



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Comparação de antígenos de *Leishmania infantum* em
testes serológicos**

Laura Barral Veloso

Orientador: *Prof. Doutor Saul Semião- Santos*

Évora,
Janeiro de 2012

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Comparação de antígenos de *Leishmania infantum* em testes
serológicos

Laura Barral Veloso

Orientador

Prof. Doutor Saul Semião- Santos

Évora,
Janeiro de 2012

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe: por me fazer acreditar que
os sonhos são possíveis de realizar.*

EPÍGRAFE

“No momento do meu último suspiro, acreditarei ainda que a ciência é a coisa mais bela e necessária para a vida do homem, que sempre foi e será a maior manifestação de amor que existe e que só com ela o homem vencerá a natureza e a si próprio. Talvez essa fé seja ingênua, e injusta, nas suas bases, mas não se tem culpa de se ter uma fé e não outra; e sou incapaz de levar vencida esta fé em mim”

Anton Tchekhov

Índice

DEDICATÓRIA	III
EPÍGRAFE	IV
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO	VII
OBJECTIVOS.....	IX
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.Revisão Teórica acerca da Leishmaniose Visceral	2
1.1.1.-Morfologia e ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	5
1.1.2- Hospedeiro Invertebrado- Vector.....	7
1.1.3-Hospedeiros Vertebrados	8
1.1.4-Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	9
1.1.5-Diagnóstico, tratamento, profilaxia e controlo da LVC.....	11
1.2- Resposta imunológica	15
1.3.Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 1 Comparação da <i>performance</i> de dois antigénios (promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> tratados com β -mercaptoetanol e tratados com tripsina) no teste de aglutinação directa para diagnóstico da leishmaniose visceral canina	26
2.1.Fundamentação teórica do DAT no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	27
2.2.Objectivos	31
2.3.Referencias Bibliográficas	32
COMPARAÇÃO ENTRE UM TESTE DAT COM ANTIGÉNIO AQUOSO TRATADO COM β -MERCAPTOETANOL E UM ANTIGÉNIO LIOFILIZADO TRATADO COM TRIPSINA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	35
CAPÍTULO 2 .. _Um β - Mercaptoetanol ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina	49
3.1.Fundamentação teórica sobre no método ELISA no diagnóstico da LV	50
3.2.Objectivos	55
3.3.Referências Bibliográficas	56
UM β -MERCAPTOETANOL ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	60
PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES PREVISTAS	74
ANEXOS	75

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Saul Semião Santos, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos pesquisadores Drs. Lénea Campino, Abdallah el Harith e Henk Schallig, em nome das seguintes instituições, respectivamente: Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, Portugal; Ahfad University for Women, Omdurman, Sudão e Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda, pelo material essencial fornecido a esse trabalho e ainda pela troca de informações e conhecimentos.

À professora Dr^a Cesaltina Pires, do Departamento de Gestão, pela solicitude e pelo apoio com as ferramentas estatísticas.

Aos professores de Bioquímica da Universidade de Évora, com os quais tive a oportunidade de aprender e expandir meus conhecimentos.

Aos colegas do curso de mestrado, pela convivência e por tornarem mais amena as dificuldades encontradas dentro e fora da sala de aula. Obrigada a todos: Elisabete Veiga, Filipa Dias, Joana Pires, José Eduardo, Laura Felício, Marta Gonçalves, Teresa Mendes e Silvia Felix.

As companheiras do laboratório Guilhermina, Esperança e Maria João por tornarem a minha rotina mais leve e os dias mais curtos entre os testes e as conversas.

A todos aqueles que tive o prazer de conhecer durante a minha passagem por Portugal e que, com certeza, marcaram a minha vida. Destaco algumas pessoas que participaram mais ativamente dos meus sonhos: Fabiana Benevenuto, Fernanda Andrade, Emylia Kulinska, Eva Nedelcheva, Evgeni Nedelcheve, Filipe Oliveira, Juliane Dominoni, João Nascimento, Marta Cuervas, Miky Danacica, Vitor Prates, Laura Ramos, Túlio Mol, Kleber, Marcos Leonardo, Carolina Sachot, Anouk Considera, Iralys Escalona, entre tantos outros.

Agradeço ainda aos meus amigos distantes e quase eternos, que fazem parte da minha vida e de mim e espero que assim continue: Camila Ruas, Fernando Francisco (Chico), Laura Sampaio, Victor Sirobaba (Vitelo), Ticiane Rocha, Cassiana Javessine, Natália Rezende, Natália Rocha, Sol, Helder Sato (Japa).

Ao Isac Marques, principalmente pela companhia e paciência. Agradeço ainda por me apresentar um pouco da cultura e belezas de Portugal

Agradeço com especial carinho à minha família pelo apoio constante, por compreenderem minha ausência e por se fazerem presentes mesmo tão distantes. A lembrança dos momentos alegres vividos e a certeza de que outros virão me estimulam a persistir e me desencorajaram de desistir.

RESUMO

Esta dissertação teve como objectivo o desenvolvimento e padronização de um ELISA para diagnóstico da LVC. O estudo foi desenvolvido de acordo com 2 objectivos cujo desenho experimental, resultados e discussões se encontram expostos nos capítulos 2 e 3. No **capítulo 1** apresenta-se uma introdução teórica sobre a LVC, com incidência na resposta imunológica e nos métodos de diagnóstico. No **capítulo 2**, avaliamos o desempenho de dois antigénios (β -ME-DAT e TRYP-DAT), no DAT e conclui-se que o β -ME-DAT tem maior sensibilidade e a mesma especificidade. Assim, o β -ME-DAT foi utilizado como teste referência para o desenvolvimento do trabalho apresentado no capítulo seguinte. O **capítulo 3** relata o desenvolvimento do β -ME-ELISA e comparamo-lo com o convencional TRYP-ELISA. O β -ME-ELISA dispõe de maior sensibilidade e especificidade e constitui um promissor método diagnóstico da LVC, sobretudo pelo seu potencial em detectar infecções precoces, e poderá vir a ser utilizado em inquéritos epidemiológicos e/ou rotina clínica.

ABSTRACT

*Comparison of antigens of *Leishmania infantum* in serological tests*

The objective of this thesis was to develop and standardize an ELISA able to diagnose CVL. The study was carried out according to two objectives and its experimental design, results and discussions are described in chapters 2 and 3. In **chapter 1** we present a theoretical introduction dealing with CVL with relevance to the immune response and specific diagnostic methods. In **chapter 2** we evaluated the performance of two antigens (β -ME-DAT and TRYP-DAT) in the DAT and we concluded that the β -ME-DAT has higher sensitivity and same specificity. Accordingly, the β -ME-DAT was used as reference test in the following studies. In **chapter 3** we present the development of the β -ME-ELISA and we compare its performance with the one of the traditional TRYP-ELISA. β -ME-ELISA showed higher levels of sensitivity and specificity, reason why, in our opinion it constitutes an encouraging diagnostic CVL tool, especially due to its eventual potential to detect early infections, before appearance of overt disease and subsequent importance in epidemiological studies as well as in clinic routine services.

OBJECTIVOS

O conjunto de trabalhos que integram esta dissertação teve como objectivo central desenvolver um novo ELISA para detecção da LVC e avaliar a sua *performance* quando comparado a testes tido referenciais já descritos na literatura.

Os objectivos específicos deste estudo foram:

- Comparar a *performance* de dois antigénios (promastigotes *de Leishmania infantum* tratados com β -mercaptoethanol e tratados com tripsina) no teste de aglutinação directa (DAT) para diagnóstico da LVC.
- Desenvolver e padronizar um ELISA, com promastigotas tratados com β -ME, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães, bem como avaliar o desempenho deste novo teste frente a amostras de soro de cães com diferentes perfis imunológicos.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: Representação esquemática da ultra-estrutura das diferentes fases evolutivas de uma <i>Leishmania</i> . A= Forma Amastigota; B= Forma promastigota. Fonte: Rey, L. (1992).....	5
Ilustração 2: Ciclo de transmissão da leishmaniose. Adaptado de Sacks and Noben-Trauth (2002).....	6
Ilustração 3: Flebótomo fêmea ingurgitada de sangue, durante repasto sanguíneo em humano. Fonte: Marques, F (2003).	7
Ilustração 4: Distribuição da infecção da <i>Leishmania infantum</i> na Europa. Adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011.....	10
Ilustração 5: Fluxograma para abordagem diagnóstica de cães com sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas consistentes com LVC. Adaptada de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011.	13
Ilustração 6: – Dicotomia Th1 e Th2 na LVC (Adaptado de Martinez-Moreno <i>et al.</i> , 1993).....	17
Ilustração 7: Reacção de hipersensibilidade do tipo III, com formação e deposição de imunocomplexos circulantes (Adaptada de Prescott <i>et al.</i> , 2005). Legenda: A- Formação de imunocomplexos (CIC) e posterior aumento da permeabilidade vascular. B- Deposição dos CIC na parede endotelial dos vasos, induzindo agregação plaquetária e lesão enzimática na parede dos vasos sanguíneos devido a desgranulação das células polimorfonucleares (PMNs).	18
Ilustração 8: Preparo e leitura de uma placa de DAT. Adaptado de Chappuis <i>et al.</i> (2007).	27
Ilustração 9. Representação esquemática do ELISA convencional (A) e visualização em placa de microtitulação (B): N: Reação Negativa; P: Reação Positiva. (Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunoparasitologia - CPqAM/FIOCRUZ.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

5- AS- ácido 5-aminosalicílico

ADN- ácido desoxirribonucleico

ARN-ácido ribonucleico

BALB/c- rato “Bagg albino” de laboratório

BSM-ELISA -do inglês “bovine submaxillary mucin”- ELISA

CDI/LEISH/ICAAM- Centro de diagnóstico e investigação em leishmaniose do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas.

CIC- imunocomplexos circulantes

ConA- convalina A

CVL- canine visceral leishmaniasis

DAT- teste de aglutinação directa

ELISA- ensaio imunoenzimático (do ingles “enzyme-linked immunosorbent assay”)

FAST- fast agglutination screening test

g- grama

GF- β - fator de crescimento β

H₂O₂- água

HPS-70- peso molecular 70 (do inglês “ heat shock protein”)

hr- hora

IC- Intervalo de Confiança

IFAT- imunofluorescência indirecta

IFI- imunofluorescência directa

IFN- γ - interferão gama

IgG- imunoglobulinas G

IgG1- imunoglobulina G da classe 1

IgG2- imunoglobulina G da classe 2

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal.

IL 2- interleucina 2

IL 4- interleucina 4

IL10- interleucina 10

iNOS- enzima indutora da sintetase de NO (iNOS, do inglês *Inducible NO synthetase*)

KCl- Cloreto de potássio

KIT-“Koninklijk Instituut voor de Tropen/ Royal Tropical Institute”

LC- leishmaniose cutânea

LCD- leishmaniose cutânea difusa

LCL- leishmaniose cutânea localizada

LCR- líquido céfalo-raquidiano

LIT- “Liver infusion triptose” (meio de cultura)

LMC- leishmaniose mucocutânea

LV- leishmaniose visceral

LVC- leishmaniose visceral canina

LVH-leishmaniose visceral humana

M- molar

MHOM/PT/01/IMT387- estirpe de *Leishmania infantum* isolada de doente com LVH e co-infectado com VIH, Portugal.

MHOM/SD/68/1-S- estirpe de *Leishmania donovani* isolada de doente com LVH no Sudão

mL- mililitros

MON-1- zimodemes responsável por leishmaniose visceral e cutânea

MON-98- zimodemes responsável por leishmaniose visceral e cutânea

M ϕ - macrófagos

NaCl- cloreto de sódio

NaHCO₃- bocarbonato de sódio

NNN- Novy-MacNeal-Nicole (meio de cultura)

n-número

NO- óxido nítrico

OMS/WHO-Organização Mundial de Saúde

PBS- solução de tampão fosfato

PBS/T- solução de tampão fosfato com tween 20

PCR- reação da polimerase em cadeia

PCR-RT- reacção da polimerase em cadeia em tempo real

PMNs- células polimorfonucleares (neutrófilos)

RIM- imunocromatografia ou imunomigração rápida

rK39- epítoto imunodominante repetitivo de uma proteína relacionada à quinesina

SD- desvio padrão

SFB- soro fetal bovino

TGF- β - factor de transformação do crescimento- β

Th1- células auxiliares (helper) do tipo 1

Th2- células auxiliares (helper) do tipo 2

TNF- α - factor de necrose tumoral

TRYP- tripsina

TRYP-DAT- teste de aglutinação direta utilizando antígeno de promastigotas tratado com tripsina

TRYP-ELISA- teste ELISA utilizando antígeno de promastigotas tratado com tripsina

UI- unidades internacionais

v/v- volume/volume

VIH- vírus da imunodeficiência humana

VPN. Valor preditivo negativo

VPP- valor preditivo positivo

w/v- peso/volume

WB- imunodeteção ou “Western blot”

β -ME- 2-mercaptoethanol

β -ME-DAT- teste de aglutinação direta utilizando antígeno de promastigotas tratado com β -ME

β -ME-ELISA- teste ELISA utilizando antígeno de promastigotas tratado com β -ME

κ - coeficiente Kappa

μ L- microlitro

INTRODUÇÃO GERAL

1.1.Revisão Teórica acerca da Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas-parasitárias que afectam pessoas, animais domésticos e silvestres. São causadas por parasitas protozoários do Género *Leishmania* Ross, 1903. Este protozoário inclui-se no sub-filo *Mastigophora* por apresentar flagelo; na ordem *Kinetoplastida*, uma vez que o flagelo emerge de uma bolsa flagelar, na base da qual se encontra uma mitocôndria única que possui cromatina muito condensada, e na família *Trypanosomatidae*, por apresentar mais do que uma forma morfológica durante o ciclo de vida. O parasita é transmitido pela picada de insectos dípteros dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Tomas e Romão, 2008).

Devido à sua endemicidade em várias regiões do mundo, as leishmanioses compreendem uma das seis endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO). Calcula-se que, das 350 milhões de pessoas em risco, 12 milhões estão infectadas por *Leishmania*, das quais 41.000 acabam por morrer anualmente. Por ano, calcula-se a ocorrência de 1,5-2 milhões de novos casos. Este complexo de doenças está geográfica e ecologicamente distribuído por todos os continentes, com excepção da Antárctida e Austrália, sendo endémico em 88 países (WHO, 2010). O aumento na dispersão da doença encontra-se relacionado a factores de desenvolvimento-social. As mudanças ambientais e climáticas, a redução dos investimentos em saúde e educação, a descontinuidade das acções de controlo, a adaptação do vector aos ambientes modificados pelo homem, a existência de factores pouco estudados ligados aos vectores, como variantes genéticas, e a emergência de novas enfermidades capazes de levar à depressão imunológica das pessoas, tais como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), são apontados como responsáveis pelas dificuldades de controlo da doença em grandes aglomerados urbanos, onde os problemas de desnutrição, habitação e saneamento básico estão presentes, favorecendo o aumento do número de casos (Gontijo e Melo, 2004).

As leishmanioses são doenças com larga variedade de manifestações clínicas e apresentam igualmente grande diversidade epidemiológica (Ashford, 2000). A sua epidemiologia é extremamente diversa: 20 espécies de *Leishmania* são patogénicas para o homem e 30 espécies de flebotomíneos são vectores. Do ponto de vista da nomenclatura epidemiológica existem duas classificações para a doença: zoonose, que

inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem é a única fonte de infecção para o flebótomo (Desjeux, 2004).

De acordo com a classificação actual, o género *Leishmania* inclui dois subgéneros, *Leishmania* e *Viannia* (Tabela 1). A diferenciação em espécies do género *Leishmania* tem sido problemática e sujeita a variadas mudanças taxonómicas, visto que a morfologia do parasita não é um critério útil para a sua diferenciação. Entretanto, a identificação de *Leishmania* spp. mostra-se importante para melhor interpretação da epidemiologia das infecções (Schallig e Oskam, 2002). Actualmente, o modelo taxonómico aceite é baseado na identificação de isoenzimas. A técnica de electroforese efectuada a um determinado grupo de isoenzimas permite individualizar zimodemes, que são referidos como sendo um conjunto de parasitas com o mesmo perfil enzimático (Campillo *et al.*, 1999).

As espécies *L. chagasi* e *L. infantum* demonstraram desenvolver a mesma sintomatologia clínica nos seus hospedeiros, apesar de possuírem localização geográfica diferente. Recentes estudos analisando comparativamente estas duas espécies obtiveram resultados por métodos enzimáticos e genéticos que demonstraram que *L. chagasi* pode ser sinónima de *L. infantum* (Grimaldi Jr e Tesh, 1993).

Os hospedeiros naturais da leishmaniose variam de acordo com a zona geográfica e incluem mamíferos domésticos e selvagens. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) continua sendo considerado o principal reservatório (Feitosa *et al.*, 2000) e desempenha o papel de fonte de infecção imediata para os vectores que infectam os humanos (Albuquerque *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas da doença dependem de inúmeras e complexas interacções entre parasita e hospedeiro, nomeadamente a espécie e a resposta imunológica do hospedeiro. Apesar da nova orientação da OMS defender a existência de 11 formas clínicas diferentes de leishmaniose (WHO, 2010), por questões pedagógicas e para facilitar a aprendizagem a doença humana é descrita como apresentando três formas clássicas, todas com consequências potencialmente graves: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LVH) ou "kala-azar" (WHO, 1990). Só a primeira forma tende a curar espontaneamente, as outras formas são consideradas fatais se as deixarmos seguir o seu curso natural (Melby, 2002). No cão, a infecção por *L. infantum* é geralmente designada por Leishmaniose Visceral Canina

(LVC) (WHO, 1996) e a distribuição do parasita é extensa, estando em maior presença no fígado, baço, nódulos linfáticos, medula óssea, rins e pele (Prats e Ferrer, 1995).

Tabela 1:Patologia, vetores, reservatórios e distribuição geográfica da leishmaniose (WHO, 2010): LV, Leishmaniose Visceral; LCL, Leishmaniose cutânea localizada; LCD, Leishmaniose cutânea difusa; LMC, Leishmaniose mucocutânea; * forma clínica associada a imunossupressão (Marques, C. S., 2011).

Espécie	Patologia habitual Patologia rara	Vetores	Reservatórios	Distribuição geográfica
Sub- gênero <i>Leishmania</i>				
<i>L. infantum</i>	LV LCL, LCD*	<i>Ph. arisi</i> <i>Ph. perniciosus</i> <i>Ph. chinensis</i>	Canídeos	Região Mediterrânea, Balcãs, Médio Oriente, Ásia Central, China
<i>L. donovani</i>	LV LCL	<i>Ph. argentipes</i> <i>Ph. martini</i> <i>Ph. orientalis</i> <i>Ph. alexandri</i>	Homem	Índia, Paquistão, China, Quênia, Sudão, Etiópia
<i>L. major</i>	LCL LCD*	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Roedores	Norte, Este e Oeste da África, próximo e médio Oriente, Ásia Central
<i>L. tropica</i>	LCL LV	<i>Ph. sergenti</i>	Homem, Canídeos	Médio Oriente, Paquistão, Índia, Região Mediterrânea
<i>L. aethiopica</i>	LCL LCD	<i>Ph. longipes</i> <i>Ph. pedifer</i>	Hiraxes	Etiópia e Quênia
<i>L. chagasi/</i> <i>infantum</i>	LV LCL, LCD*	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. mexicana</i>	LCL LC	<i>Lu. omelca omelca</i>	Roedores; Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. amazonensis</i>	LCL LCD, LV	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Roedores Marsupiais	América Central e do Sul
<i>L. venezuelensis</i>	LCL	<i>Lu. rabgeliana</i>	Equinos, Felinos	Venezuela
Sub- gênero <i>Viannia</i>				
<i>L. peruviana</i>	LCL	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	Canídeos, Roedores	Peru
<i>L. lainsoni</i>	LCL	<i>Lu. ubiquitalis</i>	Roedores	Brasil, Peru
<i>L. naiffi</i>	LCL	<i>Lu. ayrozai</i> <i>Lu. paraensis</i>	Desdentados	Brasil
<i>L. shawi</i>	LCL	<i>Lu. whitmani</i>	Primatas, Preguiças	Brasil
<i>L. guayanensis</i>	LCL LMC	<i>Lu. umbratilis</i>	Preguiças, Roedores, Marsupiais	América do Sul
<i>L. panamensis</i>	LCL LMC, LCD*	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. prapidoi</i> <i>Lu. gomezi</i>	Preguiças, Primatas, marsupiais, Roedores, Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC LCD*, LV	<i>Lu. wellcomei</i>	Canídeos, Equinos e Roedores	América Central e do Sul

A monitorização do reservatório canino é muito importante no sentido de auxiliar o controlo da leishmaniose visceral no homem. Daí que seja imperativo melhorar e desenvolver novas ferramentas para o diagnóstico da infecção canina, que sejam de confiança, fáceis de utilizar e de baixo custo (Taran *et al.*, 2007).

A ocorrência simultânea da LVH e LVC aponta para a necessidade de serem desenvolvidos estudos adicionais que esclareçam o papel do cão no ciclo de transmissão do parasita nessas áreas.

1.1.1.-Morfologia e ciclo de vida da *Leishmania*

Todos os parasitas do género *Leishmania* possuem um ciclo de vida polimórfico e heteroxénico. A forma promastigota, extracelular, flagelada e móvel, coloniza o insecto vector e a amastigota, forma intracelular e sem flagelo livre (Ilustração 1), é encontrada nos hospedeiros vertebrados (Neves, 2005; Roberts e Janovy-Jr, 1996).

A manutenção do ciclo biológico da *Leishmania* depende tanto da capacidade das formas promastigotas em colonizar o aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado, como das formas amastigotas em estabelecer um parasitismo intracelular no macrófago do hospedeiro vertebrado (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987; Chang, 1990).

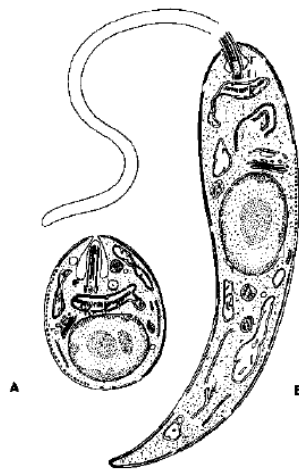


Ilustração 1: Representação esquemática da ultra-estrutura das diferentes fases evolutivas de uma *Leishmania*. A= Forma Amastigota; B= Forma promastigota. Fonte: Rey, L. (1992).

O flebótomo fêmea, durante o repasto que efectua no hospedeiro mamífero infectado, ingere sangue que contém macrófagos (M ϕ) oriundos, sobretudo, da pele. Os M ϕ parasitados são rapidamente destruídos e libertam as formas amastigotas. Estas são formas esféricas ou sub-esféricas com 2,5-6,8 μ m de diâmetro. Durante as primeiras 24 horas, as amastigotas multiplicam-se por fissão binária longitudinal e diferenciam-se em promastigotas no aparelho digestivo do flebotomíneo. Estas finalmente, diferenciam-se, pelo menos em parte, em promastigotes metacíclicos, que são formas fusiformes, livres e móveis, com cerca de 10-20 μ m de comprimento e 1,5-3,0 μ m de largura e são encontradas na parte anterior do tubo digestivo do vector, sobretudo acumuladas ao nível da válvula stemodeal (Ilustração 2). Durante os repastos subsequentes do flebotomíneo estas formas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado. Os promastigotes metacíclicos extremamente infecciosos são rapidamente fagocitados pelos M ϕ do hospedeiro vertebrado, internalizando-se dentro do vacúolo parasitóforo. Num período de 24 a 48 horas, as promastigotes transformam-se em amastigotes e multiplicam-se, podendo haver ruptura dos M ϕ e, novamente podendo ser fagocitados por outras células, causando assim a sua distribuição pelo organismo (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987).

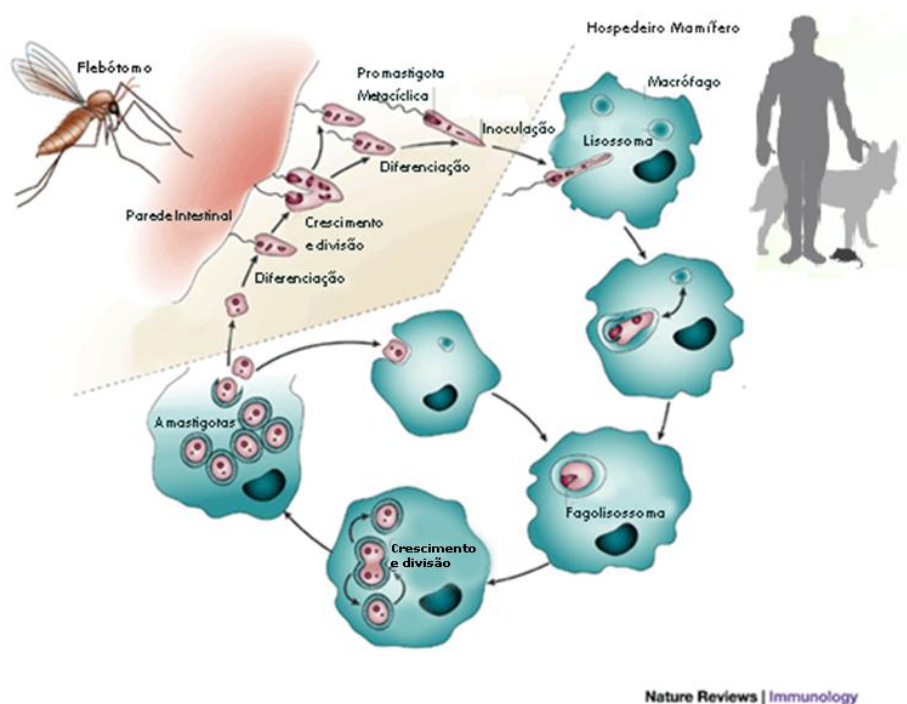


Ilustração 2: Ciclo de transmissão da leishmaniose. Adaptado de Sacks and Noben-Trauth (2002).

