



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

EDENEIDE MARIA XAVIER

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ABORDAGEM DIAGNÓSTICA
BASEADA EM UM NANOCOMPÓSITO PARA A LEISHMANIOSE
VISCERAL**

**RECIFE
2014**

EDENEIDE MARIA XAVIER

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ABORDAGEM DIAGNÓSTICA
BASEADA EM UM NANOCOMPÓSITO PARA A LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de doutor em Genética.

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Coorientadores: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

RECIFE

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Xavier, Edeneide Maria

Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a Leishmaniose visceral/ Edeneide Maria Xavier. – Recife: O Autor, 2014.

82 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Coorientadores: Sinval Pinto Brandão Filho e Milena de Paiva Cavalcanti

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Leishmaniose visceral I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador) II. Brandão Filho, Sinval Pinto (coorientador) III. Cavalcanti, Milena de Paiva (coorientadora) IV. Título**

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-67

EDENEIDE MARIA XAVIER

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ABORDAGEM DIAGNÓSTICA
BASEADA EM UM NANOCOMPÓSITO PARA A LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. Valéria Pereira Hernandes
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães**

**Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães**

**Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães**

**RECIFE
2014**

O amor é o que move os sonhos, e quando se tem uma base sólida com uma família que te sustenta, nossos sonhos tornam-se realidade. Dedico esse trabalho aqueles me ensinaram o significado do verdadeiro amor e que me permitem sonhar todos os dias, minha mãe (*in memoriam*), meu pai, irmãos e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Deus, na sua infinita sabedoria, nos guias dia após dia, e é através dos caminhos que ele nos apresenta, que temos o prazer de alcançar grandes realizações, por isso agradeço todos os dias ter essa fé inabalável, pois é dela que vem a vontade de lutar e seguir sempre em frente.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, Dr. Valdir Albino e Dr. Sinval Brandão Filho, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança e apoio ao longo do doutorado.

Não poderia deixar de agradecer de forma especial à Dra. Milena Paiva, pelo empenho em me ajudar, pela sua disposição em me aceitar aos “45 minutos do segundo tempo” como coorientadora. De verdade, não tenho palavras para dizer o quanto isso significou para mim, o meu muito obrigada.

Tenho muito a agradecer a Renata Santos, Kyldman, Rayana e Sergio Paiva, pois de fato sem eles não teria sido possível terminar esse trabalho, o meu muito obrigada pelo apoio e acima de tudo pela amizade construída ao longo desse percurso, obrigada pela ajuda e pela atenção sempre dispensada, para vocês meu eterno carinho.

Agradeço ao Dr. Celso Melo, por ter aberto as portas do departamento de física para que esse trabalho pudesse ser concretizado.

À CAPES e a FACEPE pela concessão das bolsas, assim como pelo suporte financeiro ao nosso projeto de pesquisa.

Agradeço a minha família pelo apoio constante pelo incentivo, em especial a meus pais que sempre se sacrificaram para poder nos dar o melhor e nos ensinar que sempre é possível. Obrigada a meus irmãos pelas mãos constantemente estendidas, e sei que se nos for permitido nascer e morrer tantas vezes, iremos estar no mesmo caminho uns dos outros como irmãos e com os mesmos pais.

Muito do que aprendi nesse longo caminho da pesquisa foi através dos ensinamentos do Dr. Frederico Abath (*in memoriam*); se hoje estou nessa trilha muito vem da sua entrega como orientador e principalmente como amigo, sei que onde quer que ele esteja estará feliz por essa minha conquista.

Um agradecimento especial à Dra. Maria Edileuza, pela amizade, companheirismo e ajuda constante, de coração obrigado por tudo.

Queria agradecer ao Dr. Roberto Werkhause, Dra. Yara, Dra. Mércia, Dra. Silvia Montenegro, Dra. Haiana, pela amizade, ensinamento e incentivo ao longo desses anos de convívio.

Em nosso caminho Deus põe amigos que são como anjos sem asas, e esses acabam por se tornarem pessoas ímpares e que estarão sempre ao nosso lado para vida toda mesmo que não habitando o mesmo espaço geográfico, porque amizade vai além de kms, quando se é verdadeira ela vai além da vida. O meu muito obrigada à, Lilian, Patrícia Furtado, Renata, Michelyne Faria, Kaly, Fabiana, Rosana, Kirte, Mary, Simone, Mineo, Eduardo, Clarice, Janaina Miranda, Joelma Souza, Giselle Campozana, Keyla, Marcelo Paiva, Duschinka Ribeiro, Andrea Rangel, Rosane Andrade, Fábio Brayner, Luiz Carlos, Sheila, Tereza Cristina, Marise, Valéria, Tereza Magalhães, Alice Varjal, Claudia Fontes, Débora Tavares, Luiza, Kátia, Waldemir, Mariana Mesel, Flávia Melo, Neidinha, Obrigada pela amizade incondicional, pelo abrigo em momentos difíceis e o carinho sublime.

Fala-se que amigos a gente não conhece, os reconhece, e ao longo desses anos, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, eu só tenho a agradecer pelas grandes amizades aqui construídas, amizades essas que sei que levarei para sempre comigo, e vocês amigos moram em mim, pois no nosso dia a dia traçamos caminhos que convergiram para uma amizade verdadeira e duradora. Agradeço todos os dias por ter vocês na minha vida: Bruna, Andréia, Gabriela, Laís, Juliana Falcão, Juliana Lima, Heidi, Márcia Schneider, Aline, Klarissa, Marcelinha, Léo, Romero e André.

Não poderia deixar de agradecer aos grandes amigos feitos durante o doutorado, amigos esses que em muitos momentos nos desdobrávamos juntos arduamente, durante as disciplinas, ou então em simples momentos de descontração de belos

sorrisos e ajuda mutua, em especial a Felipe Lira, Jamima, Anna Carolina, Mariana Andrade, Lívia Alves, Rosanny Holanda, Georgia e Mariana Marques.

Durante essa fase do doutorado fiz certas viagens a congressos e cursos, onde tive o prazer de conhecer pessoas especiais que hoje posso dizer que, apesar da distância estão em meu coração e considero como amigos, Raquel Filet, Carolina Cunha, Caroline Gonçalves, Thiago Belinato, Juliana Rodrigues, Ana Luiza, Felipe Andrade, Juliana Bezerra.

Um agradecimento a todos que fazem o Laboratório de Imunoparasitologia, o meu muito obrigada pela amizade e incentivo: Vanessa, Júnior, Pietra, Filipe, Luciana, Leo, Thiago, Ericka, Juliana Viana, Rômulo, Andrea, Kamila, Fernando, Debora, Lays, Suenia e os demais.

Um agradecimento especial ao Dr Carlos Henrique Nery, Dr Vladimir Costa e Teresinha Farias da Universidade Federal do Piauí, pela doação de amostras de pacientes com LV.

Muito obrigada ao Departamento de Genética, em nome de seus professores e funcionários, em especial à Professora Neide Santos.

E a todos os amigos do Aggeu Magalhães, os quais não dá para colocar todos aqui o meu muito obrigado pela amizade e carinho durante todos esses anos de convívio e amizade.

Nenhuma grande descoberta foi feita jamais
sem um palpite ousado.

Isaac Newton

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é na atualidade considerada um grave problema em saúde pública no mundo, e quando não tratada rapidamente pode levar a morte. A busca por diagnósticos rápidos e precisos vem sendo cada vez mais alvo de pesquisas. Existe uma variedade de testes para detecção da *Leishmania*, os quais envolvem os testes sorológicos, parasitológicos e moleculares. Todos apresentam certas limitações, busca por testes rápidos e sensíveis vem sendo cada vez mais estudadas. O teste ELINOR é baseado na utilização de nanopartículas magnéticas fluorescente híbridos, o qual produz um sinal de luminescência, que é facilmente visualizado em microscópio de fluorescência, em baixas concentrações de DNA ou de RNA, sem a necessidade de amplificação do material genético, antes de ser testado. O objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho do teste ELINOR, assim como sua sensibilidade e especificidade, frente a alguns testes para o diagnóstico da LV. Foram analisadas um total de 100 amostras (humanos e cães) previamente diagnosticada com LV, e 63 amostras de (humanos e cães) como controle. As amostras de humanas foram submetidas a testes (cultura, IT-Leish, PCR, qPCR) as de cães apenas a PCR, qPCR e em seguida todas submetidas ao teste ELINOR com a utilização das sondas LINF 1b. Os resultados em humanos mostram uma acurácia de 90,2%, sensibilidade de 94,2% e especificidade de 88,3%. Em cães a sensibilidade foi de 79,4%, especificidade de 93,3%, e uma acurácia de 86,5%. Levando-se em consideração todas as amostras (cães + humanos), a sensibilidade foi de 87,3 %, a especificidade 89,8 %, e a acurácia de 88,9%. Comparando esses resultados com os encontrados na literatura, observa-se que tanto a sensibilidade quanto a especificidade do Teste ELINOR são equivalentes a resultados obtidos por outros testes usados para o diagnóstico da LV. Este estudo indica que possivelmente um sistema de diagnóstico rápido baseado na luminescência exacerbada de origem inorgânica/orgânica (“ELINOR”, do acrônimo em inglês) identificada nos compósitos PANI/AuNPs pode ser bastante promissora, tendo em vista que o teste ELINOR detectou de forma rápida e específica a presença de DNA do patógeno em material biológico, revelando-se assim uma boa plataforma para o desenvolvimento de testes moleculares simples e de baixo custo.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Diagnóstico; Teste ELINOR

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is nowadays considered a world public health problem and if not treated rapidly can lead to death. The search for rapid and precise diagnosis became the goal of many researches. There is a variety of tests for leishmaniasis detection, those related to serological, parasitological and molecular detections. All present certain limitations and the search for sensitive and rapid tests are more and more studied. The ELINOR test is based on magnetic fluorescent hybrid nanoparticles, which produce a luminescent sign easy to visualize under fluorescent microscope in low concentrations of DNA and RNA with no necessity of amplification of the genetic material before tested. The aim of this study was evaluate the performance of ELINOR test, as well as its sensibility and specificity, comparing to some other leishmaniasis tests. A hundred samples from human and dogs, previously diagnosed as LV, and 63 samples as control were used as control. Human samples were submitted to (culture, IT-Leish, PCR, qPCR) and dog samples were submitted to PCR and qPCR only, secondly all the samples were submitted to ELINOR test, using Linf 1b probes. The results in humans show a accuracy of 90,2%, 94,2% sensibility de 94,2% and 88,3% specificity. In dogs sensibility was 79.4%, specificity 93.3%, and accuracy 86.5%. Considering all samples (dogs + humans), the sensibility was 87,3%, specificity 89,8%, and accuracy 88,9%. Comparing these results to those found in the literature, it was observed that considering sensibility and specificity, ELINOR test results are equivalent to results presented by the ones found in the literature, it was observed that either sensibility or specificity of ELINOR test are equivalent to results obtained by other tests for LV diagnosis. The present work indicates that possibly a rapid diagnosis system based on luminescence from organic/non organic origin (ELINOR, in english) identified in the composites PANI/AuNPS can be very promissor as the ELINOR test rapidly and specifically detected the presence of the pathogen DNA.

Key words: Visceral leishmaniasis, Diagnosis, ELINOR test

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no mundo	19
Figura 2:	Ciclo de vida do parasita	22
Figura 3:	Diagrama de blocos de um biossensor.	40
Figura 4:	Modelo geral para sensor de DNA baseado em polímeros condutores	42
Figura 5:	Microscopia de Fluorescência (20x) do Teste ELINOR realizadas em pacientes suspeita de LV	58
Gráfico 1:	Curva ROC da análise das amostras de indivíduos com LV	59
Figura 6:	Microscopia de Fluorescência (20x) do Teste ELINOR realizadas em cães suspeita de LV	61
Gráfico 2:	Curva ROC da análise das amostras de cães com LV.	62
Gráfico 3:	Curva ROC da análise de todas as amostras do ensaio ELINOR (humanos e cães).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos de diagnósticos utilizado para detecção da LV	38
Tabela 2	Resultados dos diferentes testes diagnósticos (Exame direto, RIFI, Cultura e RK39) dos pacientes portadores de Leishmaniose visceral	57
Tabela 3	Resultados de testes :PCR e qPCR, para cães suspeitos de LV.	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
°C	Graus Celsius
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
kDNA	DNA do cinetoplasto
EDTA	<i>Edtilenodiamino tetra-acético</i>
ELINOR	Luminescência exacerbada de origem inorgânica/orgânica
ELISA	<i>Ensaio imunoenzimático</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
IC	Intervalo de confiança
IT-LEISH	O teste imunocromatográfico rápido
kg	Quilograma
Kit	Conjunto diagnóstico
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
min	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
NTC	<i>Non template control</i> (Controle negativo)
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	PCR Quantitativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SUS	Sistema Único de Saúde
TRALD	Teste Rápido Antígeno para <i>Leishmania donovani</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Aspectos epidemiológicos - Leishmaniose visceral	19
2.2 Agente etiológico e Ciclo de vida	20
2.3 Manifestações Clínicas	23
2.4 Diagnóstico	25
2.4.1 Testes Parasitológicos	25
2.4.2 Testes Imunológicos	26
2.4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	27
2.4.2.2. Teste de Aglutinação Direta (DAT)	28
2.4.2.3 Fast Agglutination Screening Test (FAST)	28
2.4.2.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	29
2.4.2.5 rK39-ICT	30
2.4.2.6 TraLd	31
2.4.2.7 kalar-azer Detect [®] e IT- LEISH [®]	32
2.4.3 Métodos Moleculares – PCR	33
2.4.3.1 PCR Convencional	33
2.4.3.2 PCR em tempo Real	36
2.4.3.3 LAMP - Amplificação Isotérmica Mediada por Ciclo	37
2.4.4. Teste ELINOR	39
2.5 Avaliação e Validação de testes diagnósticos	43
3. OBJETIVOS	47
3.1.1 Geral	47
3.1.2 Específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1.1 Caracterização do estudo	48
4.1.2 Amostragem	48
4.1.3 - Pacientes Humanos	48
4.1.4 - Cães	49
4.2 Definição de casos e controles	49

4.3 Testes Parasitológico e sorológicos	49
4.4 Diagnóstico molecular	50
4.4.1 Extração do DNA	50
4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).	50
4.4.3 PCR em tempo real (qPCR)	51
4.5 Teste ELINOR	51
4.5.1 a Preparação dos substratos:	51
4.5.1 b. Preparação das nanopartículas:	52
4.5.2 Silanização de lâminas de vidro	53
4.5.3 Preparação das amostras para análise por microscopia de fluorescência:	53
4.6. Análise dos dados	54
4.7 Aspectos Éticos	55
5. RESULTADOS	56
5.1 Humanos	56
5.2 Análise dos experimentos em Cães	60
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	73
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade de grande importância na saúde pública, apresentando altas taxas de incidência e ampla distribuição geográfica no Mundo e, de forma particular, no Nordeste do Brasil. Esta doença pode levar à morte quando assume as formas mais graves. Na atualidade vem se buscando métodos diagnósticos mais precisos e eficazes que possibilitem uma confirmação mais rápida da doença.

Atualmente o diagnóstico precoce é um grande desafio, porque o tratamento é, na maioria das vezes, baseado em suspeita clínica, uma vez que, os métodos diagnósticos existentes ainda são pouco eficazes. Recentemente, diversas pesquisas no campo da nanotecnologia, em especial na área de polímeros condutores na confecção de biossensores, vêm tendo bons resultados na sua utilização para diagnósticos de várias doenças.

