

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ANDERSON PACHECO DOS SANTOS

“SOROLOGIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREAS DE AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO CHAGÁSICA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Anderson Pacheco dos Santos
Mestre em Imunologia
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Dra. Maria Esther de Carvalho

Campinas
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa59s

Santos, Anderson Pacheco dos
Sorologia de leishmaniose tegumentar americana em
áreas de avaliação de infecção chagásica no Estado de
São Paulo, Brasil / Anderson Pacheco dos Santos. –
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Esther de Carvalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leishmaniose. 2. Chagas, Doença de. 3. ELISA.
4. Imunoglobulina G. I. Carvalho, Maria Esther. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Serological tests to American cutaneous leishmaniasis applied on screened samples for Chagas disease in areas of the State of São Paulo, Brazil.

Palavras-chave em inglês: Leishmaniasis; Chagas' disease; ELISA; Immunoglobulin G.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Maria Esther de Carvalho, Rita Maria da Silva, Silmara Marques Alegretti.

Data da defesa: 22/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 22 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Esther de Carvalho
(Orientadora)

Maria Esther de Carvalho

(Assinatura)

Profa. Dra. Rita Maria da Silva

Rita Maria da Silva

(Assinatura)

Profa. Dra. Silmara Marques Alegretti

Silmara Marques Alegretti

(Assinatura)

Dr. Horácio Manuel Santana Teles

(Assinatura)

Profa. Dra. Regina Maura Bueno
Franco

(Assinatura)

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Summary	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas no Estado de São Paulo	3
1.2 O Programa de Controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo	7
1.3 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose no Estado de São Paulo	8
1.4 O Programa de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo	10
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Amostras	16
4.2 Técnicas sorológicas convencionais adotadas	16
4.3 Padronização do ELISA avidéz	18
4.4 Critério para adoção de resultado positivo e negativo	24
4.5 Organização dos dados	24
4.6 Aspectos éticos da pesquisa	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Determinação da concentração ideal de antígeno	27
5.2 Determinação da concentração ideal do caotrópico	28
5.3 Imunofluorescência Indireta e Imunoensaio Enzimático	31
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Mônica, Sr. Aguinaldo e D. Cecília pela paciência e compreensão que tiveram comigo durante o decurso dos estudos.

Para D. Aparecida, Sr. Gerson e André pela ajuda e apoio que me deram para terminar a pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Esther de Carvalho, que aceitou desenvolver e me orientar na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco Andrade Jr. pela permissão para utilizar o Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical para desenvolver e elaborar este projeto.

À Dra. Luciana Meireles pelo suporte e dicas que colaboraram para a realização deste projeto.

À Roselaine Pereira Alvim Cardoso pela ajuda nos experimentos de bancada.

À Izilda Curado, Rubens Antonio da Silva, Iole Arumi Sei e D. Benedita Aparecida Magalhães da Silva, pela amizade, incentivo e apoio técnico.

Ao Dr. Cláudio Santos Ferreira pela revisão da dissertação e tradução para o inglês do resumo.

Ao Dr. Horácio Manuel Santana Teles por aceitar compor a banca e ter colaborado com sua ajuda e críticas.

À Dra. Elizabeth Tenório, Cosue Miyake e demais colegas de trabalho da Seção de Hepatite do Instituto Butantan pelo incentivo e colaboração para a continuidade e finalização deste projeto.

Aos membros da banca examinadora pela contribuição com suas críticas e sugestões na elaboração deste trabalho.