1.1.2- Hospedeiro Invertebrado- Vector

Os vectores naturais de *Leishmania* são insectos dípteros hematófagos pertencentes à família *Psychodidae*, à subfamília *Phlebotominae* e aos géneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, ou *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Killick-Kendrick, 1990).

Os flebotomíneos distribuem-se por vastas regiões do mundo, em habitats muito diversos, desde biótipos abaixo do nível do mar até outros localizados a mais de 3000 m de altitude (Killick-Kendrick, 1999). Para se desenvolverem, estes insectos de reduzidas dimensões (2-3 μ m) necessitam, em geral, de temperaturas médias entre 15 e 20°C, protecção da luz solar direta, humidade moderada e abundância de detritos orgânicos. O seu ciclo biológico é completado durante todo o ano em áreas tropicais, mas apenas de Maio a Outubro na região paleártica (Alves-Pires e Ribeiro, 1991). Nos países mediterrânicos, durante o Inverno as larvas do quarto estágio entram em diapausa, os adultos emergem na Primavera e sucessivas novas gerações aparecem até ao Outono (Killick-Kendrick, 1999).

A actividade dos vectores adultos é crepuscular e nocturna, desde que não haja vento nem chuva. Só as fêmeas são hematófagas (Ilustração 3) e, de acordo com a espécie respectiva, podem picar mamíferos, aves ou répteis, sendo o sangue necessário para a postura de ovos. Durante o período de tempo que o sangue demora a ser digerido, os vectores fazem refeições açucaradas, que servem de fonte energética e são importantes para o desenvolvimento dos parasitas no intestino (WHO, 1990). A simples presença de *Leishmania* no trato intestinal de um flebotomíneo não o define como vector, sendo necessário avaliar a sua capacidade de transmissão (Grimaldi *et al.*, 1989).



Ilustração 3: Flebótomo fêmea ingurgitada de sangue, durante repasto sanguíneo em humano. Fonte: Marques, F (2003).

Embora a transmissão por um vector flebotomíneo represente a mais frequente e a mais importante via de transmissão de *Leishmania*, já foram descritas outras vias de transmissão. Nuwayri-Salti e Khansa (1985), observaram que ratos BALB/c apresentaram infecção por *L. major* após contacto directo prolongado com animais infectados. A infecção por via sexual já foi referida na literatura, onde Silva (2007) efectuou um estudo em que observou transmissão venérea de *L. infantum* entre cães através da detecção do ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita no sémen. Pangrazio *et al.* (2009) descreveram a transmissão vertical da doença quando encontraram ADN e amastigostas de *L. infantum* em fetos de cadelas infectadas. Para além disso, existem casos humanos documentados de transmissão vertical de *Leishmania* (Meinecke *et al.*, 1999; Figueiró-Filho *et al.*, 2004). Owens *et al.* (2001) documentaram a existência de infecção por *Leishmania* em cães após transfusões de sangue. Embora muito raramente, os ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho *et al.*, 2005) e as pulgas *Ctenocephalides felis* (Ferreira *et al.*, 2009) também podem estar implicados na transmissão de *Leishmania*.

1.1.3-Hospedeiros Vertebrados

Entre os vertebrados, apenas na classe dos mamíferos, algumas espécies foram identificadas como portadoras de protozoários do género *Leishmania*; no Velho Mundo foi observada infecção em 37 espécies e no Novo Mundo em 51 espécies (Dereure, 1999). Os mamíferos podem ser hospedeiros acidentais, irrelevantes na manutenção do parasita a longo prazo, ou hospedeiros reservatórios, essenciais à sua persistência e transmissão aos seres humanos (WHO, 1990).

Em função do hospedeiro vertebrado, Garnham (1965) estabeleceu a existência de três tipos de ciclos nas infecções por *Leishmania*. Nos ciclos primários (savanas da África Oriental, estepes da Ásia Central e floresta amazónica) as leishmanioses zoonóticas envolvem essencialmente animais silváticos e acidentalmente o homem. Nos ciclos secundários (bacia mediterrânica e aglomerados urbanos na China e no Brasil) o carácter silvático está afastado e o reservatório é doméstico ou sinantrópico. Nos ciclos terciários (sobretudo no subcontinente indiano) os seres humanos constituem o único reservatório e a transmissão é assegurada por flebotomíneos antropofílicos.

O cão doméstico é considerado o principal hospedeiro reservatório da doença em humanos na zona do Mediterrâneo, América do Sul e Médio Oriente, onde a espécie *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) é o agente causador de doença. Mesmo em regiões onde existem elevadas taxas de infecção em cães, a incidência de doença clínica na população humana é normalmente baixa. Contudo, as taxas de exposição do homem à *Leishmania* foram consideradas elevadas, após determinação da prevalência de anticorpos e de resultados positivos no teste dérmico (Greene, 2006).

A infecção com a espécie *Leishmania infantum* foi reportada em canídeos selvagens como as raposas (*Vulpes vulpes*) e em javalis (*Sus scrofa*) na Europa e no Médio oriente. Estas espécies silváticas podem apresentar sintomatologia ou serem assintomáticas. Está descrita a infecção em felídeos domésticos com leishmaniose por variadas espécies, tais como *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. braziliensis* (Greene, 2006). Os equinos também podem ser infectados com o protozoário, o que já foi descrito na América do Sul e Central, Alemanha e Espanha (Rolão *et al.*, 2005).

1.1.4-Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A leishmaniose, enquanto processo infeccioso, constitui nos cães um espectro nos extremos do qual estão a doença clínica e a infecção assintomática ou subclínica (Pinelli *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1998). Actualmente considera-se a infecção canina por *L. infantum* importante não apenas devido ao seu carácter zoonótico e ao papel do cão como reservatório, mas também porque a doença representa um importante problema médico-veterinário (Fernández-Pérez *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas da LVC e LVH são similares e apresentam como sinais mais comuns, febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia no seu estágio final. No homem, as causas de óbitos mais comuns são associadas a broncopneumonias, gastroenterites, septicemias e sangramentos graves, tais como: hemorragia digestiva alta ou baixa e insuficiência cardíaca devido a anemia grave, contribuindo para o aumento da mortalidade. No cão a causa mais comum de mortalidade é a insuficiência renal (Brasil, 2006).

Na doença canina, as classificações podem seguir diferentes padrões, de acordo com diferentes autores. Desse modo, usualmente, pode-se classificar a LVC de acordo com

as manifestações clínicas apresentadas pelo cão infectado, podendo enquadrá-lo em assintomático, quando não apresenta sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomático, onde se observa a presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, onde alguns ou todos sinais comuns da doença são evidentes, como alterações dermatológicas, incluindo alopecia, dermatite furfurácea, úlceras e outras, bem como onicogribose, linfadenopatia, emagrecimento acentuado, queratoconjuntivite (Brasil, 2006).

Os dados disponíveis sugerem que na Europa em 15 milhões de cães existentes mais de 2,5 milhões (16,7%) estão infectados (Moreno e Alvar, 2002). Vários registos de prevalência revelam o aparecimento da infecção em novas localizações (Dereure, 1999; Baldelli *et al.*, 2001), bem como o seu aumento em outras já conhecidas (Cringoli *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004).

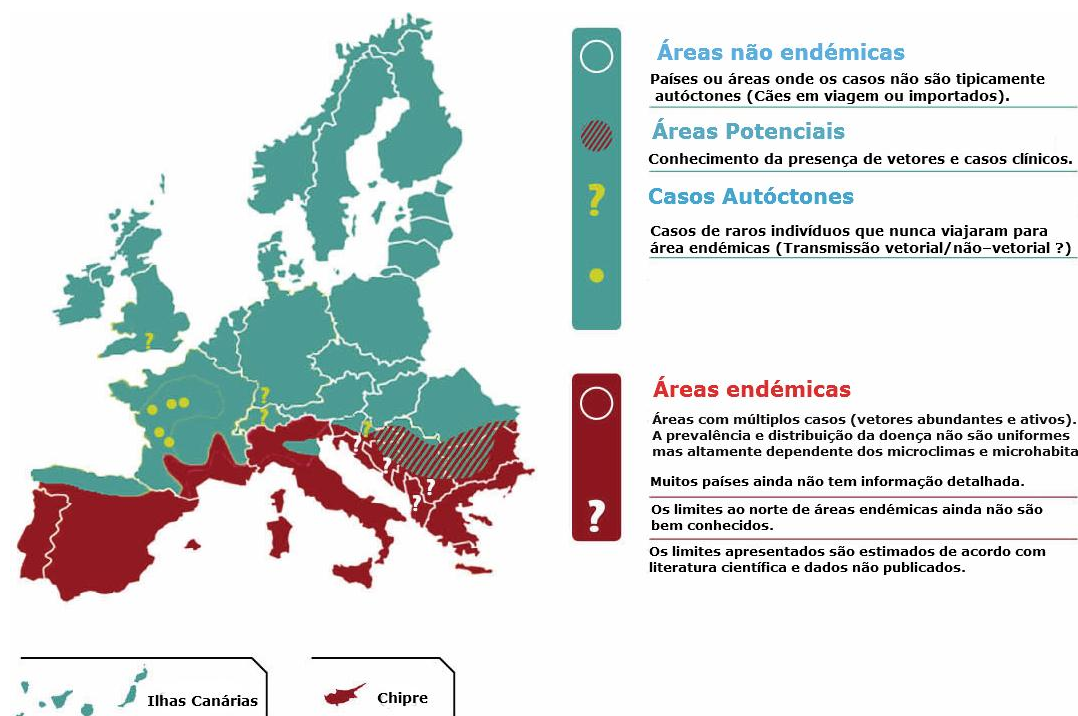


Ilustração 4: Distribuição da infecção da *Leishmania infantum* na Europa. Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011.

Os inquéritos epidemiológicos realizados em cães, em Portugal, indicam uma prevalência na ordem dos 4% a 21%, semelhante á de outros países mediterrânicos. Contudo, diversos autores alertam para a probabilidade da percentagem de cães portadores assintomáticos ser muito mais elevada. Com a associação de técnicas

serológicas e moleculares, a prevalência registada nos estudos epidemiológicos realizados em canídeos tem sido, de facto, significativamente mais elevada (Gramiccia e Gradoni, 2005). Em Portugal, o zimodeme mais frequente no cão é o MON-1 (Abranches *et al.*, 1992). Entretanto, Cardoso *et al.* (2002) descreve um caso de zimodeme MON-98 num cão no Alto Douro, que até então se julgava restrito ao Egipto. A ocorrência de novos casos em áreas livres, bem como a identificação de novas zimodemes de *Leishmania* no país alertam para a necessidade de mais estudos em cães, vectores e pessoas.

1.1.5-Diagnóstico, tratamento, profilaxia e controlo da LVC

De uma maneira geral, o diagnóstico da LVC vem-se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se principalmente a três fatores: variedade de sintomas clínicos e semelhança com aqueles observados noutras doenças infecciosas; alterações histopatológicas inespecíficas e, por último, inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (Brasil, 2006).

O diagnóstico da LVC deve basear-se em dados epidemiológicos, clínicos, bioquímicos e aqueles que são os obtidos a partir de provas diagnósticas específicas, principalmente por métodos de detecção do parasita e técnicas de imunodiagnóstico, destinadas a avaliar a resposta imune celular e humoral (Ferrer, 1999; Cañavate *et al.*, 2005). O diagnóstico laboratorial da LVH e LVC faz-se recorrendo à mesma metodologia. Existem três tipos de testes de diagnóstico: parasitológico, molecular e imunológico.

Os testes parasitológicos permitem a observação directa (através da observação microscópica de amastigotas em esfregaços/ decalques de amostras biológicas) ou em cultura, em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicole), Schneider ou outro, através da inoculação de amostras, preferencialmente, de órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico (baço, medula óssea, fígado e gânglios linfáticos). Os métodos imunohistoquímicos foram sugeridos como métodos suplementares, para confirmar o diagnóstico, particularmente em órgãos que não apresentem elevada carga parasitária. Contudo, estes métodos são invasivos, muito demorados e inapropriados para estudos epidemiológicos. Apesar do diagnóstico parasitológico ainda constituir a “*golden standard*” para confirmar a infecção por *Leishmania*, trata-se de uma técnica invasiva,

demorada e requer pessoal treinado, tanto para proceder a uma rigorosa coleção de amostras, quanto para efectuar um adequado exame ao microscópio (Gomes *et al.*, 2008).

Métodos baseados em técnicas moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (PCR) e, mais recentemente, a PCR em tempo real (PCR-RT), identificam sequências específicas de ADN dos parasitas, por exemplo, dos genes do kADN, e são cada vez mais utilizados não só no diagnóstico dos casos da doença activa, como também na monitorização da carga parasitária durante o tratamento (Solano- Gallego *et al.*, 2009). No entanto, um resultado negativo na PCR, quando da existência de uma suspeita clínica, não é suficiente para descartar uma possível infecção. A utilização relativamente recente de técnicas de biologia molecular, capazes de detectar o ADN ou ácido ribonucleico (ARN) do parasita, apesar de serem muito válidas, requerem, quando aplicadas em testes diagnósticos de rotina, equipamento muito específico e dispendioso que limitam substancialmente a sua utilização, como acontece com a aplicação de PCR nas situações de campo, em países sub-desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento (Gomes *et al.*, 2008).

A resposta humoral específica tende a ser muito intensa na LVC, com elevados níveis de imunoglobulinas (IgG) anti-*Leishmania*, por isso a detecção desses anticorpos constitui um meio essencial para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* (Gomes *et al.*, 2008). O diagnóstico imunológico é muitas vezes realizado para estudos de seroprevalência e na determinação de possíveis focos endémicos da doença. Estes métodos permitem verificar a existência de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, geralmente do tipo IgG, no soro sanguíneo. Os anticorpos podem ser também encontrados, embora menos frequentemente, no humor aquoso e no líquido céfalo-raquidiano (LCR). Além disso, vários autores detectaram anticorpos anti-*leishmania*, predominantemente IgG, na urina de humanos e mais tarde também em canídeos, sempre associados a glomerulonefrites e proteinúria. Pensa-se que os anticorpos passem por entre a barreira glomerular para a urina, devido a lesão glomerular que se instala com o decorrer da infecção e que se deve à deposição e aglomeração de imunocomplexos. Por outro lado, também pode dever-se à produção de anticorpos no tracto urinário, em situações de nefrite túbulo intersticial, ou a lesões ao nível dos órgãos urogenitais, como bexiga, uretra e próstata (Solano-Gallego *et al.*, 2003).

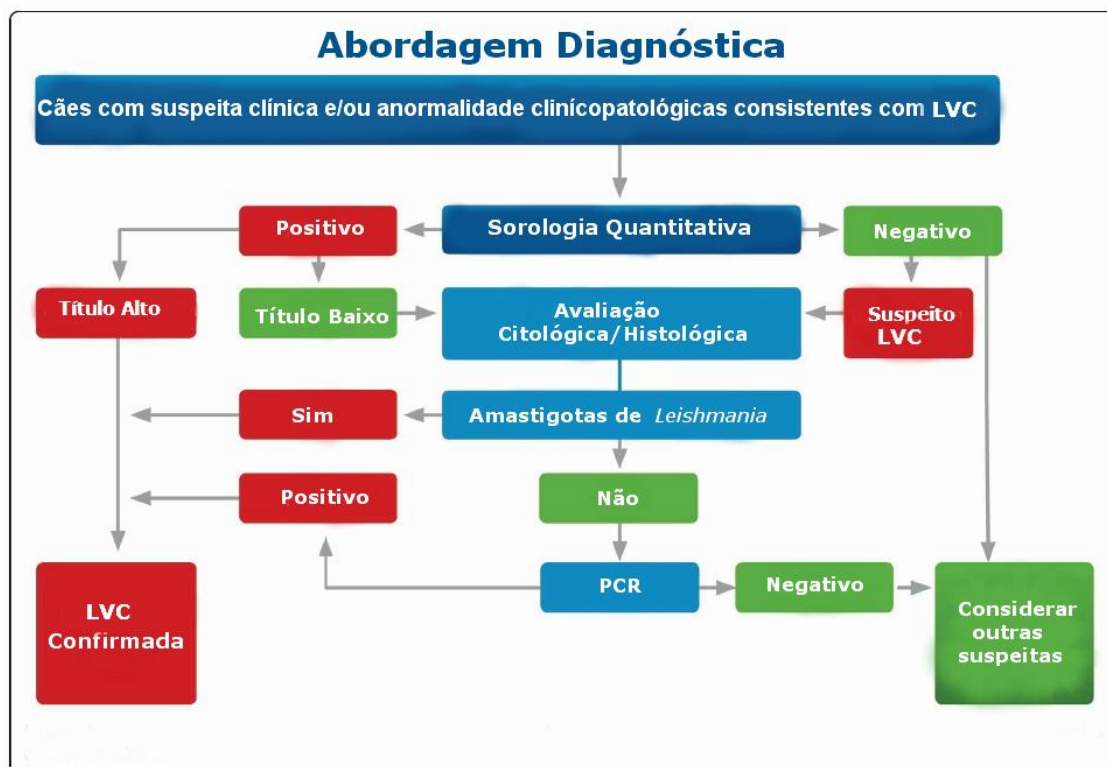


Ilustração 5: Fluxograma para abordagem diagnóstica de cães com sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas consistentes com LVC. Adaptada de Solano-Gallego *et al.*, 2011.

Existem várias técnicas serológicas utilizadas para detecção de anticorpos anti-*leishmania*. Cada uma apresenta vantagens e desvantagens conforme o princípio de cada método (Hommel *et al.*, 1978; Edrissian e Darabian, 1979; Dye *et al.*, 1993).

Entre as mais utilizadas encontram-se a técnica de imunofluorescência directa (IFI) e indirecta (IFAT), o ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação directa (DAT), a imunodeteção ou “Western blot” (WB) e a imunocromatografia ou imunomigração rápida (RIM) (Rachamin *et al.*, 1991; Vercammen *et al.*, 1997; Mancianti, 2002). Estas técnicas podem utilizar como antígeno parasitas intactos, extratos totais solúveis, exo-antígenos ou diversas proteínas purificadas ou recombinantes, o que sem dúvida dificulta a sua padronização (Nakhaee *et al.*, 2004).

No diagnóstico da LVC, regra geral, os métodos serológicos são dotados de elevada sensibilidade e especificidade mas apresentam uma forte limitação no que diz respeito à impossibilidade de diagnosticar a doença na sua fase inicial, quando ainda não se produzem anticorpos. O período de seroconversão dura cerca de 1,5 a 3 meses após a inoculação da forma infectante ao animal, e nesta altura é impossível encontrar anticorpos anti-*leishmania*; o mesmo sucede em animais em que não ocorre estimulação

da resposta humoral e posterior produção de anticorpos, como é o caso dos animais denominados de resistentes à infecção - assintomáticos (Campillo *et al.*, 1999). Por outro lado, não se deve esquecer que a presença de anticorpos não implica automaticamente a existência de infecção. Pensa-se que cerca de 10% dos animais infectados que possuem títulos serológicos significativamente elevados nunca evoluem para a doença clínica (Maia, 2007).

A diminuição dos níveis de anticorpos tem sido utilizada para monitorizar a terapêutica; contudo, os níveis de anticorpos podem decrescer apenas com a diminuição da carga parasitária, não necessariamente com a eliminação parasitária total (Greene, 2006). Podem também ocorrer falsos-positivos devido ao aparecimento de reactividade cruzada em cães com leishmaniose cutânea, doença de Chagas, ehrlichiose, rickettsiose e toxoplasmose, entre outras (Gomes *et al.*, 2008). Para além disso, nos países do Norte e Sul da América, pode haver reactividade cruzada serológica com os parasitas do género *Trypanosoma*, uma vez que este agente patogénico afecta os canídeos domésticos e selvagens (Greene, 2006).

Ao analisarem o que acima foi descrito, alguns autores afirmam que a especificidade e a sensibilidade dos diferentes métodos de diagnóstico dependem de vários factores que podem ser influenciados pela natureza dos antigénios que se utilizam nesses testes (Mohammed *et al.*, 1985; Singh e Sivakmar, 2003). Essa é uma das razões pela qual a OMS recomenda que os testes serológicos sejam sempre realizados em combinação com outros exames clínicos e parasitológicos (WHO, 2010).

Por outro lado, a questão que envolve o tratamento da LVC é bastante controversa. Isto porque a LVC é mais resistente ao tratamento que a leishmaniose humana e apenas uma pequena quantidade de espécies do género *Leishmania* são completamente eliminadas pelos fármacos disponíveis (Greene, 2006). Na maioria das ocasiões não se consegue uma eliminação total do parasita, mas apenas remissão da sintomatologia (cura clínica) e diminuição no tempo da capacidade infectante para os flebótomos. Regra geral, ocorrem recidivas entre os 6 meses e os 2 anos após o final da terapêutica instituída. Esta ineficácia terapêutica não está bem caracterizada, mas pensa-se que a localização intracelular do parasita, o possível alojamento das formas amastigotas em certos tecidos, o desenvolvimento de resistência frente aos fármacos utilizados e, por fim, a necessidade da instalação de uma resposta imunitária celular eficaz possam intervir na eficácia do tratamento (Campillo *et al.*, 1999). É óbvio que o diagnóstico tardio da

infecção (já depois do aparecimento da sintomatologia clínica) contribuiu significativamente para este insucesso.

O tratamento antiparasitário da LVC é geralmente instituído com recurso a antimoniato de meglumina-Glucantime® (Slappendel e Teske, 1997; Amusategui *et al.*, 1998), alopurinol (Vercammen *et al.*, 1995; Ginel *et al.*, 1998; Koutinas *et al.*, 2001) – separados ou em combinação (Denerolle e Bourdoiseau, 1999) – ou anfotericina B (Oliva *et al.*, 1995; Lamothe, 2001). Diversos outros compostos, incluindo aminosidina (Poli *et al.*, 1997), pentamidina (Rhalem *et al.*, 1999), miltefosina, metronidazol e cetoconazol, têm sido também utilizados (Baneth e Shaw, 2002). A terapia tem efeito variável no quadro clínico e na resposta imunitária dos animais afectados (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Muitos cães exibem recuperação clínica associada a um decréscimo do título de anticorpos específicos e aumento da imunidade celular (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1999; Fernández-Pérez *et al.*, 2003). Com efeito, é possível estimular a actividade anti-*Leishmania* dos MΦ após quimioterapia (Vouldoukis *et al.*, 1996). A melhoria do estado clínico e imunológico é, com frequência, apenas temporária e os animais sofrem recaída ou recorrência (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Guarga *et al.*, 2002).

A OMS recomenda como estratégias para o controlo da LV zoonótica o diagnóstico e tratamento sistemático dos casos humanos, medidas de luta contra os vectores e também a protecção individual de hospedeiros, sobretudo do homem (WHO, 1996). Ainda como controle, a OMS recomenda a eutanásia dos cães portadores da infecção, apesar desta ser pouco aceite, por questões éticas, emocionais e económicas. Além disso, estudos, realizados em países onde a eutanásia é adoptada como medida de controle, mostram resultados pouco satisfatórios (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001; Ashford *et al.*, 1998). O controlo da LVC tem como objectivo proteger os cães e simultaneamente reduzir o risco de infecção humana (Martínez-Moreno *et al.*, 1999; Fernández-Pérez *et al.*, 2003).

1.2- Resposta imunológica

Os protozoários desenvolveram estratégias complexas de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, provavelmente utilizadas durante todo o processo de infecção, promovendo a sua perpetuação no organismo. Em relação à *Leishmania*, há evidências

clínicas e experimentais que, para além dos factores presentes no parasita e no hospedeiro, a saliva do vector, aquando da picada, influencia a evolução da doença (Lima e Titus, 1996). Segundo alguns autores, as falhas dos hospedeiros vertebrados em controlarem a infecção podem estar relacionadas com dois factores principais: a habilidade da *Leishmania* em resistir às acções microbidas dos Mφ activados e a inibição da resposta imunitária celular do hospedeiro (Grimaldi e Tesh, 1993).

A seroconversão pode ocorrer no cão no intervalo de 1 a 22 meses a seguir á infecção (uma média de 5 meses) (Oliva *et al.*, 2006). Apenas nos cães em que o parasita se tenha disseminado é que os títulos dos anticorpos aumentam com o decorrer do tempo.

Nem todos os cães infectados com *Leishmania*, natural ou experimentalmente, desenvolvem a doença. A resposta imunitária desencadeada pelo cão na altura da infecção e nos momentos seguintes é um factor determinante no desenvolvimento ou não da doença (Baneth, 2006).

A resolução da infecção por *Leishmania* também está associada à actividade leishmanicida de espécies reactivas de oxigénio e óxido nítrico (NO). O NO é produzido nos Mφ a partir do metabolismo da L-arginina, numa reacção catalisada pela enzima indutora da sintetase de NO (iNOS, do inglês *Inducible NO synthetase*). Citocinas como o interferão gama (IFN- γ) e factor de necrose tumoral (TNF- α) estimulam a expressão de iNOS enquanto a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 10 (IL10) e o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) inibem a sua expressão, tornando a célula refractária à actividade microbida (Wilson *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2007; Liese *et al.* 2008; Goto e Prianti, 2009).