Estudos há muito já vem demonstrando a existência de uma forte afinidade elétrica entre polímeros condutores catiônicos e cadeias de DNA. Assim as cadeias poliméricas constituintes dos nanocompósitos (CNMPC) carregadas positivamente, tendem a se ligar com os grupos fosfatos, de carga negativa, que encontram-se presentes na região externa das cadeias de DNA, tornando-se assim uma grande ferramenta para o reconhecimento da presença de patógenos.

O teste ELINOR (luminescência exacerbada de origem inorgânica/orgânica “ELINOR”, do acrônimo em inglês), é baseado no uso de nanopartículas fluorescentes, preparadas a partir de nanocompósitos híbridos (óxido metálicos/polímeros condutores), que permitem identificar certos compósitos denominados CNMPC, usados como biomarcadores. A grande vantagem desta associação é a intensidade do sinal de luminescência exibido e detectado em

microscópio de fluorescência em baixas concentrações de DNA ou RNA, sem amplificação prévia pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou equivalente, do material genético a ser testado.

Diante da importância das leishmanioses para a saúde pública e das inovações apresentadas pela nanotecnologia, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do teste fluorescente ELINOR para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos Epidemiológicos - Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em 98 países, cuja mortalidade anual é estimada em mais de 58.000 óbitos, onde 400 mil novos casos são notificados anualmente. Desses, cerca de 90% são registrados na Índia, Bangladesh, Sudão, Brasil e Etiópia (Figura 1). Nas Américas, 12 países já relataram casos autóctones de LV, sendo que cinco destes notificaram em 2012 um total de 3.231 casos, sendo o Brasil o país que concentra a grande maioria (~96,5%) dos casos (OPAS/WORD, 2012). Segundo o Ministério da Saúde, a LV inicialmente tinha um caráter rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Casos autóctones são notificados em pelo menos 21 estados da Federação, distribuídos nas cinco regiões (Alvar *et al.*, 2012; Brasil, 2014).

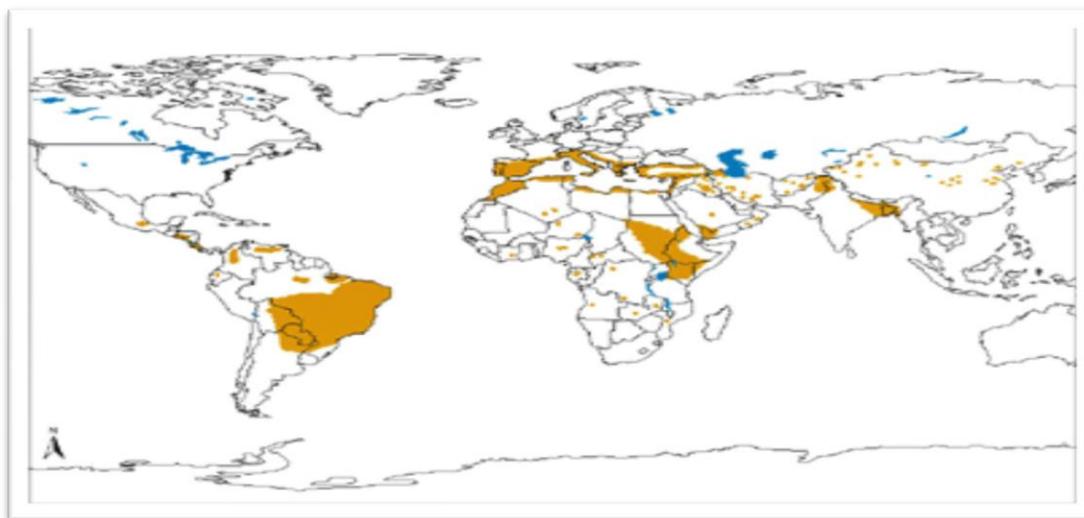


Figura 1: Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Antigo e Novo mundo.
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010.

No Brasil, houve um aumento no número de casos de LV ao longo das últimas décadas, com uma média anual de 3.484 casos entre 2000-2010 e uma alta taxa de letalidade tem-se observado, variando de 3,2 a 8,5% neste período (Brasil, 2011a; b).

A LV é endêmica em Pernambuco, mas apesar dessa região apresentar um quadro de ampla distribuição geográfica, principalmente na década de 1990, ainda observa-se poucos estudos epidemiológicos realizados durante esses anos (Dantas Torres, 2005; Dantas Torres, 2006). Já foram registrados casos na região Agreste, nos municípios de Altinho, Caruaru, Riacho das Almas, São Caetano e Surubim, onde se observa um número significativo de casos. No Sertão, também foram notificados casos nas cidades de Salgueiro e Petrolina (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2005).

2.2 Agente etiológico e Ciclo de vida

A LV é uma zoonose que, quando não tratada, pode evoluir para a forma crônica e conseqüentemente levar a óbito em 90% dos casos. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, as quais estão inclusas duas espécies: *L. (Leishmania) donovani* e *L. (Leishmania) infantum*, dependendo da região geográfica (Camargo *et al.*, 2007). A literatura mostra uma certa divergência em relação à utilização do nome específico *L. chagasi* para designar o agente etiológico da LV nas américas. Estas controvérsias estão relacionadas com a origem da doença no Novo Mundo (Mauricio, 2000. Dantas –Torres, 2006;).

Vários autores sugerem que *L. chagasi* e *L. infantum* são idênticas, tendo sido introduzidas nas Américas durante o processo de colonização portuguesa e espanhola; já outros afirmam que a *L. chagasi* já era encontrada no Continente

Americano muito antes do processo de colonização europeia (Rioux *et al.*, 1990; Killick-Kendrick, 1985; Lainson e Rangel, 2005; Dantas-Torres, 2006; Elkhoury *et al.*, 2008).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório em decorrência da alta susceptibilidade à infecção, ao intenso parasitismo cutâneo e a presença nas residências, servindo assim como fonte de infecção para os vetores ali presentes. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor, o qual faz parte da família Psychodidae, conhecido popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No ciclo enzoótico silvestre, a cadeia de transmissão envolve a raposa (*Cerdocyon thous*) como reservatório primário e possivelmente outros mamíferos silvestres, tais como o marsupial *Didelphis albiventris*, no qual *L. longipalpis* também é o principal vetor conhecido (Shaw *et al.*, 1989; Sherlock *et al.*, 1984; Brasil, 2014; Quinnell e Courtenay, 2009; Xavier-Gomes, *et al.* 2009).

O ciclo de vida da LV é bastante complexo, heteroxênico, no qual se alternam dois estágios distintos, envolvendo vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados. O ciclo se inicia quando as fêmeas se alimentam do sangue de um hospedeiro infectado e passam a ingerir as formas amastigotas do parasito, as quais depois de várias transformações no tubo digestivo do inseto transformam-se em formas promastigotas metacíclicas. O tempo de desenvolvimento do parasito no vetor é, em média, de 8 a 20 dias. Essas formas promastigotas (forma infectante do parasito) podem ser eliminadas durante o repasto sanguíneo para um novo hospedeiro. Nesse novo hospedeiro, essas formas são fagocitadas por macrófagos, no interior dos quais se diferenciam em amastigotas e se multiplicam

reiniciando o ciclo, como mostra a Figura 2. (Killick-Kendrick, 1990; Marzochi, 1992; Ashford, 1996).

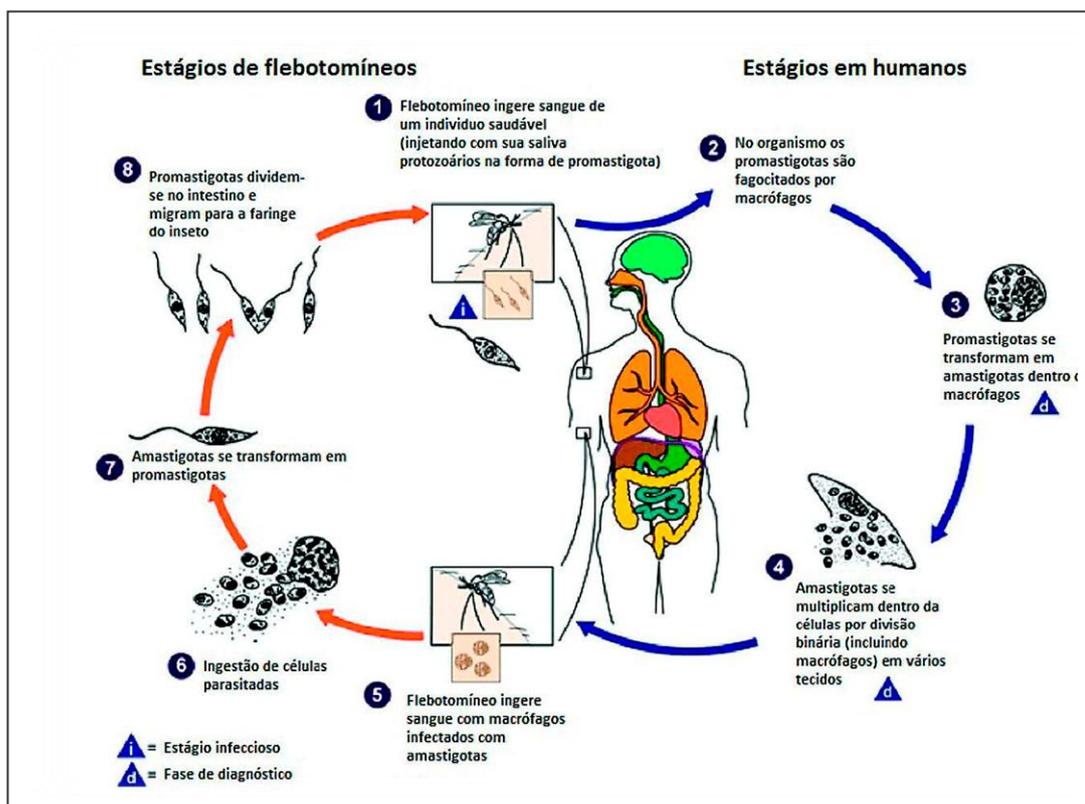


Figura 2: Ciclo de vida do parasito

Fonte: Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, 2013.

A transmissão da LV no Brasil é predominantemente associada à *L. longipalpis* ou *L. cruzi*. Alguns autores acreditam que a transmissão na população canina pode ocorrer também através da ingestão de carrapatos infectados, como também através de mordeduras, cópula e ingestão de vísceras contaminadas. Todos esses achados, no entanto, ainda não apresentam evidências epidemiológicas mais consistentes para uma melhor confirmação desses mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia. Não se observa transmissão direta da LV de pessoa a pessoa, mas nos últimos anos o que vem se observado é o crescimento cada vez mais de transmissão por

compartilhamento de agulhas entre os usuários de drogas e de indivíduos infectados com HIV, acidentes com perfuro cortante, transfusão sanguínea e transmissão congênita (Aranha-Campos, 2003; Genaro, 2003; Brasil, 2007).

Nos últimos anos, tem-se observado que a LV apresenta uma letalidade bastante acentuada, passando de 3,6%, em 1994, para 6,7% em 2003, com um incremento de 85%, e para 8,4% em 2004. Portanto fica cada vez mais evidente a necessidade da busca por um método diagnóstico rápido e que contribua para a redução da mortalidade que essa enfermidade apresenta quando não tratada rapidamente (Alvarenga *et al.*, 2010).

2.3 Manifestações clínicas

A infecção no homem pela *Leishmania (L.) infantum* caracteriza-se por um amplo espectro clínico, os quais tendem a variar desde manifestações discretas (oligossintomáticas), moderadas e graves, até as assintomáticas, onde não aparece evidência de manifestações clínicas. Já no cão essas manifestações são observadas de maneira lenta e início insidioso (Brasil, 2014).

Os cães doentes, por sua vez, estão classificados em: cães assintomáticos, nos quais não se observam sinais clínicos; cães oligossintomáticos, nesses constata-se a presença de adenopatia linfóide, emagrecimento e pelagem opaca. Nos cães sintomáticos, é observado todos ou alguns sinais mais comuns da doença tais como alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose, ceratoconjuntivite) e paresia dos membros posteriores (Brasil, 2006).

A LV é caracterizada clínica e laboratorialmente, cujos principais sintomas são febre irregular de longa duração, hepatoesplenomegalia, perda de peso,

pancitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Estes sintomas podem ser confundidos com outros tipos de enfermidade, tais como malária, a esquistossomose, toxoplasmose hepatoesplênica, a salmonelose septicêmica prolongada, as doenças linfoproliferativas, a endocardite bacteriana subaguda, a brucelose, a febre tifóide, dentre outros (Alencar *et al.*, 1991; Gonçalves *et al.*, 1986).

A ocorrência da doença é mais comum em crianças de faixa etária menor que 10 anos, tendo em vista que a imunidade duradoura passa a se desenvolver com a idade, portanto é bem provável que a maior incidência de doença e de óbito no grupo de menor idade dependa da maior suscetibilidade à infecção e da depressão da imunidade observada nesta faixa etária (Queiroz *et al.*, 2004).

No Brasil, a LV clássica é observada em pessoas de todas as idades, mas estudos indicam que, em áreas endêmicas, 80% dos casos registrados são encontrados em grupos de crianças. Outro fator importante é que em alguns focos urbanos existe uma tendência para possíveis alterações relacionadas a distribuição dos casos por grupo etário, onde se observa uma incidência elevada em grupo de adultos jovens (Silva *et al.*, 2001).

Segundo Baneth e Solano-Gallego (2012), a LV é crônica em cães e pode afetar qualquer órgão ou tecido desse hospedeiro; e, em decorrência dos numerosos mecanismos patogênicos envolvidos, é observado que a manifestação clínica é bastante variada e na maior parte dos casos é inespecífica. É importante ressaltar que por se tratar de uma doença de notificação compulsória, a LV apresenta características clínicas de evolução grave, o diagnóstico precisa ser feito rapidamente e de forma precisa (Brasil, 2006).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico para a detecção de *Leishmania infantum* torna-se complexo uma vez que existe uma grande variedade de sinais clínicos bastante semelhantes aos de outras enfermidades. Além disso, ainda existe a dificuldade do acesso da população em geral a testes que sejam bastante sensíveis e específicos (Quinnell *et al.*, 2013).

O Ministério da Saúde (MS) recomenda que, para que ocorra a redução da mortalidade da LV, é necessário um diagnóstico precoce para dá início imediato ao tratamento. De acordo com as medidas implantadas pelo Programa de Vigilância e Controle da LV Nacional, no diagnóstico se faz necessário a identificação do parasito em um esfregaço ou cultura e / ou teste sorológico positivo em pacientes com febre e aumento do baço (Moura, *et al.*, 2012). Os testes para detecção da *Leishmania infantum* podem ser testes parasitológicos, imunológicos ou moleculares.

2.4.1 Testes parasitológicos

O teste padrão-ouro (*gold standard*) para LV é a observação do parasito em esfregaços obtidos de punção esplênica, medula óssea e linfonodos. O material retirado do baço é mais sensível para a detecção do parasito, no entanto tem um maior risco durante a coleta. Esses procedimentos são extremamente invasivos e por isso exigem profissionais bem treinados, assim como locais apropriados para a coleta; tais métodos, desde que seguidos rigorosamente, evitam que os diagnósticos sejam concluídos apenas com base na observação de critérios clínicos e epidemiológicos (Brasil, 2003, Quinnell *et al.*, 2013).