SANTOS, AP. **Sorologia de Leishmaniose Tegumentar Americana em áreas de avaliação de infecção chagásica no Estado de São Paulo, Brasil.** Campinas, 2008 Dissertação de Mestrado – Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – [IB/UNICAMP]

RESUMO

As zonas endêmicas de leishmanioses e doença de Chagas, duas grandes endemias causadas por cinetoplastídeos, sobrepõe-se na América do Sul, especialmente na região Sudeste do Brasil, o que pode gerar casos de co-infecção entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. Ocorrem reações cruzadas, mesmo com baixos títulos, em inquéritos sorológicos de pacientes infectados com os parasitas, o que leva a falsas estimativas de prevalência de ambas as infecções. Este trabalho tem o objetivo de observar o efeito de um diluente de amostra proposto para reduzir a ocorrência de reações cruzadas em testes sorológicos para doenças causadas por cinetoplastídeos e outros parasitas. Foram selecionadas 585 amostras de sangue provenientes de quatro regiões do Estado de São Paulo, entre litoral e planalto, colhidas no período compreendido entre 1996 a 2003, durante atividades do Programa de Controle da Doença de Chagas. As análises das amostras foram feitas através das Reações de Imunofluorescência (RIFI) e do ensaio imunoenzimático (ELISA). Com as amostras reagentes (onze no total), para doença de Chagas e leishmaniose em ambas as técnicas, foi realizado o teste ELISA alta avides, que utiliza um diluente com caotrópico, que demonstrou redução nos títulos da reação positiva falsa, restando apenas uma amostra sem redução significativa do seu título, que sugeriu ser um caso de co-infecção de doença de Chagas e leishmaniose, epidemiologicamente factível dada a existência de ambas as infecções na área estudada. O uso deste diluente em estudos clínicos e epidemiológicos pode aprimorar o diagnóstico para a identificação de soropositivos em regiões de sobreposição de endemias causadas por cinetoplastídeos.

Palavras chave: Sorologia, Leishmaniose, Doença de Chagas, ELISA, RIFI, Avides de IgG.

SANTOS, AP. **Serological tests to American cutaneous leishmaniasis applied on screened samples for Chagas disease in areas of the State of São Paulo, Brazil.** Campinas, 2008 Master Dissertation – Department of Parasitology, Institute of Biology, State University of Campinas – [IB/UNICAMP]

SUMMARY

Leishmaniasis and Chagas disease are endemic in extensive areas of the American Continent. These parasitic diseases can occur together in South America, particularly in southwestern regions of Brazil, which poses a serious epidemiological problem due to the observed serological cross-reactivity between *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*, even at low titers. As false prevalence estimates of these agents are critically misleading, we designed an experiment aiming at analyzing the effect of a diluent intended to reduce the chances of false positive tests resulting from serological cross-reactivity between these kinetoplastids and other parasites. As a part of the activities of the Program for the Control of Chagas disease, we selected 585 blood samples collected, during the period from 1996 to 2003, from residents in four regions situated between the seacoast and the plateau of the State of São Paulo. The serological tests used (IFAT and ELISA) produced a total of eleven positive reactions. Lower false positive titers resulted from the use of high avidity ELISA plus a chaotropic diluent. The only serological result in which titers corresponding to both infections were not significantly reduced was suggestive of mixed infection, on the basis of the fact that it was connected to a patient evidently exposed to both agents. This experiment suggests that the use of a chaotropic diluent can be a useful tool to reduce the proportion of such false parasitic mixed infection results as those investigated by us.

Key words: Serology, Leishmaniasis, Chagas disease, ELISA, IFAT, IgG antibody avidity.

1 INTRODUÇÃO

Doença de Chagas e Leishmaniose Tegumentar Americana, duas endemias prevalentes no continente americano são causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, respectivamente (Ferreira *et al.* 2003). Além de provocar graves problemas de saúde pública às populações que afetam, trazem conseqüências nefastas do ponto de vista social e econômico (Vexenat *et al.* 1996). Ocupam lugar de destaque dentre as doenças causadas por protozoários transmitidas nos trópicos, sendo superadas em importância apenas pela malária (Lumsden & Marsden 1971).