Na infecção visceral a susceptibilidade também esta relacionada com a resposta das células T auxiliares 1 (do inglês “helper” -Th1) associada à activação dos mecanismos leishmanicidas dos Mφ pela interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ e à formação de granulomas em tecidos infectados. No entanto, a dicotomia do perfil de resposta imunológica Th1 e Th2 verificado para a infecção com *L. major* não é tão evidente em modelos murinos de LV (Rosa *et al.*, 2006; Rolão *et al.*, 2007; Ettinger e Wilson, 2008). Na LV murina, a resposta de Th1 é reprimida pela produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e fator de crescimento β (GF- β) (Wilson *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2007). O fenótipo de susceptibilidade à LV murina parece estar mais relacionado com a incapacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 efectiva do que com o predomínio de uma resposta Th2. Uma vez que a IL-4 do tipo 2 não parece apresentar-se em quantidade

suficiente para influenciar a resposta Th1, nem o curso da infecção (Miralles *et al.*, 1994).

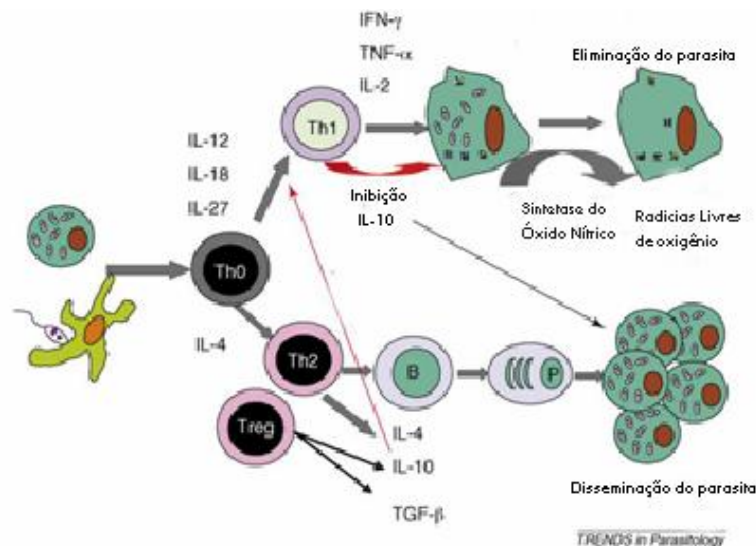


Ilustração 6: – Dicotomia Th1 e Th2 na LVC (Adaptado de Martinez-Moreno *et al.*, 1993).

Actualmente, alguns autores, adotam a determinação das subclasses IgG1 e IgG2 como indicadores do “*status*” clínico dos cães com LVC e como marcadores serológicos do prognóstico da infecção nos cães acometidos (Costa-Val, *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2006; Iniesta *et al.*, 2005; Quinnel *et al.*, 2003; Leandro *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Nieto *et al.*, 1999; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Deplazes *et al.*, 1995). Vários trabalhos, comparando as absorvâncias das leituras destas subclasses nos soros de cães com LVC, demonstraram uma correlação directa, entre a indução de altos níveis de IgG1 anti-*Leishmania* e o aparecimento de sinais clínicos em cães infectados por *L. infantum*, enquanto anticorpos IgG2 foram associados com uma infecção sem sinais clínicos (Deplazes *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Quinnel *et al.*, 2003; Iniesta *et al.*, 2005). No entanto, outros autores encontraram associação inversa destas subclasses com os quadros clínicos da LVC (Leandro, *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2006; Costa-Val *et al.*, 2007).

A alta produção de imunoglobulinas na LVC é potencialmente danosa para os animais acometidos, sobretudo pela deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos (Lopez *et al.*, 1996).

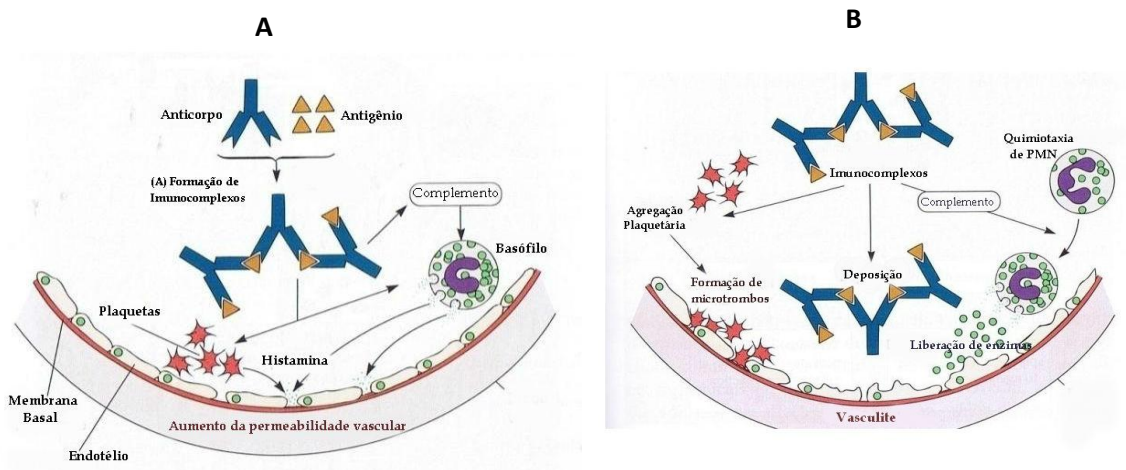


Ilustração 7: Reacção de hipersensibilidade do tipo III, com formação e deposição de imunocomplexos circulantes (Adaptada de Prescott *et al.*, 2005). Legenda: A- Formação de imunocomplexos (CIC) e posterior aumento da permeabilidade vascular. B- Deposição dos CIC na parede endotelial dos vasos, induzindo agregação plaquetária e lesão enzimática na parede dos vasos sanguíneos devido a desgranulação das células polimorfonucleares (PMNs).

Neste âmbito, a doença clínica pode manifestar-se desde uma ligeira dermatite papular associada à imunidade celular específica e baixa resposta humoral (Ordeix *et al.*, 2005) até uma doença grave caracterizada por danos renais com glomerulonefrite devidos à deposição de complexos imunes associados com uma maciça resposta humoral e altas cargas parasitárias (Costa *et al.*, 2003).

As características genéticas de cada animal/raça, bem como a virulência de cada estirpe de *L. infantum* são também fatores-chave para um conhecimento mais profundo da regulação imunitária do cão perante esta parasitose (Baptista-Fernandes *et al.* 2007; Santos-Gomes *et al.*, 2008).

1.3.Referências Bibliográficas

- Abranches, P., Sampaio-Silva, M.L., Santos-Gomes, G.M., Avelino, I.C., Pires, C.A., Conceição- Silva, F.M., Seixas-Lopes, A., Silva-Pereira, M.C.D. and J.G. Janz, (1992). Kala-azar in Portugal.VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto Douro). *Res. Revs. Parasitol.*, **52**: 121-124.
- Albuquerque, A.L., Aragão, F.R; Faustino, M.A. G.; Gomes, Y.M., Lira, R.A.; Nakasawa, M. and L. C. Alves (2007) Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. *Clin. Vet.*, **71** (1): 78-80.
- Alves-Pires, C. and H. Ribeiro (1991). The phlebotomine sandflies of Portugal. Observations on the ecology of the vectors of leishmaniasis in the Alto Douro region. *Parasitol.*, **33** (1): 63-68.
- Amusategui, I., Sainz, A. and M.A.Tesouro (1998). Effects of antimonial therapy for canine leishmaniasis on antibody titer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **849**: 444-446.
- Ashford, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I. and M.C. Eulalio (1998) Sampaio, D.P.; Badaró, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *A. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**:53-57.
- Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, **30**: 1269-1281.
- Baldelli, R., Battelli, G., Maroli, M., Mollicone, E., Gudi, A., Stegagno, G. and G. Tasini (2001). A new stable focus of canine leishmaniosis in Northern Italy.*Parasitol*, **43**: 151-153.
- Baneth, G. (2006). Leishmaniasis.In C. E. Greene (Ed), *Infectious diseases of the dog and cat* (3rd ed., pp 685-695). Philadelphia: Elsevier, Inc.
- Baneth, G. and S.E. Shaw (2002).Chemotherapy of canine leishmaniosis.*Vet Parasitol*, **106**:315-324.
- Baptista-Fernandes, T., Marques, C.; Roos, R. O. and G.M. Santos-Gomes (2007) Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **30** :40-45.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T. and L. Chabanne (1997). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* **59**: 21-30.
- Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. (2006) *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF.
- Cabral, M., O'grady, J., Gomes, S., Souza, J., Thompson, H.and J. Alexander (1998) The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, **76**: 173-180.
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez,S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q. and M.C. Varela (1999). *Parasitol. Vet.*, McGraw-Hill Interamericana, 651-665.
- Cañavate, C., Cruz, I.and M. Flores(2005) Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Información Veterinária: La leishmaniosis canina*, 1a parte, 28-32.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H.; Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J., Rodrigues, J and H.D.F.H. Schallig (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal).*Vet. Parasitol.*,**121**: 21-32.

- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.P. and M. Rodrigues (2002) *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Trop.*, **83**: 83-85.
- Chang, K. P. (1990) *Modern Biology: Cell Biology of Leishmania*. 2.ed. New York: Farman and Company, p.79-89.
- Cortes, S., Rolão, N., Gomes- -Pereira, S., Capela, M.J.R. and Abranches, P. (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **79**: 273-284.
- Costa, F., Goto H., Saldanha, L., Silva, S., Sinhorini, I., Silva, T. and J. Guerra (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis [versão electrónica]. *Vet. Pathol*, **40**: 677–684.
- Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., Gontijo N.F., Michalick, M.S.M., Alexander, B., Williams, P. and M.N. Melo. (2007). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity, *The Vet. J.*, **174**: 636-643.
- Coutinho, M., Bueno, L., Sterzik, A., Fujiwara, R., Botelho, J., De Maria, M., Genaro, O., and P. Linardi (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **128**: 149–155.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Capuano, F., Baldi, L., Veneziano, V. and G. Capelli (2002). Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, **106**: 307-313.
- Denerolle, P., Bourdoiseau, G. (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J. Vet. Intern. Med.*, **13**: 413-415.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H. and J. Jecckert (1995) Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Par. Immunol.*, **17**: 451-458.
- Dereure, J., Pratlong, F. and J.P. Dedet (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean basin. In Killick-Kendrick, R. (ed.). *Canine leishmaniasis: an update*. Hoechst. Roussel. Vet., pp. 18-25.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, *Microbiol. Inf. Dis.*, **27**(5):305- 318.
- Dye, C., Vidor, E. and P. Darabian (1993) Serological diagnosis of Leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infectol.*, **103**: 647-656.
- Edrissian, G.H. and P. Darabian. (1979) A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Trans R. Soc. of Trop. Med. Hyg.*, **73**:289-292.
- Ettinger, N. A. and M.E. Wilson (2008) Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2**:252.
- Feitosa, M. M., Ikeda, F. A., Luvizotto, M. C. R. and S.H.V. Perri (2000) Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clín. Vet.*, **28**:36-44.
- Fernandez-Perez, F.J., Gomez-Munoz, M.T., Mendez, S. and J. M. Alunda (2003) Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.*, **86**: 83-91.
- Ferreira M., Fattori, K., Souza, F and V. Lima (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp.. *Vet. Parasit.*, **165**(1-2):150-154.

- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. In Killick-Kendrick, R. (ed.). *Canine leishmaniasis: an update. Hoechst Roussel Vet.*, pp. 6-10
- Figueiró-Filho, E., Duarte G., El-Beitune, P., Quintana, S. and T. Maia (2004). Leishmaniose visceral e gestação: relato de caso. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **27**(2): 92-97.
- Ginel, P.J., Lucena, R., López, R. and J.M. Molleda (1998). Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, **39**: 271-274.
- Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C. and Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Vet. J.*, **175**: 45-52.
- Gontijo, C. M. and M.N. Melo (2004). Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e perspectivas. *R. Brasil. Epidemiol.*, **7** (3):338-349
- Goto, H. and M.G. Prianyi (2009) Imunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, **51**(5):241-246.
- Gramiccia, M. and L. Gradoni (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Vet. Parasitol.*, **35** (11-12):1169-1180.
- Granham, P.C.C. (1965). The *Leishmania*, with special references of the role of animal reservoir. *Am. Zool.*, **5**: 141-151.
- Greene, C.E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat* (3th edition). Philadelphia: Saunders Elsevier, pp.685-698.
- Grimaldi Jr., G., Tesh, R.B. and D. McMahon-Pratt (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **41**: 687-725.
- Grimaldi, G Jr and R.B. Tesh (1993). Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**: 230-250.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribañez, M.A. and J.A. Castillo (2002). Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **88**: 13-20.
- Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and G. Lanotte (1978) The micro-chnique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Annals of Trop. Med. Parasitol.*, **72**:213-218.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M. T., Piarroux, R., Gállego, M.; Alunda, J. M. and M. Portús (2002) Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **9**(5):1137-1141.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectores of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol* **4**: 1-24
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, **17**: 279-289.
- Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Diakou, N. and O. Papadopoulos (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **98**: 247-261.
- Lamothe, J. (2001). Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, **42**: 170-175.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L.; Romão, P.; Cortes, S., Rolão, N., Gomes-Pereira, S., Capela, M.J.R. and P. Abranches (2001) Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibodies response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **79**: 273-284.
- Liese J., Schleicher, U. and C. Bogda (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiol.*, **213**:377-387.

- Lima, HC and R.G. Titus (1996). Effect of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania*. *Immunopathol.*, **71**: 69-76.
- Lopez, R., Lucena, R. and M. Novalez (1996) Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zent. Vet.*,**43**:460-474.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J.M., Goncalves, L. and L. Campino (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal* (doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009).
- Mancianti, F., Nardoni, S. and M. Melosi (2002). Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parassitol.*, **44**(1): 99.
- Marques, C. S. (2011) Actividade Funcional dos neutrófilos durante a infecção por *Leishmania infantum*. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Martinez-Moreno, A., Gomez-Nieto, C. and S. Hernandez-Rodriguez (1999). Leishmaniosis canina. In Cordero-del-Campillo, M.; Rojo-Vazquez, F.A. (coords.) *Parasitologia Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 652-665.
- Meinecke, C., Schottelius, J., Oskam, L. and B. Fleischer (1999). Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala azar) from an asymptomatic mother to her child. *Ped.*, **104**(5): 65.
- Melby P. C. (2002) Recent developments in leishmaniasis. *Curr. Op. Infec. Dis.*, **15**:485–490.
- Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D. and H.W. Murray (1994) Th1 e Th2 Cell- associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, **62**(3):1058-1063.
- Mohammed, E. A., Wright, E. P., Kager, P. A., Laarman, J.J. and K.W. Pondmam (1985) ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of Kala-Azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hig.*, **79**(3): 344 .
- Mollyneux, D.H. and R. Killick-Kendrick. (1987) The Leishmaniasis in biology and medicine: Morphology, ultrastructure and life cycles. *Academic Press Inc.*, p. 122-168.
- Moreno, J. and Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experiment model. *Trends Parasitol.*, **18** (9):399-405.
- Nakhaee, A., Thaeri, T., Taghikhani, M, Mohebbali, M., Salmanian, A.-H.; Fasel, N. and S. Rafati (2004). Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet. Parasitol.*, **119**: 107-123.
- Neves, D. P. (2005) Gênero *Leishmania*. In: *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 7, p. 41–46. ISBN 85-7379-737-1.
- Nieto, C. G., García-Alonso, M., Requeña, J. M. Mirón, C., Soto, M., Alonso, C. and Navarrete, I. (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **67**:117-130.
- Nieto, J.; Chamizo, C., González, F., Blanco, F., Barker, D.C. and J. Alvar (1999). The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **71**:181-195.
- Nuwayri-Salti, N. and H. Khansa (1985). Direct non-insect-vector transmission of *Leishmania* parasites in mice. *Internat. J. Parasitol.*, **15** (5):497-500
- Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., De Luna, R., Cortese, L., Orsini, S., Davidson, R.N. and A. Persechino (1995). Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **36**:1013-1019.

- Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V. F., Gramiccia, M., Pagano, A., Muccio, T. di and Gradoni, L. (2006) Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naïve Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (4): 1318-1322.
- Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L. and A. Fondati (2005). Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.*, **16**:187- 191.
- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Wlaton, R., Nolan, T., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. and U. Giger (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **219**: 1076-1083.
- Palatnik-de-Souza, C.B.; dos Santos, W.R.; França-Silva, J.C.; da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W. and O. Genaro (2001) Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *A. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**:510-517.
- Pangrazio, K., Costa, E., Amarilla, S., Cinoa, A., Silva, T., Paixão, T., Costa, L., Dengues, E., Diaz, A. and R. Santos (2009). Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.*, **165** (3-4):327-331
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G. and J. Ruitenberg (1994) Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, **62**:229-235.
- Poli, A.; Sozzi, S., Guidi, G., Bandinelli, P. and F. Mancianti (1997). Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **71**: 263-271.
- Prats, N. E. L. and Ferrer, (1995) A. Possible mechanism in the pathogenesis of lesions in canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, **137** (4):103-4.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and D.A. Klein (2002). *Microbiology*. (5th ed). New York: McGraw-Hill.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. (6th ed). New York: McGrawHill Higher Education. ,pp 681-758.
- Quinnel, R. J., Courtenay, O., Garcez, L. M., Kaye, P.M., Shaw, M. A., Dye, C. and M.J. Day (2003) IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol and Immunopathol*, **91**(3): 161-168.
- Rachamim, N.; Jaffe, C.L.; Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D.; Schnur, L.F. and R.L. Jacobson (1991). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **85**: 503-508.
- Reis, A. B.; Martins-Filho, OA; Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M. G., Mayrink, W., França-Silva, J. C., Giunchetti, R. C., Genaro, O. and R. Corrêa-Oliveira (2006) Parasite density and impaired biochemical hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, **81** (1):68-75.
- Rey, L. (1992) Bases da Parasitologia Médica. Editora Guanabara. 349 p.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S. and C.L. Jaffe (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **71**(1):69-76.
- Riera, C., Valladares, J.-E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J. and M. Arboix (1999). Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, **84**: 33-47.

- Roberts, L. S. and J. Janovy-Jr (1996) Kinetoplastida: Trypanosomes. In: *Foundations of Parasitology*. 5th edition. Wm C Brown. Chapter 5. ISBN 0-697-26071-2.
- Rolão, N., Cortes, S., Gomes-Pererira, S. and L. Campino (2007) *Leishmania infantum* Mixed Thelper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp. Parasitol.*, **115**: 270-276.
- Rosa, R.; Marques, C.; Rodrigues, O.R. and G. M. Santos-Gomes(2006) *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. *Acta Trop.*, **97**:309-317.
- Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**: 845-858.
- Santos-Gomes, G.M; Roos, O. R. and C. Marques (2008) Resposta imunológica. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1º ed. Lisboa, Portugal, 69-83.
- Schallig, H.D.F.H. and L. Oskam (2002).Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health*, **7**: 641-651.
- Singh S and R. Sivakumar (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgraduate. Med.*, **49**: 55-60.
- Slappendel, R. J. and E. Teske (1997). The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis: a randomized clinical trial. *Vet. Quart.*, **19**:10-13.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G. and Ferrer, L. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 1651-18.
- Solano-Gallego, L., Miró,G. Koutinas,A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva , C. and G. BanethL (2011) LeishVet guidelines for the practical managementof canine leishmaniosis. *Parasites e Vectors*, **4**:86.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M. and M. Portús (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, **96**: 265-276.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portús, M. and J. Alberola (2003). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis.*Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **10**(5), 849- 855.
- Taran, M., Mohebbali,M., Modaresi, M.H., Mamishi, S., Mahmoudi, M. and M. Mojarad (2007) Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by ELISA Using K39sub Recombinant Antigen. *Iranian J. Publ. Health*, **36** (2):1-6
- Tomás A. and S. Romão 2008. Biologia do parasita. In: *Leishmaniose Canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações, 1ªedição. Lisboa, Portugal, 7-26.
- Tripathi, O., Singh, V. and S.Naik (2007). Immune response to *Leishmania*: paradox rather the paradigm. *FEMD. Immunol. Med. Microbiol.*, **51**:229-242
- Vercammen, F., Berkvens, D., Le Ray, D., Jacquet, D. and T. Vervoort (1997) Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests.*Vet. Rec.*, **141**: 328-330.
- Vercammen, F., De Deken, R. and P. Kageruba (1995). First evaluation of the use of allopurinol as a single drug for the treatment of canine leishmaniosis. *Vlaams Dier. Tijds.*, **64**:208-214.
- Vouldoukis, I., Drapier, J.C., Nüssler, A.K., Tselentis, Y., Silva, O.A., Gentilini, M., Mossalayi, D.M., Monjour, L. and B. Dugas (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful

chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **40**:253-256.

WHO (1990). Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series, 793. World Health Organization, Geneva, 158 pp.

WHO (1996). *Manual on visceral leishmaniasis control*. WHO/LEISH /96.40. Division of Control of Tropical Diseases & Overseas Development Administration, World Health Organization, Geneva, 79 pp.

WHO. 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva. 22-26 Março, 201 pp.

Wilson, M.E., Jeronimo, S.M. and R.D. Pearson (2005) Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial. Pathog.*, **38**(4):147-160.

Sites Consultados

Marques, F. Gênero de flebotomíneos encontrado no Piauí pode reconstruir a evolução desses insectos. Acesso em 15/10/2011. Disponível em:
http://www.fiocruz.br/~ccs/arquivosite/novidades/jul03/flebotomo_fer.htm.

Silva, F. L: (2007) Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores / 47 p., versão electrónica. Acesso em 10/10/2011. Disponível em:
http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/VETC7AQMRK/1/tese_fabiana_lessa_silva.pdf

CAPÍTULO 1

Comparação da *performance* de dois antigénios (promastigotes de *Leishmania infantum* tratados com β -mercaptoetanol e tratados com tripsina) no teste de aglutinação directa para diagnóstico da leishmaniose visceral canina

2.1. Fundamentação teórica do DAT no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O teste de aglutinação directa ou DAT (do inglês “*Direct Agglutination Test*”) foi desenvolvido, na década de 80, por investigações do grupo de Abdallah El-Harith no KIT (“Koninklijk Instituut voor de Tropen/ Royal Tropical Institute”) e no laboratório de parasitologia da Universidade de Amesterdão (Amesterdão, Holanda). Este método, adaptado da versão original de Allain e Kagan (1975), utiliza no seu antígeno promastigotas intactos e corados, em suspensão ou liofilizados e baseia-se na capacidade dos anticorpos dos soros dos doentes reconhecerem epítopes expostos em promastigotes de *L. donovani* da estirpe 1-S em microplaca de poliestireno de fundo em V e aglutinarem, formando um produto visual de fácil detecção devido à acção do corante, eliminando a necessidade de equipamentos específicos (estereoscópios ou microscópios) para a sua leitura (Harith *et al.*, 1987a, 1988; Sundar e Rai, 2002). O teste é feito com 11 diluições seriais de cada soro teste e, a recíproca da maior diluição onde o fenómeno de aglutinação ainda pode ser detectado, é lida após 18 horas de incubação, determinando a positividade do ser humano ou animal testado e o seu título (Ilustração 8). O DAT é um dos testes mais simples e baratos utilizados para o diagnóstico da LVH e da LVC, sendo o seu uso rotineiro nos países da África Sub-Saariana, na Índia e no Nepal com sensibilidade variando de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (Alves e Bevilacqua, 2004; Gontijo e Melo, 2004; Abdallah *et al.*, 2004; Mohebbali *et al.*, 2005; Sundar e Rai, 2002; Zijlstra *et al.*, 2001).

Ilustração 8: Preparo e leitura de uma placa de DAT. Adaptado de Chappuis *et al.* (2007).



Após o desenvolvimento do DAT para detecção da LVH, foram necessariamente considerados ajustamentos, modificações, melhorias e simplificações. Entre estes, a adição de citrato de sódio ao antígeno em suspensão mostrou-se eficiente, já que esta substância age na manutenção de forças de repulsão intracelular, que são responsáveis por evitar a agregação espontânea, contribuindo para a estabilização das suspensões

com formas promastigotas fixadas em formaldeído. Uma modificação foi a incorporação de uma nova proteína no diluente do DAT. Esta é crucial para a prevenção de aglutinação inespecífica. Inicialmente a proteína testada foi o Soro Fetal Bovino (SFB), contudo a eventual deterioração e contaminação bacteriana quando em altas temperaturas limitava o seu uso em trabalhos de campo realizados em regiões tropicais. Como substituto, foi indicado o uso da gelatina, uma proteína desnaturada, livre de imunoglobulinas que possam afectar os resultados do DAT. A sua forma de apresentação em pó pode resistir a temperaturas de 30° C ou superiores. Os resultados obtidos não foram alterados com essa substituição e, com isso, o teste tornou-se mais barato e prático para utilização no campo. Um melhoramento significativo, foi a adição do β -ME, no diluente, a fim de reduzir as reacções inespecíficas. Este foi testado e resultou em um aumento na sensibilidade e especificidade, alcançando, inicialmente, índices de 100% e 98,8%, respectivamente. Para além das amostras de plasma inicialmente testadas, ficou comprovada a eficácia do teste quando realizado com amostra de sangue total e eluatos de sangue em papel filtro, obtendo-se com isso, uma maior facilidade de realização do teste em locais onde o armazenamento e preparação de amostras de soro ou plasma são mais difíceis (Harith *et al.*, 1988).

Do ponto de vista técnico, uma das maiores vantagens que o DAT apresenta reside no facto de, no seu procedimento nunca se utilizar conjugado de imunoglobulina espécie-específico, podendo ser útil em casos de infecções naturais e experimentais de mamíferos (Garcez *et al.*, 1996).