É observado que a cultura também apresenta as mesmas dificuldades que a microscopia, uma vez que esses testes utilizam amostras obtidas através de procedimento também invasivos, podendo produzir variações na sensibilidade, deve a processo de contaminação por outros microrganismos, além de necessitar de profissional experiente, bem como ser uma técnica demorada e de alto custo (Srivastava *et al.*, 2011).

Os métodos parasitológicos apresentam uma alta especificidade, cerca de 100%, no entanto a sensibilidade é bastante variável uma vez que a distribuição dos parasitos não se apresenta de forma homogênea no mesmo tecido. A literatura já demonstrou uma sensibilidade de 98% quando se utiliza aspirado do baço (Gontijo e Melo, 2004).

Uma alternativa visando melhorar a sensibilidade é baseada na inoculação do material de punção de fígado, baço e medula óssea em hamsters (*Mesocricetus auratus*), para fazer o isolamento do parasito. No entanto esse procedimento esbarra em algumas limitações tais como: custo elevado, tempo para execução e mesmo com os constantes avanços de novas tecnologias o cultivo *in vivo* ainda é muito bem empregado (Brasil, 2006).

As técnicas imunohistoquímicas também oferecem algumas vantagens, para aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas, uma vez que apresentam facilidades na execução e alto grau de contraste entre os parasitos e as células hospedeiras (Tafari *et al.*, 2004).

2.4.2 Testes Imunológicos

Na atualidade existe uma gama de testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*; no entanto um dos grandes problemas encontrados

ainda é a baixa sensibilidade, especificidade, assim como a disponibilidade e custos desses testes na rotina clínica. Os testes sorológicos mais utilizados são RIFI- imunofluorescência indireta; teste de aglutinação direta; testes imunoenzimáticos – ELISA, Dot, testes imunocromatográficos – TRALd, K39, LEISHK39, rK39 (Ravel *et al*, 1995; Brasil, 2003; Gontijo e Melo, 2004).

2.4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI é uma técnica baseada na detecção de anticorpos, que permite detectar a doença em seus estágios iniciais, no entanto são indetectáveis do sexto ao nono mês após a cura. Apresenta uma sensibilidade que pode variar de 90 a 100% e uma especificidade em torno de 80% a 98% (Mancianti *et al.*, 1995).

Apesar disso, os títulos observados na LV são mais elevados sendo considerados compatíveis com a doença (título igual ou superior a 1:90) (Genaro, 2003)

Apresenta reações cruzadas com doença de Chagas e LTA. Como a maioria dos testes sorológicos esse teste apresenta algumas desvantagens, como: baixa especificidade, reprodutibilidade, exige pessoal treinado é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (Alves e Bevilacqua, 2004; Brasil, 2006; Gontijo e Melo, 2004; Srivastava *et al.*, 2011).

Atualmente o MS preconiza os testes sorológicos para o diagnóstico de LV canina através de teste rápido DPP e o ELISA os quais são utilizados nos Laboratórios de referência no Sistema Únicos de Saúde (Brasil, 2006).

2.4.2.2 Teste de Aglutinação Direta (DAT).

É um teste desenvolvido nos anos 80 o qual baseia-se na capacidade dos anticorpos dos soros dos pacientes passarem a reconhecer epítomos expostos nas formas promastigotas de *L.donovani* linhagem 1S em microplaca de poliestireno de fundo em V. Esse teste é de fácil detecção, uma vez que o mesmo forma um produto final visível, o qual não necessita de equipamentos específicos (estereoscópios ou microscópios) para a sua leitura (El-Harith *et al.*, 1987, 1988; SUNDAR e RAI, 2002). A sua sensibilidade varia de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (Zijlstra *et al.*, 2001; Rai, 2002; Alves e Bevilacqua, 2004; Gontijo e Melo, 2004; Mohebbali *et al.*, 2005)

No entanto, quando comparado com RIFI e ELISA, apresentam sensibilidade e especificidade inferiores. As principais desvantagens são a necessidade de múltipla pipetagem, tempo de incubação relativamente longo e o alto custo do antígeno (Boelaert *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005; Chappuis *et al.*, 2006)

O DAT apresenta uma variação o Fast Agglutination Screening Test (FAST), cuja aplicabilidade vem sendo testada em situações epidêmicas, assim como em inquéritos populacionais (Gontijo e Melo, 2004).

2.4.2.3 Fast Agglutination Screening Test (FAST).

O FAST é baseado no DAT, no entanto ele combina uma concentração parasitária mais elevada com um menor volume de teste. Ele utiliza apenas uma diluição sorológica cujo resultados são obtidos em aproximadamente dentro de três horas considerado um teste rápido, já o DAT leva em média de 18 a 20 horas para ser concluído. Essa rapidez possibilita a triagem em um grande número de

amostras, sendo útil em inquéritos epidemiológicos de grandes populações caninas (Schalling *et al.*, 2002)

O FAST apesar de ser considerado um teste relativamente rápido ele apresenta falhas na sua reprodutibilidade provocada por variações técnicas, assim como dificuldade no processo de padronização, o que pode comprometer o controle de qualidade e a possibilidade de comparar resultados de diferentes laboratórios (Schoone *et al.*, 2001, Gotijo; Melo, 2004).

2.4.2.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Outro teste bastante utilizado no diagnóstico da LV é o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) no qual é possível a detecção de anticorpos contra *Leishmania ssp.* Nessa técnica os antígenos são imobilizados em placa de poliestireno após o contato antígeno-anticorpo, este complexo passa a ser reconhecido por outro anticorpo, que é ligado a uma enzima que possa produzir um composto facilmente detectável (fluoróforo). É considerado positivo aquele que apresenta o valor da densidade óptica igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo (Brasil, 2006).

A sensibilidade e especificidade depende do tipo de antígeno utilizado (bruto ou purificado) e reações cruzadas com tripanossomatídeos, por exemplo antígenos purificados como as glicoproteínas de membranas gp 62, gp71 gp 83 (Hero *et al.*, 2014). A literatura aponta vários antígenos já estudados, no entanto ainda não existe um antígeno padrão. Esse teste apresenta uma boa vantagem que é a possibilidade de análise de grande quantidade de amostras em um tempo relativamente curto, quando comparado a RIFI. No entanto, para a sua execução,

depende de técnicos treinados, assim como equipamentos específicos. Esses teste não é aplicado no diagnóstico de rotina em regiões endêmicas para a LV em humanos, sendo utilizada na rotina apenas para o diagnóstico da LV canina (Meirelles *et al.*, 2006; Maia e Campino, 2008; Srivastava *et al.*, 2011).

Um das desvantagens apontadas para a realização do ELISA é o tempo empregado para a execução do teste, por isso nos últimos anos vários testes imunocromatográficos vem sendo desenvolvido, os chamados testes rápidos, eles passaram a serem utilizados usando anticorpos monoclonais anti-IgG de cão e antígenos de *Leishmania* de diferentes fontes os quais são adsorvidos em membranas de nitrocelulose. Os principais antígenos empregados são o rK26 ou rK39, e o anticorpo anti-IgG canino, constituindo a linha-controle. A presença de anticorpos anti-rK39 ou rK26 é indicativo de infecção, e um fator importante é que para esse teste, ainda não foi encontrado reatividade com outros tripanossomatídeos (Gradoni, 2002, Bisugo *et al.*, 2007).

2.4.2.5 rK39-ICT. Teste imunocromatográfico

O teste rápido rK39-ICT, é um dos testes mais utilizados na América Latina, principalmente para o diagnóstico da LV em humanos, que é específico para as espécies do complexo *L. donovani*. Estudos mostram que o rK39-ICT é bastante sensível, além de um indicador confiável, onde mostra cerca de 98,4-100% de sensibilidade e 81,2-96,4% de especificidade (Boelaert *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2011).

Esse teste é baseado no antígeno K39 de *Leishmania*, membro da família das cinesinas e apresenta uma unidade repetitiva de aproximadamente 39 aminoácidos de formas amastigotas de *L. infantum*. Estudos vem mostrando que

a identificação de anticorpos IgG anti-K39 tem sido bastante promissor devido a sensibilidade e especificidade para a LV, a partir daí esse antígeno foi clonado o que resultou na produção do antígeno recombinante K39 (rK39), sendo esse adsorvido em fitas de nitrocelulose que são utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral (Lemos *et al.*, 2003).

Este antígeno, quando empregado no ELISA, mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade. Além disso, esse antígeno é também utilizado em amostras de pacientes coinfectedos com HIV e pós tratamento, onde a cura clínica é confirmada com a diminuição dos níveis de anticorpos quando esse tratamento é bem sucedido (Gotijo, 2004).

Vários são os testes que utilizam o rK39 como antígeno recombinante, pois esses testes rápidos conseguem detectar infecções clínicas ou subclínicas, fazendo desses testes importantes em áreas onde a LV é hiperendêmica. Por serem testes baseados na pesquisa de anticorpos, os mesmos possuem limitações, podendo permanecer positivos após a cura da doença (Brandoniso *et al.*, 2002). Dentre esses testes pode-se citar: TraLd, kalar-azer Detect[®] e IT-LEISH.

2.4.2.6 TraLd

O TraLd (Teste Rápido Antígeno para *Leishmania donovani*) é baseado no antígeno rK39 sendo também um teste imunocromático, rápido e simples de ser executado. Tem como princípio a reação do soro ou sangue do paciente, onde o rK39 é fixado em papel. A proteína A é conjugada com ouro coloidal e possibilita ligação antígeno-anticorpo de forma específica, onde o antígeno é detectado em

segundos. O seu tempo de execução é em torno de um a dez minutos (Badaró *et al.*, 1996; Leal, 2009).

Estudos realizados no Brasil aplicando esse teste em amostras de cães de área endêmica mostrou 92% de sensibilidade e 99,5% de especificidade. Ele não foi capaz de detectar infecções em animais com títulos de RIFI entre 1:40 e 1:320. Contudo, pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose. Mesmo apresentando certas limitações, estudos indicam que esse teste pode ser utilizado em programas de saúde pública, uma vez que para a sua utilização ele requer pequena quantidade de sangue, e o tempo de execução é em torno 10 minutos, podendo ser utilizada em campo (Genaro *et al.*, 1997).

2.4.2.7 kalar-azer Detect[®] e IT- LEISH[®]

O antígeno recombinante K39 (rK39) representa um avanço importante no diagnóstico da leishmaniose visceral humana LV, principalmente devido a sua sensibilidade e especificidade aliado a sua fácil execução. No Brasil, o teste rápido kalar-azer Detect[®] baseado no K39 (rK39) - (INBIOS Internacional, Seattle, WA) foi avaliada pela primeira vez em 2003, mostrando uma sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (Carvalho *et al.* 2003).

Esse teste vem sendo bastante utilizado pelo Ministério da Saúde por ser rápido IT-LEISH[®] (DiaMed Latino-America SA, Suíça). Assis *et al.* 2011, avaliaram o teste através de um estudo multicêntrico que mostrou uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97%.

O que vem se observando com o grande advento da biologia molecular é que a combinação das técnicas sorológicas e moleculares, tem sido de grande

importância para detectar o maior número de animais positivos para LV canina em diferentes áreas endêmicas (Gramiccia e Gradoni, 2005).

2.4.3 Métodos Moleculares – PCR

2.4.3.1 PCR Convencional

Foi a partir dos anos 80 que a biologia começou a tomar impulso e surgir com novas ferramentas moleculares trazendo grandes avanços para os diagnósticos de vários tipos de doenças. Nessa época foi possível a detecção, assim como a identificação mais precisa dos parasitos do gênero *Leishmania*, sem que fosse necessário o isolamento em cultura (Gontijo e Melo, 2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e específica na qual ocorre a amplificação do DNA de *Leishmania* spp; pode detectar o DNA do parasito, antes mesmo do surgimento dos primeiros sintomas ou sinais clínicos da doença (Singh e Sivakumar, 2003).

A biologia molecular vem sendo utilizada como objeto de estudo com a crescente busca por variantes da técnica de PCR (PCR-RFLP; PCR-SSCP; NESTED-PCR; Multiplex-PCR, *Real Time* - PCR, entre outras. Ela é empregada na avaliação da diversidade genética, na taxonomia, diagnóstico, avaliação epidemiológica, genotipagem, etc (Ei Tai *et al.*, 2001; Cortes *et al.*, 2004)

A PCR convencional apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, a qual pode identificar os protozoários envolvidos, utilizando diversos tipos de amostras clínicas, mostrando resultados fidedignos e confiáveis em poucas horas. Esses são uma das suas principais vantagens sob os métodos convencionais , onde apresenta uma 94% de sensibilidade e de especificidade de 100% (Fisa *et al.*, 2001; Reithinger e Dujardin, 2007).

Assim como outros métodos de diagnósticos a PCR também depende de algumas variáveis tais como: área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação; o método de extração do DNA (Brasil, 2006).

A maioria dos protocolos existentes para a PCR é realizada em três etapas, as quais cada uma delas é realizada em uma temperatura específica que permite sua maior eficiência, sendo composta em média por 35 ciclos (Rodrigues, Silva e Siqueira, 2006).

Existe uma série de fatores que possibilitam um aumento na sensibilidade da técnica de PCR, tais como: diferentes métodos de extração de DNA, tipos de *primers* ou frações do sangue (sangue total, fração de leucócitos ou concentrado de leucócitos (Piarroux *et al.*, 1994, Lachaud *et al.*, 2001, Lachaud *et al.*, 2002).

A PCR vem sendo muito utilizada no diagnóstico tanto da leishmaniose humana (Silva *et al.*, 2004) como da canina (Lachaud *et al.*, 2002), o que possibilita a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia. O conhecimento do alvo não deve ser parcial e sim de conhecimento amplo compreendendo a sua natureza no contexto biológicos, para que se possa desenvolver oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ou sondas usadas como hibridizadores específicos para a sequência alvo. O custo dessa técnica já foi bastante elevado, mas atualmente valor empregado no equipamento tornou-se acessível para os laboratórios, onde os insumos devido à concorrência, já apresentam valores mais baixos (Gontijo e Melo *et al.*, 2004; Rolão *et al.*, 2004; Vitale *et al.*, 2004; Wortmann *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006).

Nos estudos com LV a PCR vem sendo bastante utilizada nos centros de pesquisas não apenas com finalidade diagnóstica, mas também como ferramenta

para o monitoramento do tratamento, assim como em pesquisas epidemiológicas. Uma vez que a mesma é sensível para a detecção do parasito, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (Gontijo e Melo, 2004).

A literatura aponta que vários sistemas baseados em PCR foram desenvolvidos para *Leishmania* spp, onde muitas sequências alvo já foram identificadas, possibilitando com isso o desenho de um grande número de *primers*, ou iniciadores. A escolha dos alvos irá depender de alguns parâmetros, tanto biológicos como físico-químicos, esses marcadores moleculares devem mostrar diferenças entre famílias, gêneros, espécies ou indivíduos (Schalling *et al.*, 2002; Floeter-Winter, 2010)

Estudos apontam que o kDNA é um alvo importante para detecção da *Leishmania*, é o DNA encontrado nos minicírculos do cinetoplastos (kDNA) da região conservada ou à amplificação do minicírculo completo. Grande parte das pesquisas, baseia-se na amplificação de fragmento dessa região conservada do minicírculo de kDNA uma vez que estas estão presentes em 10.000-20.000 cópias no genoma mitocondrial e por ser a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível que a da região variável (Gontijo e Melo, 2004; Nunes *et al.*, 2007).

Estudos mostram que mesmo a PCR convencional sendo sensível e específica, tem limitações, como a grande dificuldade de quantificação, fato esse que a impossibilita de fazê-la diferenciar a infecção da doença. No entanto a partir de 2001 com o surgimento da PCR em tempo real (qPCR) essa quantificação passou a ser suprida (Schalling e Oskam, 2004).

