (Holloway et al., 1993), porém todos os trabalhos citados necessitam de um tratamento prévio de precipitação de imunocomplexos em soro com posterior aplicação das amostras ao método diagnóstico de escolha, sendo necessário a realização de duas reações. A proposta em nossos ensaios foi que o tratamento da amostra estivesse incluído na reação de ELISA convencional, tornando-o assim uma técnica de ELISA com fase dissociativa para imunocomplexos. A utilização do teste ELISA com fase dissociativa foi relatada em estudo de dissociação ácida para antígeno p24 na infecção pelo vírus HIV (Miles et al., 1993).

Como parte da padronização do ELISA dissociativo, inicialmente algumas amostras foram submetidas a vários pHs ácidos, tendo como finalidade a verificação da estabilidade destas diluições quando submetidas ao tratamento ácido, permitindo a comparação dos resultados obtidos pela técnica convencional. Os resultados deste experimento possibilitaram a definição de um pH de trabalho para nossos testes. Foi observado que em uma condição extrema ocorre uma falsa detecção de IgG, através da ocorrência de precipitação inespecífica na reação, este acontecimento pode induzir a interpretação de resultados falsos positivos, fenômeno também observado em estudo com Alzheimer, onde em condições e objetivos diferentes o autor descreve que a utilização de um pH muito ácido gera precipitação de IgG no ELISA (Li et al., 2007).

O agente dissociante e o agente neutralizante utilizados por nós foram usados em trabalho semelhante na dissociação de imunocomplexos para detecção de antígeno p24 do vírus HIV em recém-nascidos (Lewis et al., 1995). Nossos testes mostraram alta sensibilidade, porém a utilização de pH ácido pode induzir a uma queda na especificidade do teste, podendo gerar resultados falsos positivos, este fenômeno tem provável relação ao tempo de exposição ao agente ácido dissociador, o que também foi observado em estudo de dissociação ácida, onde o autor relatou a indução de falsa positividade na mensuração de IgG no ELISA (Li et al., 2007).

Um controle de imunocomplexos foi desenvolvido para testar a viabilidade da dissociação ácida e o mostrou eficiência em sua aplicação, sendo negativo quando testado pelo ELISA convencional e positivo no ELISA dissociativo. A produção de imunocomplexo *in vitro* foi padronizada através da avaliação entre a capacidade de associação e dissociação de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em amostras de soro em quantidades crescentes de antígeno solúvel de *Leishmania*

precipitados por PEG, resultando em uma zona de equivalência ideal para associação entre anticorpo e antígeno nas mais elevadas concentrações de antígeno testadas, dado confirmado em estudo semelhante onde o autor identificou que altas concentrações entre antígeno e anticorpo induzem a formação de imunocomplexos *in vitro* (Paganelli et al., 1981). A precipitação de imunocomplexos produzidos *in vivo* e *in vitro* na Leishmaniose visceral através da utilização de PEG foi descrita anteriormente (Casali e Lambert, 1979), confirmando sua presença por meio da detecção de complemento por imunodifusão radial e anticorpo IgG anti-*Leishmania* em eletroforese e demonstrou concentrações semelhantes entre imunocomplexos produzido *in vivo* e *in vitro*, confirmando assim o ocorrido em nossos experimentos.

A confirmação da presença de imunocomplexos foi realizada por DOT-ELISA ácido, através da detecção de antígeno circulante após dissociação em membrana. A utilização de DOT-ELISA na detecção de antígeno de *Leishmania* foi descrita anteriormente, mostrando resultados concordantes entre os métodos de DOT e ELISA (Senaldi, 1996). A detecção de antígeno por DOT-ELISA ácido foi empregada em um estudo com o vírus da Dengue, a técnica empregada foi similar a utilizada em nossos experimentos, porém a amostra de soro era utilizada em diluições baixas com altas concentrações de antígeno e anticorpos (Koraka et al., 2003). A técnica de detecção de antígeno circulante por DOT-ELISA ácido mostrou alta correlação com os resultados obtidos pelo ELISA dissociativo, confirmando a interferência na sorologia convencional causada devido a presença de imunocomplexos circulantes.