Harith *et al.* (1989) avaliou a aplicabilidade do DAT para detecção de anticorpos anti-*leishmania* em amostras de cães naturalmente infectados. Entretanto, para eliminar as reacções cruzadas nas amostras caninas verificou que foi necessário incorporar o dobro da quantidade de β -ME na preparação do diluente sérico do que o utilizado em amostras humanas (0.01 M para amostras humanas e 0.02M para amostras caninas, o equivalente a, respetivamente 780 μ l/100ml e 1.560 μ l/100ml). Como resultado foram obtidas taxas de sensibilidade de 100% e especificidade de 98,2%. Desta forma o teste acabaria por ser recomendado a aplicar em serviços veterinários de saúde. Em diversos estudos realizados com cães de área endémicas para LVC, o DAT apresentou uma sensibilidade variável desde 70,6% (Moheballi *et al.*, 2004) a 100% (Silva *et al.*, 2006) e especificidade de 84,9% (Moheballi *et al.*, 2004) a 100% (Schallig *et al.*, 2002).

Apesar de sua alta consistência para o diagnóstico da LVH e LVC, registam-se ocasionalmente títulos marginais com o DAT (entre 1:1600 e 1:3200 em humanos e 1:160 e 1:320 em cães) em pacientes não portadores de leishmaniose (Harith *et al.*, 1988). Para minimizar a ocorrência destas reacções indesejáveis e de resultados duvidosos outras alterações foram propostas e incorporadas na técnica do DAT. Nos primeiros estudos utilizando o DAT, o tratamento do antígeno foi realizado com tripsina, para induzir a degradação de proteínas complexas na superfície da forma promastigota, que de outra forma poderiam evocar reacções inespecíficas (Andrade *et al.*, 1987; Harith *et al.*, 1987b). Uma vez que a degradação da tripsina se mostra limitada à separação de peptídeos nas ligações arginina-lisina, outros agentes clivantes (pronase, lipase e α -amilase) e redutores (β -ME) foram testados com o intuito de eliminar todas as ligações peptídicas e reduzir ainda mais a reactividade cruzada, sendo que o β -ME foi o que apresentou melhores resultados. Outra inovação prendeu-se com a adição de ureia no diluente da amostra, extremamente útil em casos de amostras de pacientes com outras doenças e que, no teste inicial, apresentam títulos positivos ou marginais, sem entretanto interferir nos resultados de amostras positivas para leishmaniose. Este efeito favorável pode ser parcialmente atribuído à capacidade de ureia para desagregar moléculas de proteína do soro em monómeros com baixa ou nenhuma afinidade de ligação ao antígeno (Harith *et al.*, 1995).

No mesmo trabalho referenciado anteriormente, Harith e a sua equipa de pesquisadores (1995) concluíram que o DAT era bastante confiável para uso no diagnóstico de rotina de LV e LVC em áreas onde a leishmaniose e a tripanossomíase ocorressem em simultâneo e afirmaram que o teste também poderia ser usado em estudos epidemiológicos voltados para a identificação de potenciais reservatórios para espécies de *Leishmania* na África equatorial e América do Sul onde a infecção por *T. cruzi* ou *T. brucei* é também comum entre os animais domésticos e selvagens. Outro facto notável prendeu-se com o fato de terem conseguido estabilizar o antígeno a 4°C, sem aglutinação e com reprodutibilidade nos testes, por um período de 9 meses.

À parte isto, Meredith *et al.* (1995), investigadores do KIT (Amsterdão/Holanda), desenvolveram uma versão liofilizada do antígeno do DAT e Oskam *et al.* (1999) relataram uma boa *performance* do teste quando utilizaram esta apresentação do antígeno. Devido aos seus elevados níveis de sensibilidade e especificidade, à sua relativa facilidade de execução quando comparado com outros testes serológicos,

juntamente com a possibilidade do exame poder ser executado em amostras em papel de filtro por um preço muito baixo, o DAT tornou-se crucial no controlo de surtos de LVH no sul do Sudão (Seaman *et al.*, 1996) e Somália (Marlet *et al.* 2003), por exemplo. Várias tentativas foram feitas para transferir a tecnologia de produção de antígenos para os centros em países com doenças endémicas, mas a sustentabilidade desta produção manteve-se problemática. Se excluirmos o nosso laboratório (CDI/LEISH-ICAAM-Universidade de Évora) onde actualmente é produzido antígeno de DAT, com qualidade, de uma forma independente e exclusiva, na Europa, existem, dois fornecedores não-comerciais fornecedores de antígenos de DAT: o KIT em Amesterdão, na Holanda, e o ITMA em Antuérpia, na Bélgica.

O antígeno na sua apresentação liofilizada pode ser conservado por até 2 anos a temperatura ambiente, o que se mostra bastante atractivo para utilização em países tropicais. Depois da sua reconstituição em soro fisiológico, deve ser armazenado a 4° C e tem estabilidade até uma semana (Meredith *et al.*, 1995; Sundar *et al.*, 1995).

A partir de 1992 e depois de ter sido avaliado de forma “cega” por especialistas da OMS, a versão inicial e aquosa do DAT foi recomendada por aquela organização das Nações Unidas como o teste serológico de eleição no despiste da LVH, sobretudo em áreas epidémicas eminentes, no Sudão, Índia e Bangladesh onde salvou a vida a centenas de milhares de pessoas (Beer *et al.*, 1991)

Recentemente o teste imunocromatográfico rK39, uma proteína dominante em amastigotas de *Leishmania* do complexo *Donovani* (Reithinger *et al.*, 2002), foi, tal como o DAT, desenvolvido especificamente para uso em campo e inicialmente mostrou eficiência diagnóstica e precisão na maioria das áreas endémicas onde foi empregue. Contudo, nos últimos anos, tem-se assistido a pequenas falhas e a relatos de menor qualidade de comportamento do teste imunocromatográfico (teste de Dipstick de rK39) (Das *et al.*, 2011).

Ainda assim, a OMS/WHO (2010) afirma que uma estratégia baseada no teste rK39 ou no DAT é mais eficiente do que um teste baseado em punção de medula óssea e nódulos linfáticos, devido à sensibilidade da técnica utilizada ser essencial no diagnóstico de doenças fatais.

Um dos maiores desafios que desde cedo foram lançados aos investigadores que desenvolveram o DAT prendeu-se com o eventual potencial demonstrado por este teste

em detectar a infecção em fases precoces, tanto no homem, quanto no cão (Semião-Santos, S:J., 1996).

Dado que um dos maiores problemas observados no tratamento desta doença se prende com o aparecimento de constantes recidivas e falhas claras de erradicação do parasita, sobretudo no cão, é de acreditar que, se dispusermos de uma ferramenta que tenha a capacidade de detectar precocemente, isto é, antes da existência de uma grande proliferação parasitária e de uma elevada carga residual de parasitas e formação excessiva de imunocomplexos circulantes ou depositados, seja possível, através da administração pronta e rápida de compostos químicos menos tóxicos e mais baratos, conseguir uma eventual erradicação dos parasitas e a cura tão desejada.

2.2.Objectivos

Este estudo pretende avaliar a eficácia do teste DAT, com antigénio com promastigotas intactos de *Leishmania infantum* tratados com β - ME, em comparação com antigénio convencional, tratado com tripsina. O antigénio que apresentar melhores resultados será utilizado como diagnóstico referência para a próxima parte do trabalho.

2.3.Referencias Bibliográficas

- Abdallah, K. A, Nour B.Y., Schallig, H. D., Mergani, A., Hamid, Z., Elkarim, A. A. and Saeed, O.K., Mohamadani A. A. (2004) Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. *Trop Med Int Health.*, **10**:1127-1131.
- Allan, D. S. and I. G. Kagan. (1974) An evaluation of the direct agglutination test for Chagas' disease. *J. Parasitol.*, **60**: 179.
- Alves, W.A. and P.D. Bevilacqua (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993 – 1997. *Cad. Saúde Públ.*, **20** (1):259-265.
- Andrade, C. R., O. A. Silva, P. P. Andrade, A. H. J. Kolk, and A. E. Harith. (1987) A direct agglutination test discriminative toward Chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, **138**:457–459.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. and M. Boelaert (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**:7-16.
- Das, N. K., Singh, S. K., Ghosh, S., Sarkar, A., Mukhopadhyay, D., Roy, S., Ganguly, D. N., Barbhuiya, J. N., Saha, B. and M. Chatterjee (2011) Case Report: Case Series of Misdiagnosis with rK39 Strip Test in Indian Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Hyg.*, **84**:688-691.
- de Beer, P., El Harith, A., Deng, L.L., Semiao Santos, S.J., Chantal, B. and M. van Grootheest (1991) A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**:283—289.
- Garcez, L.M., Shaw, J.J., Silveira, F.T. (1996). Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Pará. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, **29**:165-180.
- Gontijo, C.M. and M.N. Melo (2004) Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev. Bras. Epidemiol.*, **7**(3):338-49.
- Harith A. E. , Slappendel, R. J., Reiter, I., van Knapen, F., De Korte, P. E. and A.H.J. Kolk (1989) Application of a direct agglutination test for the detection of specific anti- *Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 2252-2257.
- Harith, A. E., A. H. J. Kolk, P. A. Kager, J. Leeuwenburg, F. Faber, R. Muigai, S. Kiugu, and J. J. Laarman. (1987b). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**:603–606.
- Harith, A. E., Chowdhury, S., Al Massum, A., Samiao-Santos, S., Karim, E., El Safi, S. and I. Haque (1995) Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:1984–1988.
- Harith, A., Kolk, A.H., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T. and P.A. Kager, (1988) Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.*, **26** (7):1321-5.
- Harith, A., Laarman, J.J., Minter-Goedbloed, E., Kager, P.A. and A.H. Kolk (1987a) Trypsin-treated and coomassie blue-stained epimastigote antigen in a microagglutination test for Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.*, **37**(1):66-71.
- Jacquet, D., Boelaert, M., Seaman, J., Rijal, S., Sundar, S. and J. Menten (2006) Magnus, E. Comparative evaluation of freeze-dried and liquid antigens in the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis (ITMA-DAT/VL). *Trop. Med.Int. Health.*, **11**(12):1777–1784.

- Marlet MV, Wuillaume F, Jacquet D, Quispe KW, Dujardin JC and M Boelaert (2003) A neglected disease of humans: a new focus of visceral leishmaniasis in Bakool, Somalia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **97**:667–671.
- Meredith, E., Kroon, N. C., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M.G., Vaningen, C.W., Costing, H.; Schoone, G.J, Terpstra, W.J. and L. Oskam (1995). Leish-Kit_ a stable agglutination test based on a freeze-dried antigen for a serodiagnostic of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**(7), 1742:5.
- Mohebali, M., Taran, M., Zarei, Z. (2004) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol.*, **121**: 239-245.
- Mohebali, M., Hajjaran, H.; Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R. and M. Fakhar (2005) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.*, **129**(3-4):243-51.
- Neogy, A .B., Vouldoukis, I., Silva, O. A., Tselentis, Y., Lascombe, J.C., Segalen, T., Rzepka, D. and L. Monjour (1992) Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, **47**(6):772-7.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. and L. Gradoni (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**: 1318-1322.
- Oskam, L., Nieuwenhuijs, L. and A. Hailu (1999) Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **93**: 275–277.
- Reithinger, R., Quinnell, R. J., Alexander, B. and C.R. Davies (2002) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40** (7):2352-2356.
- Schallig, H.D., Schoone, G.J., Beijer, E.G., Kroon, C.C., Hommers, M., Ozbek, Y., Ozensoy, S., da Silva, E.S., Cardoso, L.M. and E.D. da Silva (2002) Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet. Parasitol.*, **109**:1-8.
- Seaman, J., Mercer, A. J. and E. Sondorp (1996) The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Inten. J. Epidemiol.*, **25**: 862–871.
- Semião-Santos, S.J. 1996. Ph. D. thesis. University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
- Sundar, S, Reed, S.G., Singh, V.P., Kumar, P.C. and H.W. Murray (1995) Rapid accurate field diagnosis of Indian Leishmaniasis. *Lancet.*, **351**:563-565.
- Sundar, S. and M, Rai (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9** (5):951-8
- Zijlstra, E.E., Nur, Y., Dsesjeux, P., Khalil, E.A., IL-Hasan, A.M. and J. Groen (2001) Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop. Med. Int. Health*, **6** (2):108-13.

Sites Consultados

____Fonte: KIT Biomedical Research, Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, Nederland. Disponível em: [http://www.kit.nl/-/INS/7647/Royal-Tropical Institute/KIT-Biomedical-Research--/Diagnostic-products--/Flyer-DAT-for-leishmaniasis.pdf](http://www.kit.nl/-/INS/7647/Royal-Tropical-Institute/KIT-Biomedical-Research--/Diagnostic-products--/Flyer-DAT-for-leishmaniasis.pdf). Acesso em: 10/2011.

COMPARAÇÃO ENTRE UM TESTE DAT COM ANTIGÊNIO AQUOSO TRATADO COM β -MERCAPTOETANOL E UM ANTIGÊNIO LIOFILIZADO TRATADO COM TRIPSINA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

¹Semião-Santos, S.J. ¹Veloso, L.B., ²Andrade, P.P., ³Melo, M.A., ¹Martins, L., ¹Marinho, A.A.,
⁴Almeida, J.A.A., ⁵Campino, L. e A.E.Harith⁶

¹ Centro de Diagnóstico e Investigação em Leishmaniose, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Évora, Portugal; ² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ³ Laboratório de Genética Molecular e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Brasil; ⁴ Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, Évora, Portugal, ⁵ Unidade de Leishmanioses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁶ Professor Emeritus de Microbiologia, Ahfad University for Woman, Omdurman, Sudan.

Abstract

In the south of Europe, more than 2.5 million dogs are infected with *Leishmania infantum* and suffer of canine visceral leishmaniasis (CVL). More than half of these are asymptomatic and infectious to phlebotomine sandflies as the symptomatic animals. Nowadays, there are no serological tests to apply in field conditions, sensible enough to signal these dogs.

In this way, hoping to develop a sensitive, specific, easy-to-use and cheap serological tool, capable of monitor CVL and meet recommendations of World Health Organization (WHO, 2010) our group tried, in this study, to adapt a direct agglutination test (DAT) able to offer, same or better benefits, as the one already developed for the human host (Harith *et al.*, 1995).

So, we compared the performance of a DAT, where its antigen was prepared from intact *Leishmania infantum* promastigotes treated with β -mercaptoethanol (β -ME-DAT), with another one, conventional, tripsinated, but prepared with intact promastigotes (TRYP-DAT).

The β -ME-DAT showed sensitivity and specificity values of 100% and the TRYP-DAT, respectively, 93.5% and 100%. The predictive positive value (PPV) was 93.9% in the β -ME-DAT and 87.8% in the TRYP-DAT; the predictive negative value (PPN) was

respectively 100% and 97.5%. The concordance ($\kappa=0.879$, $p=0.000$) and correlation (0.935) obtained between the two tests with these different antigens were optimal.

Despite the fact that more studies are needed to better evaluate our findings, in our opinion, this new β -ME-DAT, has the potential to detect CVL at its early stages, prior to appearance of clinical signs and parasite proliferation and consolidation. This achievement suggests new research lines directed towards early diagnosis of CVL and subsequent quick treatment, possibly using less toxic and cheaper medicines.

Resumo

No Sul da Europa, mais de 2,5 milhões de cães estão infectados com *Leishmania infantum* e sofrem de leishmaniose visceral canina (LVC). Mais de metade desses animais são assintomáticos e tão infecciosos para os flebótomos quanto os sintomáticos. Actualmente não existem testes serológicos suficientemente sensíveis, ao ponto de, em condições de campo, conseguirem assinalar esses cães. Na esperança de desenvolvermos uma ferramenta sensível, específica, barata e de fácil manuseamento que monitorize a LVC e vá de encontro às recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) procuramos, neste estudo, adaptar um teste de aglutinação directa (DAT) que, à semelhança do que já foi feito para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) no reservatório humano (Harith *et al.*, 1995), pudesse, no canino, oferecer os mesmos benefícios.

Por isso, comparámos a *performance* de um DAT cujo antígeno foi preparado a partir do tratamento de promastigotes de *Leishmania infantum* com β -mercaptoethanol (β -ME-DAT) com um, convencional, em que o antígeno foi preparado a partir de promastigotes tratados com tripsina (TRYP-DAT).

O β -ME-DAT apresentou índices de sensibilidade e de especificidade de 100% enquanto o TRYP-DAT, de respectivamente 93,5 e 100%. O valor predictivo positivo (VPP) foi de 93.9% para o β -ME-DAT e 87.8%, para o TRYP-DAT; o valor predictivo negativo (VPN) foi, respectivamente de 100% e 97.5%. A concordância ($\kappa=0.879$, $p=0,000$) e a correlação (0,935) obtidas entre os dois testes com diferentes antígenos, foram óptimas.

Apesar de serem necessários mais estudos, na nossa opinião, este novo β -ME-DAT tem potencial para detectar a LVC na sua fase precoce, i.e., antes do aparecimento de sinais

clínicos e antes da estabilização e proliferação parasitária. Este facto sugere novas linhas de investigação direccionadas ao diagnóstico precoce com esta ferramenta e subsequente tratamento rápido, possivelmente, com medicamentos menos tóxicos e mais baratos.

Introdução

Na Bacia Mediterrânica, a leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por *L.infantum*. Muitas pessoas, nesta região, têm cães – o reservatório hospedeiro provado de *L.infantum* – e também outros animais que atraem os flebótomos às suas casas, favorecendo, desta forma, a transmissão aos seres humanos (Gramiccia, 2011). Os dados disponíveis sugerem que, só no sul da Europa, em 15 milhões de cães existentes, mais de 2,5 milhões (16,7%) estão infectados (Moreno e Alvar, 2002). As seroprevalências de leishmaniose visceral canina (LVC) variam desde 1.7% no sul do Chipre (Deplazes *et al.*, 1998) até mais de 40% na Itália meridional (Oliva *et al.*, 2006). Mais de metade dos cães infectados com LVC apresentam infecções assintomáticas e esses são tão infecciosos para os flebotomos quanto os sintomáticos (Molina *et al.*, 1994; Michalsky *et al.*, 2007). Os testes serológicos que existem actualmente não dispõem da sensibilidade suficiente para, em condições de campo, distinguirem os cães assintomáticos dos sintomáticos. Daí que exista uma necessidade urgente em desenvolver uma ferramenta sensível que monitorize a LVC e possa ser utilizada no campo (Rajasekariah *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um diagnóstico precoce e eficaz constitui uma das ferramentas chave para o controlo da Leishmaniose Visceral Humana (LVH) e da LVC. A utilização de métodos de fácil execução e interpretação, baratos, sensíveis e específicos, que não requeiram infra-estruturas complexas nem profissionais especializados, tais como o teste de aglutinação directa (DAT), são actualmente recomendados pela OMS, já que se têm mostrado eficazes no diagnóstico da doença (WHO, 2010).

Após o seu desenvolvimento em 1986 para o diagnóstico de LVH (Harith *et al.*, 1986), primeira avaliação em 1987 (Harith *et al.*, 1987) e melhoramento em 1988 (Harith *et al.*, 1988), os autores da versão original procederam á sua adaptação ao diagnóstico da LVC em 1989 (Harith *et al.*, 1989).

Desde então, o DAT tem sido utilizado, tanto no diagnóstico de LVH quanto no de LVC, avaliado e modificado em dezenas ou mesmo centenas de estudos por inúmeras equipas de investigadores em todo o mundo. Várias têm sido as melhorias introduzidas no DAT, mas de todas elas, a utilização do 2-Mercaptoetanol (β -ME) no tratamento do antígeno do DAT, ao invés da realização do tratamento convencional com tripsina, obteve os resultados mais encorajadores, com um aumento significativo nas taxas de especificidade e sensibilidade desta técnica (Harith *et al.*, 1995). Este facto abriu novas perspectivas que merecem avaliação e investigação. Por isso, neste estudo pretendemos comparar dois antígenos de DAT tratados com agentes clivantes diferentes: sendo um antígeno comercializado liofilizado, tratado com tripsina (TRYP-DAT) frente a um antígeno líquido tratado com β -ME (β -ME-DAT) e processado no nosso laboratório.

Material e Métodos

Cultivo de Leishmania para produção de β -ME-DAT – Parasitas do género *Leishmania* e da estirpe MHOM/PT/01/IMT387 (isolada de um paciente com LV e co-infectado com o vírus da imunodeficiência adquirida - VIH), fornecida pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, Portugal, foram mantidos *in vitro*, como descrito por Harith *et al.* (1995). A produção das formas promastigotas para a preparação do antígeno do β -ME-DAT foi realizada através da manutenção das culturas do parasita em meio LIT/Hemin (Sadigursky e Brodskyn 1986) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), inactivado a 56°C por 30 minutos, e com 1% de Estreptomicina/Penicilina, mantidos em agitação constante (190 rpm), por um período de pelo menos 7 dias, a temperaturas constantes de 26-27°C.

Processamento do antígeno aquoso β -ME-DAT – Os promastigotas em fase logarítmica (principalmente formas alongadas) foram colhidos 7-8 dias após a sua inoculação no meio de cultura anteriormente referido. A solução com os parasitas foi submetida a três lavagens em solução de Locke's (pH 6,9) e centrifugação (4.000 x g) por 10 min, a 4°C. Após a última lavagem, os *pellets* de promastigotes foram ressuspensos em solução de Locke's, à qual foi adicionado 1.6% (vol/vol) de β -ME. O preparado das suspensões com parasitas foi mantido a 37°C por 45 minutos. Após esse período os parasitas foram fixados por 20h a 4°C com formalina a 1%, em solução de Locke's. Após lavagem em citrato salino (0,15M cloreto de sódio + 0,056M citrato de sódio, pH 7,4), os parasitas foram corados com azul brilhante de Coomassie 250-R

(Sigma®) a 0,1% em citrato salino durante 90 minutos, sob agitação constante. A solução com os parasitas corados foi novamente lavada no tampão de citrato salino e as formas coradas ressuspensas com formalina a 1% na mesma solução tampão. Por fim, a suspensão foi filtrada em filtro Millipore (41 mm/dm. de porosidade) e a concentração de parasitas foi ajustada para 2×10^8 promastigotas/ml, sendo então adicionada formalina. A preparação foi mantida a 4°C para posterior utilização.

β-ME - O β-ME (Sigma®), descrito como responsável por clivar as pontes de dissulfureto das cadeias de polipeptídeos e amplamente utilizado para retardar a oxidação de compostos com teor de ácido tetrahidrofólico, foi utilizado para tratamento da cultura de promastigotas tal como acima referido.

Processamento do antígeno liofilizado TRYP-DAT – Foi utilizado antígeno comercial liofilizado, fornecido pelo Departamento de Investigação Biomédica do "Koninklijk Instituut voor de Tropen" (KIT), Amesterdão. Cada frasco contém 5 ml de antígeno liofilizado (KIT Biomedical Research, Amsterdam) com uma concentração parasitária de 5×10^7 promastigotas de *L. donovani* (MHOM/SD/68/1-S) / mL. Foram adicionados 5 ml de solução fisiológica (0,9% NaCl p/v [Sigma, S 1649®]) ao antígeno e o frasco foi homogeneizado suavemente, sem agitar. Esta operação foi realizada previamente à realização do respectivo DAT.

Tripsina - A tripsina é apontada como um agente de clivagem, relacionado com a separação dos peptídeos nas ligações dos aminoácidos arginina-lisina.

Delineamento dos grupos de amostras - Para este estudo foram testadas amostras de soros (n=151) de cães domésticos, machos e fêmeas de várias raças e idades, provenientes de diferentes regiões. As amostras foram divididas em grupos da seguinte forma:

G1 = trinta e um soros de animais confirmados para LVC (n=31), sendo 22 de animais do Concelho de Évora e que apresentavam diagnóstico confirmado por observação microscópica de esfregaços do gânglio poplíteo, corados com Giemsa, e 9 soros confirmados por crescimento em cultura NNN, cedidos pela Unidade de Leishmanioses do Instituto de Medicina Tropical, Lisboa, Portugal.

G2 = trinta e oito soros de animais com sinais clínicos suspeitos de LVC (n=38) mas sem exames parasitológicos realizados.

G3 = quarenta e cinco soros de animais com outras doenças (n=45), dos quais 26 foram recolhidos na campanha anual de vacinação anti-rábica de 2010, no Concelho de Évora, Portugal; 16 colhidos de animais atendidos e diagnosticados no Hospital Veterinário da Universidade de Évora, Évora, Portugal; e 3 amostras enviadas pelo Laboratório de Parasitologia e Imunologia da Universidade de Campina Grande, Patos/PB, Brasil. Os 45 soros de cães, pertenciam a animais com as seguintes alterações: desordens neoplásicas (n=12), dirofilariose (n=8), babesiose (n=4), erlichiose (n=3), tripanossomíase por *T. cruzi* (n=3), esgana (n=3), gastroenterite hemorrágica (n=2), desordens cutâneas (n=2), doença auto-imunitária (n=1), leptospirose (n=1), leucemia (n=1), conjuntivite (n=1), epilepsia (n=1), dipetalonemose (n=1), problema respiratório (n=1) e toxocaríase (n=1).

G4 = trinta e sete soros de animais saudáveis (n=37) e parasitologicamente negativos para LVC.

Protocolo Técnico - O DAT foi realizado de acordo com protocolo padrão, descrito para diagnóstico da LV em hospedeiros caninos (Harith *et al.*, 1989). Para a realização do teste, diluições seriadas de 1:10 até 1:10.240 dos soros foram feitas com diluente sérico (NaCl a 0,9% em água destilada, suplementado com 1% de SFB e com 1,56 mL de β -ME 0,2M - Sigma®). Os soros diluídos foram colocados em microplacas de fundo em “V”, começando a partir da segunda coluna a diluição da amostra na concentração de 1:10 (10 μ l amostra + 90 μ l) e então repassou-se para a coluna a seguir 50 μ l de solução. O antígeno foi adicionado após incubação da placa com soros, a 37°C durante uma hora. A primeira coluna, contendo diluente + antígeno, foi usada como controle da reacção. As placas permaneceram durante 18h à temperatura ambiente e foram lidas a seguir. O título de aglutinação foi determinado como sendo o do poço, anterior àquele onde se observava um “botão” idêntico ao observado no poço controle da 1ª coluna. Como padronizado, o título considerado positivo para LVC foi de $\geq 1:320$.