A doença de Chagas ou Tripanossomose americana é causada por *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Craig & Faust 1943). Foi descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas – Carlos Chagas – brasileiro que teve o mérito de descrevê-la relacionando todos os elos da cadeia de transmissão. Craig & Faust (*op. cit.*) relatam distribuição da infecção por *T. cruzi* nas Américas, desde o México até o Chile e a Argentina, em humanos e, desde o sul dos Estados Unidos até Chile e Argentina, em hospedeiros invertebrados e reservatórios mamíferos. Em fins de 1950, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgava 12 milhões de pessoas infectadas e outras 35 milhões expostas ao risco de contrair a infecção (WHO 1960). Recentemente, os relatos são para cerca de 20 milhões de infectados nas Américas Central e do Sul (WHO 1997, Telles *et al.* 2003), sendo o Brasil atingido por cerca de cinco milhões de casos (Ferreira *et al.* 2003). Sabe-se hoje que a doença de Chagas ultrapassou os limites das Américas, constituindo risco para disseminação no continente europeu, por transmissão transfusional, devido a migração de americanos infectados (Viñas 2008).

Hemípteros hematófagos, triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, transmitem o agente etiológico. Recebem várias denominações populares no Brasil, dentre elas barbeiro, chupão, chupança, potó. Representam importância epidemiológica como vetores as espécies que se adaptaram aos domicílios humanos, apresentando diferenças regionais no

Brasil. No Estado de São Paulo, *Triatoma infestans* representou a espécie mais importante na transmissão da doença de Chagas, assim como *Panstrongylus megistus*, nos Estados de Minas Gerais e Bahia. Nos sertões do nordeste, a principal espécie vetora é representada por *T. brasiliensis* (Silveira *et al.* 1984, Ferreira *et al.* 2003). À medida que foi sendo obtida a eliminação das principais espécies transmissoras, consideradas secundárias, como *T. sordida*, *Rhodnius prolixus*, passaram a exigir a atenção das Instituições encarregadas de seu controle.

Trypanosoma cruzi, que tinha inicialmente sua circulação entre animais reservatórios silvestres, recentemente tornou-se adaptado também ao ciclo doméstico, envolvendo seres humanos. A doença de Chagas humana inicia-se com uma aparente ou inaparente fase aguda, mais severa em crianças nos primeiros anos de vida. Pode evoluir para uma fase crônica, mais importante do ponto de vista epidemiológico, em que os indivíduos infectados representam potenciais reservatórios e fontes de infecção. Além disso, os infectados podem desenvolver formas clínicas graves, cardíacas e/ou digestivas, que atingem cerca de 30% dos casos. As implicações da doença, de ordem econômica, foram explicitadas por Pessoa & Martins (1982). Segundo esses autores, a incapacitação para o trabalho, na segunda metade de vida dos pacientes, a época mais produtiva, gera grande demanda de hospitalização e reabilitação. Além disso, o infectado chagásico, nem sempre sintomático, é marginalizado pela sociedade, não lhe sendo dada muitas vezes oportunidade de trabalho remunerado em atividades que seriam possíveis de executar, em consequência da falta de avaliação física adequada (Lana & Tafuri 1995, Dias 1999).

As leishmanioses são um conjunto de doenças amplamente distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp, transmitidas por insetos hematófagos *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae), sendo o gênero *Lutzomyia* considerado o principal vetor (Forattini 1973). Podem provocar lesões ulcerativas cutâneas ou mutilações, além de infecções viscerais nas formas mais graves da doença (Ghose *et al.* 1980, Barbosa *et al.* 2002). Simplificadamente, essas duas grandes categorias clínicas definem as formas que caracterizam, respectivamente, a Leishmaniose Tegumentar Americana, ou LTA e a Leishmaniose Visceral Americana, ou LVA,

como são conhecidas. Têm vasta ocorrência nas Américas, África, Ásia e sul da Europa, afetando 15 milhões de pessoas, além de apresentar risco para outras 350 milhões (Ferreira *et al.* 2003, WHO 1998). Esses autores relatam que, a cada ano, dois milhões de novos casos surgem no mundo. Ashford (2000) considera as leishmanioses como zoonoses re-emergentes.