Apesar da real possibilidade de interferência de imunocomplexos em testes sorológicos utilizados na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* tendo como consequência resultados conflitantes nas rotinas laboratoriais, a presença de

imunocomplexos como principal fator interferente não é abordada na maioria dos artigos da área, provavelmente devido ao fato de que para que seja possível a confirmação da presença de imunocomplexos a amostra deva ser submetida a um dispendioso processo de preparo (Evans et al., 1988; Soares et al., 2001).

Na infecção experimental em hamster, o ELISA convencional indicou a progressão da doença através de altos títulos de IgG anti-*Leishmania*, como já mostrado por outros autores (Afrin e Ali, 1997; Melby et al., 2001). A estimativa de carga parasitária em baço apresentou crescimento gradual ao longo da infecção, estabelecendo ótima correlação entre os níveis de anticorpos detectados, fato que confirma a suscetibilidade do modelo experimental utilizado e possibilitou uma ótima reprodução da infecção natural (Nieto et al., 2011). Os resultados das amostras com infecção experimental analisadas pelo ELISA dissociativo, indicam que a maior interferência na sorologia convencional ocorreu aos 30 dias de infecção, período associado à fase aguda da doença, resultados similares foram encontrados em estudo de avaliação de função renal associada a presença de imunocomplexo (Elshafie et al., 2006). A detecção de imunocomplexos através de precipitação por PEG com detecção direta por ELISA foi realizada em infecção experimental em ratos, mostrando-se um método promissor para a identificação de doença ativa e monitoramento de tratamento através da detecção da variabilidade dos níveis de antígeno (Azazy et al., 1997). A utilização da técnica indireta e modificada de ELISA, sem a necessidade de tratamento prévio da amostra mostrada em nossos experimentos mostrou eficiência semelhante na indicação da presença de imunocomplexos circulantes em infecção experimental.

As amostras de hamster com infecção experimental foram submetidas à análise pelo ELISA convencional e ELISA dissociativo e seus resultados foram correlacionados, o que permitiu a identificação de uma parcela de amostras com

resultados negativos no ELISA convencional e positivas no ELISA dissociativo. Estes resultados podem ser explicados pela presença de imunocomplexos nestas amostras, com posterior confirmação da presença de antígeno circulante pelo DOT-ELISA ácido na maioria das amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo. Uma amostra não indicou a presença de antígeno circulante pelo DOT-ELISA ácido, o que pode ser decorrente da pouca quantidade de antígeno nessa amostra. Resultados negativos no DOT-ELISA podem estar relacionados a quantidade de antígeno presente na amostra, desta forma não sendo detectado pelo nosso sistema, originando um resultado falso negativo no DOT-ELISA, o que também foi observado em estudo semelhante (Azazy, 2004). Também deve ser considerada a possibilidade de um resultado falso positivo no ELISA dissociativo, atribuído a desnaturação de IgG nesta amostra especificamente, como demonstrado em nossa padronização, pela maior reatividade de amostras submetidas a stress ácido mais forte.

A avaliação do ELISA convencional e ELISA dissociativo foi realizada de forma semelhante em amostras de cães, a análise dos resultados permitiu a identificação de resultados discordantes entre o ELISA convencional e ELISA dissociativo, vale ressaltar que os resultados por nós obtidos foram confrontados com os resultados realizados previamente a este trabalho pelo Instituto Adolfo Lutz, que utilizou as técnicas de RIFI para uma parcela das amostras testadas e ELISA em todas as amostras. Os resultados do ELISA convencional e ELISA dissociativo indicaram alta frequência de amostras positivas e negativas concordantes, porém uma pequena parcela das amostras inicialmente negativas no ELISA convencional mostrou discordância de resultados quando testadas pelo ELISA dissociativo e DOT-ELISA ácido, sendo consideradas positivas.