Desenho do estudo - O antígeno β -ME-DAT, obtido a partir da estirpe IMT 387, foi testado frente a diferentes perfis de amostras caninas (G1, G2, G3 e G4) e os resultados apresentados foram comparados com os resultados obtidos para as mesmas amostras com o antígeno comercial liofilizado, TRYP-DAT.

Os dois antígenos, β -ME-DAT e TRYP-DAT, tiveram os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo calculados. A sensibilidade do teste é dada pela percentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos doentes e a especificidade, pela percentagem de negativos, entre indivíduos não doentes. O valor preditivo positivo (VPP) refere-se à probabilidade de ter a doença se o resultado for positivo, enquanto o valor preditivo negativo (VPN) refere-se à probabilidade de não ter a doença quando o resultado for negativo. A interpretação da concordância entre os antígenos foi feita a partir do coeficiente de Kappa (κ), onde resultados abaixo de 0,6 são considerados maus; de 0,6 a 0,80 são considerados bons; de 0,81-0,99 ótimos e o resultado igual 1 define a correlação perfeita entre os resultados dos antígenos. Utilizamos ainda o coeficiente de correlação linear de Pearson. Uma das suposições para a utilização deste coeficiente é de que as variáveis envolvidas na análise sejam medidas em nível intervalar, o que ocorre com o aumento dos títulos do DAT. A análise estatística foi realizada com o programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Utilizando o antígeno β -ME-DAT, todas as amostras do grupo de cães confirmados com LVC (G1=31) apresentaram resultados positivos, ao passo que, utilizando o TRYP-DAT, verificámos 2 resultados falso-negativos, com títulos de 1:80 e 1:160. Ao testarmos os soros dos animais do grupo com sintomatologia suspeita de LVC (G2=38), verificámos que, todos os resultados obtidos no β -ME-DAT foram positivos, com resultados compreendidos entre 1:320 e $>1:10.240$. Neste grupo, utilizando o antígeno TRYP-DAT, sete soros apresentaram resultados negativos, com títulos de 1:20 ($n=1$), 1:40 ($n=1$), 1:80 ($n=3$) e 1:160 ($n=2$). No grupo de animais portadores de outras doenças (G3=45) não foram observadas reacções cruzadas independentemente do antígeno utilizado. Contudo, uma amostra desse grupo, referente a um cão com dirofilariose, apresentou resultado 1:160 ao utilizarmos o antígeno β -ME-DAT. Com o TRYP-DAT todos os resultados ficaram abaixo do título 1:80. Entre os animais saudáveis e parasitologicamente negativos para LVC (G4=37), todas as amostras apresentaram resultados negativos nos dois testes e os títulos obtidos, com ambos os antígenos, ficaram sempre abaixo do valor de 1:80. Através da observação destes resultados,

calculámos uma taxa de sensibilidade de 93,5% e especificidade de 100% para TRYP-DAT, enquanto o β -ME-DAT, apresentou índices de sensibilidade e especificidade de 100%.

O VPP foi de 93.9% e o VPN de 100% para os testes realizados com o antígeno tratado com β -ME-DAT; para o TRYP-DAT, os resultados alcançados foram respectivamente de 87,8 e 97,5%.

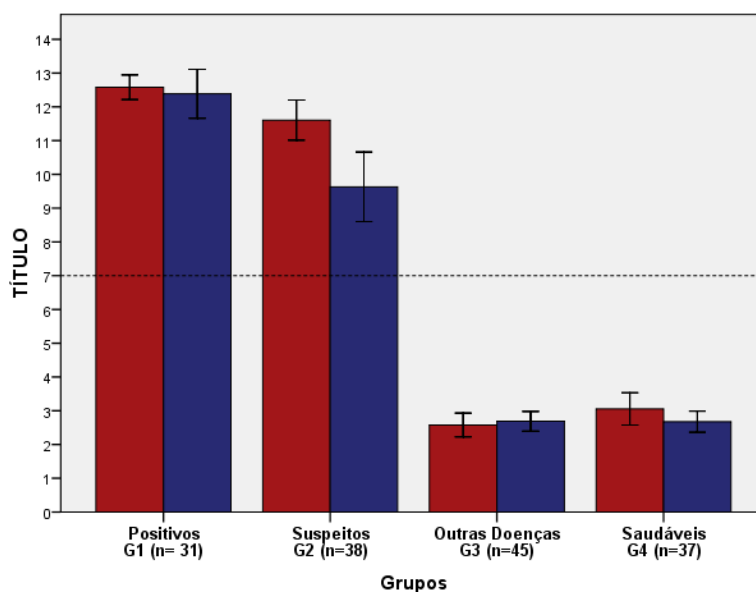


Gráfico 1: Reactividade dos antígenos β -ME-DAT (■) e antígeno TRYP-DAT (■). As barras expressam os valores médios dos resultados e o Erro Bar foi calculado com IC de 95%. As diluições foram iniciadas em 1:10 (título 1) e terminam no título 10.240 (título 12), podendo o resultado ser superior à maior diluição da placa (título 13). A linha pontilhada na horizontal representa o título de corte do teste (título 7= 1:320).

Com isso, observamos que os dois antígenos apresentaram médias similares para os diferentes grupos, excepto no G2, que corresponde aos animais com suspeita de LVC. Neste grupo, o β -ME-DAT apresentou uma média significativamente maior, devido à positividade de todas as amostras testadas (Gráfico 1).

Os resultados dos dois antígenos apresentaram óptima concordância ($\kappa= 0,879$, $p=0,000$) e a correlação obtida entre os testes com os diferentes antígenos foi de 0,935

Tabela 1: Concordância e correlação entre resultados obtidos com β -ME DAT e Tryp DAT em 151 amostras de cães com diferentes perfis imunológicos.

Teste	Teste Estatístico	β -ME-DAT	TRYP-DAT
β-ME-DAT	Concordância*	1	0.879
	Correlação**	1	0.935
TRYP-DAT	Concordância*	0.879	1
	Correlação**	0.935	1

* Concordância calculada com o índice de correlação Kappa

** Correlação de Pearson.

Discussão

Neste estudo, utilizando o β -ME DAT, obtivemos índices de 100% tanto para a sensibilidade quanto para a especificidade. Estes valores são concordantes com o estudo de Harith *et al.* (1995) que obtiveram o mesmo índice para antígeno tratado com β -ME, aquando da avaliação de amostras humanas.

Os cálculos dos índices de sensibilidade e especificidade do TRYP-DAT foram de 93,5% e 100%, respectivamente. Apesar de estes resultados serem mais baixos do que os obtidos com o β -ME-DAT eles apresentam uma boa concordância com os resultados avançados na literatura, quando utilizado antígenos com tratamento convencional por tripsina. Na primeira vez que o TRYP-DAT aquoso foi avaliado em soros caninos, verificou-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98.9% (Harith *et al.*, 1989). Mais tarde, Neogy *et al.*, (1992), encontraram valores de sensibilidade e especificidade similares (95,5% e 100% respectivamente). E, o mesmo se pode dizer de trabalhos posteriores; Vercammen *et al.*, 1997 (100% e 95% respectivamente), Aoun *et al.*, 2000 (95.1% e 96.5%), Da Silva *et al.*, 2006 (91% e 100%) e Ferreira *et al.*, 2007 (93% de sensibilidade e 95% de especificidade).

Aquando do desenvolvimento do “kit” Dog-Leish, utilizando uma versão liofilizada do mesmo TRYP-DAT, Oskam *et al.* (1996), relataram valores de sensibilidade mais elevados (100%) e especificidade de 98.8%, contudo consideraram, um título de corte mais elevado (1:640). Valores semelhantes seriam confirmados por Schallig *et al.* (2001) que apresentam no seu estudo taxas de 100% de sensibilidade e 97,8% especificidade.

Este valor de sensibilidade (100%) encontrado por estes autores nos trabalhos referenciados acaba por contradizer outros estudos, utilizando antígenos tripsinados liofilizados, tanto com soros humanos (Meredith *et al.*, 1995, descreve uma sensibilidade de 92%, Schallig *et al.*, em 2002, num estudo comparativo com FAST, descreve uma sensibilidade de 88.6% e Pedras *et al.*, 2008 descreve uma sensibilidade de 96.6%;) como com soros caninos (Teran-Angel *et al.*, 2007, descreve uma sensibilidade de 93% e Babakhan *et al.*, 2009, uma sensibilidade de 98.6%). Esta oscilação de resultados parece não favorecer a apologia na utilização da versão liofilizada versus a aquosa, tanto mais que, noutro estudo se conclui, que um método de preservação em glicerol, económico e simples de executar, dispõe de melhor potencial para aplicação em larga escala do que o método de antígeno liofilizado (Harith *et al.*, 2003)

A sensibilidade dos testes foi calculada inicialmente com base no grupo de controlos positivos (G1, n=31). O TRYP-DAT apresentou dois (2) resultados falso-negativos definindo a sua sensibilidade em 93,5%. Este último índice é comparável ao obtido por Teran-Angel *et al.* (2007) que descreve índices de 92,6% para sensibilidade. Quando analisamos a sintomatologia dos animais em relação ao título obtido, observamos que o resultado de 1:160 foi encontrado num animal sintomático e de 1:80 num animal assintomático. Já anteriormente, Garcez *et al.* (1996) encontrou uma baixa sensibilidade (71,4%) para o DAT no diagnóstico da LVC, utilizando um antígeno tripsinado. Em referência a este caso, Teran-Angel *et al.* (2007) sugere que essa reduzida capacidade do teste em identificar os animais positivos pode ser devido a factores decorrentes de particularidade dos circulantes na área do estudo.

No grupo G2 (n=38), o β -ME-DAT apresentou títulos positivos para todas as amostras, o que associado à sintomatologia clínica sugestiva de LVC sugere uma forte indicação de infecção por *Leishmania*. Entretanto, o TRYP-DAT apresentou 7 resultados negativos entre as amostras dos cães com suspeita clínica de LVC. Relacionamos este facto com uma maior capacidade do β -ME DAT em identificar infecções em fase inicial. Tal facto pode ser justificado por estudos anteriores, onde melhorias na técnica de diagnóstico do DAT foram propostas e outros agentes clivantes (α -amilase, lipase, pancreatina e β -ME) foram testados em comparação à tripsina. Os autores concluíram que o tratamento com β -ME proporcionava um aumento nos títulos das amostras positivas em 3 a 5 vezes (Harith *et al.*, 1995).

A suspeita inicial da existência de reactividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* sp. e outras doenças não foi sustentada, devido à baixa reactividade sorológica anti-*Leishmania* no grupo G3 (n=45), composto por animais portadores de outras patologias e negativos parasitologicamente para LVC. Para as 3 amostras de cães portadores de outros tripanossomídeos (com infecção causada por *T. cruzi*) obtivemos resultados de 1:80 (n=2) e 1:10 (n=1), para os dois antígenos. O título mais alto entre os animais do G3 (1:160) foi obtido com o antígeno β -ME-DAT, num cão com dirofilariose. Estes resultados superam, por exemplo, os relatados por Ferreira *et al.* (2006) que descreve a ocorrência de reação cruzada numa amostra de cão com *Ehrlichia canis*.

Ambos os antígenos conseguiram identificar correctamente os animais aparentemente saudáveis e com parasitologia negativa para LVC (G4=37). O limite dos títulos encontrados neste grupo ficou compreendido entre valores de <10 e 1:80 com o antígeno β -ME, e entre 1:10 e 1:80, com o antígeno TRYP-DAT. Com base nos resultados apresentados calculamos um VPP de 93,9% e VPN de 100% para os testes realizados com o antígeno tratado com β -ME. O DAT realizado com antígeno tripsinado apresentou resultados de 87,8% para VPP e de 97,5% para VPN. Com isso, o β -ME DAT mostrou ter maior fidelidade em identificar correctamente os animais verdadeiramente positivos e negativos.

Quando comparamos os dois antígenos, o β -ME-DAT apresenta índices óptimos de sensibilidade e especificidade. Creditamos essa substancial melhora à utilização do β -ME no tratamento das formas promastigotas, utilizadas no antígeno. Tal facto é concordante com dados anteriormente publicados e reforça a afirmação de que o efeito do tratamento com β -ME provoca um desdobramento nas glicoproteínas de superfície do parasita, aumentando a afinidade de ligação do antígeno a anticorpos específicos anti-*leishmania* ao passo que a tripsina tem a sua actividade limitada sobre as ligações arginina-lisina, de superfície (Santos *et al.*, 1991).

A concordância entre os antígenos TRYP-DAT e β -ME-DAT foi avaliada pelo coeficiente Kappa, que apresentou valor igual a 0,88 ($\kappa= 0.88$, $p= 0,000$), mostrando uma óptima correlação, quando utilizando valores binários para os resultados. Com isso, conclui-se que os resultados dos dois antígenos são muito próximos e comparáveis.

Um diagnóstico preciso e rápido da LVC é de grande importância devido ao facto de permitir que o tratamento seja instaurado numa fase precoce, a fim de prevenir a manifestação grave da doença, e também para prevenir que o cão constitua uma fonte de

infecção do vetor e transmissão da doença para o homem (Abranches *et al.*, 1991), bem como por poder fornecer informações valiosas para as autoridades de saúde pública num curto intervalo de tempo (Terán-Angel *et al.*, 2007).

O diagnóstico da LVC apresenta-se difícil devido à sua ampla manifestação clínica, a geralmente apresentar resultados de histopatologia inespecíficos e à difícil visualização do parasita em esfregaços corados (Schallig *et al.*, 2001). O DAT tem constituído uma boa alternativa para o diagnóstico da LVC, principalmente por este teste demonstrar ser capaz de detectar a infecção em fases iniciais (Cardoso *et al.*, 2004).

Em estudos efectuados anteriormente (Semião-Santos, 1996), ainda utilizando antígenos tratados com tripsina, o DAT já havia mostrado, no diagnóstico de LVC, todo o seu potencial na detecção da infecção na sua fase precoce. Agora, no nosso entender, devido ao tratamento da superfície das formas promastigotas com β -ME, esse potencial foi significativamente aumentado. Devido aos excelentes resultados obtidos neste estudo acreditamos que o cultivo e preparo de antígenos modificados para o DAT tornam promissores a utilização deste teste em inquéritos epidemiológicos e diagnóstico de rotina na clínica veterinária.

Agradecimentos

Os autores estão agradecidos ao Dr A.J. Flor Ferreira, Veterinário Municipal da Câmara Municipal de Évora, pela sua colaboração nos trabalhos de campo; ao Dr. Henk Schallig, do laboratório de Investigação Biomédica do “Royal Tropical Institute” (KIT), Amesterdão, Holanda, por ter fornecido o antígeno liofilizado TRYP-DAT e aos clínicos veterinários do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, Évora, Portugal. O primeiro autor, foi financiado pelo contrato C2008-UE/ICAAM05 como investigador contratado ao abrigo do Programa Ciência 2009 da Fundação Ciência e Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal.

Referências Bibliográficas

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim N, Campino, L., Schnur, L. F. and C.F. Jaffe (1991) An experimental model for canine leishmaniasis. *Parasitol. Immunol.*, **13**:537-550.
- Aoun, K., Bouratbine, A., Harrat, Z., Guizani, I., Mokni, M., Bel Hadj Ali, S., Ben Osman, A., Belkaid, M., Dellagi, K. and R. Ben Ismail (2000) Données épidémiologiques et parasitologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **93**:101–103.

- Babakhan, L., Mohebbali, M., Khomedi, A., Edrissian, G. H. and H. Keshavarz (2009). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitol. Res.*, **105**: 717-720.
- Cardoso L., Schallig H.D., Neto, F., Kroon, N. and M. Rodrigues. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in a dog from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using direct agglutination test (DAT) and fast agglutination test (FAST). *Acta Trop.*, **91**:95-100.
- Da Silva, E. S., van der Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M., Schallig H. D. and R.P. Brazil (2006) Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.*; **30**:637-43.
- Deplazes, P., Grimm, F., Papaprodou, M., Cavaliero, T., Gramiccia, M., Christofi, G., Christofi, N., Economides, P. and J. Eckert (1998). Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON-1. *Acta Trop.*, **71**: 169-178.
- Ferreira, E.C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., Silva, E.S., Schallig, H. and C.M.F. Gontijo (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, **146**:235-241.
- Garcez, L. M., Shaw, J. J. and F.T. Silveira (1996) Direct agglutination test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Para. *Rev. Soc. Bras. Med.*, **29**:165-80.
- Gramiccia M. (2011) Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, **181**: 23-30.
- Harith, A. E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A. Leeuwenburg, J., Faber, F., Muigai, R., Kiugu, S. and J. J. Laarman. (1987) Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**:603–606.
- Harith, A. E., Slappendel, R.J., Reiter, I., Van Knappen, F., De Korte, P., Huigen, E. and A. H. J. Kolk. (1989) Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**:2252–2257.
- Harith, A.E., Chowdhury, S., Al-Masum, A., Semião-Santos, S.J., Karim, E., El Safi, S and I. Haque (1995) Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1984-1988.
- Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Kiugu, S. and J.J. Laarman (1986) A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**: 583-587
- Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T. and P.A. Kager (1988) Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **26** (7): 1321-1325.
- Harith, A.E., Mutasim, M., Mansour, D., Mustafa, F. and H. Arvidson (2003) Use of glycerol as an alternative to freeze-drying for long-term preservation of antigen for the direct agglutination test. *Trop.Med.Int.Health*, **8**(11): 1025-1029.
- Meredith, S.E., Kroon, N.C., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M.G., Van Impen, C.W., Oosting, H., Schoone, G.J., Terpstra, W.J. and L. Oskam (1995) Leish-Kit, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J.Clin.Microbiol.*, **33**(7): 1742-1745.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., Gonzalés, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. and J. Alvar (1994) Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonize *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **88**: 491-493.

- Moreno, J. and Alvar, J. (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experiment. *Trends Parasitol.*, **18**(9):399-405
- Neogy, A. B., Vouldoukis, I., Silva, O. A., Tselentis, Y., Lascombe, J.C., Segalen, T., Rzepka, D. and L. Monjour (1992) Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg.*, **47**(6):772-7.
- Oliva, G., Scalone, A., Fogliori Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. and L. Gradoni (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**: 1318-1322.
- Oskam L., Slappendel, R.L., Beijer, E.G., Kroon, N.C., van Ingen, C.W., Ozensoy, S., Seray, Özbel, Y. and W.J. Terpstra (1996). Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **16**: 235-239.
- Pedras, M.J., Viana, L.P., Oliveira, E.J. and A. Rabello (2008). Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39, soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of VL. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, **102**: 172-178.
- Rajasekariah, G-Halli R. , Cardoso, L., Dogcio, D. A., Martin, S. K. and. Smithyman A. (2008) A Novel Exo-antigen-based ELISA for the Detection of Canine Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **78**(4):616–623.
- Sadigursky M. and C.I. Brodskyn (1986) A new liquid medium without blood and serum for cultivation of hemoflagelates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**: 942-944.
- Santos, M. A., Andrade, M., P. P. de, Andrade, C. R. de, Padovan, P. A and W. de Souza (1991) Effect of trypsin and 2-mercaptoethanol on the exposure of sugar residues on the surface of *Leishmania donovani chagasi*. *Parasitol. Res.*, **77**:553–557.
- Schallig, H. D., Schoone, G. J., Kroon C. C., Hailu, A., Chappuis, F., and H. Veecken. (2001). Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol. Immunol.*, **190**: 69-71.
- Schallig, H.D.F.H., Schoone, G.J., Beijer, E.G.M., Kroon, C.C.M., Hommers, M., Ozbel, Y., Ozensoy, S., Silva, E.S., Cardoso, L.M. and E.D. da Silva (2002) Development of a fast agglutination test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet. Parasitol.*, **109**: 1-8.
- Semião-Santos, S. J. (1996) Ph. D. thesis. Canine Visceral Leishmaniasis in Évora District, Portugal: A sero-epidemiological study. University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
- Terán-Angel, G., Schallig, H., Zerpa, O., Rodríguez, V., Ulrich, M. and Cabrera, M. (2007). The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Biomédica*, **27**(3): 447-453
- Vercammen, F.; Berkvens, D.; Le Ray, D.; Jacquet, D. and T. Vervoort (1997) Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet. Rec.*, **141**(13):328-330.
- WHO (2010) Control of the leishmaniasis. Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26. ISBN: 978 92 4 120949 6.

CAPÍTULO 2

Um β - Mercaptoetanol ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina

3.1.Fundamentação teórica sobre no método ELISA no diagnóstico da LV

Engvall e Perlmann (1972) foram os responsáveis pela introdução do ensaio ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) como teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos e Voller *et al.* (1976) pela sua padronização e aplicação para o diagnóstico das infecções parasitárias. Segundo Camargo (1987), uma das vantagens do ELISA é a de que o resultado é a expressão da capacidade de ligação de anticorpos de uma forma directa e não por titulação. A intensidade da cor revelada é medida por uma leitura em espectrofotómetro e indica a concentração de anticorpos existente na amostra avaliada.

Existem algumas variações deste ensaio (directo, indirecto, “sandwich”, captura, inibição, celular, entre outros) mas, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, o mais amplamente utilizado é o indirecto, permitindo a avaliação do soro do animal infectado, mediante utilização de um sistema enzimático. Assim, uma diluição do soro suspeito é adicionada à placa, após a sua sensibilização e bloqueio dos sítios inespecíficos para, posteriormente se adicionar um anticorpo conjugado a uma enzima, peroxidase ou fosfatase alcalina (as mais vulgarmente utilizadas), um cromógeno e um substrato capaz de oxidá-lo, permitindo a leitura da placa de forma subjetiva (leitura visual) ou objetiva, com o apoio de um espectrofotómetro, também conhecido como leitor de ELISA, com filtros específicos para o cromógeno utilizado (Crowther, 2001; Gibbs, 2006).

Uma outra abordagem diz-nos que o ELISA é um método que quantifica um antígeno imobilizado numa superfície sólida pelo uso de um anticorpo específico com uma enzima ligada de forma covalente e, o resultado da ligação antígeno-anticorpo leva a uma reacção com produção de cor que é medida por um espectrofotómetro (Abbas and Lichtman, 2005) (Ilustração 9). Os critérios de positividade nos testes de ELISA dependem do limiar de reactividade ou *cut-off* que deve ser fixado para cada teste, dispensando muitas vezes diluições sucessivas de soros.

A técnica de ELISA apresenta vantagens em relação a outros métodos de diagnóstico da leishmaniose. Por exemplo, a sua leitura pode ser feita de forma automatizada, não sendo dependente do observador. Por outro lado permite que grandes quantidades de amostras sejam processadas ao mesmo tempo; por isso, tem sido utilizada frequentemente em levantamentos epidemiológicos (Sundar e Raí, 2002).

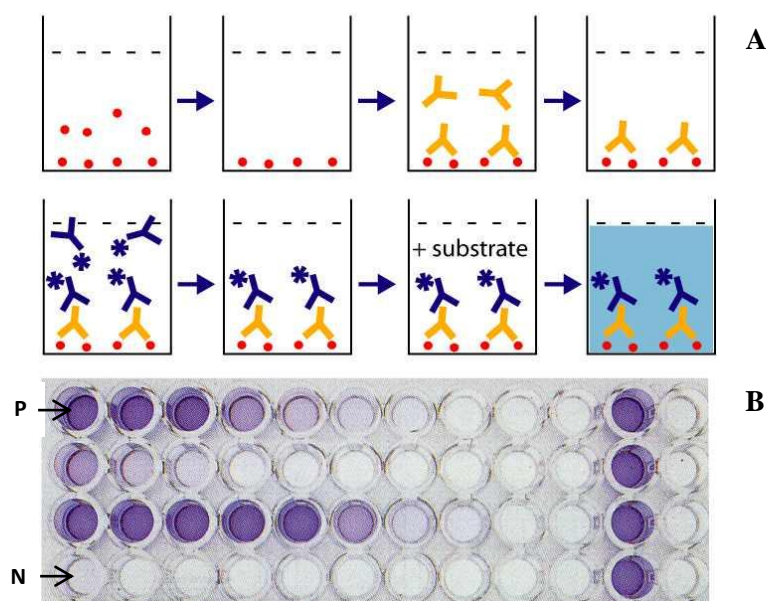


Ilustração 9. Representação esquemática do ELISA convencional (A) e visualização em placa de microtitulação (B): N: Reação Negativa; P: Reação Positiva. (Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunoparasitologia - CPqAM/FIOCRUZ).

Outra vantagem está no fato desta técnica poder ser facilmente adaptada ao uso de vários antígenos tais como os antígenos citoplasmáticos totais, purificados, peptídeos sintéticos definidos e proteínas recombinantes (Maia e Campino, 2008). Muitos autores concordam com o facto da sensibilidade e da especificidade do teste serem fortemente influenciados pelo tipo de antígeno utilizado (Islam *et al.*, 2002; Miro *et al.*, 2008; Porrozzi *et al.*, 2007; Salotra *et al.*, 2002; Santarém *et al.*, 2005; Scalone *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2008; Zijlstra *et al.*, 1998).

Têm sido descritos métodos de ELISA baseados em frações purificadas ou recombinantes (Mettler *et al.*, 2005, Nieto *et al.*, 1999, Rhalem *et al.*, 1999) que, regra geral, apresentam índices elevados de sensibilidade e especificidade, com relato de muito poucas reações cruzadas com outros agentes patogénicos (Mettler *et al.*, 2005, Rosário *et al.*, 2005). A importância de se trabalhar com antígenos específicos purificados é alvo de discussão na literatura. Entre outros aspectos, referem os vários autores, não só a questão do diagnóstico, mas também o acompanhamento da resposta imune ao longo da doença e a seleção de moléculas, potenciais candidatas para testes de vacinação (Sheppard e Dwyer, 1986; Blaxter *et al.*, 1988; Reed *et al.*, 1987; Burns *et al.*, 1993).