2.4.3.2 PCR em tempo Real

A PCR em tempo real é uma variação da PCR a qual é baseada em um sistema fluorescente que é capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação no mesmo momento que ocorre a reação. Onde a fluorescência passa a ser captada por moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, tais como: SYBR® Green, TaqMan®, Molecular Beacons (Couto-Sant'anna *et al.*, 2004; Gomes, 2008; Carvalho, 2008;).

A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, ou seja, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (Kubista *et al.*, 2006)

A qPCR é monitorada no mesmo instante em que ela está sendo processada, o que a faz ser mais rápida, uma vez que não se faz necessário a etapa de eletroforese. Tudo acontece em tempo real, e esse monitoramento possibilita uma melhor representação da quantidade de material iniciado quando comparado com a PCR tradicional. A técnica apresenta uma grande capacidade de obter dados quantitativos, pode ser útil em várias aplicações, as quais podem incluir: identificação de alelos em DNA genômica, análise de sequências de vários patógenos a partir de diversas fontes, além de análise de patógenos em alimentos, análise de produtos transgênicos, além da aplicação em diagnóstico (Bustin, 2000; Novais *et al.*, 2004).

Estudos feitos por Mary et al. (2004) possibilitou a demonstração da correlação entre a quantificação de *L. infantum* em amostras oriundas de sengue periférico e estado clínico dos pacientes, fato esse que permitiu a discriminação entre pacientes sintomáticos, pacientes curados, assim como portadores

assintomáticos, o que promoveu um diagnóstico e monitoramento da terapia com segurança e uma maior rapidez.

2.4.3.3 LAMP - Amplificação Isotérmica Mediada por Ciclo

Recentemente, uma outra ferramenta de diagnóstico promissor vem sendo utilizada, ela é realizada através da amplificação isotérmica mediada por ciclo (LAMP) apresentando um potencial não só o diagnóstico rápido e sensível, mas também a sua viabilidade como uma técnica alternativa para os métodos moleculares (Takagi *et al.*, 2009).

No LAMP é usado uma combinação de dois conjuntos de primers. Um conjunto de iniciadores amplifica todas as espécies de *Leishmania*, enquanto o outro amplifica apenas as espécies pertencentes ao complexo de *L. donovani* (que provoca a LV). O LAMP detecta DNA do patógeno com alta sensibilidade e especificidade. Os reagentes para LAMP são secados no interior da tampa do tubo de reação, e ao contrário da maioria dos outros testes moleculares, o DNA alvo é amplificado a uma temperatura constante. Os resultados são lidos visualmente utilizando luz azul, o que significa que o ensaio pode ser realizado com muito menos material de laboratório do que outros testes de detecção de DNA (Finddiagnostics, 2013).

Apesar de todas as vantagens que essas técnicas trouxeram ao longo do tempo, muitos desses testes encontram-se disponíveis apenas em ambiente de pesquisa. Esses fatores estão relacionados ao custo elevado, como também a necessidade de sua execução em laboratórios com elevada tecnologia e com espaço exclusivo para a sua realização. Vale salientar outra coisa importante, é a

discordância de resultados, a qual talvez esteja relacionada a protocolos não padronizados, fazendo com que os resultados variem entre os laboratórios.

A tabela 1 apresenta os testes mais importantes que a literatura aponta para o diagnóstico da Leishmanose Visceral apontando as suas vantagens e suas desvantagens assim como as suas sensibilidade e especificidade.

Tabela 1: Tipos de diagnósticos utilizado para detecção da LV

TESTES DIAGNOSTICOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS	SENSIBILIDADE/ESPECIFICIDADE
Parasitológico	Alta especificidade (100%).	Teste invasivo, a cultura fácil de contaminação além de ser um método demorado. Sensibilidade variável	100% / 98% Gontijo e Melo, 2004
RIFI	A doença pode ser detectada nos estágios iniciais. Apresenta uma alta sensibilidade.	Apresenta reações cruzadas com outras parasitoses e baixa especificidade.	90 a 100% / 80 a 98% (Srivastava <i>et al.</i> , 2011)
DAT	Apresenta uma boa sensibilidade e não necessita de equipamentos como microscópio para sua leitura.	Custo elevado, necessita de pessoal treinado e o tempo para realização do teste é relativamente longo.	91% a 100% / 72% a 100% Alves e Bevilacqua, 2004; Gontijo e Melo, 2004; Mohebbali <i>et al.</i> , 2005; Sundar e Rai, 2002; Zijlstra <i>et al.</i> , 2001
FAST	Considerado um teste relativamente rápido na sua execução.	Baixa reprodutibilidade	95,4 / 88,5% Akhoundi <i>et al.</i> (2010)
ELISA	Análise de um bom número de amostras.	Reação Cruzada com outras tripanossomatídeos.	Varia de acordo com o antígeno que utilizar / 50% a 70% / 97 a 100% Romero <i>et al.</i> , 2009
rK39-ICT	Boa sensibilidade e especificidade	O paciente mesmo curado pode apresentar positividade nesse teste tendo em vista que ele é baseado em pesquisa de anticorpos.	98,4 a 100% / 81,2 % a 96,4% Srivastava <i>et al.</i> , 2011
TraLd	Teste rápido e simples execução. Pode ser aplicado para amostras de soro ou sangue	Reação cruzada com outras parasitoses.	92 % / 99,5% (Leal, 2009)
IT-LEISH	Alta sensibilidade e especificidade	Reação cruzada.	93% a 97% Assis, 2011
PCR/qPCR	Alta especificidade Velocidade Diminuição dos riscos de contaminação Uso de reagentes mais seguros ao operador Reprodutibilidade	Custo elevado, e variações nos resultados quando se utilizando de protocolos diferentes.	Acima 90% / 100/ Disch <i>et al.</i> 2003
LAMP	Alta sensibilidade, técnica simples, baixo custo	Variações nos resultados quando se utilizando de protocolos diferentes.	93.6% / 100% (Ghasemian <i>et al.</i> , 20014)

Tendo em vista várias desvantagens oferecidas por inúmeros testes disponíveis no mercado e por a LV ser uma doença de grande importância em saúde pública e levar a óbito se não for diagnosticada de forma rápida, é cada vez mais constante a busca por testes rápidos que apresentem boa sensibilidade e que seja altamente específico.

Devido às características presentes no teste ELINOR, este passou a ser visto como uma proposta interessante de um teste rápido, de preço acessível e relativamente fácil de ser executado, para que o mesmo passe a ser utilizado em pontos primários de atendimento, como auxílio complementar ao diagnóstico do exame clínico.

2.4.4 Teste ELINOR

Nos últimos anos a ciência vem buscando cada vez mais encontrar métodos diagnósticos precisos e que, além de apresentarem boa especificidade e sensibilidade, sejam fáceis e rápidos, além de baixo custo. Neste contexto, várias pesquisas com biossensores de DNA vêm sendo desenvolvidas para doenças infecciosas e outros fins (Palecek *et al.*, 1998; Christopoulos, 1999).

Esse campo vem sendo cada vez mais explorado uma vez que combina conhecimentos e competências de ciências fundamentais, como a biologia, a física e química, interagindo a engenharia e a informática, de maneira a tentar satisfazer as necessidades das diversas áreas associadas (Marks, 2007)

Os biossensores são dispositivos que tem por finalidade fazer a detecção de analitos-alvo através de reações biológicas, combinam um componente biológico, que irá fazer sua interação com um substrato alvo, a um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis,

os quais podem ser posteriormente processado e gravado para uma melhor análise (Wang, 2000; Pathak *et al*, 2007).

De acordo com Wang (2000) os biossensores, podem ser classificados em dois tipos de acordo com natureza do evento de reconhecimento. São os dispositivos de bioafinidade, os quais irão depender da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície, onde os elementos de reconhecimento biológico podem ser os ácidos nucleicos, anticorpos, receptores protéicos, células, tecidos, dentre outros. O outro tipo é dispositivo bioanalíticos ou catalíticos, nesses uma enzima imobilizada é usada para que seja possível o reconhecimento do substrato-alvo (Wang, 2000). A Figura 3 mostra o diagrama de blocos de um biossensores.

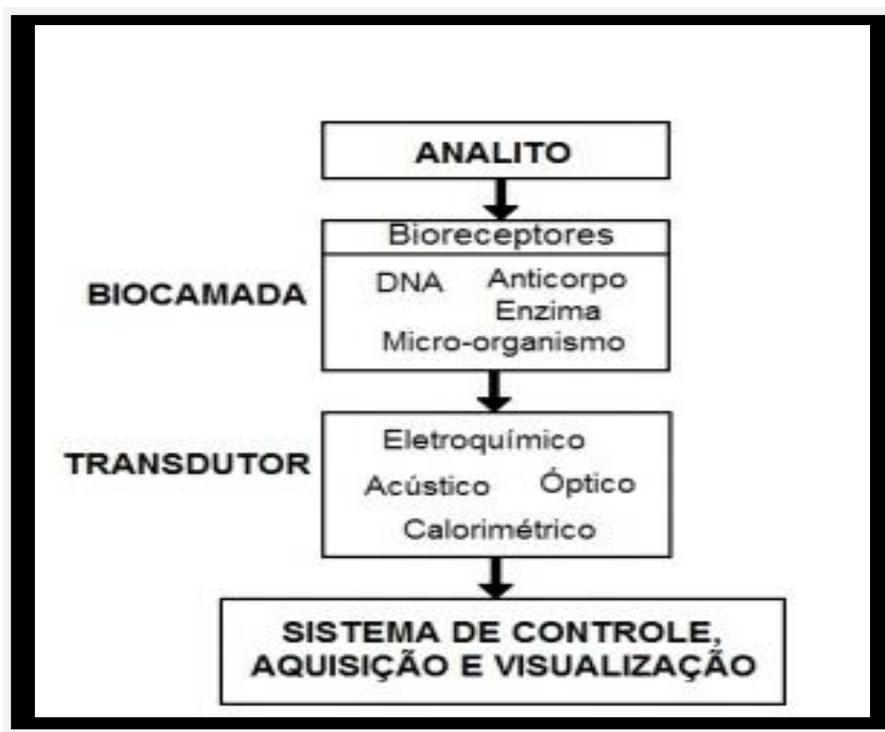


Figura 3: Diagrama de blocos de um biossensor.

Fonte: Moreira *et al.*, 2012.

O biossensor tem como principal objetivo a geração de um sinal elétrico

cuja magnitude ou frequência é diretamente proporcional à concentração do analito (Moreira et al., 2012).

De acordo com a figura 3 os biossensores são compostos por um componente que introduz a amostra, um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal (Lee *et al*, 2008).

Os sistemas de biossensores baseados em ácidos nucleicos possibilitam a não utilização de marcadores, tais como radioisótopos, enzimas e fluoróforos, eles permitem o monitoramento da hibridização de DNA em tempo real, além de mostra altas sensibilidade e especificidade (Caruso *et al.*, 1997).

O ácido desoxirribonucleico é um polímero, formado por monômeros que são os nucleotídeos, esses nucleotídeos são compostos por um monossacarídeo de cinco carbonos (uma pentose), uma base heterocíclica da família purina ou pirimidina (base nitrogenada) e um grupo fosfato. O DNA vem sendo utilizado a bastante tempo como um elemento de reconhecimento biológico para biossensores, nesses casos ocorre a hibridização seletiva de uma molécula de DNA de fita simples com a sua fita complementar (Wu *et al.*, 2006).

O teste ELINOR é um biossensor composto por um sistema de detecção, um componente de transdução (transformação) do sinal e um substrato. Ele foi designado como ELINOR em decorrência do uso do fluoróforo de PANI/Au na qual a fluorescência é em decorrência ao efeito ELINOR (Enhanced Luminescence of Inorganic/organic Origen) (Melo *et al.*, 2008)

Esse sistema de detecção é constituído por pequenos fragmentos conhecidos de DNA (*primers* ou sonda) que é adsorvido em uma lamina de vidro silanizada. Nessa lâmina deve ser colocado uma amostra contendo moléculas de DNA que deverão ser testadas. Havendo complementariedade entre as

sequencias (Sonda-DNA testado) ocorrer a hibridização na superfície do biossensor. Posteriormente a essa etapa, a lamina será lavada em água deionizada para retirada do excesso de material que não hibridizou, a hibridização é traduzida em um sinal luminoso através de um nanocomposito fluorescente adicionado ao meio (Figura 4) (Peng *et al.*, 2009)

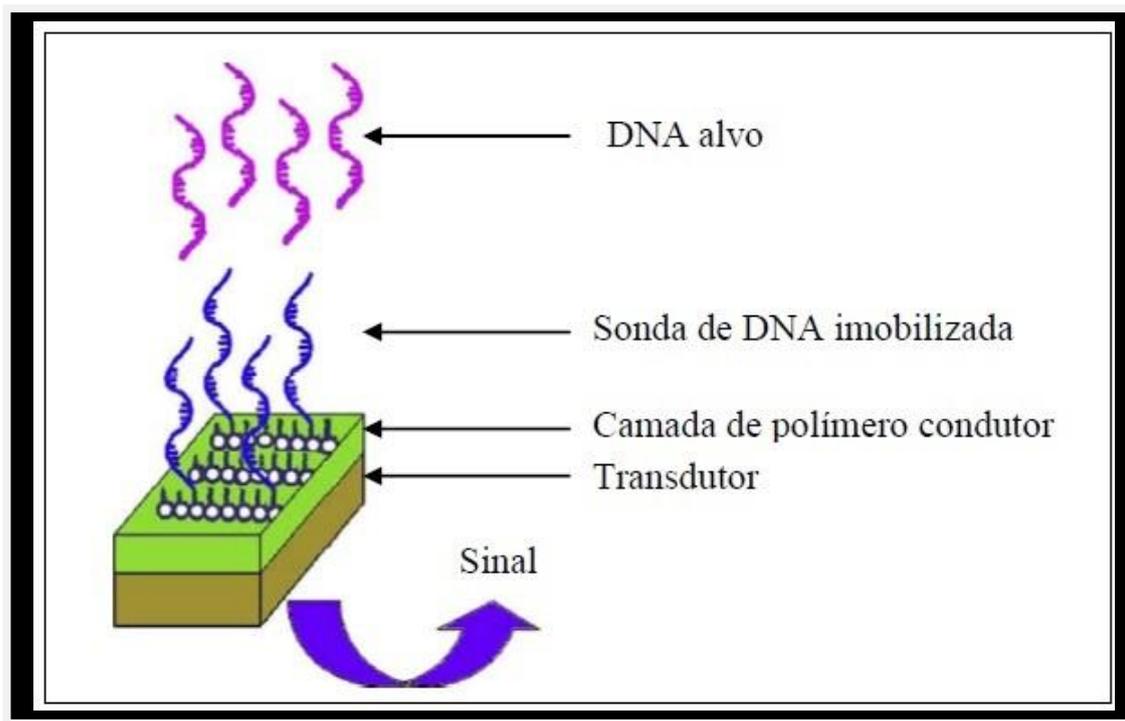


Figura 4: Modelo geral para sensor de DNA baseado em polímeros condutores
Fonte PENG *et al.*, 2009 (modificado)

Os nanocompósitos de ouro e polianilina (NcAuPANI) vem demonstrando cada vez mais ter excelentes propriedades elétricas e ópticas que os tornam componentes importantes para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis (Andrade *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que já se encontra bem estabelecida na literatura a forte afinidade elétrica entre polímeros condutores catiônicos e cadeias de DNA. Portanto o CNMPC através de cadeias poliméricas que são carregadas positivamente, tendem a ligar-se aos grupos fosfatos, que apresentam carga

negativa, que estão presentes na região externa das cadeias de DNA (Liu *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2008).