O primeiro relato, na história da descoberta do agente etiológico da leishmaniose, data de 1885, quando Cunningham, na Índia, descreveu formas amastigotas presentes em casos de calazar, ou leishmaniose visceral (Altamirano-Enciso 2003). Na América do Sul, a leishmaniose visceral foi descrita pela primeira vez em 1913, no Paraguai. No Brasil, o primeiro caso autóctone foi relatado por Chagas, em 1936 (Craig & Faust 1943). A presença da doença vem sendo registrada, desde então, em diversos municípios brasileiros no Norte e no Nordeste. Dados recentes evidenciam sua expansão em nosso país, não se limitando apenas a zonas rurais, mas chegando às periferias dos grandes centros urbanos (Brasil 1999, Amato 2006). É uma doença negligenciada, pois 80% dos casos ocorrem em população de baixa renda (Lauletta & Goto 2006). São raros os casos que atingem pessoas de classe média em áreas endêmicas (Brasil 1999), associando-se a baixo nível de escolaridade (Queiroz *et al.* 2004). A expansão está diretamente relacionada com dois fatos principais: a derrubada de florestas para construção de rodovias e de moradias de pioneiros (que entraram acidentalmente no ciclo zoonótico da doença) e locais de residências antigas de colonos de fazendas, onde animais domésticos e reservatórios não silvestres (cão, cavalo, roedores) mantêm o parasita circulando no peridomicílio (Brasil 1991, Nogueira *et al.* 1998).

1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, desde o desaparecimento das infestações domiciliares de *Triatoma infestans* e, portanto, da interrupção da transmissão vetorial da infecção chagásica, no início de 1970 (Buralli 1985, Carvalho 2000), o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), desenvolvido pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), autarquia da Secretaria de Estado da Saúde, centrou atividades no estudo e vigilância das espécies

ditas secundárias, principalmente *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* e *T. tibiamaculata*, espécies habitualmente encontradas em peridomicílios e intradomicílio. As áreas de maior frequência de encontro destes triatomíneos no Estado estão assinaladas na Figura 1.

A maior concentração de *T. sordida* se dá na região do planalto, áreas das regionais da SUCEN de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Araçatuba. Nas regiões do Vale do Ribeira, Sorocaba, Campinas e, em municípios pertencentes às regiões de Campinas e Ribeirão Preto, que fazem divisa com o Estado de Minas Gerais, observa-se a presença de *P. megistus*. *R. neglectus* estão dispersos na região de planalto, coincidindo em grande parte com a distribuição de *T. sordida* e *T. tibiamaculata*, na região do Vale do Ribeira (Wanderley *et al.* 2006a).

A SUCEN adota, para o Estado, uma divisão em Serviços Regionais (SRs), que propicia o desenvolvimento de seus trabalhos técnicos e administrativos de certo modo descentralizados, ainda que sob direção de uma gerência geral na capital de São Paulo. São dez SRs, cujas sedes localizam-se nas cidades de: São Paulo (SR-01), São Vicente (SR-02), Taubaté (SR-03), Sorocaba (SR-04), Campinas (SR-05), Ribeirão Preto (SR-06), São José do Rio Preto (SR-08), Araçatuba (SR-09), Presidente Prudente (SR-10) e Marília (SR-11). Em um nível hierárquico menor, conta com 27 setores, espalhados no Estado sob o comando dos Serviços Regionais, que possibilita a abrangência dos trabalhos em todos os municípios do Estado (Wanderley *et al.* 2006b). Na Figura 2 encontra-se a representação dos SRs e dos setores operacionais da SUCEN, com indicação das sedes dos seus municípios.