Têm sido propostos para o diagnóstico de LVC e LVH, ELISAs utilizando antígenos quimicamente definidos e específicos do parasita. É o caso do antígeno recombinante K39 (rK39); um epítoto imunodominante repetitivo de uma proteína relacionada à quinesina, que é muito observado entre as espécies de *Leishmania* viscerotrópicas; mostrou-se sensível e específico para o diagnóstico da LVC e LVH (Badaró *et al.*, 1996; Scalone *et al.*, 2002). No entanto, alguns estudos sugerem que o rK39 fica muito aquém das expectativas quando se pretende detectar casos assintomáticos de animais comprovadamente infectados (Porrozzi *et al.*, 2007). Numa tentativa de ultrapassar este problema, alguns investigadores descreveram o antígeno (peroxidase trypanredoxina citosólica) LicTXNPx de *L. infantum*; um membro da cascata de *Leishmania*, exclusiva para a destoxificação das peroxidases (Castro-Pinto *et al.*, 2004), como sendo uma sonda (probe) altamente imunogénica durante infecções naturais humanas ou infecções caninas experimentais (Santarém *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2008). Estudos prévios indicaram que, os anticorpos anti-LicTXNPx se encontravam presentes nas infecções experimentais sintomáticas e assintomáticas com *Leishmania*. Este facto sugere que este antígeno é um marcador que pode constituir um bom candidato, tanto para as infecções clínicas quanto para as infecções subclínicas causadas por *Leishmania*.

Outro antígeno considerado candidato para o diagnóstico da LV é o recombinante A2. Este é expresso nas formas amastigotas como uma família de proteínas que apresenta um número de repetições de dez aminoácidos (Zhang *et al.*, 1996). Alguns estudos sugerem que o recombinante A2 é particularmente útil para o diagnóstico da LVC (Carvalho *et al.*, 2002). Andrade *et al.* (1992) propuseram a utilização da porção carboxi-terminal (porção antigénica) da proteína recombinante HSP-70 (Heat Shock Protein) de *L. chagasi* e demonstraram um bom desempenho deste teste, com possibilidade de identificação específica e precoce da infecção em cães.

Entre os antígenos purificados utilizados para diagnóstico da LV está o ligante de fucose-manose (FML), que é um antígeno específico no serodiagnóstico humano (Palatinik-de-Souza *et al.*, 1995) e canino (Borjacabrera *et al.*, 1999). O FML está presente na superfície do parasita durante todo o seu ciclo (Palatniki de-Souza *et al.*, 1993). Esta fração glicoproteica é composta por 29% de açúcares neutros, 44% de proteínas e traços de carboidratos e hexoaminas. Entre os açúcares neutros foram identificados: 10% de fucose, 47% de manose, 30% de glicose e 12% de galactose (Palatnik *et al.*, 1989). Em 2007, Cândido concluiu nos seus estudos que, em animais

oligossintomáticos, o ELISA-FML apresentava maior sensibilidade, enquanto que, nos animais sintomáticos, o ELISA com antígeno total, mostrava ser mais sensível na detecção de positividade na LVC.

Um outro método de diagnóstico foi desenvolvido por Islam *et al.* (2002) para detectar a imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania donovani* por ELISA, usando como amostra, a urina humana. Foram utilizados como antígenos, um extracto de promastigotas de *L. donovani* e um outro antígeno constituído por promastigotas de *L. donovani* purificados com acetona. Com o extracto de antígeno convencional foi obtida, segundo os autores, uma sensibilidade de 93,5% e especificidade de 89,3%, enquanto com o antígeno purificado se conseguiram aumentar os níveis de sensibilidade e especificidade para 95% e 95,3%, respectivamente.

Na bibliografia consultada encontramos a descrição de métodos de ELISA em que é utilizado antígeno total do parasita para o diagnóstico da doença canina e humana (Lima *et al.*, 2003, Martin *et al.*, 1998). Tais métodos têm algumas vantagens sobre outros métodos comumente utilizados sobretudo devido à facilidade na preparação do antígeno total e por facilitar a produção de grandes quantidades de antígenos sob condições padronizadas (Evans *et al.*, 1990). Mohammed *et al.* (1985) argumentaram que a utilização de formas intactas do parasita seria mais indicada nos ensaios imunoenzimáticos uma vez que, os antígenos semi-purificados ou purificados do parasita, por serem solúveis, exigem extensa manipulação, levando à perda de reprodutibilidade e de especificidade do diagnóstico. Mettler *et al.* (2005) obtiveram uma elevada sensibilidade em cães assintomáticos (94,1-100%) e sintomáticos (100%) usando ELISA baseada em antígenos de promastigotas e amastigotas.

Alguns autores afirmam que as técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas no que diz respeito à especificidade e afirmam que podem apresentar reacções cruzadas, não somente com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, mas também com outros organismos filogeneticamente distantes (Rachamin *et al.*, 1991; Gontijo e Melo, 2004). Alguns trabalhos mostram que os anticorpos contra *Ehrlichia canis* (*E. canis*) e *Babesia canis* (*B. canis*) (Mancianti *et al.*, 1996; Gomes e Cordeiro, 2004) e toxoplasmose (Lima *et al.*, 2005) produzem reacções cruzadas com *Leishmania* sp. em exames sorológicos utilizados para detectar cães com leishmaniose. Todavia, Oliveira *et al.* (1998) afirmam não terem observado reacção cruzada entre amostras de *E. canis* e *B. canis* e sugerem a

possibilidade de existirem coinfeções de dois ou mais agentes etiológicos destes em áreas endémicas para estas doenças.

Santos *et al.* (2010) relata que a fixação dos antígenos em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epítopes alvo, mascarando o antígeno.

A tripsina tem sido utilizada para induzir a degradação de proteínas complexas na superfície das formas promastigotas do antígeno, evitando a aglutinação inespecífica (Andrade *et al.*, 1987; Harith *et al.*, 1987). Entretanto, Harith *et al.* (1987) sugerem que devido à limitada actividade proteolítica da tripsina, os epítopes ou artefactos provenientes do meio de cultura permanecem intactos e podem ser interferentes no teste. Devido a essa constatação, mostra-se necessário a avaliação de outros agentes redutores e clivantes na preparação dos antígenos.

Entre os agentes redutores já testados encontra-se o 2-hydroxyethyl mercaptan ou β -mercaptoethanol (β -ME) (Sigma®). Santos *et al.* (1991) descrevem que o tratamento das formas promastigotas com β -ME induz um significativo aumento na densidade dos receptores concavalina A (Con A) da superfície da *L. d. chagasi*. Os autores sugerem que este aumento é devido ao desdobramento de uma ou mais glicoproteínas de superfície após a clivagem de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína, expondo receptores de Con A de segunda ordem, que se apresentam ocultos na estrutura quaternária da proteína.

Abass *et al.* (2006) desenvolveram um ELISA para diagnóstico da leishmaniose humana utilizando o β -ME no tratamento das formas promastigotas de *Leishmania donnovani*. O desempenho foi altamente satisfatório, uma vez que obteve 97,5% de sensibilidade e 100% de especificidade, mesmo quando testaram amostras de pacientes com tripanossomíase africana, malária, febre tifoide, tuberculose e leucemia. Para além disso, o antígeno utilizado nesse ELISA, fixado em formaldeído e tratado com β -ME, mostrou ser estável durante um período de armazenamento de pelo menos 2 meses. Essa constatação foi reforçada pela ausência de alterações microscópicas na morfologia dos promastigotes e homogeneidade do antígeno. Em estudos efectuados posteriormente, Abass *et al.* (2011) validaram o teste e recomendam sua aplicação a nível de laboratório em confirmação dos resultados obtidos com DAT ou com o teste de “dipstick” com

rK39 (os dois testes actualmente recomendados pela OMS para o despiste da LVH (WHO,2010).

O desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos depende fundamentalmente do conhecimento de diversos aspectos sobre a resposta imune do hospedeiro frente à infecção por estes protozoários. Estes estudos devem considerar ainda aspectos como a praticabilidade, rapidez e custo dos métodos diagnósticos a serem desenvolvidos.

Estes dados, anteriormente referidos, alertam para a necessidade do contínuo desenvolvimento de técnicas de detecção da LVH e LVC, que alcancem elevadas taxas de sensibilidade e especificidade para que possam ser empregues com sucesso na rotina de vigilância epidemiológica e, sobretudo, na identificação dos indivíduos com a forma assintomática da doença. Só desta forma, através de um diagnóstico precoce, poderemos alcançar o sucesso da cura, evitando recidivas e formas variadas de manifestação da doença, podendo recorrer a métodos de tratamentos mais rápidos, menos invasivos, menos tóxicos e mais baratos.

3.2.Objectivos

O β -ME-ELISA mostrou-se eficaz no diagnóstico da leishmaniose humana, bem como na eliminação do antigo problema relativo a possíveis reacções cruzadas. Tomando em linha de conta as ideias acima, propomos desenvolver um teste similar para o diagnóstico da LVC. Obviamente que considerando também a sua padronização com as modificações pertinentes com o objectivo de obter a melhor *performance* possível na análise de amostras serológicas caninas.

3.3.Referências Bibliográficas

- Abass, E.M., Mansour, D., Mutasim, M., Hussein M. and AE Harith. (2006). β -Mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Med.Microbiol.*, **55**: 1193-1196.
- Abbas, A.K.; Lichtman, Andrew H. (2005) *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Oxford, **5**.
- Abass, E.M., Mahamoud, A., Mansour, D., Mohebali, M. and AE Harith. (2011). Validation of a β -ME- ELISA for detection of anti *Leishmania donovani* antibodies in Eastern Sudan diagnosis of visceral leishmaniasis. *Iran J.Immunol.*, **58**(3): 150-158.
- Andrade, C. R., Kirchhoff, L. V., Donelson, J. E., and K. Otsu (1992). Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J. Clin. Microbiol.*, **30**:330-335.
- Andrade, C. R., O. A. Silva, P. P., Andrade, A. H. J. Kolk and A. E. Harith.(1987) A direct agglutination test discriminative toward Chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, **138**:457-459.
- Badaro, R., Benson, D., Eulalio, M.C., Freire, M., Cunha, S. and E.M. Netto (1996) rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **173**:758-61.
- Blaxter, M.L., Miles, M.A: and J.M. Kelly (1988) Specific serodiagnosis of visceral leishmaniasis using a *Leishmania donovani* antigen identified by expression cloning. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**:259-270.
- Borja-Cabrera, G.P., Da Silva, V.O., Da Costa, R.T.; Reis, A.B.; Mayrink, W.; Genaro, O. and C.B. Palatinik-de-Souza (1999) The Fucose- Mannose-Ligand-Elisa in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **61**(2):296-301.
- Burns, J.M.Jr., Sheffler W. G., Bensen D. R., Ghalib H. W., Badaró, R. and S.G. Reed (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 775-779.
- Camargo, M. E. (1987) Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Ars. Curandi Cardiol.*, **9**:29-38.
- Cândido, T. C. (2007) Comparação entre os métodos de ELISA-antígeno total e ELISA-Ligante de fucose e manose em cães sintomáticos e oligossintomáticos para leishmaniose visceral Araçatuba,. Acesso eletrônico em 10/10/2011. Disponível em: http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bfo/33004021075P8/2007/candido_tc_me_araca.pdf
- Carvalho, F. A. A., H. Charest, C. A. P. Tavares, G. Matlashewski, E. P. Valente, A. Rabello, R. T. Gazinelli, and A. P. Fernández (2002) Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **43**:289-295
- Castro-Pinto, D.B., Echevarria, A., Genestra, M.S., Cysne-Finkelstein, L. and L.L. Leon (2004) Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **19**: 57-63.
- Crowther, J.R. (2001) *The ELISA Guidebook: Theory and practice*. 2ª Edição. New Jersey: Humana Press. 426p. (Série Methods in Molecular Biology , v. 149).

- Engvall, E. and P. Perlmann (1972) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. *J. Immunol.*, **109**(1):129-135.
- Evans, T.G., Vasconcelos, I.A., Lima, J.W., Teixeira, J.M., McAullife, I.T., Lopes, U.G., Pearson, R.D., Vasconcelos, A.W., (1990) Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **42**: 118–123.
- Gomes, A.P.S. and R.L.R. Cordeiro (2004) Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Ver. Bras.Parasitol. Vet.*, **23** (1):238.
- Gontijo, C.M.F. and M.N. Melo (2004) Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, **7** (3).
- Harith, A. E., A. H. J. Kolk, P. A. Kager, J. Leeuwenburg, F. Faber, R. Muigai, S. Kiugu and J. J. Laarman. (1987) Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**:603–606.
- Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and G. Lannotte (1978) The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.*, **72**:213-18.
- Islam M.Z., Itoh M., Shamsuzzaman S.M., Mirza R., Matin F., Ahmed I., Shamsuzzaman Choudhury A.K., Hossain M.A., Qiu X.G., Begam N., Furuya M., Leafasia J.L., Hashiguchi Y. and E. Kimura (2002) Diagnosis of visceral leishmaniasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using urine samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**(4):789-794.
- Lima, V.M. de , Fattori, K.R., Michelin, A.de F., da Silveira, Neto. L., Vasconcelos, R.de O. (2010) Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.*, **173**(3-4):330-3.
- Lima, V: M. F. , Biazzone, L., Silva, A. C., Correa, A. P. F. L. and M.C.R. Luvizotto (2005) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dog. *Pesq. Vet. Bras.*, **25**(4):215-218.
- Maia, C. and L. Campino (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*, **158**:274-287.
- Mancianti, F., Pedones, F. and A. Poli (1996) Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, **65**(1):1-9.
- Martin, S.K., Thuita-Harun, L., Adoyo-Adoyo, M. and K.M. Wasunna (1998) A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes . *Annals Trop .Med. Parasitol.*, **92**(5): 571-577.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. and P. Deplazes (2005) 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.*, **43**: 5515-5519.
- Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. and G. Baneth (2008) Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.*, **24**: 371-377.
- Mohammed, E.A.; Wright, E.P.; Kager, P.A.; Laarman, J. J. and K.W. Pondman (1985) ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kalaazar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**(3):344-350.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C. and I. Navarrete (1999) Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **67**:117-130.

- Oliveira, T. M. F. de S.; Furuta, P. I.; Carvalho, D. de and R.Z. Machado (2008) A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **17**(1): 7-11.
- Palatinik, C.B., Borojevic, R., Previato, J.O. and L. Mendonça-Previato (1989) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect. Immun.*, **57**(3):754-763.
- Palatinik-de-Souza, C.B., Dutra, H.S. and R. Borojevic (1993) *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose-Ligand (FML). *Acta. Trop.*, **53**(1): 59-72.
- Palatinik-de- Souza, C.B., Gomes, E., Paraguai de Souza, E., Palatinik, M., Luz, K. and R. Borojevic (1995) *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, **89**(4):390-393.
- Porrozzi, R., Costa, M. V. S. da , Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A. and G. Grimaldi Jr. (2007) 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.*, **14**:544-548.
- Rachamin, N., Jaffe, C.L., Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Schnur, L.F. and R.L. Jacobson (1991) Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann. Trop. Parasitol.*, **85**:503-508.
- Reed, S. G., R. Badaro and R. M. Cheri Lloyd. (1987). Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. *J. Immunol.*, **138**: 1596-1601.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Guessous-Idrissi, N., Lasri, S., Natami, A., Riyad, M. and B. Berrag (1999) Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, **81**:173-184.
- Rosario, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B. and M. Carneiro (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **100**:197-203.
- Salotra, P., Sreenivas, G., Nasim, A. A., Subba Raju, B.V. and V. Ramesh (2002) Evaluation of enzymelinked immunosorbent assay for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis with crude or recombinant k39 antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immuno.*, **9**:370-373.
- Santarem, N., Tomas, A., Ouaisi, A., Tavares, J., Ferreira, N., Manso, A., Campino, L., Correia, J.M. and A. Cordeiro-da-Silva (2005) Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunol. Lett.*, **101**: 18-23.
- Santos ,M. A. M. de, Andrade, P.P., Andrade, C. R. de., Padovan, P. A. and W. de Souza (1991) Effect of trypsin and 2-mercaptoethanol on the exposure of sugar residues on the surface of *Leishmania donovani* chagasi. *Parasitol. Res.*; **77**(7):553-7.
- Santos, A.S. (2010). Aplicação da técnica de imuno-histoquímica no diagnóstico veterinário. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Nível: Doutorado.
- Scalone, A., de Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R.R., Simpson, D., Donoghue, A.R., Frank, G.R. and L. Gradoni (2002) Evaluation

- of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **104**: 275-285.
- Sheppard, H. W. and D.M. Dwyer (1986) Cloning of *Leishmania donovani* genes encoding antigens recognized during visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **19**:35-43.
- Silvestre, R., Santarem, N., Cunha, J., Cardoso, L., Nieto, J., Carrillo, E., Moreno, J. and A. Cordeiro-da-Silva (2008), Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Vet. Parasitol.*, **158**, 23-30.
- Sundar, S. and M- Rai (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **9**(5):951-958.
- Voller, A., Bidwell, D. E. and A. Bartlett (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine Theory and practice. *Bull World Health Organ.*, **53**(1): 55–65.
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. ISBN: 0512 – 3054
- Zhang, W. W., Charest, H., Ghedin, E. and G. Matlashewski (1996) Identification and expression of the A2 amastigote-specific protein *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **78**, p. 79-90.
- Zijlstra, E.E., Daifalla, N.S., Kager, P.A., Khalil, E.A., El-Hassan, A.M., Reed, S.G. and H.W. Ghalib (1998) rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**: 717-720.

Sites consultados

Gibbs, J. Corning Home. Life Sciences. ELISA Technical Bulletin (2006). Acesso em: 16/09/2011. Disponível em: http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/elisa1.asp?region=na&language=EN

UM β -MERCAPTOETANOL ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

¹Veloso, L.B., ¹Semião-Santos, S.J., ²Andrade, P.P., ³Melo, M.A., ¹Martins, L., ¹Marinho, A.A.,
⁴Almeida, J.A.A. e A.E.Harith⁵

¹ Centro de Diagnóstico e Investigação em Leishmaniose, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Évora, Portugal; ² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ³ Laboratório de Genética Molecular e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Brasil; ⁴ Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, Évora, Portugal; ⁵ Professor Emeritus de Microbiologia, Ahfad University for Woman, Omdurman, Sudan.

ABSTRACT

Following antigen preparation procedures similar to those of the direct agglutination test (DAT) an IgG ELISA employing intact β -mercaptoethanol (β -ME)-treated *Leishmania infantum* promastigotes was developed for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL). The new β -ME-ELISA was, also compared with another developed ELISA employing intact trypsin-treated (TRYP-ELISA) similar parasites. The performance of the β -ME ELISA was assessed in dogs with confirmed CVL, revealing “slight lower sensitivity (29/31 = 93.5%)” than that of the DAT (31/31 = 100%), but higher than of the TRYP-ELISA (27/31 = 87.1%). When challenged with sera of dogs with non-CVL conditions, including babesiosis, ehrlichiosis and Chaga’s disease, the specificity of the β -ME-ELISA was 97.5% compared to 100% for DAT and 94.1% for the TRYP-ELISA. In an endemic population (n=38) manifesting a clinical suspicion of CVL, results obtained with the β -ME ELISA were more concordant with those of DAT (33/38 = 86.3%) than the TRYP-ELISA (27/38 = 71.1%). Results here obtained also agree with those obtained in a similar test developed for visceral leishmaniasis in humans (Abass *et al.*, 2006).

Furthermore, the incorporated intact β -ME treated promastigotes antigen demonstrated higher sensitivity in ELISA (29/31 = 93.5% or 62/69 = 88.9%) than the intact trypsin treated promastigotes antigen (27/31 = 87.1% or 54/69 = 78.2%) if respectively considered only confirmed CVL or confirmed and highly suspected individuals.

Present results advocate the simultaneous application of the technique (β -ME ELISA) with the DAT for confirmation of CVL in laboratories with limited facilities.

RESUMO

Desenvolveu-se um IgG ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) utilizando promastigotes intactos de *Leishmania infantum* tratados com β -mercaptoetanol, mimificando a preparação antigénica actualmente protocolada para a execução do teste de aglutinação directa (DAT). O novo β -ME-ELISA foi comparado com um outro (TRYP-ELISA) onde se utilizaram parasitas similares mas tratados com tripsina. O β -ME-ELISA mostrou uma sensibilidade ligeiramente mais baixa ($29/31 = 93.5\%$) que o DAT ($31/31 = 100\%$) mas mais elevada do que o TRYP-ELISA ($27/31 = 87\%$) em cães com LVC confirmada. Na reacção a soros de cães com outras doenças, incluindo babesiose, erlichiose e doença de Chagas, o β -ME-ELISA revelou uma especificidade de 97.5% , o DAT de 100% e o TRYP-ELISA de 94.1% . Numa população endémica ($n=38$) suspeita de sofrer de LVC, os resultados obtidos com o β -ME-ELISA foram mais concordantes com os do DAT ($33/38 = 86.3\%$) do que com os do TRYP-ELISA ($27/38 = 71\%$).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os que foram obtidos num outro trabalho em que foi desenvolvido um teste similar mas para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos (Abass *et al.*, 2006).

Ainda, o antígeno de promastigotes intactos tratados com β -ME mostrou uma sensibilidade mais elevada no ELISA ($29/31 = 93.5\%$ ou $62/69 = 88.9\%$) do que o antígeno tratado com tripsina ($27/31 = 87.1\%$ ou $54/69 = 78.2\%$) se considerarmos respectivamente apenas os soros de cães com LVC confirmada ou estes e também os animais altamente suspeito de terem LVC.

Os resultados obtidos levam-nos a acreditar que esta técnica (β -ME-ELISA) deverá ser executada juntamente com o DAT na confirmação de LVC em laboratórios que disponham de facilidades limitadas.

INTRODUÇÃO

Apesar da sua eficácia no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), ocasionalmente, o teste de aglutinação directa (DAT) regista títulos marginais (1:80/1:160) em animais que não têm LVC. Recentes melhoramentos na realização do teste, incluindo a incorporação de β -mercaptoethanol (β -ME) no processamento do antígeno e de, ureia no diluente, de forma a promover a desnaturação de anticorpos aglutinantes não específicos, contribuíram para aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste (Harith *et al.*, 1995). É possível que, dada a natureza solúvel do antígeno normalmente empregue nos testes de ELISA, se encontrem algumas dificuldades que impeçam a reprodutibilidade do diagnóstico de LVC. Neste estudo, combinámos a utilização de antígenos superficiais de promastigotes favoravelmente modificados pelo β -ME e pela tripsina, tal como anteriormente realizado no DAT, com a utilização de imunoglobulinas definidas e descritas para ELISA, com o objectivo de otimizar ainda mais o diagnóstico de LVC em laboratórios com facilidades limitadas. Por outro lado, é possível que, através do desenvolvimento deste tipo de técnica se consiga uma maior sensibilidade de forma a resolver um dos problemas mais urgentes no diagnóstico da LVC: a deteção das formas assintomáticas da doença. Acreditamos que se dispusermos de uma ferramenta que permita um diagnóstico precoce eficaz é possível, com um tratamento rápido, menos tóxico e mais barato, atingir não só a remissão dos sintomas clínicos como ainda, possivelmente a cura parasitológica.

MÉTODOS

Estirpes e condições de cultura

Utilizou-se neste estudo, para o processamento de antígeno de DAT e de β -ME ELISA, uma estirpe de *Leishmania infantum*, MHOM/PT/01/MT387, isolado de um caso de leishmaniose visceral de Portugal, originária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, Lisboa, Portugal).

A estirpe foi mantida *in vitro* através de subcultura sucessiva de 7 a 8 dias de intervalo a 26°C no meio de infusão de fígado e triptose (LIT)/com hemin (Sadigursky e Brodskyn,

1986). A cultura em massa, de promastigotes, processou-se no mesmo meio (LIT) sem hemin, mas suplementada com 20% de soro fetal bovino, inativado pelo calor e 100 UI de penicilina ml^{-1} e 100 μg de estreptomicina ml^{-1} . A incubação de culturas fez-se a 26°C.

Animais e amostras: Foram incluídos neste estudos, soros (n=151) de cães domésticos, machos e fêmeas de várias raças e idades, provenientes de várias regiões. Foram distribuídos pelos seguintes grupos:

G1 - Trinta e um soros (n = 31) de cães confirmados com LVC dos quais 22 pertencentes ao Concelho de Évora (Évora, Portugal) em que a LVC foi diagnosticada por observação microscópica de lâminas com esfregaços do gânglio poplíteo, corados com Giemsa e 9 cedidos pela Unidade de leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal) e confirmados em cultura de NNN (ver referência bibliográfica).

G2 – Trinta e oito (n=38) soros de cães com sinais clínicos suspeitos de LVC e com título de DAT $\geq 1:320$, mas sem exame parasitológico realizado.

G3 – Quarenta e cinco (n=45) soros de cães com outras doenças que não LVC, dos quais 26 foram recolhidos na Campanha Anual de Vacinação Anti-rábica de 2010, no Concelho de Évora (Évora, Portugal), 16 colhidos de animais apresentados e diagnosticados no Hospital Veterinário da Universidade de Évora (Évora, Portugal) e 3 enviados do laboratório de Parasitologia e Imunologia, da Universidade de Campina Grande (Patos, Brasil). Os 45 soros pertenciam a animais que sofriam das seguintes infecções: desordens neoplásicas (n=12), dirofilariose (n=8), babesiose (n=4), ehrlichiose (n=3), tripanossomíase por *T.cruzi* (n=3), esgana (n=3), gastroenterite hemorrágica (n=2), problemas de pele (n=2), doença auto-imunitária (n=1), leptospirose (n=1), leucemia (n=1), conjuntivite (n=1), epilepsia (n=1), dipetalonemose (n=1), insuficiência respiratória (n=1) e toxocarose (n=1). Todos os soros destes animais registaram títulos negativos de DAT ($\leq 1:320$).