Um aspecto importante do teste ELINOR está relacionado à intensa luminescência dos CNMPC, que são as (nanopartículas/metálica)/(polímero condutor), os quais são utilizados como excelentes biomarcadores fluorescentes. Essa fluorescência pode ser detectada por microscopia de fluorescência mesmo havendo pequenas concentrações de DNA de interesse, fato esse que torna desnecessária a prévia realização de procedimentos de amplificação (via técnicas como (PCR ou equivalentes) do material genético a ser testado (Melo *et al.*, 2008).

2.5 Avaliação e Validação de testes diagnósticos

Quando um teste de diagnóstico é avaliado alguns critérios devem ser levados em consideração, uma vez que o seu desempenho irá depender do conhecimento prévio da presença ou ausência da doença. Portanto essa indicação da verdade é designado “padrão ouro”, que nada mais é do que um teste padrão que irá ser utilizado como comparativo por parte de outros testes, cujo objetivo será a avaliação da exatidão dos mesmos, onde os resultados obtidos possam conferir o máximo de acertos de forma a estabelecer o diagnóstico real (Almeida Filho e Rouquayrol, 1992).

De acordo com Crowter (2001) a escolha de um padrão de referência é um ponto crucial para que seja possível a legitimidade na comparação. É observado que algumas vezes, padrões de referência combinados poderão ser utilizados quando existir ausência de um único padrão, onde o resultado de dois ou mais

testes poderão ser combinados para indicarem um padrão de referência composto.

Em pesquisa epidemiológica, os testes diagnósticos não são apenas focados nos exames laboratoriais, mas, levam em consideração os interrogatórios clínico, exame físico e métodos propedêuticos diversos. É importante ressaltar que os critérios avaliados para os desempenhos desses testes estão relacionados com a ausência de desvios da verdade (ausência de viés), assim como da sua precisão, nesse caso o mesmo teste quando aplicado ao mesmo paciente ou amostra, esse deverá apresentar os mesmos resultados: respectivamente da reprodutibilidade do teste e da sua validade (OPS, 2014).

A reprodutibilidade de um teste é avaliada pela consistência de resultados obtidos quando os exames se repetem. Nesse caso a avaliação dessa reprodutibilidade deve ser levado em conta se as condições técnicas e biológicas foram idênticas quando se repete o teste (OPS, 2014)

Uma das propriedades fundamentais dos testes diagnósticos é justamente a sua validade que é avaliada através dos cálculos de sua sensibilidade, especificidade e valor preditivo (Feinstein, 1977). Essa validade será então mensurada pela sua capacidade em categorizar de maneira correta pessoas ditas realmente doentes, como positivas e as sadias como negativas para o referido teste que está sendo aplicado (Hennekens e Buring, 1987).

Assim, conceitua-se como sensibilidade, a capacidade que um teste diagnóstico tem de conseguir identificar os verdadeiros positivos nos indivíduos verdadeiramente doentes. A especificidade é definida, como a capacidade de que um teste tem de identificar os verdadeiros negativos naqueles indivíduos que são verdadeiramente sadios. Os valores preditivos de um teste é a proporção de

indivíduos que são verdadeiramente positivos em relação aos diagnosticados positivos apresentados pelo teste. Esses valores são variáveis, uma vez que irá depender da prevalência da doença na população da população estudada. Os valores preditivos podem ser positivos e negativos, onde o positivo é a proporção de indivíduos que apresentam a doença entre todos os indivíduos com teste positivo; e o valor preditivo negativo é a proporção de indivíduos sem a patologia de interesse entre todos os indivíduos com teste negativo. Isso demonstra que essas medidas irão depender da sensibilidade e especificidade assim como da prevalência da enfermidade na população estudada (Ferreira e Ávila, 2001).

Os testes diagnósticos podem apresentar quatro situações possíveis: Verdadeiros Positivos (VP), onde o teste é positivo e o paciente apresenta a doença; Falsos Positivos (FP) nesse o teste é positivo, no entanto o paciente não tem a doença; Falsos Negativos (FN) quando o teste é negativo e o paciente tem a doença; Verdadeiros Negativos (VN) quando o teste é negativo e o paciente não tem a doença. Sendo os melhores testes aqueles que apresentam poucos resultados FP e FN (Vaz, 2009).

É importante observar que um dos maiores problemas em relação aos dados de sensibilidade e especificidade, é que essas medidas são dependentes dos critérios de diagnóstico adotados ou de um valor de corte, o qual é, em algumas vezes selecionado arbitrariamente. Portanto, quando ocorre a mudança de critério nesse sentido, pode ocorrer um aumento na sensibilidade e conseqüentemente uma diminuição na especificidade, e vice-versa. O que irá provocar um quadro incompleto do desempenho de um teste diagnóstico selecionado (Vaz, 2009).

A literatura mostra que na atualidade não existe testes diagnósticos para V que apresente 100% de sensibilidade e especificidade, (Gontijo e Melo, 2004). Além disso, testes que sejam práticos em sua coleta associado a uma abordagem laboratorial cada vez mais simples, permitindo a redução de variáveis. Isto permite uma maior segurança.

Com o grande desenvolvimento da nanotecnologia as nanopartículas de ouro, vêm sendo cada vez mais investigadas para o desenvolvimento de biossensores, com isso os nanocompósitos de ouro e polianilina (NcAuPANI) tem demonstrado boas propriedades elétricas e ópticas que os tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis (Nascimento *et al.*, 2011). O uso de NcAuPANI advém da possibilidade da utilização desse sistema para imobilização de ácidos nucleicos na superfície do eletrodo, com isso o NcAuPANI demonstra ser um bom candidato como matriz para o desenvolvimento de um biossensor para *L. infantum*.

3. OBJETIVOS

3.1.1 Geral

Avaliar uma nova abordagem baseada em um nanocompósito para o diagnóstico de leishmaniose visceral.

3.1.2 Específicos

- Avaliar o teste ELINOR na detecção de *Leishmania spp.* em amostras clínicas coletadas de pacientes e cães de área endêmica para leishmaniose visceral;
- Comparar o desempenho do teste ELINOR com os testes diagnósticos convencionais para leishmaniose visceral.
- Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia de amostras clínicas coletadas de pacientes e cães suspeitos de leishmaniose visceral;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo de avaliação de métodos de diagnósticos, em sua fase III (avaliação em amostras de campo).

4.1.2 Amostragem

Amostragem foi de conveniência de acordo com o número de pacientes e cães com suspeita clínica de LV, conforme descrito a seguir.

4.1.3 Pacientes Humanos

Todas as amostras de humanos utilizados nessa pesquisa foram provenientes da Universidade Federal do Piauí, amostras clínicas, procedentes de área endêmica, que eram conduzidas a essa instituição através de Hospitais de referência e avaliados por médico infectologista responsável.

Os pacientes foram submetidos ao exame clínico e epidemiológico e em seguida foi feito a anti-sepsia no local para a realização de punção aspirativa da medula óssea e procedimentos de esfregaço em lâminas, procedimento esse realizado pelo médico.

Realizar-se-á assepsia com algodão embebido em álcool etílico a 70%, em seguida, foram colhidos, de cada paciente 5 mL de sangue intravenoso, com auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha 25x7 mm. O material foi colocado diretamente em tubo de ensaio para formação do coágulo e posterior remoção do soro, a amostra foi estocada em freezer a -20°C, até a utilização.

Foi coletada amostras de 2 a 5 mL (cinco mililitros) de sangue em tubo tipo vacutainer com o anticoagulante EDTA, mantidas a 4°C e posterior extração e purificação do DNA.

4.1.4 Cães

Os animais selecionados para o estudo foram submetidos a uma avaliação prévia pela médica veterinária responsável pelo projeto.

Foi coletada amostras de 5 mL (cinco mililitros) de sangue em tubo tipo vacutainer com o anticoagulante EDTA, mantidas a 4°C e posterior extração e purificação do DNA.

4.2 Definições de casos e controles

Foram considerados casos, 18 pacientes (Grupo I) e 83 cães domésticos (Grupo II) com sinais clínicos, histórico epidemiológico compatível com a doença e pelo menos um dos testes diagnósticos positivos.

Como controle foi considerado pacientes humanos que nunca habitaram área endêmica e nunca receberam transfusão sanguínea e apresentaram diagnóstico molecular negativo (Grupo III) (13 pacientes); Cães com histórico clínicos epidemiológico compatíveis com a doença e pelo menos um dos testes diagnósticos negativos constituíram o Grupo IV composto por (50 cães).

4.3. Testes Parasitológico e sorológicos

Outros testes adicionais foram realizados, como testes parasitológicos, destinadas à pesquisa do parasita, cultura de formas promastigotas e o teste rápido LEISHR.

Para diagnóstico parasitológico da LV foram efetuados punção aspirativa na medula, com o auxílio de seringa e agulha. Com o material obtido, foram confeccionados esfregaços em lâminas, essas foram fixadas com metal e coradas pelo Giemsa e visualizadas no microscópio óptico com a objetiva 100x.

Foram utilizados antígenos de promastigotas de *Leishmania infantum* preparados “in house” para a realização do teste de RIFI. Foram utilizados a anti-IgG humana conjugada ao isocianato de fluoresceína-FITC.

O teste IT-LEISHR[®] seguiu, estritamente, as instruções do fabricante. Todas as amostras de humanos foram testadas e cedidas pela Universidade Federal do Piauí.

4.4 Diagnóstico molecular

4.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA das amostras coletadas foi efetuada com o Blood Mini Spin e DNA Isolation Kit (quiagen) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi usado para avaliação do sistema de PCR e ELINOR.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).

PCR convencional (PCR) foi realizada usando o sistema LINF1B (PAIVA CAVALCANTI et al., 2009) com algumas modificações, com um volume final de 25ul contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, a dNTP 0,2mM, 5 pmoles de cada um dos primers e 2.5 U de *Taq* DNA polimerase. A essa mistura foi adicionados 2ul do DNA amostra a ser analisada. A amplificação foi constituída

de 35 ciclos: 94°C (1 minuto), 65°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. O produto da PCR passou pelo processo de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e usando 100 pb ladder DNA (GibcoBRL-Life Technologies) como marcador molecular.

4.4.3 PCR em tempo real (qPCR)

O diagnóstico molecular, através da PCR em tempo real foi realizado utilizando um *primer* do sistema LINF 1B, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do complexo *L. donovani* de acordo com (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2009), no Departamento de Imunologia, laboratório de imunoparasitologia do CPqAM-Fiocruz.

4.5 Teste ELINOR

O teste ELINOR foi realizado no departamento de Física, no laboratório de Polímero convencional da Universidade Federal de Pernambuco, sob a coordenação do Dr. Celso Pinto.

4.5.1 a Preparação dos substratos:

1 - *Oxidação*: os substratos foram imersos durante 90s em uma solução de KMnO_4 (0,5 g) em H_2SO_4 (15,0 mL) e, em seguida, lavados por diversas vezes com água deionizada até não mais restarem indícios de presença da solução oxidante.

2 - Hidroxilação *das lâminas*: os substratos foram imersos numa solução em ebulição de NH_4OH 1% durante 1 hora.

3 - *Formação da camada de MPTS (Mercapto propil trimetoxi silano Aldrich-175617) automontada*: nesta etapa, os substratos foram tratados individualmente para evitar aderência de uns com os outros, sendo então colocados dentro de um balão de fundo redondo, contendo uma solução de MPTS, Propanol-2 e água deionizada (175,0 μL , 7,0 mL e 70,0 μL), munido com um condensador de refluxo. Todo o sistema foi mantido sob condições de refluxo durante 30 minutos para cada substrato. Depois de transcorridos os 30 minutos, os substratos foram avaliados visualmente para verificação da perfeita formação da camada de MPTS. Em caso satisfatório, os substratos foram em seguida lavados com propanol-2 (por duas vezes) e depois com água deionizada. A seguir, foram secos pela aplicação de jatos de nitrogênio e, enfim, submetidos a um processo de *annealing* a 115°C por 30 minutos.

4.5.1 b. Preparação das nanopartículas:

As nanopartículas foram sintetizadas com o uso de um balão de fundo redondo contendo etanol (20mL) e os reagentes: Ani- $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ (0,030mol/L), 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano (MPS - $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_6\text{SSi}$) (0,27mol/L) e $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,81mmol/L), foram subsequentemente adicionados e mantidos sob agitação vigorosa (1.100 rpm) por um período de 48h. Para cada 1,0 mL da solução de nanocompósito, foram adicionadas 2 gotas de solução de HCl 1,0M em etanol.

4.5.2 Silanização de lâminas de vidro

As lâminas de vidro foram imersas durante 24 horas em solução a 25% de hidróxido de amônio (NH_4OH – Dinâmica, Brasil) e, posteriormente, limpas com água deionizada durante 10 minutos. Em seguida, elas foram lavadas brevemente com etanol anidro (Dinâmica, Brasil), e então imersas durante 30 min em uma mistura contendo MPTS a 1%, etanol a 95% e de ácido acético 16 mM (pH 4.5), à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com uma mistura de etanol a 95% e ácido acético 16 mM (pH 4,5) e, logo depois, colocadas em uma estufa a 150 ° C durante 2 horas (Rogers *et al.*, 1999).

4.5.3 Preparação das amostras para análise por microscopia de fluorescência:

Esquemáticamente, as etapas a serem seguidas do teste ELINOR foram:

- ✓ Desnaturação da sonda, por aquecimento durante 3 minutos a 94° C e, logo depois, fez-se a deposição de 1 μL dessa na lâmina silanizada previamente aquecida a 55° C.
- ✓ Desnaturação do DNA do paciente (da mesma forma como feito para a sonda) esse DNA foi extraído de sangue de paciente e sangue de cães como descrito nas seções 4.1.3 e 4.1.4, em seguida, adicionou-se 1 μL desse na lâmina, com a sonda aquecida a 55° C. A sonda e o DNA ficaram em contato por, no mínimo, 1 minuto.
- ✓ Retirou-se a lâmina (com a sonda e DNA do paciente) do aquecimento a 55° C e, após resfriamento a temperatura ambiente, adicionou-se 1 μL do compósito PANI/AuNPs acidificado (pH \approx 3). Depois da secagem

da lâmina . (A solução contendo os CNMPC foi gotejada sobre a lâmina; Lavou-se a lâmina com álcool etílico a 50% utilizando e posteriormente a lamina foi seca com jato de nitrogênio.