A comparação total entre todas as metodologias testadas indicam boa concordância entre os testes ELISA convencional e ELISA comercial entre as amostras positivas e negativas, servindo como base para validação de nossos resultados. Os resultados da RIFI foram comparados aos da técnica convencional e dissociativa de ELISA, mostrando elevada discordância, principalmente em resultados considerados negativos para RIFI. Os resultados falsos negativos da RIFI confirmados pelo ELISA indicam baixa sensibilidade do teste, concordando com dados encontrados na literatura, onde em trabalho comparativo entre métodos para diagnóstico da Leishmaniose visceral em cães sintomáticos e assintomáticos, observou-se a melhor eficiência na detecção de resultados positivos pelo ELISA (Mettler et al., 2005). A detecção de imunocomplexos na Leishmaniose visceral através de métodos sorológicos dissociativos é pouco relacionada à sorologia, em geral sua presença está associada à instalação e progressão da infecção, onde os estudos focam, por exemplo, a avaliação da função renal em consequência da possível deposição glomerular de imunocomplexos (Margarito et al., 1998). A população canina é considerada extremamente suscetível a Leishmaniose visceral, sendo responsável por sua disseminação (Solano-Gallego et al., 2009), devido a este fato a identificação de uma importante fração das amostras caninas com interferência na sorologia convencional devido a presença de imunocomplexos, o que era uma condição esperada.

Amostras humanas de área endêmica foram testadas de forma semelhante no ELISA convencional e ELISA dissociativo. A validação de nossos testes utilizou como referência os resultados negativos previamente estabelecidos pela RIFI, à comparação entre os resultados indicou alta discordância entre os mesmos, onde através da aplicação do ELISA convencional e ELISA dissociativo foi identificada uma parcela de amostras positivas. Essa discrepância entre a RIFI e o ELISA foi

anteriormente observada em estudo comparativo entre métodos de diagnóstico para Leishmaniose visceral aplicados a soros humanos (Iqbal et al., 2002; Pedras et al., 2008), onde os resultados de RIFI indicam a ocorrência de falsos resultados negativos, concordando com o ocorrido em nossos ensaios, indicando menor sensibilidade da RIFI na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, quando comparadas ao método de ELISA. A utilização de *L. (L.) major* na RIFI para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* pode induzir a uma baixa sensibilidade e apresentar reações cruzadas, enquanto a utilização de antígeno específico de *L. (L.) chagasi* confere melhor eficiência relacionada a especificidade e sensibilidade do teste, fato confirmado através da discordância significativa entre os resultados, concordando assim com dados de estudo comparativo entre RIFI e ELISA, que utilizou o mesmo preparo antigênico utilizado em nossos experimentos, apresentando resultados falsos negativos (Mancianti et al., 1995).

Uma pequena parcela das amostras humanas analisadas foi negativa no ELISA convencional e positiva no ELISA dissociativo, sugerindo a presença de imunocomplexos interferindo diretamente na sorologia convencional. A indicação da presença de imunocomplexos nesta pequena parcela das amostras relaciona-se a diversos aspectos da doença humana, tal como a baixa suscetibilidade após infecção por Leishmaniose visceral no hospedeiro humano, resultando em infecção controlada em pessoas infectadas (Stanley e Engwerda et al., 2007). Estudos relacionados ao acompanhamento da doença, utilizando técnicas que direta ou indiretamente possam confirmar a presença de antígeno circulante podem ser utilizados como parâmetro para administração de tratamento, uma vez que a presença de antígeno na circulação pode corresponder a doença ativa em alguns casos (Evans et al., 1988) ou ainda representar risco de recorrência devido a

fatores relacionados a imunossupressão, como em pacientes HIV positivos (Cota et al., 2011).