G4 – Trinta e sete soros (n=37) de cães saudáveis, negativos parasitológicamente e com títulos de DAT negativos ($\leq 1:320$).

Processamento dos antígenos e execução dos testes serológicos

O processamento de antígeno de DAT utilizado neste estudo fez-se de acordo com a versão melhorada anteriormente desenvolvida (Harith *et al.*, 1995). Resumindo, os promastigotes de uma estirpe de *L.infantum*, bem caracterizada e não virulenta, MHOM/PT/01/MT387, proveniente do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, Lisboa, Portugal) foram mantidos em meio de LIT com hemin (Sadigursky e Brodskyn, 1986). A cultura em massa, de promastigotes, processou-se no mesmo meio (LIT) sem hemin, mas suplementada com 20% de soro fetal bovino e antibióticos. Os promastigotes foram processados assim que a sua densidade populacional atingiu $2 \times 10^7/\text{ml}$. A cultura foi então centrifugada e lavada a $+4^\circ\text{C}$ em solução de Locke's e o "pellet" tratado com β -ME. Posteriormente os parasitas foram lavados e suspensos em Locke's suplementado com 2,5% de formaldeído. Após fixação, a suspensão foi colocada em solução de citrato salino e corada com 0.02 (w/v) de Coomassie Brilliant Blue. O antígeno foi depois submetido a um processo de filtração. Depois a suspensão foi lavada e resuspensa em 1,2%, (v/v) formaldeído/citrato salino 10 vezes concentrada (5×10^8 promastigotes ml^{-1}) e mantida em stock até utilizada a $+4^\circ\text{C}$.

O antígeno para o β -ME ELISA foi processado como anteriormente descrito para o DAT, com a excepção do passo de protocolo que incluía o corante Coomassie Brilliant Blue. O antígeno de promastigotes intactos foi fixo numa solução de 1,2% (v/v) formaldeído/citrato salino a $1,5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$. Como controlo, foi processada uma suspensão antigénica de promastigotes, da mesma forma, mas sem o tratamento com β -ME. Neste caso os promastigotes foram tratados com tripsina (Harith *et al.*, 1989) para execução do ELISA convencional, utilizando antígeno de DAT não corado.

O ELISA foi executado de acordo com os procedimentos descritos por Voller *et al.* (1980), utilizando antígeno de promastigotes intactos tratados com tripsina e separadamente, tratados com β -ME. Após a adição do substrato (5-AS) a reacção foi medida a um comprimento de onda de 490 nm num espetrofotómetro para microplacas de 96 poços (Spectra Count TM, Packard Bio Science Company, USA). As diluições das suspensões do antígeno tratado com β -ME e do antígeno tratado com tripsina foram feitas em tampão codificante carbonato/bicarbonato 0,06M pH = 9,6 de $1,5 \times 10^5$ até 5×10^7 promastigotes. Foram consideradas ótimas as concentrações antigénicas de $2,5 \times 10^6$ promastigotes por ml^{-1} , as diluições de soro de 1:100 e as diluições de conjugado (Rabbit anti-dog IgG peroxidase, Sigma®) de 1:1.000.

A determinação do ponto de corte da técnica de ELISA para os diferentes antígenos foi realizada na amostra de 37 animais saudáveis, negativos parasitologicamente e com títulos de DAT negativos para LVC, na titulação de 1:100. Para tanto, utilizou-se a equação $x + 3 \text{ SD}$, sendo x a média dos animais negativos e SD o desvio padrão deste mesmo grupo, tendo sido estipulado o ponto a partir da média da leitura das densidades ópticas de todas as amostras, acrescida de três desvios-padrões.

O DAT foi executado de acordo com o protocolo melhorado, utilizando 1:320 como título de corte (Harith *et al.*, 1995). Para confirmação ou exclusão de LVC, todas as amostras que apresentassem títulos marginais no DAT (1:160 – 1:320) foram retestadas após tratamento com 0,03 M de ureia.

Análise dos dados

A sensibilidade para cada um dos 3 testes (β -ME ELISA, TRYP-ELISA convencional e DAT) foi definida como a proporção de verdadeiros positivos correctamente identificados [positivos confirmados/(positivos confirmados + falsos negativos) X 100%]. A especificidade foi definida como a proporção de verdadeiros negativos correctamente identificados [negativos confirmados/(falsos positivos + negativos confirmados) X 100%]. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) e definido como índice de significância $p < 0,5$. O nível de correlação entre os testes foi determinado pelo cálculo do coeficiente de Pearson com Índice de Confiança (IC) de 95%. Para avaliar a concordância entre os diferentes antígenos e testes, calculou-se o índice Kappa de concordância, sendo $\kappa < 0,4$ aceite como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como concordância boa e $\kappa > 0,7$ como óptima.

RESULTADOS

O cut-off dos testes foi calculado com base nos resultados apresentados por 37 animais aparentemente saudáveis e com parasitologia negativa para LVC. Dessa forma, leituras de absorvância de $\geq 0,26$ e $\geq 0,44$ foram consideradas positivas, respectivamente para o β -ME-DAT e o TRYP-DAT.

De 31 casos de cães confirmados com LVC testados no β -ME-ELISA, 29 (93,5%) apresentaram valores de densidade óptica positivos, no intervalo de 0,26 – 0,59 (considerando exclusivamente a titulação de 1:100). Os dois soros negativos apresentaram densidade óptica de 0,21 e 0,25. Não se observaram reacções cruzadas em soros de animais saudáveis (n=37), contudo, em cães com outras condições clínicas que não LVC (n=45), 2 soros (um com tripanossomíase devido a *T.cruzi* e outro com uma dermatofitose devido a *Microsporium canis*) apresentaram valores de densidade óptica positiva, respectivamente 0,40 e 0,28. Assim podemos registar uma sensibilidade de 93,5% e uma especificidade de 97,5% para o β -ME-ELISA (Tabela 1).

De 31 casos de cães confirmados com LVC testados no TRYP-ELISA, 27 (87,1%) apresentaram valores de densidade óptica positivos, no intervalo de 0,44 – 0,83 (considerando, tal como anteriormente, apenas a titulação de 1:100). Os quatro soros negativos apresentaram densidades ópticas de 0,25, 0,30, 0,32 e 0,36. Não se observaram reacções cruzadas em soros de animais saudáveis (n=37), contudo, em cães com outras condições clínicas que não LVC (n=45), 4 soros (um com babesiose devido a *B.canis*, outro com *Dipetalonema spp.*, outro com uma dermatofitose devido a *Microsporium canis* e um com epilepsia) apresentaram valores de densidade óptica positiva, respectivamente 0,53 e 0,48 e os últimos dois com 0,57. Assim podemos registar uma sensibilidade de 87,1% e uma especificidade de 94,1% para o TRYP-ELISA.

Vinte e cinco (65,7%) dos 38 cães suspeitos de terem LVC que foram testados tanto com o β -ME como com o TRYP-ELISA, mostraram valores positivos. Oito soros (21,1%) foram positivos no β -ME-ELISA mas negativos no TRYP-ELISA. Dois (5,3%) foram positivos no TRYP-ELISA e negativos no β -ME-ELISA. Apenas 3 (7,9%) soros foram negativos em ambos os testes. A concordância entre os dois testes foi de 73,7%.

O DAT foi realizado nas amostras de todos os animais incluídos neste estudo (n=151) e o facto de ser recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como teste diagnóstico serológico “golden-standard” a par do teste rK-39 (Burns *et al.*, 1993), permitiu-nos que fizesse parte da definição do Grupo II (animais suspeitos de LVC devido ao facto de apresentarem sinais clínicos suspeitos e teste DAT \geq 1:320, apesar de não terem sido sujeitos a exame parasitológico). Assim foi possível calcular os níveis de sensibilidade dos dois ELISAs incluindo os grupos 1 e 2: 88,9% (62/69) para o β -ME-ELISA e 78,2% (54/69) para o TRYP-ELISA.

Se considerarmos apenas o resultado dos soros dos animais confirmados parasitologicamente, 2 amostras de LVC deram positivas no antígeno tratado com β -ME mas negativas com o antígeno tratado com tripsina. Através da comparação com o antígeno tratado com tripsina, o antígeno tratado com β -ME mostra uma sensibilidade relativamente maior para a detecção de LVC (93.5% versus 87.1%). Ao nível dos mesmos títulos de corte respectivos, ambas as preparações antigénicas deram valores de densidades óticas negativas (tratado com β -ME – 0,06/0,25 e tratado com tripsina 0,08/0,38) com todos os 37 soros de animais saudáveis testados, contudo o β -ME-ELISA apresentaria duas reacções cruzadas contra 4 reacções cruzadas do TRYP-ELISA em 45 amostras de outras doenças que não LVC, implicando uma especificidade superior para o β -ME-ELISA (97,5% de 80/82) do que para o TRYP-ELISA (94,1% de 78/82).

O β -ME-DAT foi utilizado como teste referência para as análises estatísticas e uma maior correlação foi obtida entre o β -ME ELISA (0,866) do que entre o TRYP-ELISA (0,752) A concordância estabelecida foi óptima para os dois antígenos testados, sendo que o β -ME-ELISA alcançou valores de 0,867 ($p < 0,05$) e o TRYP-ELISA 0,743 ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1: Concordância e correlação entre resultados obtidos com β -ME DAT, β -ME ELISA e TRYP-ELISA em 151 amostras de cães com diferentes perfis imunológicos.

Teste	Teste Estatístico	β -ME-DAT	β -ME ELISA	TRYP-ELISA
β-ME-DAT	Concordância*	1	0,866	0,743
	Correlação**	1	0,867	0,752
β-ME-ELISA	Concordância*	0,866	1	0,713
	Correlação**	0,867	1	0,716
TRYP-ELISA	Concordância*	0,743	0,713	1
	Correlação**	0,752	0,716	1

* Concordância calculada com o coeficiente Kappa.

** Correlação de Pearson.

Tabela 2: Distribuição dos resultados do β -ME-ELISA quando comparados aos resultados do β -ME-DAT.

Título DAT	Número de amostras β -ME-ELISA com absorvância de:			Nº de indivíduos
	$\leq 0,10-0,25$	$0,26-0,52$	$0,53-0,82$	
<10-160	80	2	0	82
320-1.280	2	3	1	6
2.560->10.240	5	50	8	63
Total	87	55	9	151

Tabela 3: Distribuição dos resultados do TRYP-ELISA quando comparados aos resultados do β -ME-DAT.

Título DAT	Número de amostras TRYP-ELISA com absorvância de:			Nº de indivíduos
	$\leq 0,10-0,43$	$0,44-0,88$	$0,89-0,95$	
<10-160	78	04	0	82
320-1.280	06	0	0	06
2.560->10.240	09	51	3	63
Total	93	55	3	151

DISCUSSÃO

Vários antígenos têm sido utilizados para diagnosticar a LVH (Rhalem *et al.*, 1999). Em geral, a purificação destes antígenos requer equipamentos sofisticados e muito tempo para a sua preparação. Também, algumas investigações têm apontado uma baixa especificidade em testes serológicos feitos com antígenos em crude, especialmente no teste ELISA (Ashford *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2002; Salotra, 2002; Lira *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). Como possíveis razões para os baixos índices obtidos nos testes estão a diversidade de estirpes de *Leishmania* descritas, o grande número de proteínas de superfície nos parasitas do antígeno crude, bem como, a possibilidade de reações cruzadas devido à heterogeneidade das preparações antigénicas. A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA: Dot-ELISA, FML-ELISA, BSM-ELISA, FAST-ELISA, micro

ELISA, entre outras (Cabrera *et al*, 1999; Nurit – Rachamin and Jaffe ,1988; Hockmeyer *et al*, 1984; Ashford *et al.*, 1993; Pappas *et al.*, 1984). Abass *et al.* (2011) ao combinar o uso de um antígeno modificado pelo tratamento com β -mercaptoethanol, similar ao utilizado no DAT, e um conjugado de anti-imunoglobulina humana obtiveram resultados muito encorajadores ao avaliar um painel de doentes portadores e não portadores de LVH, sendo registados índices de 93,3% para sensibilidade e 90,4% de especificidade. Numa tentativa de desenvolver um teste similar para amostras canina, obtivemos uma sensibilidade de 93,5% e uma especificidade de 97,5% para o β -ME-ELISA.

Para comparação do β -ME-ELISA, as mesmas amostras foram testadas com o TRYP-DAT que apresentou valores de sensibilidade de 87,1% e especificidade de 94,1%. Os resultados obtidos com o antígeno tripsinado são inferiores aos encontrados por Lima *et al.* (2010) que obteve 100% de sensibilidade e 91,2% de especificidade. Rosário *et al.* (2005) em testes realizados com ELISA com antígeno total de *L. chagasi*, em animais serologicamente positivos para LVC, obteve sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Por outro lado, Reithinger *et al.* (2002) apresenta um valor ainda menor (81%) para a sensibilidade do teste ELISA, recorrendo neste caso a um antígeno recombinante. De fato, a especificidade e sensibilidade de diferentes métodos dependem de vários fatores. Um deles, bastante importante, é sem dúvida a natureza do antígeno utilizado para o teste (Mohammed *et al*, 1985; Singh and Sivakumar, 2003).

Entre as possíveis deficiências que geralmente se encontram quando se aplica o diagnóstico pelo método ELISA está a possibilidade de encontrar reacções cruzadas, sobretudo se, utilizando antígeno total (Gontijo e Melo, 2004), bem como a modificação dos índices de sensibilidade em decorrência do curso da infecção (Quinnell *et al.*, 2001). No β -ME-ELISA desenvolvido neste estudo encontrámos duas reacções cruzadas, uma com *Trypanosoma cruzi* e outra com *Microsporium canis*. Vários autores relatam reacções cruzadas ao desenvolverem testes ELISA para diagnóstico de LVC: Mancianti *et al.*, 1995 relata reacções cruzadas com *Dirofilaria immitis* e *cryptococcus spp.* Também são frequentes os relatos de reacções cruzadas com *Babesia canis* (Rosário *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2009; Marcondes *et al.*, 2011), *Ehrlichia canis* (Fisa *et al.*, 1997; Ferreira *et al*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009), *Neospora caninum* (Mettler *et al.*, 2005), *Toxoplasma gondii* (Coelho *et al.*, 2009; Marcondes *et al.*, 2011),

Leptospira interrogans (Porrozzi *et al.*, 2007) e *Trypanosoma cruzi* (Rosario *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2009; Marcondes *et al.*, 2011).

Com o intuito de estabelecer uma melhor análise e interpretação dos resultados dos testes de ELISA, utilizámos como teste de suporte diagnóstico um DAT com antígeno modificado com β -ME. Este teste apresentou óptimos índices de sensibilidade e especificidade (100%) e como esta técnica é uma das recomendadas pela Organização Mundial de Saúde como teste diagnóstico serológico confiável e seguro (WHO, 2010), decidimos calcular novos níveis de sensibilidade e especificidade para os dois ELISAs, utilizando para os cálculos todos os grupos de cães testados. Com isso, o β -ME-ELISA obteve 88,9% de sensibilidade e 97,5% de especificidade. E o TRYP-ELISA obteve 78,2% de sensibilidade e 94,1% de especificidade. Os melhores índices de especificidade do β -ME-ELISA pode ser justificado pelo uso do β -ME no tratamento das formas promastigotas de *Leishmania* (Santos *et al.*, 1991) e coincide com os resultados obtidos no teste desenvolvido para a leishmaniose visceral humana (Abass *et al.*, 2006).

Quando analisamos a distribuição dos resultados do β -ME-ELISA e TRYP-ELISA em comparação ao β -ME-DAT (tabela 2 e tabela 3) podemos concluir que os menores valores de densidade ótica são observados em relação aos menores títulos do DAT (<1:320), ao passo que altos títulos (1:2.560-1:10.240) tendem a apresentar valores de densidade ótica mais altos, para ambos os antígenos, indicando uma boa correlação dos testes. Esta constatação foi confirmada por análises estatísticas e obteve-se uma maior correlação com o β -ME-ELISA (0,866) do que com o TRYP-ELISA (0,752). A concordância estabelecida para os dois antígenos testados, foi óptima, sendo que, o β -ME-ELISA alcançou valores de 0,867 ($p < 0,05$) e o TRYP-ELISA 0,743 ($p < 0,05$).

Ao longo dos 2 meses de armazenamento (a +4°C), a reactividade do antígeno fixo em formaldeído manteve-se estável. Utilizando as mesmas “batches” de antígeno tratado com β -ME e tripsina, obtiveram-se valores comparáveis de densidade ótica nos dias 0, 30, 45 e 60 em todas as 31 amostras (G1) de LVC (resultados não mostrados). Da mesma forma observou-se uma “performance” consistente, mas no campo negativo (<0,26 e <0,44) nos 37 soros não-LV dos animais aparentemente saudáveis (grupo 4). O exame microscópico das espécimes de antígeno tratado com β -ME e tripsina após 60 dias de armazenamento revelou uma morfologia normal dos promastigotes e uma suspensão antigénica homogénea.

Os altos valores de especificidade e sensibilidade demonstrados neste estudo pelo β -ME-ELISA pode ser atribuída ao efeito favorável provocado pelo β -ME na superfície dos promastigotas. O número irrelevante de reacções cruzadas, o potencial para detectar infecções precoces, a facilidade de execução e a possibilidade de analisar um grande número de amostras, torna este β -ME-ELISA um teste de triagem promissor para o diagnóstico de LVC, quiçá também em animais assintomáticos.

Agradecimentos

Os autores estão agradecidos ao Dr. A. J. Flor Ferreira, Veterinário Municipal da Câmara Municipal de Évora, pela sua colaboração nos trabalhos de campo; á Prof. Dr. Lénea Campino, Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Lisboa, Portugal por ter disponibilizado a estirpe MHOM/PT/01/MT387; ao Dr. Henk Schallig, do laboratório de Investigação Biomédica do “Royal Tropical Institute” (KIT), Amesterdão, Holanda, por ter fornecido o antígeno liofilizado TRYP-DAT; á Dr^a Cesaltina Pires, Departamento de Gestão da Universidade de Évora, Évora, Portugal por ter auxiliado na aplicação da análise estatística e aos clínicos veterinários do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, Évora, Portugal. O segundo autor, foi financiado pelo contrato C2008-UE/ICAAM05 como investigador contratado ao abrigo do Programa Ciência 2009 da Fundação Ciência e Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal.

Referências Bibliográficas

- Abass, E.M., Mansour, D., Mutasim, M., Hussein M. and AE Harith. (2006). β -Mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Med.Microbiol.*, **55**: 1193-1196.
- Abass, E.M., Mahamoud, A., Mansour, D., Mohebali, M. and AE Harith. (2011). Validation of a β -ME- ELISA for detection of anti *Leishmania donovani* antibodies in Eastern Sudan diagnosis of visceral leishmaniasis. *Iran J.Immunol.*, **58**(3): 150-158.
- Ashford, D.A., Badaro, R., Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalis, M.G. and J.R. David (1993). Studies on the controlo f visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test – Enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISATM) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **48**(1):1-8.
- Cabrera, G.P., Silva, V.O., Costa, R. T. and Genaro O. (1999) The fucose mannose ligant-Elisa in the diagnosis and prognoses of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*; **61**:296-301.
- Carvalho, F.A.A; Charest, H.; Tavares, C.A.P.; Matlashewski, G.; Valente, E.P.; Rabello, A.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P. (2002) Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **43**(4):289-295.

- Coelho, E.A.F., Ramírez, L., Costa, M.A.F., Coelho, V.T.S., Martins, V.T., Chavez-Fumagalli, M.A., Oliveira, D.M., Tavares, C.A.P., Bonay, P., Nieto, C.G., Abanades, D.R., Alonso C. and M. Soto. (2009). Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin. Vacc.Immunol.*, **16**(12): 1774-1780.
- Ferreira, E.C., Lana, M., carneiro, M., reis, A.B., Paes, D.V., Silva, E.S., Schallig, H. and C.M.F. Gontijo (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet.Parasitol.*, **146**: 235-241.
- Fisa, R., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Valls, D., Serra, T., Colmenares, M., Castillejo, S. and M. Portús (1997). Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J.Vet.Invest.*, **9**:50-55.
- Gontijo, C.M.F. and M.N. Melo. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, **7**(3).
- Harith, A. E., Slappendel, R.J., Reiter, I., Van Knappen, F., De Korte, P., Huigen, E. and A. H. J. Kolk. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**:2252–2257
- Harith, A.E., Chowdhury, S., Al-Masum, A., Semião-Santos, S.J., Karim, E., El Safi, S and I. Haque (1995). Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1984-1988.
- Hockmeyer, W.T., Welde, B.T., Sabwa, C.L.A. (1984) Complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann Trop Med Parasitol* ; **78**:489-93.
- Lima, V.M.F., Fattori, K.R., Michelin, A.F., Neto L.S. and R.O. Vasconcelos (2010). Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*, **173**: 330-333.
- Lira, R.A., Cavalcanti, M.P., Nakazawa, M., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Abath, F.G.C., Alves, L.C., Souza W.V. and Y.M. Gomes (2006). Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos Kits. *Vet. Parasitol.*, **137**: 11-16.
- Mancianti, F., Falcone, M.L., Gianelli C. and A. Poli (1995). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet.Parasitol.*, **59**: 13-21.
- Marcondes, M., Biondo, A.W., Gomes, A.A.D., Silva, A.R.S., Vieira, R.F.C., Camacho, A.A., Quinn, J. and Chandrashekar R. (2011). Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet. Parasitol.*, **175**: 15-19.
- Mettler M., grimm, F., Capelli, G., Camp, H. and P. Deplazes (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic infections in dogs. *J.Clin.Microbiol.*, **43**(11): 5515-5519.
- Mohammed, E. A., Wright, E. P., Kager, P. A., Laarman, J.J. , Pondman, K.W. (1985). ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala azar. *Trans.R.Soc. Trop.Med. Hyg.* **79**,344–350.
- Nurit – Rachamin S. and C.L. Jaffe. (1988). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **85**:503-8.
- Pappas, M.G., Hajkowski, R. R., Cannon, L. T., Hockmeyer, W. T. (1984). Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot - Elisa): comparison with standard Elisa and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, **14**:239 – 49
- Pinheiro, P.H.C., Pinheiro, A.N., Ferreira, J.H.L., Costa, F.A.L., Katz, S. and C.L. Barbieri. (2009). A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* as na antigen

for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet.Parasitol.*, **162**: 32-39.

Porrozzi, R., Costa, M. V. S. da , Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G., Jr. (2007). 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. Vacc. Immunol.*, **14**: 544-548.

Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A. and C. Dye (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol.*, **122**(3):253-261.

Reithinger, R., Quinnell, R.J., Alexander B. and C.R. Davies (2002). Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using a immunochromatographic dipstick test, Enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. *J.Clin.Microbiol.*, **40**(7):2352.

Rhalem A., Sahibi H., Guessous-Idrissi N., Lasri S., Natami A., Riyad M. and Berrag B. (1999) Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* **81**:173-184.

Rosário, E.Y., Genaro, O., França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B. and M. Carneiro (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem.Inst.Osw.Cruz*, **100**(2): 197-203.

Sadigursky M. and C.I. Brodskyn (1986). A new liquid medium without blood and serum for cultivation of hemoflagelates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**: 942-944.

Salotra, P., Sreenivas, G., Nasim, A.A. Subbaraju, B.V, and V. Ramesh (2002) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis with crude or recombinant k39 antigen. *Clin Vaccine Immunol.*, **9**(2): 370-373.

Santos ,M-A. M. de, Andrade, P.P., Andrade, C. R. de, Padovan, P. A and W de Souza, W. (1991) Effect of trypsin and 2-mercaptoethanol on the exposure of sugar residues on the surface of *Leishmania donovani chagasi*. *Parasitol Res.*, **77**(7):553-7.

Singh, S. and R. Sivakumar (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* **49**, 55–60.

Voller, A., Bidwell, D. and A. Barlett. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay. In *Manual of Clinical Immunology*, pp. 359-371. Edited by N. Rose and H. Friedman. Washington, DC. American Society for Microbiology.

WHO (2010). Control of the leishmaniasis. Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. ISBN: 0512 – 3054.

PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES PREVISTAS

Do presente trabalho de mestrado resultarão as seguintes publicações:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

- Veloso, L.B., Semião-Santos, S.J., Andrade, P.P., Melo, M.A., Martins, L., Marinho, Almeida, J.A. and A.E. Harith (2012) Um β Mercaptoethanol ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. (a submeter).
- Semião-Santos, S.J. Veloso, L.B., Andrade, P.P., Melo, M.A., Martins, L., Marinho, A.A., Almeida, J.A., Campino, L. and A.E. Harith (2012). Comparação entre um teste DAT com antígeno aquoso tratado com β -Mercaptoethanol e um antígeno liofilizado tratado com Trypsina no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (a submeter).

Comunicações em painel (poster)

- Veloso, L.B., Semião-Santos, S.J., Andrade, P.P., Melo, M.A., Martins, L., Marinho, Almeida, J.A. and A.E. Harith. (2012) UM β Mercaptoethanol ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. VIII Congresso Hospital Veterinário de Montenegro, 11 e 12 de Fevereiro/2012.
- Semião-Santos, S.J. Veloso, L.B., Andrade, P.P., Melo, M.A., Martins, L., Marinho, A.A., Almeida, J.A., Campino, L. and A.E. Harith (2012) Comparação entre um teste DAT com antígeno aquoso tratado com β -Mercaptoethanol e um antígeno liofilizado tratado com tripsina no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. VIII Congresso Hospital Veterinário de Montenegro, 11 e 12 de Fevereiro/2012.