- ✓ Procedeu-se com a análise de microscopia de fluorescência.
 - a) As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas por meio de um microscópio MF500 (HIPOWER, China), com lâmpada de mercúrio de 100W, conjunto de filtros com excitação entre 330 nm - 400 nm e equipado com câmera digital (Mshot MC30).
 - b) As imagens de fluorescência foram obtidas por meio de uma objetiva de 20X

4.6 Análise dos dados

Para o cálculo do valor da sensibilidade, especificidade e acurácia do teste ELINOR em relação aos outros testes, foi elaborada a Curva ROC. Os testes foram avaliados por um grupo de 46 pessoas através de um software específico para a esta análise, onde os avaliadores puderam fazer um comparativo das amostras, com imagens de referências negativas e positivas e a partir dessa, informar qual seria o valor real daquela amostra como referências. Para a execução da curva ROC foi utilizado o site <http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html>, este site contém JROCFIT e JLABROC4, que foram os programas Java, que tem por finalidade calcular receiver operating characteristic (ROC), onde o JROCFIT executou cálculos de dados de notação discretos, e o JLABROC4 teve por função calcular dados distribuídos de forma contínua. JROCFIT e JLABROC4 foram traduzidas diretas dos programas ROCFIT e LABROC4, respectivamente

A classificação das imagens para cálculo da curva ROC era baseada em 6 opções: 1 – Negativa, 2 – Provavelmente Negativa, 3 – Possivelmente Negativa, 4 – Possivelmente positiva, 5 – Provavelmente Positiva, 6 – Positiva

4.7 Aspectos Éticos

Esse projeto não possui implicação ética, desde que se utilizaram amostras de DNA identificadas através de códigos, doadas pela Universidade Federal do Piauí em parceria com o projeto “Influencia do genótipo de *Leishmania chagasi* sobre a patogenia da leishmaniose visceral (Nº 0116/2005) (anexo 1) e pelo Serviço de Referência do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz, que faziam parte do projeto intitulado “População de ectoparasitas em animais domésticos e sua relação com a epidemiologia das leishmanioses em Pernambuco (Nº P-50/10-5) (anexo 2).

Os pacientes que concordavam em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais referentes a doença.

Os donos dos cães assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, como também responderam a um questionário os quais tinham informações a respeito da identificação dos animais, dados sobre os proprietários e informações epidemiológicas e clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC).

5. RESULTADOS

5.1 Humanos

Diagnóstico Parasitológico. Através do exame microscópico direto dos esfregaços em lâmina de material obtido do sangue de pacientes, 18 (100 %) foram positivos. Os isolados foram preservados em meio de cultura com 8 % de glicerol em criotubos em nitrogênio líquido (-196°C) no Banco de Cepas da Universidade Federal do Piauí.

Diagnóstico imunológico. A RIFI para detecção de anticorpos específicos anti - *Leishmania* spp. foi realizada nas 18 amostras e todos os pacientes do estudo foram positivos (Tabela 1).

Diagnóstico molecular: Os testes moleculares (PCR e qPCR) foram realizados em colaboração com equipe do Serviço de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ – PE, nos quais foram confirmada a doença.

A tabela 2 mostra os resultados dos testes realizados.

Tabela 2: Resultados dos diferentes testes diagnósticos (Exame direto, RIFI, Cultura e RK39, PCR e qPCR) dos pacientes portadores de Leishmaniose visceral

EXAMES	Nº examinado	Nº Positivos	% Positivos
Pesquisa direta	18	18	100%
RIFI	18	18	100%
Cultura	18	18	100%
RK39	18	18	100%
qPCR	18	18	100%
PCR	18	18	100%

Diagnóstico pelo ELINOR.

O teste ELINOR para o diagnóstico em leishmaniose visceral humana foi realizado em duplicatas de 18 amostras, previamente avaliadas por outros testes diagnósticos como retratado anteriormente na tabela 1. Treze (13) amostras foram usadas como controle negativo (indivíduos sadios de área não endêmica).

Os resultados das imagens para o Teste ELINOR estão representados na figura 5 para pacientes com suspeita de LV.

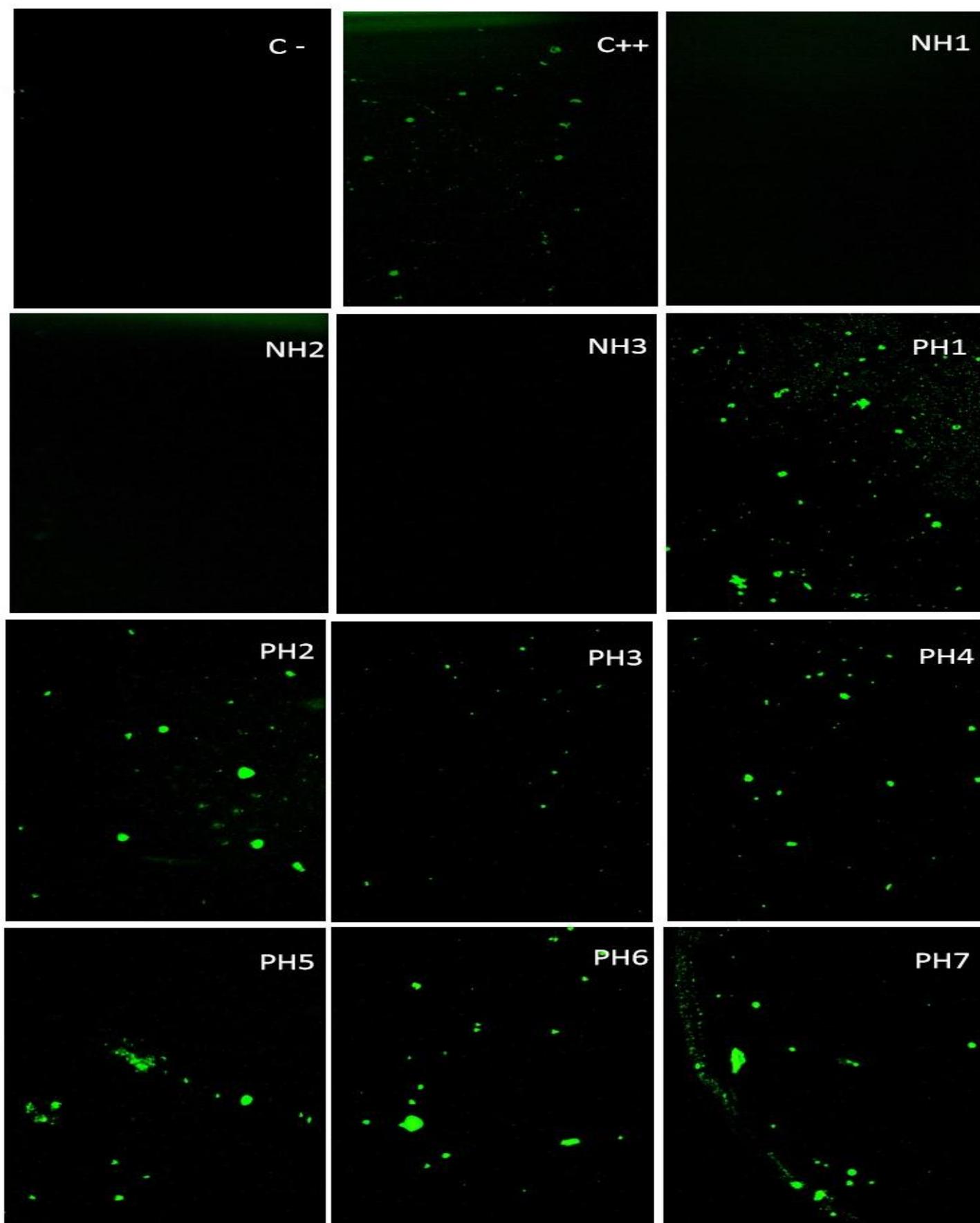
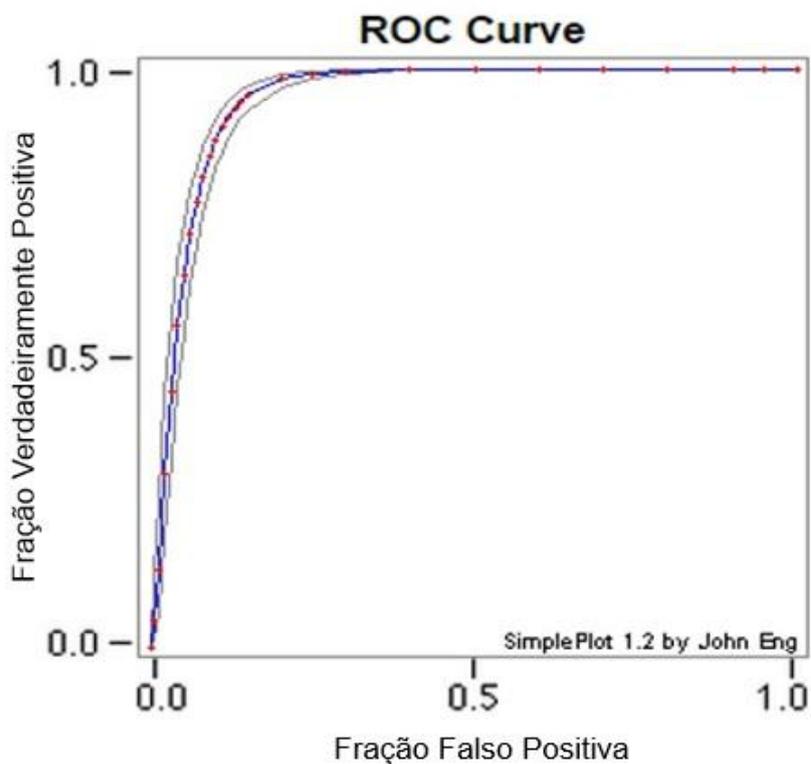


Figura 5: Microscopia de Fluorescência (20x) do Teste ELINOR realizadas em pacientes suspeita de LV
Legenda: C- (controle negativo, sem DNA), C++ (controle positivo para leishmaniose:DNA extraído de cultura), NH1 a NH3 (amostra de humanos negativos); PH1 a PH7 (amostras de humanos positivos)

Para o cálculo do valor da sensibilidade, especificidade e acurácia do teste ELINOR em relação aos outros testes foi elaborada a Curva ROC, que estão demonstrados no gráfico 1..

Gráfico 1: Curva ROC da análise das amostras de indivíduos com LV.



O desempenho do teste ELINOR utilizando como sonda o sistema Linf 1B em amostra de sangue de humanos apresentou uma acurácia de 90,2%, sensibilidade de 94,2% e especificidade de 88,3%. Todas as amostras apresentaram uma sensibilidade e especificidade para todos do estudo 100 % (Cultura, RIFI, RK39, PCR, qPCR).

5.2 Análise dos experimentos em Cães

Foram incluídos no estudo 83 amostras de cães com sinais clínicos sugestivos para LVC e para o grupo controle foi utilizado 50 amostras de cães sadios de áreas não endêmicas.

Todas as amostras incluídas no estudo foram positivas para LV através da PCR e qPCR.

Tabela 3: Resultados de testes :PCR e qPCR, para cães suspeitos de LV

EXAMES	Nº examinado	Nº Positivos	% Positivos
qPCR	83	83	100%
PCR	83	83	100%

As imagens a seguir mostram as micrografias de fluorescência do teste ELINOR.

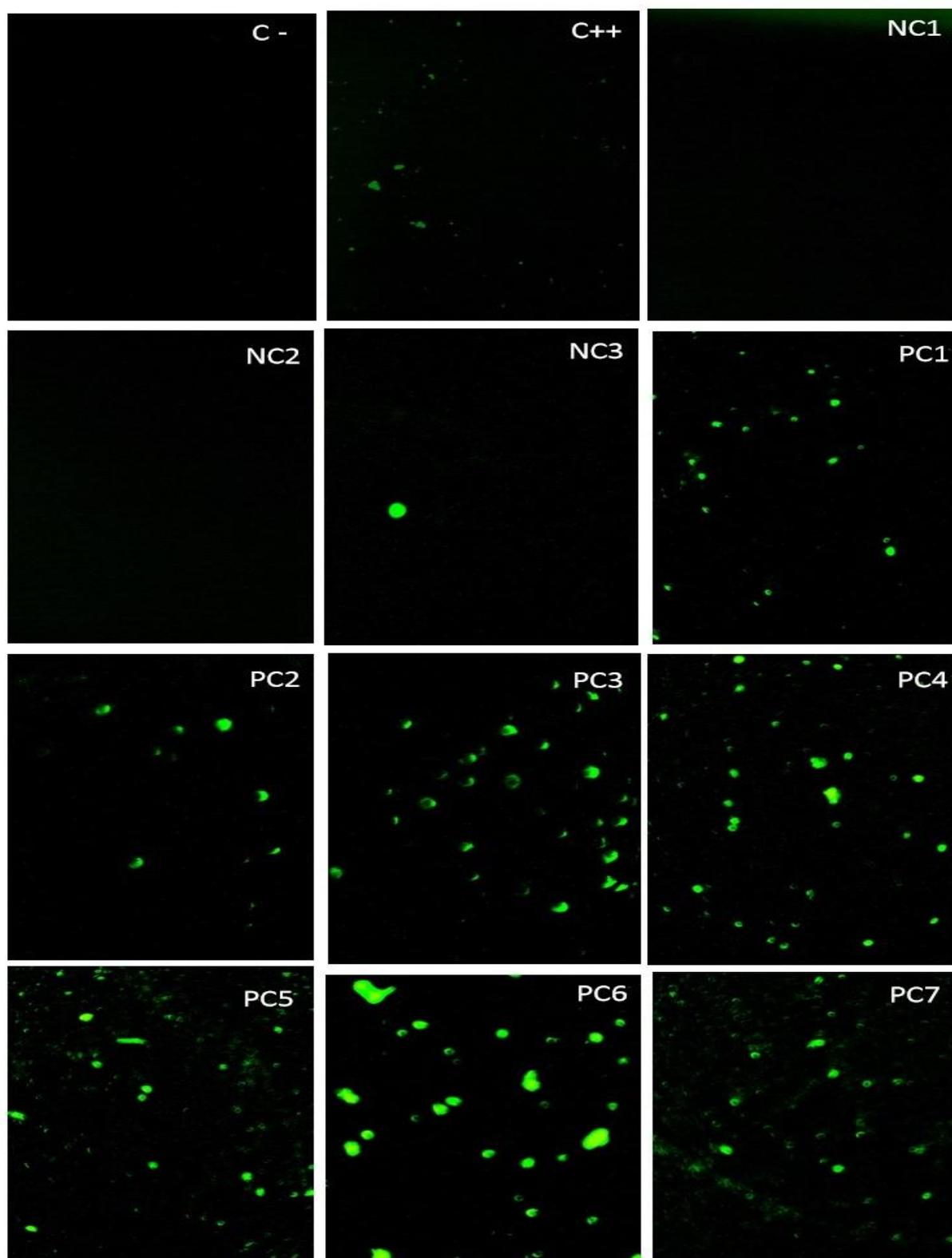
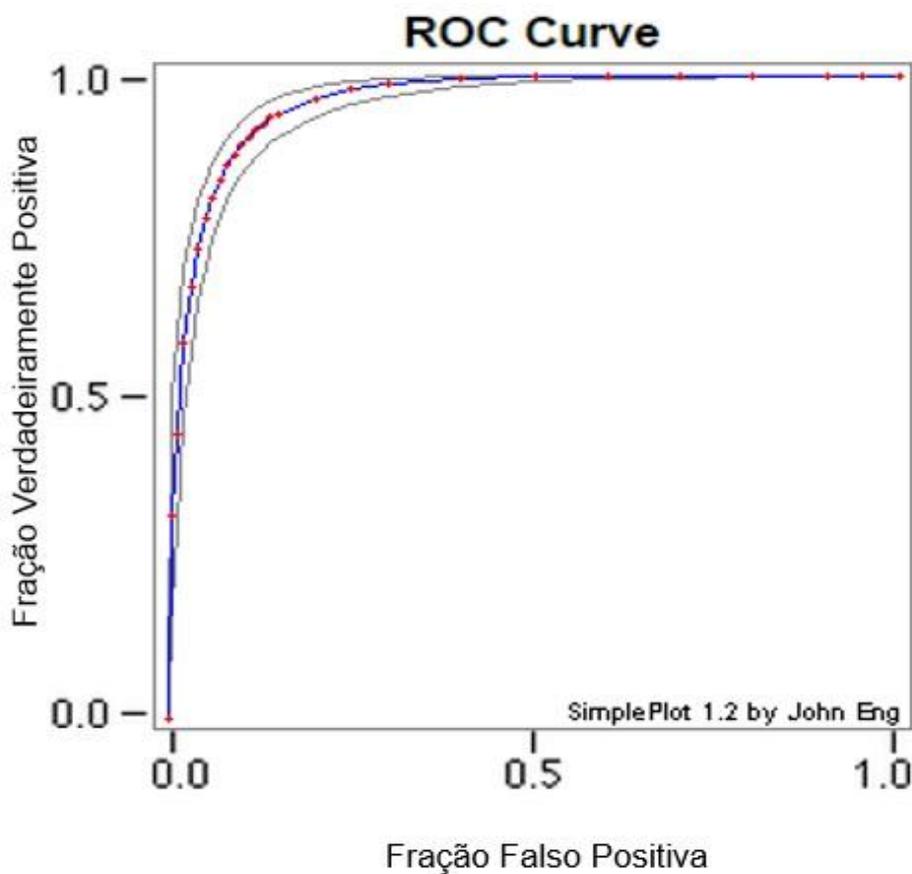


Figura 6: Microscopia de Fluorescência (20x) do Teste ELINOR realizadas em cães suspeita de LV. Legenda: C- (controle negativo, sem DNA), C++ (controle positivo para leishmaniose DNA extraído de cultura), NC1 a NC3 (amostra de cães negativos); PC1 a PC7 (amostras de cães positivos)

O gráfico 2 mostra os valores de acurácia, sensibilidade, especificidade para o teste ELINOR, das amostras de cães com LV.