O diagnóstico da Leishmaniose visceral é considerado complexo por apresentar uma série de sintomas clínicos comuns a outras doenças (Srivastava et al., 2011). Frente a suspeita de um caso de Leishmaniose visceral a conduta mais indicada para o diagnóstico laboratorial é o método parasitológico, através da detecção de parasitas com visualização microscópica e isolamento em cultura de possíveis formas amastigotas presentes em aspirados de baço, fígado, linfonodo e medula óssea, conferindo a esta metodologia alta especificidade (Singh et al., 2006). Aspirados de baço e fígado são amostras amplamente utilizadas no diagnóstico parasitológico da Leishmaniose visceral, porém sua realização pode desencadear complicações hemorrágicas conferindo risco ao paciente, sendo necessário profissional altamente treinado e condições estruturais para sua execução (da Silva et al., 2005; Kar, 1995). Testes alternativos que utilizam sangue periférico, como a sorologia, são cada vez mais estabelecidos para o diagnóstico da Leishmaniose visceral, entre eles destaca-se o teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, apresentando excelentes parâmetros de sensibilidade e especificidade nos kits comerciais disponíveis no mercado, sua interpretação permite o monitoramento da doença e tratamento através da caracterização do elevado perfil sorológico que caracteriza a Leishmaniose visceral (Kumar, 2001). Apesar da viabilidade do teste ELISA com alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, sua utilização é limitada principalmente a estudos epidemiológicos (Palatinik-de-Souza et al., 2011)

A infecção por *L. (L.) chagasi* é caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos, que não contribuem para a defesa imunológica do indivíduo infectado, quando um quadro de alta parasitemia é estabelecido, ocorre o

desencadeamento da alta produção de anticorpos IgG na tentativa de defesa contra o parasita, através do revestimento da superfície da amastigota por anticorpos IgG anti-*Leishmania*, este processo resulta na formação de imunocomplexos circulantes (Halstead et al., 2010). A abordagem da presença de imunocomplexos no sangue periférico e sua interferência na sorologia da Leishmaniose visceral são escassas, porém este estudo evidenciou a necessidade de uma triagem inicial de pacientes suspeitos para os exames parasitológicos mais invasivos, melhorando a eficiência destes por diminuir a sobrecarga do observador especializado e o risco inerente da punção medular ou esplênica.

Nossos dados mostram que na Leishmaniose visceral há uma interferência de imunocomplexos em uma fração dos ensaios sorológicos. Este fenômeno indica que os testes sorológicos, embora promissores possam gerar resultado falso negativo em pacientes parasitologicamente confirmados, criando preconceitos junto ao clínico ou veterinário, o que leva ao seu descrédito e consequente abandono. Esta é uma consequência que implica no aprimoramento destes métodos como o apresentado, para permitir seu uso adequado e confiável. Nossa primeira abordagem foi muito promissora, mas seu aprimoramento é indispensável para que o mesmo processo que vem ocorrendo não corroa sua utilidade futura.

7 CONCLUSÕES

7.1 Geral

Os resultados obtidos pelo ELISA dissociativo confirmam a interferência de imunocomplexos na sorologia convencional.

7.2 Específicas

- a) A dissociação de imunocomplexos em pH ácido permite a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, não detectados pela técnica convencional de ELISA;
- b) Imunocomplexos podem estar presentes durante a Leishmaniose visceral, interferindo em testes sorológicos;
- c) A técnica dissociativa mostrou-se útil para a indicação de imunocomplexos em amostras de soro através da determinação de incremento de IgG;
- d) Apesar da interferência por imunocomplexos ser restrita a um grupo pequeno de amostras testadas, a aplicação do teste ELISA dissociativo gerou mudança no critério de avaliação dos resultados iniciais;