ANEXOS

ANEXO I

1. Solução de tampão carbonato (pH 9,6)

Carbonato de sódio -5,3 g

Hidrogenocarbonato de sódio -4,186 g

Água destilada -1000 ml

2. Solução de Locke

Glicose – 0,25% (p/v)

NaCl– 0,9% (p/v)

KCl – 0,04% (p/v)

CaCl₂ – 0,02 (p/v)

NaHCO₃- 0,02 (p/v)

3. Solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,2)

Cloreto de sódio -8 g

Di-hidrogenofosfato de potássio - 0,2 g

Hidrogenofosfato de sódio dodeca-hidrato - 2,8 g

Cloreto de potássio -0,2 g

Água destilada (q.s.p.) 1000 ml

4. Solução PBS/Tween 20 (PBS/T)

Tween 20 - 0,5 ml

PBS (q.s.p.) 1000 ml

5. Solução para diluição dos soros e dos conjugados

Leite em pó desnatado Molico®- Nestle

PBS/T (q.s.p.) 100 ml

6. Solução tampão de citrato/fosfato (pH 4)

Ácido cítrico -1,05 g

Hidrogenofosfato dissódico - 0,71 g

Água destilada (q.s.p.) 100 ml

7. Meio LIT (*Liver Infusion Triptose*)

NaCl- 4.0 g

KCl- 0.4 g

Na₂HPO₄- 8.0 g

Triptose- 5.0 g

Infusão de fígado- 5.0 g

H₂O destilada -880 mL

Soro Fetal Bovino- 100 mL

Hemoglobina de sangue bovino- 20 mL

8. Tampão Substrato

5-As purificado- 1 µg por mL

Ajustar o pH para 5,95

Manter a -20 °C

Nota: Antes de adicionar esta solução à placa, acrescentar 2 µL de H₂O₂ 10% por cada mL da solução.

ANEXO II

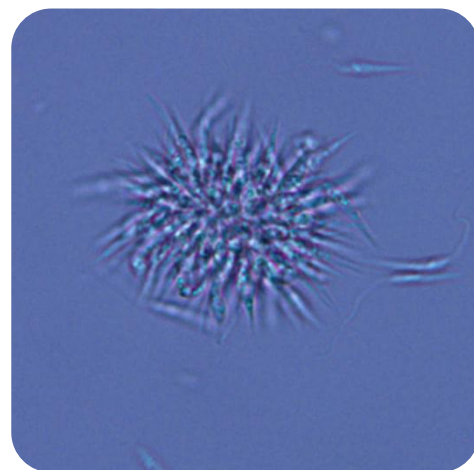
PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* MHOM/PT/01/IMT387

1.Material:

- 1.1. Meio LIT.
- 1.2. Soro de bovino fetal (SBF) (Gibco BRL, 10108).
- 1.3. Solução de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL, 15070).
- 1.4. Promastigotas da estirpe *L. infantum* MHOM/PT/01/IMT387 (Estirpe isolada de um paciente com leishmaniose visceral e co-infectado com HIV), fornecidas pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa/ Portugal.

2.Execução:

- 2.1. Assegurar condições de esterilidade.
- 2.2. A 850 ml de LIT adicionar 150 ml de SBF e 10.000 U de penicilina/10 mg de estreptomicina.
- 2.3. Seguidamente, adicionar 50 ml de suspensão celular de promastigotas em fase estacionária (10^9 promastigotas/ml) a 950 ml do meio acima descrito.
- 2.4. Acompanhar o crescimento da cultura através de microscopia óptica e quando as leishmanias estiverem predominantemente com formas alongadas e for constante a visualização de rosetas das promastigotas na cultura.
- 2.4. Após 7-8 dias de incubação a 26-27°C e agitação constante as promastigotas são recolhidas por centrifugação a 10.000 g (4°C).
- 2.5. Lavar 3 vezes em solução de LOCKE (Anexo I).
- 2.6. Iniciar a preparação do antígeno para o β -ME-ELISA e β -ME DAT, conforme anteriormente descrito.



Formas promastigotas de *Leishmania infantum*, microscopia óptica, aumento de 40 x. Formação de rosetas de parasitas.

ANEXO III

PROTOCOLO DO TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRECTA (DAT) COM SORO DE CÃO*

Material:

1. Preparação do antígeno

1.1. Antígeno de *Leishmania* liofilizado. Cada frasco contém 5 ml de antígeno liofilizado (KIT Biomedical Research, Amsterdam) com uma concentração parasitária de 5×10^7 promastigotas de *L. donovani* (MHOM/SD/68/1S)/ ml. Adicionar 5 ml de solução salina fisiológica (0,9% NaCl p/v [Sigma, S 1649]) ao antígeno. Deixar o antígeno à temperatura ambiente, durante 5 min, antes de utilizar. Mexer ligeiramente o antígeno sem agitar.

1.2. Antígeno de *Leishmania* em solução: A concentração do antígeno foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ promastigotas de *Leishmania infantum* MHOM/PT/01/IMT387/ mL. O antígeno foi deixado à temperatura ambiente e homogeneizado suavemente antes de utilizado na preparação das placas.

2. **Diluyente sérico.** Solução fisiológica (0,9 g de NaCl [Sigma, S 1649] em ml de H₂O destilada), contendo 0,2 M 2-mercaptoetanol (1,56 ml de 2-mercaptoetanol [Sigma, M 6250] em 100 ml de solução fisiológica) e 1% de SFB.

2.3. Placas de microtitulação com fundo cónico (Greiner, 96K, V-form, 651101).

2.4. Micropipetas e pontas.

3. Execução:

3.1. Encher cada um dos poços da 2ª coluna do lado esquerdo da placa com 90 µl do diluyente sérico; e todos os outros com 50 µl também do mesmo diluyente.

3.2. Adicionar 10 µl de soro ou de eluato de papel filtro (conforme a seguir) (Semião Santos *et al.*, 1996).

a cada um dos poços com 90 µl do líquido de diluição. Com uma pipeta homogeneizar (3 vezes) o soro diluído a 1:100 e tirar 50 µl para o próximo poço à direita na mesma linha. Homogeneizar (3 vezes) e transferir 50 µl para o poço seguinte. Repetir até o fim

da linha. Os poços da 1ª coluna são utilizados como controlos negativos, adicionando-se apenas 50 µl do líquido de diluição.

3.3. Incubar a 37°C durante 1 h.

3.4. Adicionar 50 µl do antígeno diluído a cada um dos poços (incluindo os da 1ª coluna) e percutir, com cuidado, todos os lados da placa.

3.5. Deixar à temperatura ambiente, durante 18 h, em superfície plana e horizontal.

3.6. Pontos azuis compactos são considerados resultados negativos, enquanto que círculos azuis difusos são considerados resultados positivos. O título limite é o recíproco da última diluição de soro que ainda revela aglutinação, comparada com o controlo negativo.

Fonte: Adaptado de KIT Biomedical Research, Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, Nederland.



Fonte: Semião-Santos, S. J. 1996. PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

ANEXO IV

PROTOCOLO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM SORO CANINO

1.Revestimento das placas

- Preparar o antígeno para uma concentração de $2,5 \times 10^6/\text{mL}$,
- Adicionar 100 μL da diluição a todos os poços da placa (Nunc-Immuno MaxiSorp Surface, 439454), excepto ao poço A1 (controle Branco)
- Cobrir as placas com película aderente e mantê-las a 4°C durante 18 h,
- Rejeitar o conteúdo dos poços da placa e lavar 3 vezes com PBS /T e seca-las.

2.Bloqueio

- Adicionar a cada poço 100 μL de uma solução de 5% (p/v) de leite em pó desnatado em solução tampão de fosfato (PBS)/Tween (PBS/T) pH 7,2 (Anexo I),
- Incubar a 37°C, em câmara húmida, durante 1 h,
- Rejeitar o conteúdo dos poços da placa,
- Lavar 3 vezes com PBS/T (3 min cada lavagem) e secar as placas.

3.Soro

- Adicionar 100 μL da diluição do soro em solução de 1% (p/v) de PBS/T + 5% leite em pó desnatado, (ANEXO I), em duplicata.
- Na linha 1, colocar os controlos positivo e negativo.
- Incubar a 37°C, em câmara húmida, durante 1 h.
- Lavar 3 vezes com PBS/T (3 min cada lavagem) e secar as placas.

4.Conjugado

- Adicionar 100 μL da diluição do conjugado rabbit anti-dog IgG peroxidase (em PBS/T, na diluição de 1:1.000,
- Incubar a 37°C, em câmara húmida, durante 1 h.
- Lavar 3 vezes com PBS/T (3 min cada lavagem) e secar as placas.

5. Revelação

- Preparar 100 ml de tampão de citrato/fosfato pH 4 (Anexo I).
- Preparar o Tampão Substrato- 5-ácido acetilsalicílico (5-AS) (Anexo I).
- Preparar água oxigenada a 10% em tudo coberto com papel de alumínio .

- Para cada placa, num tubo envolvido em papel de alumínio, misturar: 10 ml de tampão citrato/fosfato + 50 µl de solução de PBS/T com 5% de leite em pó desnatado + 20 µl de água oxigenada a 10%.
- Adicionar 100 µl da solução a cada poço.
- Incubar a placa a 37°C, durante 30 min, envolta em papel de alumínio.

6. Leitura

- Ligar o leitor de ELISA (Multiskan) 10 min antes da operação de leitura.
- Utilizar o comprimento de onda de 492 nm.

Anexo V

Abaixo seguem os resultados de todas as amostras com os variados testes executados:

Grupo 1 (n=31) - Soros de Animais parasitologicamente positivos para LVC						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME ELISA	TRYP-ELISA
3L	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,28	0,80
1121	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,33	0,51
2646	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,59	0,48
2584	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,27	0,58
2677	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,40	0,63
3234	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,30	0,32
3291	Esfregaço +	Assintomático	5.120	>10240	0,37	0,78
3600	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,42	0,49
2480	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,46	0,76
2579A	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,37	0,66
105P	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,46	0,46
2092	Esfregaço +	Assintomático	2.560	>10240	0,38	0,25
2662	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,25	0,62
P31	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,35	0,49
705	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,47	0,82
728	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,21	0,60
105	Esfregaço +	Sintomático	>10240	>10240	0,47	0,81
IHMT 01	NNN Cultura +	Sintomático	2.560	160	0,30	0,60
IHMT 02	NNN Cultura +	Assintomático	>10240	>10240	0,33	0,71
IHMT 04	NNN Cultura +	Assintomático	>10240	>10240	0,29	0,74
IHMT 05	NNN Cultura +	Assintomático	>10240	1.280	0,28	0,77
IHMT 06	NNN Cultura +	Assintomático	5.120	>10240	0,32	0,73
IHMT 10	NNN Cultura +	Assintomático	>10240	>10240	0,27	0,54
IHMT 13	NNN Cultura +	Sintomático	>10240	>10240	0,26	0,77
IHMT 14	NNN Cultura +	Assintomático	>10240	>10240	0,30	0,65
IHMT 19	NNN Cultura +	Sintomático	>10240	>10240	0,38	0,30
3377	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,31	0,55
P28	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,31	0,56
P29	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,28	0,83
1262	Esfregaço +	Assintomático	>10240	>10240	0,26	0,77
1766	Esfregaço +	Assintomático	2.560	80	0,30	0,36

Conversão dos resultados para valores binários, onde 1=positivo e 0=negativo.

Grupo 1 (n=31) - Soros de Animais parasitologicamente positivos para LVC						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME ELISA	TRYP-ELISA
3L	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1121	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2646	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2584	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2677	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
3234	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
3291	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
3600	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2480	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2579A	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
105P	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2092	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
2662	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	0,00	1,00
P31	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
705	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
728	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	0,00	1,00
105	Esfregaço +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 01	NNN Cultura +	Sintomático	1,00	0,00	1,00	1,00
IHMT 02	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 04	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 05	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 06	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 10	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 13	NNN Cultura +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 14	NNN Cultura +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 19	NNN Cultura +	Sintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
3377	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
P28	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
P29	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1262	Esfregaço +	Assintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1766	Esfregaço +	Assintomático	1,00	0,00	1,00	0,00

G2 (n=38): Soros de animais suspeitos de LVC mas sem exame parasitológico						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
994	-	Sintomático	1.280	1.280	0,27	0,40
1004	-	Sintomático	2.560	640	0,37	0,70
1653	-	Sintomático	>10240	>10240	0,20	0,82
2582	-	Sintomático	5.120	2.560	0,16	0,75
1009	-	Sintomático	>10240	>10240	0,29	0,76
10	-	Sintomático	>10240	320	0,27	0,80
O	-	Sintomático	>10240	>10240	0,30	0,54
Q	-	Sintomático	2.560	320	0,35	0,78
490	-	Sintomático	2.560	640	0,37	0,40
1056	-	Sintomático	1.280	80	0,27	0,39
1774	-	Sintomático	5.120	80	0,35	0,42
2411	-	Sintomático	>10240	2.560	0,42	0,68
2480	-	Sintomático	>10240	>10240	0,31	0,73
CA 30P	-	Sintomático	>10240	2.560	0,31	0,78
CA 30A	-	Sintomático	5.120	5.120	0,31	0,73
1678P	-	Sintomático	>10240	1.280	0,26	0,83
P 46	-	Sintomático	>10240	>10240	0,31	0,78
668	-	Sintomático	2.560	320	0,31	0,73
HV 03	-	Sintomático	>10240	>10240	0,52	0,98
HV 04	-	Sintomático	>10240	>10240	0,27	0,85
4	-	Sintomático	>10240	1.280	0,45	0,63
1678	-	Sintomático	>10240	1.280	0,34	0,83
HV 05	-	Sintomático	>10240	>10240	0,15	0,20
HV 06	-	Sintomático	1.280	160	0,29	0,41
HV 07	-	Sintomático	320	160	0,20	0,18
HV 08	-	Sintomático	640	80	0,25	0,19
HV 09	-	Sintomático	1.280	20	0,59	0,32
HV 11	-	Sintomático	2.560	40	0,30	0,75
HV 13	-	Sintomático	>10240	>10240	0,82	0,76
IHMT 11	-	Sintomático	2.560	1.280	0,26	0,27
3325	-	Sintomático	>10240	>10240	0,44	0,80
301	-	Sintomático	>10240	2.560	0,65	0,60
303	-	Sintomático	>10240	>10240	0,74	0,79
304	-	Sintomático	>10240	>10240	0,70	0,95
349	-	Sintomático	>10240	2.560	0,56	0,95
351	-	Sintomático	5.120	320	0,27	0,41
352	-	Sintomático	>10240	>10240	0,78	0,70
356	-	Sintomático	>10240	>10240	0,54	0,54

Conversão dos resultados para valores binários, onde 1=positivo e 0=negativo.

G2 (n=38): Soros de animais suspeitos de LVC mas sem exame parasitológico						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
994	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
1004	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1653	-	Sintomático	1,00	1,00	0,00	1,00
2582	-	Sintomático	1,00	1,00	0,00	1,00
1009	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
10	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
O	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
Q	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
490	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
1056	-	Sintomático	1,00	0,00	1,00	0,00
1774	-	Sintomático	1,00	0,00	1,00	0,00
2411	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
2480	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
CA 30P	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
CA 30A	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1678P	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
P 46	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
668	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
HV 03	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
HV 04	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
4	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
1678	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
HV 05	-	Sintomático	1,00	1,00	0,00	0,00
HV 06	-	Sintomático	1,00	0,00	1,00	0,00
HV 07	-	Sintomático	1,00	0,00	0,00	0,00
HV 08	-	Sintomático	1,00	0,00	0,00	0,00
HV 09	-	Sintomático	1,00	0,00	1,00	0,00
HV 11	-	Sintomático	1,00	0,00	1,00	1,00
HV 13	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
IHMT 11	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
3325	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
301	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
303	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
304	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
349	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
351	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	0,00
352	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00
356	-	Sintomático	1,00	1,00	1,00	1,00

Grupo 3 (n=45)- soros de animais portadores de outras doença e parasitologicamente negativos para LVC						
Amostra	Parasitologia	Doença	β-ME DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
CA 01	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	20	10	0,12	0,14
CA 02	Esfregaço -	Discordem Neoplásica	20	20	0,13	0,19
CA03	Esfregaço -	Dirofilariose	20	20	0,17	0,17
CA 04	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	10	20	0,22	0,30
CA 06	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	<10	10	0,12	0,12
CA 07	Esfregaço -	Babesiose	20	20	0,23	0,53
CA 10	Esfregaço -	Dirofilariose	40	20	0,17	0,10
CA 12	Esfregaço -	Conjunctivite	20	20	0,14	0,15
CA 15	Esfregaço -	Esgana	10	10	0,11	0,08
CA 17	Esfregaço -	Esgana	20	20	0,24	0,14
CA 21	Esfregaço -	Toxocaríose	40	80	0,16	0,16
CA 24	Esfregaço -	Disordem Neoplásica	20	20	0,16	0,18
CA 25	Esfregaço -	Esgana	10	40	0,21	0,19
CA 27	Esfregaço -	Disordem Neoplásica	10	10	0,13	0,17
CA31	Esfregaço -	Babesiose	10	10	0,18	0,18
CA 36	Esfregaço -	Babesiose	20	10	0,18	0,18
CA 40	Esfregaço -	Dipetalonemose	<10	<10	0,19	0,48
CA 42 a	Esfregaço -	Dirofilariose	40	40	0,18	0,18
CA 42 b	Esfregaço -	Dirofilariose	10	10	0,18	0,19
CA 50	Esfregaço -	Ehrlichiose	40	40	0,20	0,16
CA 51	Esfregaço -	Ehrlichiose	40	40	0,16	0,13
CA 53	Esfregaço -	Dirofilariose	10	20	0,16	0,11
CA 55	Esfregaço -	Desordem de pele	<10	10	0,12	0,13
CA 56	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	<10	10	0,13	0,17
CA 57	Esfregaço -	Doença Pulmonar	20	20	0,19	0,21
CA 58	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	10	20	0,13	0,14
CA 60	Esfregaço -	Leucemia	10	20	0,16	0,26
CA 61	Esfregaço -	Desordem cutânea	40	40	0,28	0,57
CA 65	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	<10	10	0,19	0,19
CA 68	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	<10	20	0,18	0,17
CA 69	Esfregaço -	Dirofilariose	20	10	0,21	0,33
CA 70	Esfregaço -	Dirofilariose	10	10	0,17	0,20
CA 71	Esfregaço -	Babesiose	10	10	0,17	0,25
CA 73	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	10	10	0,18	0,19
CA 74	Esfregaço -	Desordem do Sistema Nervoso	10	10	0,23	0,57
CA 75	Esfregaço -	Ehrlichiose	20	10	0,16	0,14
CA 76	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	10	10	0,16	0,18
CA 77	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	10	20	0,18	0,33
CA 78	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	10	10	0,13	0,15
CA 79	Esfregaço -	Dirofilariose	160	10	0,14	0,15
CA 80	Esfregaço -	Leptospirose	<10	<10	0,14	0,15
PAN	Esfregaço -	Lupus erytrematosus	10	10	0,14	0,18
F- 01	Esfregaço -	Trypanosomíase	80	80	0,40	0,39
15.3	Esfregaço -	Trypanosomíase	80	80	0,22	0,20
02.4	Esfregaço -	Trypanosomíase	10	10	0,23	0,31

Conversão dos resultados para valores binários, onde 1=positivo e 0=negativo.

Grupo 3 (n=45)- soros de animais portadores de outras doença e parasitologicamente negativos para LVC						
Amostra	Parasitologia	Doença	β-ME DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
CA 01	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 02	Esfregaço -	Discordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA03	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 04	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 06	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 07	Esfregaço -	Babesiose	0,00	0,00	0,00	1,00
CA 10	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 12	Esfregaço -	Conjunctivite	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 15	Esfregaço -	Esgana	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 17	Esfregaço -	Esgana	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 21	Esfregaço -	Toxocaríose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 24	Esfregaço -	Disordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 25	Esfregaço -	Esgana	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 27	Esfregaço -	Disordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA31	Esfregaço -	Babesiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 36	Esfregaço -	Babesiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 40	Esfregaço -	Dipetalonemoe	0,00	0,00	0,00	1,00
CA 42 a	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 42 b	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 50	Esfregaço -	Ehrlichiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 51	Esfregaço -	Ehrlichiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 53	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 55	Esfregaço -	Desordem de pele	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 56	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 57	Esfregaço -	Doença Pulmonar	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 58	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 60	Esfregaço -	Leucemia	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 61	Esfregaço -	Desordem cutânea	0,00	0,00	1,00	1,00
CA 65	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 68	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 69	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 70	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 71	Esfregaço -	Babesiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 73	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 74	Esfregaço -	Desordem do Sistema	0,00	0,00	0,00	1,00
CA 75	Esfregaço -	Ehrlichiose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 76	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 77	Esfregaço -	Desordem Neoplásica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 78	Esfregaço -	Gastroenterite Hemorrágica	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 79	Esfregaço -	Dirofilariose	0,00	0,00	0,00	0,00
CA 80	Esfregaço -	Leptospirose	0,00	0,00	0,00	0,00
PAN	Esfregaço -	Lupus erytrematosus	0,00	0,00	0,00	0,00
F- 01	Esfregaço -	Trypanosomiase	0,00	0,00	1,00	0,00
15.3	Esfregaço -	Trypanosomiase	0,00	0,00	0,00	0,00
02.4	Esfregaço -	Trypanosomiase	0,00	0,00	0,00	0,00

Grupo 4 (n=37): Amostras de cães aparentemente saudáveis e negativos parasitologicamente para LVC						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
R 12	Esfregaço -	Assintomático	40	10	0,13	0,24
4P	Esfregaço -	Assintomático	80	20	0,25	0,33
4 L	Esfregaço -	Assintomático	20	80	0,13	0,21
5 L	Esfregaço -	Assintomático	20	80	0,11	0,18
3000	Esfregaço -	Assintomático	80	20	0,13	0,16
54 NICE	Esfregaço -	Assintomático	80	40	0,12	0,20
11 NICE	Esfregaço -	Assintomático	80	40	0,13	0,20
636	Esfregaço -	Assintomático	40	40	0,12	0,23
18150G	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,07	0,14
18383	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,08	0,16
CA	Esfregaço -	Assintomático	20	20	0,08	0,19
276	Esfregaço -	Assintomático	10	10	0,08	0,19
277	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,11	0,18
551	Esfregaço -	Assintomático	40	10	0,10	0,19
553	Esfregaço -	Assintomático	80	10	0,20	0,11
1450	Esfregaço -	Assintomático	20	40	0,11	0,32
1454	Esfregaço -	Assintomático	20	20	0,09	0,35
1455	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,18	0,20
1460	Esfregaço -	Assintomático	80	40	0,25	0,22
2113	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,13	0,13
A	Esfregaço -	Assintomático	40	40	0,14	0,33
B	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,10	0,19
C	Esfregaço -	Assintomático	40	10	0,11	0,12
D	Esfregaço -	Assintomático	40	20	0,11	0,13
F	Esfregaço -	Assintomático	<10	20	0,09	0,11
I	Esfregaço -	Assintomático	40	20	0,16	0,16
J	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,10	0,18
S	Esfregaço -	Assintomático	40	10	0,10	0,22
R 3	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,06	0,08
R 6	Esfregaço -	Assintomático	20	10	0,07	0,15
R 7	Esfregaço -	Assintomático	10	10	0,06	0,09
2798	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,07	0,16
2806	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,07	0,15
2780	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,06	0,14
3168	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,07	0,25
3265	Esfregaço -	Assintomático	<10	10	0,07	0,13
N	Esfregaço -	Assintomático	80	10	0,25	0,38

Conversão dos resultados para valores binários, onde 1=positivo e 0=negativo.

Grupo 4 (n=37): Amostras de cães aparentemente saudáveis e negativos parasitologicamente para LVC						
Amostra	Parasitologia	Sintomatologia	β-ME-DAT	TRYP-DAT	β-ME-ELISA	TRYP-ELISA
R 12	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
4P	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
4 L	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
5 L	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
3000	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
54 NICE	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
11 NICE	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
636	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
18150G	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
18383	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
CA	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
276	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
277	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
551	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
553	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
1450	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
1454	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
1455	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
1460	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
2113	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
A	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
B	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
C	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
D	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
F	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
I	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
J	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
S	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
R 3	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
R 6	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
R 7	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
2798	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
2806	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
2780	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
3168	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
3265	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00
N	Esfregaço -	Assintomático	0,00	0,00	0,00	0,00

Resultados Estatísticos de Correlação (Pearson) e Concordância (Kappa) utilizando o programa SPSS

Resultados da Análise Estatística de Correlação (Pearson) entre β -ME-DAT e TRYP-DAT.

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,935	,011	32,293	,000 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,903	,018	25,597	,000 ^c
N of Valid Cases		151			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Resultados da Análise Estatística de Concordância (Kappa), utilizando valores binários, entre β -ME-DAT e TRYP-DAT.

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,879	,039	10,877	,000
N of Valid Cases		151			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Resultados da Análise Estatística de concordância (Kappa) e correlação (Pearson), utilizando conversão dos resultados para valores binários, entre β -ME-DAT e TRYP-ELISA.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,752	,052	13,907	,000 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,752	,052	13,907	,000 ^c
Measure of Agreement	Kappa	,743	,054	9,235	,000
N of Valid Cases		151			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Resultados da Análise Estatística de concordância (Kappa) e correlação (Pearson), utilizando conversão dos resultados para valores binários, entre β -ME-DAT e β -ME -ELISA.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,867	,040	21,257	,000 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,867	,040	21,257	,000 ^c
Measure of Agreement	Kappa	,866	,041	10,656	,000
N of Valid Cases		151			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.