Gráfico 2: Curva ROC da análise das amostras de cães com LV.

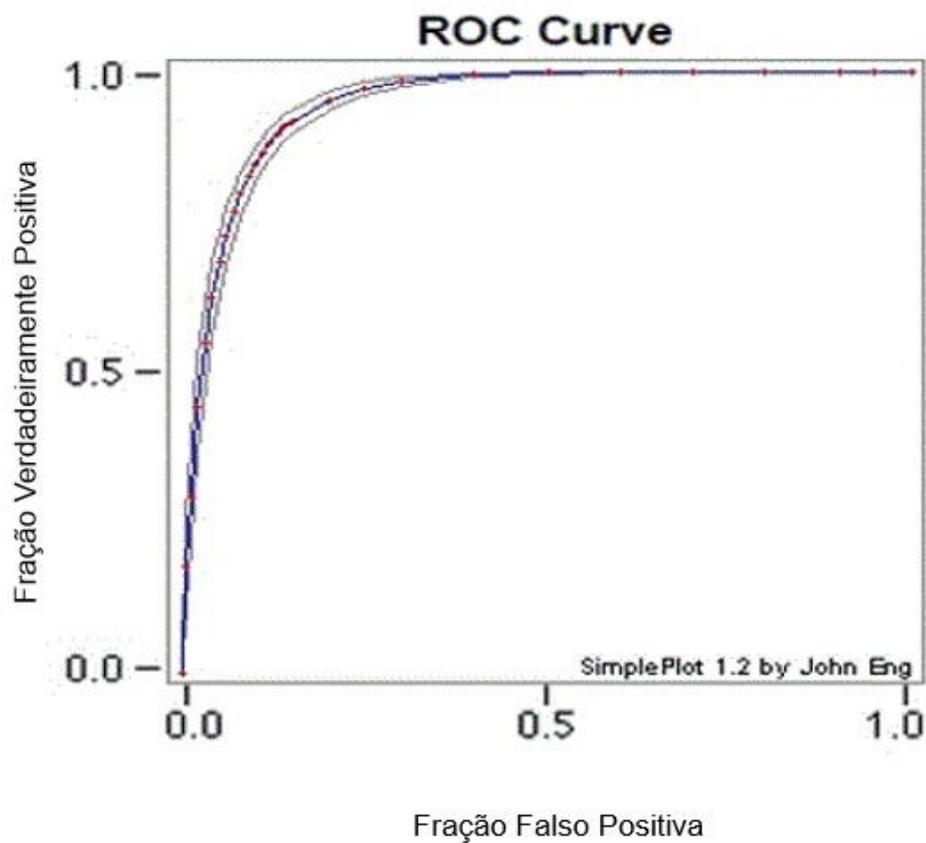


A análise estatística do teste revelou uma sensibilidade de 79.4%, especificidade de 93.3%, e uma acurácia de 86.5%.

Ao analisar o número total das diferentes amostras, incluindo 132 amostras de cães, e 31 de humanos, obteve-se os valores de 87,3 %, sensibilidade, 89,8 %, especificidade e 88,9% de acurácia.

O gráfico 3 mostra os valores de acurácia, sensibilidade, especificidade para o teste ELINOR de todas as amostras utilizadas no ensaio (humanos + cães).

Gráfico 3: Curva ROC da análise de todas as amostras do ensaio ELINOR (humanos e cães).



6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral vem cada vez mais se expandindo em áreas urbanas onde o número de casos humanos e cães positivos são preocupantes. Vários fatores estão correlacionados com essa expansão, onde se podem destacar fenômenos climáticos, crescimentos desordenados nas cidades de médio e grande porte, impactos ambientais, deterioração da condição socioeconômica de populações urbanas, entre outros (Franke *et al.*, 2002).

Na LV o diagnóstico não pode ser apenas baseado no exame clínico a partir dos sintomas apresentados, nem só no histórico relatado pelo paciente, pois tais circunstâncias não são suficientes para justificar um tratamento direcionado para LV, uma vez que as manifestações clínicas dessa enfermidade não são tão específicas, podendo ser muitas vezes confundidas com diversas patologias (Ritmeijer *et al.*, 2006; Dotta *et al.*, 2009).

Relatos mostraram que apesar da grande quantidade de testes diagnósticos existentes para LV o padrão-ouro preconizado pelo MS para a infecção por *L. infantum*, é o parasitológico, o qual é baseado em métodos de detecção direta do parasita, acabam por oferecer a vantagem de simplicidade, mas a necessidade da coleta de aspirados de medula óssea ou de baço faz destas técnicas bastante invasivas. Além disso, a sensibilidade do exame direto pode ser baixa, podendo variar de 52% a 98%, no entanto apresenta uma especificidade de 100% (Disch *et al.*, 2006).

A presente pesquisa teve como objetivo principal demonstrar a sensibilidade e especificidade do teste ELINOR no diagnóstico da LV quando comparado com outros testes utilizados para detecção da LV. Os resultados do

presente estudo mostrou uma alta sensibilidade 94%, assim como uma especificidade (88,3%) e uma acurácia (90,2%), para o teste ELINOR em amostras humanas.

Na LV os testes sorológicos ainda são bastante utilizados, no entanto nos indivíduos assintomáticos que apresentaram uma resposta humoral baixa, os níveis de anticorpos ficaram abaixo da linha de corte (cut-off) ou no limite de detecção. Com isso um resultado dito negativo não descarta uma possível infecção, provocando um falso negativo. Outra desvantagem observada nesse teste é a ocorrência de resultados falsos positivos, uma vez que anticorpos circulantes podem permanecer no sangue periférico mesmo que o parasita seja eliminado (Riera, 2003). Contudo, os testes de RIFI e ELISA, são muito utilizados em inquéritos populacionais (Gontijo, 2004).

De acordo com Assis (2008) estudos feitos com RIFI mostraram uma sensibilidade variando de 77 a 100%. Esses resultados devem ser obtidos através do tipo de antígeno utilizado, bem como o protocolo. Por exemplo antígenos totais, purificados, assim como os recombinantes, onde a sensibilidade desses antígenos podem variar de 60% a 82% para o antígeno A2. Estudos realizados com o antígeno recombinante empregado no ELISA apresentaram alta sensibilidade e especificidade de 100% (Burns *et al.*, 1993).

O DAT (teste de aglutinação direta) é outro teste sorológico de baixo custo e que apresenta uma sensibilidade de 91 a 100%, contudo, a especificidade se mostra bastante inconsistente podendo variar de 72 a 100%. Esse teste foi validado em diversas áreas endêmicas (Pedras *et al.*, 2008).

Nossos achados corroboram com os testes sorológicos mais utilizados na atualidade para detecção da leishmaniose humana, uma vez que tanto as sensibilidades assim como a especificidade são bastante semelhantes.

A importância de desenvolver testes diagnósticos rápidos, específicos e sensíveis tanto para humanos como para cães é na atualidade uma das metas de pesquisa nessa área.

A detecção precoce de cães infectados é hoje um grande desafio para tentar impedir a expansão da doença e conseqüentemente o controle da mesma. Existe uma imensa variedade de testes diagnóstico canina, os quais empregam diferentes tipos de antígenos. No entanto ainda não se encontra disponível um antígeno que seja muito específico e que apresente um método de fácil execução, assim como ocorre em testes para humanos. Por essa razão, o diagnóstico para LVC continua sendo ainda grande desafio, apesar dos progressos observados no desenvolvimento de vários métodos (Faria e Andrade, 2012).

O resultado do teste ELINOR em amostras de cães mostrou uma sensibilidade mais baixa do que a especificidade e acurácia. Resultados semelhantes encontrados por Coura-Vital et al (2014) que utilizaram o ELISA como teste de triagem e o DPP como teste confirmatório.

O ensaio sorológico imunoenzimático ELISA em cães é considerado um método de triagem e seus resultados são comumente expressos em reagente ou não reagente. Apresentando uma sensibilidade que pode variar de 71 a 100% e especificidade entre 85 e 100%, porém apresentam reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* e *L. braziliensis* (Brasil, 2014; Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007)

Romero *et al.* (2009) avaliou alguns testes sorológicos para detectar LV utilizaram outro tipo de antígeno, a) ELISA – usando o antígeno de promastigotas e os recombinante K26 (ELISA rK26), b) K39 (rK39 ELISA), c) teste de imunofluorescência indireta com antígeno de promastigota (IFI) e e) teste imunocromatográfico (TRALd) usando o antígeno rK39. O total de indivíduos utilizado no estudo foi de 1241 os quais foram selecionados de área endêmica para LV. A sensibilidade dos testes sorológicos foi de 50,0%, 66,7%, 69,4%, 83,3% e 88,9% para ELISAp, ELISA rK26, ELISA rK39, IFI e TRALd, respectivamente. As especificidades foram de 96,0% para TRALd, 97,6% para ELISAp e IFI, e 100,0% para ELISA rK26 e rK39.

É importante ressaltar, que divergência de resultados entre exames sorológicos, possivelmente é devido aos diferentes tipos de protocolos utilizados (Mettler *et al.*, 2005; Rosário *et al.*, 2005).

O diagnóstico molecular que visa à detecção do DNA do parasito, utilizando-se amostras biológicas, tais como sangue e aspirado de medula, vem ao longo do tempo cada vez mais sendo aperfeiçoado e pesquisado tanto para cães como para humanos.

A PCR tem apresentado elevada sensibilidade (acima de 90%) e especificidade (100%) na grande maioria dos trabalhos publicados (Disch *et al.*, 2003).

Essas ferramentas são extremamente importantes em programas de controle da LV, uma vez que é útil na detecção de casos com baixa intensidade de infecção, para os quais os exames parasitológicos, que são procedimentos invasivos apresentam sensibilidade considerada limitada, outro ponto importante dos métodos moleculares é que os mesmos possibilitam a diminuição da

ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, além de permitir a distinção entre infecção ativa, sub - clínica ou passada, o que não é permitido testes sorológicos (Brasil, 2006; Alam *et al.*, 2009;).

A necessidade de diagnósticos rápidos e confiáveis está intimamente ligada à necessidade de tratamento seguro, eficaz das chamadas doenças "negligenciadas". A lista de doenças, sem ferramentas de diagnóstico adaptado de campo inclui a leishmaniose.

É importante ressaltar que as restrições significativas tanto de aplicabilidade, assim como de eficiência dos métodos convencionais existentes para o diagnóstico da LV torna cada vez mais importante a busca por alternativas para o desenvolvimento e produção de diagnósticos que combinem rapidez, baixo custo, alta sensibilidade e especificidade assim como simplicidade operacional, fatores que são bem evidenciados no teste ELINOR.

Diante dos resultados obtidos é possível afirmar que os valores de sensibilidade e especificidade obtidos pelo Teste ELINOR são promissores para o diagnóstico da LV em humanos e cães uma vez que os dados encontrados corroboram com resultados apresentados na literatura por outros testes, tendo até, em alguns casos se mostrado mais sensível e mais específico.

Estudos realizados por Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2009) comparando os sistemas RV1/RV2 e Linf 1b mostraram que a qPCR utilizando o sistema linf 1b em amostras de sangue é mais sensível que a PCR convencional (sensibilidade PCR= 23,8%, qPCR= 100%). Já em relação à especificidade, apesar da PCR convencional ter apresentado valor de 100%, as análises por meio dos IC e o teste 2x mostram que os dois testes (PCR convencional e qPCR) são equivalentes.

Ensaios feitos com o ELINOR utilizando esses dois sistemas mostraram resultados bastante semelhantes para o diagnóstico de LV humana em 35 amostras, previamente avaliadas pela técnica de PCR e qPCR.

Segundo os resultados da PCR, essas 35 amostras corresponderam a 20 casos positivos e 15 negativos. A sensibilidade foi de 90 %, especificidade de 67 % e a acurácia de 80%, corroborando com os resultados encontrados pelo sistema Linf 1B onde a sensibilidade foi de 94%, especificidade de 88,3% e uma acurácia de 90,2% quando se englobando todas as amostras, (humanos+cães).

Um das grandes vantagens da utilização do teste ELINOR para a detecção da LV é a utilização do sangue periférico, o que torna o teste menos invasivo do que os testes que utilizam a medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo para o diagnóstico. Apesar que o nível de parasita no sangue periférico tende a ser menor do que aquela quantidade de parasito encontrado em outro tipo de tecido como a medula óssea.

A nanotecnologia associada à biotecnologia vem sendo hoje considerada um grande instrumento utilizado para melhorar a qualidade de vida da população, como por exemplo o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Nos últimos anos, as propriedades únicas de nanopartículas (NPs) metálicas, como as utilizadas pelo teste ELINOR foram objeto de estudo de vários grupos de pesquisa com aplicações numa ampla área (Niosi e Reid, 2007).

Esses estudos mostram que a polianilina (PANI) tem-se mostrado particularmente útil no desenvolvimento de biossensores. Em particular, os materiais de polímero de nanopartículas, devido às suas propriedades sinérgicas e híbridos que podem ser utilizadas como monitores de hibridização (Schmidt e Malwitz, 2003).

O teste ELINOR por suas características apresenta totais condições de vir a ser uma forte proposta no desenvolvimento de um teste rápido, de baixo custo, simples para LV, que possa ser utilizado como ferramenta de diagnóstico complementar ao exame clínico por sua alta sensibilidade e especificidade.

Outro ponto importante que deve ser destacado é que o teste ELINOR é um teste baseado na complementariedade de sequências de DNA específica, uma vez que utiliza sonda de DNA para LV, o que teoricamente o torna mais específico, podendo assim diminuir reações cruzadas com outras parasitoses que é tão comum em testes sorológicos. Afinal de acordo com Tales *et al.* (2005), o DNA é uma molécula adequado para aplicação nesse tipo de teste tendo em vista que apresenta um grande potencial de reconhecimento molecular, uma vez que o mesmo possibilita a formação de ligações que são facilmente sintetizadas, estáveis e reutilizáveis após desnaturação.