- e) A interferência por imunocomplexos foi identificada em período inicial na infecção experimental e pode estar associada a uma fase oligossintomática da doença;
- f) Os resultados de ELISA indicam baixa sensibilidade da RIFI na detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em amostras caninas e humanas;
- g) A utilização do ELISA dissociativo pode elucidar casos onde a suspeita clínica este presente, porém o resultado sorológico é conflitante ou negativo, gerando dúvida ao médico solicitante, o resultado do ELISA dissociativo pode ser avaliado como um método de triagem para pacientes suspeitos, onde resultados positivos podem sugerir a realização do teste parasitológico;
- h) O teste ELISA dissociativo foi mais eficiente na identificação de resultados positivos na Leishmaniose visceral;
- i) A detecção de antígeno circulante em amostras com incremento de IgG no ELISA dissociativo mostrou-se capaz de confirmar a presença de imunocomplexos em amostras de soro;
- j) A técnica de DOT-ELISA ácido confirmou a ocorrência de dissociação de imunocomplexos.

REFERÊNCIAS

Afrin F, Ali N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun*.1997 Jun;65(6):2371-7.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*.2003 Mar;17(1):1-18.

Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Apr;10(2):298-319.

Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004 Jan-Feb;20(1):259-65.

Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2001 Jan 15;78(1):11-6.

Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, et al. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul;81(1):46-51.

Azazy AA. Detection of circulating antigens in sera from visceral leishmaniasis patients using dot-ELISA. *J Egypt Soc Parasitol*. 2004 Apr;34(1):35-43.

Azazy AA, Chance ML, Devaney E. A time-course study of circulating antigen and parasite-specific antibody in cotton rats infected with *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997 Mar;91(2):153-62.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008 Jul;24(7):324-30.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2009. [citado 2012 Fev 20]. 816p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf>.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral: Normas e condutas [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2006. [citado 2012 Fev 20]. 120p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf>.

Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release*. 2008 Feb 11;125(3):210-27.

Carvalho EM, Andrews BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 Jan;32(1):61-8.

Casali P, Lambert PH. Purification of soluble immune complexes from serum using polymethylmetacrylate beads coated with conglutinin or C1q. Application to the analysis of the components of in vitro formed immune complexes and of immune complexes occurring in vivo during leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1979 Aug;37(2):295-309.

Center for Diseases Control and Prevention, National Center for Health Statistics. Parasites – Leishmaniasis, Image Library [Internet]. Atlanta: Centers for Diseases Control and Prevention, 2009. [citado 2012 Fev 24]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Nov;5(11):873-82.

Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Mar-Apr;44(2):232-42.

Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jun;5(6):e1153.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect. 2011 Oct;17(10):1478-83.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol. 2002 Apr;72(2):132-41.

da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jun;72(6):811-4.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009 Nov-Dec;22(6):491-502.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. BMJ. 2003 Feb 15;326(7385):377-82.

den Boer ML, Alvar J, Davidson RN, Ritmeijer K, Balasegaram M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. Expert Opin Emerg Drugs. 2009 Sep;14(3):395-410.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol. 1996 Sep-Oct;14(5):417-23.

de Vallière S, Mary C, Joneberg JE, Rotman S, Bullani R, Greub G, et al. AA-amyloidosis caused by visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-infected patient. Am J Trop Med Hyg. 2009 Aug;81(2):209-12. Erratum in: Am J Trop Med Hyg. 2009 Oct;81(4):732.

Durkin M, Estok L, Hospenthal D, Crum-Cianflone N, Swartzentruber S, Hackett E, et al. Detection of Coccidioides antigenemia following dissociation of immune complexes. Clin Vaccine Immunol. 2009 Oct;16(10):1453-6.

ElShafie AI, Elghazali G, Rönnelid J, Venge P. Cystatin C as a marker of immune complex-associated renal impairment in a Sudanese population with visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2006 Nov;75(5):864-8.

Elshafie AI, Ahlin E, Mathsson L, ElGhazali G, Rönnelid J. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. J Immunol. 2007 Apr; 15;178(8):5383-9.