Em termos de custos, estimativas preliminares para o teste mostram que o custo do material a ser depositado em cada ponto da lâmina componente do kit de análise deve ser inferior a R\$0,75, valor passível de substancial redução com o aprimoramento do processo.

Comparando o custo operacional do teste ELINOR com o teste rápido (imunocromatográfico rK39) observa-se uma larga vantagem do ELINOR, uma vez que o teste rápido custa em torno de US\$ 2,71, já em relação ao parasitológico, esse custo é em torno de US\$ 1,58, mas se levado em consideração os profissionais envolvidos para realização desse exame, o valor agregado passa para US\$ 72,1, tendo vista que para realização dos exames parasitológicos é necessário profissional qualificado (médico), e materiais

específicos. Comparando o ELINOR a RIFI, o custo do mesmo também se apresenta bem abaixo já que a RIFI tem um custo de US\$ 8,56 (Sousa, 2007).

O ELINOR poderá ser utilizado como ferramenta de diagnóstico nos programas de saúde nacionais, pelo seu baixo custo, e sem que haja a necessidade de infra-estruturas complexas, assim como mão-de-obra tão qualificada, mas que sejam devidamente treinados para exercer tais funções. Sugerindo assim, a sua incorporação na rotina dos diversos laboratórios utilizados nos serviços de saúde e hospitais de referência, recomendadas pelo Programa de Controle da leishmaniose do Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS).

A expectativa é de que possamos desenvolver um kit de diagnóstico rápido com o método ELINOR, afinal esse teste pode ser utilizado para o diagnosticar doenças causadas por diferentes tipos de patógenos, além de que é um teste tecnicamente viável e de baixo custo, o que o torna bastante competitivo.

Portanto o teste ELINOR se mostra bastante promissor, e indica o quanto hoje a nanotecnologia vem tomando espaço e sendo uma poderosa ferramenta para obtenção de testes diagnósticos rápidos específicos e sensíveis, os quais apresentam várias vantagens. A literatura já mostra que nos últimos anos vem crescendo o depósito de patentes para diagnóstico ou tratamento de doenças, o que reflete sem dúvida o grande potencial dessa nova tecnologia.

Esta pesquisa apresentou uma boa eficácia na metodologia para o diagnóstico da LV. Indicando vários pontos positivos. Entretanto, ensaios necessitam ser realizados, com amostras de sangue de pacientes infectados com *Leishmania* e outras doenças responsáveis pelas reações cruzadas como na Doença de Chagas, Tuberculose e Hanseníase as quais não foram realizadas.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir:

- ✓ O teste ELINOR mostrou ser um teste promissor para detecção de *Leishmania spp*, podendo ser considerado, no futuro, como uma ferramenta alternativa para a detecção da LV;
- ✓ O desempenho do teste ELINOR foi similar ao exame direto, cultura, RIFI, e RK39-, PCR e qPCR;
- ✓ O teste mostrou alta acurácia, sensibilidade e especificidade nos grupos estudados;

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671.
- Alam MZ, Kuhls K, Schweynoch C, Sundar S, Rijal S, Shamsuzzaman AK, Raju BV, Salotra P, Dujardin JC, Schönian G (2009) Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of *Leishmania donovani* strains in the Indian subcontinent. *Infection Genetics Evolution, Amsterdam* 9:24-31.
- Alencar JE, Dietze R (2001) Leishmaniose visceral (calazar) In: VERONESI. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 706-717.
- Almeida Filho N, Rouquayrol MZ (1992) Introdução à Epidemiologia Moderna. 2 Belo Horizonte Salvador e Rio de Janeiro: COOPMED, 84.
- Alvarenga DG, Escalda PMF, Costa ASV, Monreal MTFD (2010) Leishmaniose visceral: Estudo retrospectivo de Fatores Associados à letalidade *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:194-197.
- Alves WA E Bevilacqua PD (2004) Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública* 20:259-265.
- Ashford RW (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology* 14:523-532.
- ASSIS, T. S. M. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília*, v. 17, n. 2. p.107-116, abr-jun, 2008.
- Assis TS, Braga AS, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, Costa CH, Costa DL, Holanda TA, Soares VY, Biá M, Caldas Ade J, *et al.* (2011) Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105:81-85.
- Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, eixeira R, Johnson WD Jr (1996) A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Disease* 54:639-649.
- Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M, Kaneto CN, VO-Camargo C, Polizel MA, Vigilato MAN et al. (2007) Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 66:185-193.
- Boelaert M, El-Safi S, Mousa H, Githure J, Mbatia P, Gurubacharya VI, Shrestha J, Jacquet D, De Muynck A, Le Ray D, Van der Stuyft P (1999) Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health* 4:31-37.
- Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G (2002) Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious* 21:461-46.

- Brasil (2003) Ministério da Saúde Brasil Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.
- Brasil Ministério da Saúde Brasil.. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Viscera (2014).
- Brasil (2007) Ministério da Saúde Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos.
- Brasil (2011). Ministério da Saúde Brasil. Letalidade de leishmaniose visceral. Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 2000-2010.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 90:775-779.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169–193.
- Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H (2007) Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. *Clínica Veterinária* 12:86-92.
- Carvalho MSZMG (2008) Otimização da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real para a detecção específica de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Monografia 1-53.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R (2003) Performance of Recombinant k39 Antigen in the Diagnosis of Brazilian Visceral Leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68:321–324.
- Caruso F, Rodda E, Furlong DN (1997) Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Analytical Chemistry* 69:2043-2049.
- Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos. Parasites – Leishmaniasis. 2013.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M (2006) A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *British Medical Journal* 333:1-5.
- Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira Nd, Oliveira LA, de Menezes Machado EM, Morais MH, Corrêa-Oliveira R, (2014) Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS ONE* 9:e91009.
- Crowter JR (2001) Validation of Diagnostic Tests. In: Crowter JR, ed. *Methods in Molecular Biology. The ELISA Guidebook*. New Jersey: Humana Press, 301-151.
- Dantas-Torres F (2006) Atual situação da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública* 40:537-531.
- Dantas-Torres F e Brandão-Filho SP (2005) Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical* 38:411-420.
- Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A (2003) Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human

- infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97:391 – 395.
- Disch J, Caligiorne RB, Maciel F, Oliveira MC, Orsini M, Dias-Neto E, Rabello A (2006) A Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56:395-400.
- El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schönian G (2001) *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR- based analyses and DNA sequencing. *Experimental Parasitology* 97:35-44.
- Elkhouryl ANSM, Alves WA, Gomes MLS, Sena JM, Luna EA (2008) Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública* 24:2941-294.
- Eng J (2014) ROC Análise Calculadora baseada em Web para as curvas ROC. 1:1.
- Faria AR e Andrade HM (2012) Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-amazônica de Saúde* 3:47-57.
- Ferreira AW e Ávila SLM (2001) Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto Imunes. 1-441.
- Ferreira WA, Mayrink W, dos Mares-Guia ML, Tavares CA (2003) Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45:35-43.
- Feinstein AR (1977) *Clinical biostatistics*. Saint Louis: The C. V. Mosby Company 1-468
- Finddiagnostics - LAMP for leishmaniasis, 2013. 1.1
- Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M (2001) Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology* 99:105-111.
- Floeter-Winter LM (2010) Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista* 7:73.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X (2006) Advantages of real time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 137:214- 221.
- Franke CR, Ziller M, Staubach C, Latif M (2002) Impact of the El Niño/Southern Oscillation on Visceral Leishmaniasis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 8:914-917.
- Ghasemian M, Gharavi Mj, Akhlaghi L, Mohebbali M, Meamar AR, Aryan E, OORMAZDI H (2014) Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 9:50-59.
- Gomes ALV (2008) Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão. Tese 1:101.
- Gonçalves, AJR, Rozembaum R, Cunha RQ, Menezes JA, Vieira Filho EC,

- Carvalho FG (1986) Calazar: relato de três pacientes adultos internados no HSE/INAMPS (RJ). Considerações sobre esta endemia de grande importância no nosso território. *Arquivos Brasileiros de Medicina* 60:369-376.
- Gontijo CMF e Melo MN (2004) Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:338-349.
- Gradoni L (2002) The diagnosis of canine leishmaniasis. In *Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum*. Intervet International, Boxmeer, The Netherlands 7-14.
- Gramiccia M e Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35:1169-1180.
- Hennekens CH e Buring JE (1987) *Epidemiology in medicine*. Boston/Toronto Little Brown and Company 1-383.
- Ikeda-Garcia FA, Marcondes M (2007) Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária* 71:34-42.
- Killick-Kendrick R. (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v.4, p.1-24.
- Lachaud, L, Marchegui-Hammami S, Chabber E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 40:210-215.
- Lainson R, Rangel, E (2005) *Lutzomyia longipalpis* e da eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana, com especial referência para o Brasil uma revisão. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100:811-827.
- Leal CRB (2009) Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista* 6, p. 14-18, 2009.
- Lee JO, So HM, Jeon EK, Chang H, Won K, Kim YH (2008) Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry* 390:1023-1032.
- Lemos EM, Carvalho SFG, Dietze RCR (2003) Avaliação para teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 não diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:36-39.
- Liu T, Burger C, Chu B (2003) Nanofabrication in polymer matrices, *Progress in Polymer Science* 5:26-28.
- Melo, C.P. et al. (2008) Compósitos de nanopartículas fluorescentes em sílica, processo para a preparação dos mesmos, e uso em sistemas de diagnóstico rápido com afinidade a moléculas biológicas, in: INPI (Ed.)
- Moreira CS (2012) *Biosensores: Conceitos e Aplicações*.
- Maia C e Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology* 158:274–287.
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 1995;59:13-21.
- Marks RS (2007) *Handbook of biosensors and biochips*.: John Wiley & Sons. 1500. 1.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H (2004) Quantification of *Leishmania*

- infantum DNA by a Real - Time PCR Assay with High Sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5249- 5255.
- Marzoch MCA (1992) Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63:82-104.
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA (2000) A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16:188-199.
- Meirelles PG, Biazon L, Ono MA, Hirooka EY, Ono EYS (2006) Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. *Revista de Ciências Agrárias* 27:617-628.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P (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. *Journal Clinical Microbiology* 43:5515-5519.
- Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M (2005) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary parasitology* 129:243-5.
- Moura AL, Oliveira HMR, Mourao MVA, Morais MHF (2013) Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical* 46:589-593.
- Novais CM, Pires-Alves M, Silva F.F (2004) PCR em tempo real : uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13.
- Nunes CM. (2007) Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 16:5-9.
- Organização Mundial da Saúde: Mapa de distribuição da leishmaniose no Antigo e novo mundo. 2010.
- Palecek E, Fojta, M, Tomschick M, Wang J (1998) Os biossensores eletroquímicos para a hibridação de DNA e danos ao DNA. *Biosens. Bioelectron* 13:621-628.
- Paiva MC, Gomes ALV, Abath FGC (2009) O desenvolvimento de um ensaio de PCR em tempo real para a quantificação de *Leishmania infantum* ADN no sangue canino. *The Veterinary Journal* 182:356-358.
- Pedras MJ, Gouvêa VL, Oliveira EJ, Rabello A. (2008) Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:172-78.
- Piarroux R, Gambarreli F, Dumon H, Dumon S, Mary C, Togo B, (1994) Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *American Society for Microbiology* 32:746-749.
- Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB (2004) Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *Jornal de Pediatria* 80:141-146
- Quinnell RJ.; Courtenay O (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136:1915-1934.
- Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O (2013) Evaluation

- of rK39 rapid diagnostic test for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:e1992.
- Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F (1995) A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Tropica* 59:187-196.
- Reithinger R Dujardin, JC (2007) Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology* 45:21-25.
- Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR (2003) Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Clinical Microbiology* 41:1486-1493.
- Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M (2003) Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98:102-110.
- Rodrigues JJS (2006) Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- Rolão N, Cortes S, O Rodrigue sR, Campino L (2004) Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real - time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction -enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Parasitology* 90:1150-1154, 2004.
- Romero HD, Silva LA, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A (2009) Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81:27-33.
- Rosário EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100:197-203.
- Sant'anna CC, Santos MARC, Franco R (2004) Diagnosis of pulmonary tuberculosis by score system in children and adolescents: a trial in Reference center in Bahia, Brazil. *Journal of Infectious Disease* 8:305-310.
- Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L (2001) Fast agglutination screening test (FAST) for detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 5:400-1.
- SHAW, JJ. et al. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London*, v. 83, p. 783-784, 1989.
- Schalling HDFH, Oskan L, Dubessay, P (2002) Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis using peripheral blood. *Tropical Medicine & Interantional Health* 7:641-651.
- Schmidt G, MALWITZ MM (2003) Properties of polymer-nanoparticle composites. *Current Opinion in Colloid and Interface Science, Amsterdam* 8:103-108.
- Sherlock, I. A, et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris*

- (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.79, p.511, 1984.
- Silva, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP(2002) Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo 44:145-149.
- Silva MBB, Stewart JM, Costa CHN (2005) Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72:811–814.
- Singh S, Sivakuma, R (2003) Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. Journal of Postgraduate Medicine 49:55-60.
- Sousa ZFD (2007) Diagnóstico da leishmaniose visceral humana em áreas rurais, endêmicas e não endêmicas, utilizando um teste imunocromatográfico. Dissertação, 121 f. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiás.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S (2011) Diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 105:1–6.
- SUNDAR S, RAI M (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology 9:951-8.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. Journal Immunological Methods 292:17-23.
- Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram ARMS, Hashighuchi Y, Noiri E, Kimura E (2009) Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. Am J Trop Med Hyg. 81578–582.
- Teles, FRR, Prazeres DMF, Lima-Filho L (2005) Trends in dengue diagnosis. Reviews in Medical Virology (Print) 15:287-302.
- Xavier-Gomes LM, Costa WB, Prado PF, Campos MO, Leite MTS (2009) Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças internadas em um hospital universitário de referência no norte de Minas Gerais, Revista Brasileira de Epidemiologia 12:549-55.
- Vaz JCL (2009) Regiões de Incerteza para a Curva ROC em Testes Diagnósticos, Dissertação, 147p. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos.
- Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S (2004) Taq Man based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v.1026, p.139–143. out. 2004.
- Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, Ghalib HW (1998) rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clinical and diagnostic laboratory immunology 5: 717-20.
- Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP,

Ryan JR (2004) Real time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panamá from both fresh and frozen tissue. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98:148 -151.

ANEXOS**ANEXO 1****MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP 64049-550
Telefones: (86) 3215-5734 Fax (86) 3215-5560

Teresina, 14 de Dezembro de 2005

À
Prof^a. Ms. DORCAS LAMOUNIER COSTA
Depto. de Medicina Comunitária - CCS

Senhora Pesquisadora,

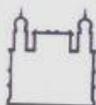
O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Federal do Piauí analisou, de acordo com os requisitos da Resolução CNS 196/96, que trata das "diretrizes e normas envolvendo seres humanos", o protocolo de pesquisa encaminhado por V.sa., intitulado "INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DE LEISHMANIA CHAGASI SOBRE A PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL" o qual teve parecer "aprovado" sob o número 0116/2005. Ressaltamos que o parecer consubstanciado emitido na reunião encontra-se arquivado para eventuais consultas.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Ferraz Mendes'.

Profa. Dra. REGINA FERRAZ MENDES
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-1/11

Certificamos que o protocolo (P-50/10-5), intitulado "POPULAÇÃO DE ECTOPARASITOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SUA RELAÇÃO COM A EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES EM PERNAME" responsabilidade de MILENA DE PAIVA CAVALCANTI, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2012 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 200 Machos.
- 200 Fêmeas.

Felis sylvestris catus

- 100 Machos.
- 100 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br