Evans TG, Pearson RD. Identification of leishmanial antigens in the sera of patients with American visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1988 Dec;56(12):3139-44.

Ferrua B, Rol N, Michel G, Marty P. Antigenemia in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3760-2.

Galvão-Castro B, Bina JC, Prata A, Lambert PH. Correlation of circulating immune complexes and complement breakdown products with the severity of the disease in human schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 Jan;30(6):1238-46.

Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984 Nov; 56(1):58-66.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras. Epidemiol*. 2004 Set; 7(3) 338-349.

Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009 Sep-Oct;51(5):241-6.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug;2(8):494-501.

Gustaw KA, Garrett MR, Lee HG, Castellani RJ, Zagorski MG, Prakasam A, et al. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(3):1350-6.

Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis*. 2010 Oct;10(10):712-22.

Handman E, Bullen DV. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002 Aug;18(8):332-4.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011 Sep;27(9):403-9.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.

Holloway Y, Snijder JA, Boersma WG. Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complexes in patients with community-acquired pneumonia by means of an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1993 Dec;31(12):3247-54.

Hommel M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect*. 1999 Sep;39(2):101-11.

Huiras E, Preda V, Maurer T, Whitfeld M. Cutaneous manifestations of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008 Jul;3(4):453-60.

Imaz MS, Schmelling MF, Kaempfer S, Spallek R, Singh M. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Braz J Infect Dis*. 2008 Jun;12(3):234-44.

Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):475-9.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):439-45.

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 1995;21(2):123-52.

Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, Osterhaus AD. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4154-9.

Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Nov;8(6):1220-4.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Mahy BWJ, ter Meulen V, Borriello SP, Murray PR, Funke G, Merz WG, et al. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* [Internet]. Published online: 15 Mar 2010. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; 2010. [cited 2012 Feb 21]. [37 p.] Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182/pdf>.

Lambert PH, Berney M, Kazyumba G. Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. *J Clin Invest.* 1981 Jan;67(1):77-85.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007 Nov-Dec;73(6):843-7

Lewis DE, Adu-Oppong A, Hollinger FB, Rosenblatt HM, Hanson IC, Reuben JM, et al. Sensitivity of immune complex-dissociated p24 antigen testing for early detection of human immunodeficiency virus in infants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995 Jan;2(1):87-90.

Li Q, Gordon M, Cao C, Ugen KE, Morgan D. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Aβ antibodies. *BMC Neurosci.* 2007 Mar 20;8:22.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009 Sep-Oct;51(5):247-53.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20;158(4):274-87.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 1995 Aug;59(1):13-21.

Margarito JM, Lucena R, López R, Molleda JM, Martín E, Ginel PJ. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Jun;45(5):263-7.

Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1912-20.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of

symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5515-9.

Miles SA, Balden E, Magpantay L, Wei L, Leiblein A, Hofheinz D, et al. Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. Southern California Pediatric AIDS Consortium. *N Engl J Med*. 1993 Feb 4;328(5):297-302.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005 Mar;7;201(5):747-54.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.

Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008 Sep;6(9):754-65.

Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res*. [Internet] 2011 Feb 23; [cited 2012 Feb 21];42(1):Article 39[13 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052183/pdf/1297-9716-42-39.pdf>.

Nyame AK, Kwar ZS, Cummings RD. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Jun 15;426(2):182-200.

Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Mar-Apr;43(2):188-93.

Ott KJ, Hanson WL, Stauber LA. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol*. 1967 Jun;53(3):641-5.

Paganelli R, Levinsky RJ, Atherton DJ. Detection of specific antigen within circulating immune complexes: validation of the assay and its application to food antigen-antibody complexes formed in healthy and food-allergic subjects. *Clin Exp Immunol*. 1981 Oct;46(1):44-53.

Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2011 Oct 0;4:197.

Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. J Pediatr (Rio J). 2002 Mar-Apr;78(2):120-7.

Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. Int J Infect Dis. 2010 Dec;14(12):e1032-9.

Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Feb;102(2):172-8.

Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Med J. 2006 Oct;82(972):649-57. Corrected and republished in: Postgrad Med J. 2007 Feb;83(976):649-57.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol. 2007 May;14(5):544-8.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol. 2006 Aug 15;112(3-4):102-16.

Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000 Jul;16(7):292-7.

Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br Med Bull. 2006 Jul 17;75-76:115-30.

Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Jan 19;4(1):e584.

Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg. 2009 Jul;81(1):27-33.

Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. Clin Infect Dis. 2009 Oct 1;49(7):1103-8.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:453-83.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 Sep 6;88(1-2):21-30.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Sep;47(1):349-58.

Senaldi G, Xiao-su H, Hoessli DC, Bordier C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. *J Immunol Methods*. 1996 Jun 14;193(1):9-15.

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008 Dec;45(4):255-72.

Silva RM, Laurenti MD, Gomes Ade C, Nogueira YL. TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Rev Saude Publica*. 2009 Dec;43(6):1044-53.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):311-30.

Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):331-44.

Soares NM, Santiago MB, Pontes de Carvalho LC. An improved anti-C3/IgG ELISA for quantification of soluble immune complexes. *J Immunol Methods*. 2001 Nov;249(1-2):199-205.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011 Jan;105(1):1-6.

Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012 Mar;110(3):1065-78.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Sep;9(5):951-8.

Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunol Cell Biol. 2007 Feb-Mar;85(2):138-47.

Swartzentruber S, LeMonte A, Witt J, Fuller D, Davis T, Hage C, et al. Improved detection of Histoplasma antigenemia following dissociation of immune complexes. Clin Vaccine Immunol. 2009 Mar;16(3):320-2.

Távora MP, Pereira MA, Silva VL, Vita GF. Estudo da validação comparativa entre as técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Jul-Aug;40(4):482-3.

Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, Lee S, Melby PC. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. Am J Trop Med Hyg. 2009 Dec;81(6):994-1003.

Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J, et al. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. J Immunol. 1994 Jul 15;153(2):768-75.

Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today. 1993 Jun;9(6):228-32.

Vinayak VK, Purnima, Singh K, Venkatswarlu K, Nain CK, Mehta SK. Specific circulating immune complexes in amoebic liver abscess. J Clin Microbiol. 1986 Jun;23(6):1088-90.

Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Epidemiol Infect. 2007 Jul;135(2):195-201.

World Health Organization - WHO. Research and Training in Tropical Diseases, Neglected Tropical Diseases. Leishmaniasis [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012. [cited 2012 Feb 21]. Available from: http://www.who.int/tdr/research/ntd/visceral_leishmaniasis/en/.

APÊNDICE – DOT-ELISA

Imagens referentes aos testes de DOT-ELISA ácido em amostras de soros com incremento de IgG no ELISA dissociativo.

Amostras	DOT - ELISA	Resultados
Hamster		Positivo
Hamster		Positivo
Hamster		Positivo
Hamster		Positivo
Hamster		Positivo
Hamster		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Positivo
Cão		Negativo
Homem		Positivo
Homem		Positivo
Homem		Positivo

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174

São Paulo, 08 de maio de 2008.

Ilmo (a)

Sr (a) Camila Aparecida Carvalho

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CE-IMT/002/29042008** e intitulado "Avaliação da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da leishmaniose visceral", sob a responsabilidade do Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

ANEXO B

Elsevier Editorial System™

Página 1 de 1

ACTA TROPICA

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Contact us
 Help ?
 Username: hfandrad
 Role: Author

Submissions Being Processed for Author Heitor Franco de Andrade Jr, M.D., Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

+ Action	Manuscript Number	Title
Action Links	ACTROP-D-12-00078	Immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: Standardization preliminary results in canine and human samples

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

[<< Author Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#)

Copyright © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.