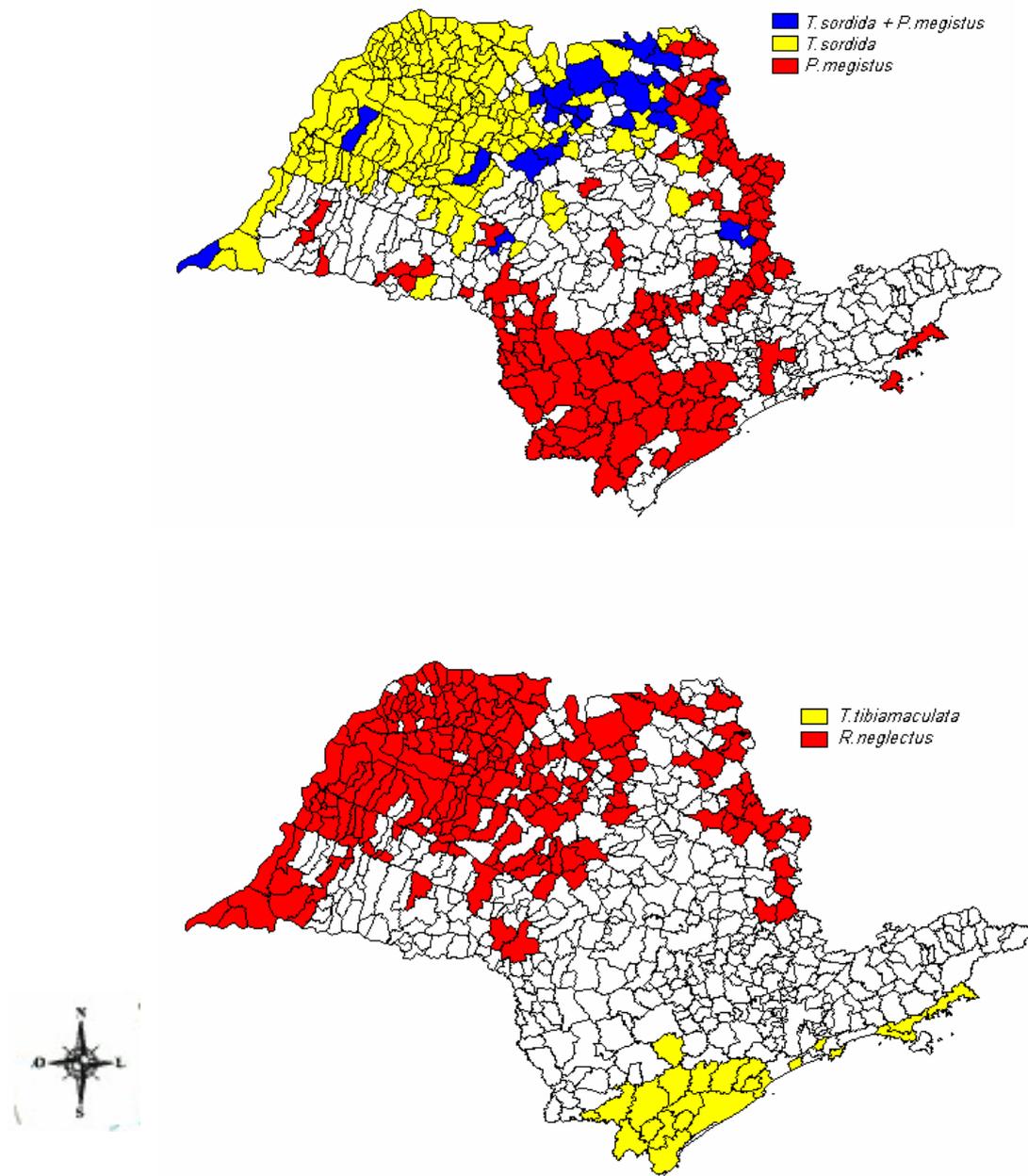


Figura 1: Municípios com ocorrência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *T. tibiamaculata* e *Rhodnius neglectus* no Estado de São Paulo, Brasil (2004 a 2006). Fonte: Wanderley *et al.* 2007. Mapas sem escala.

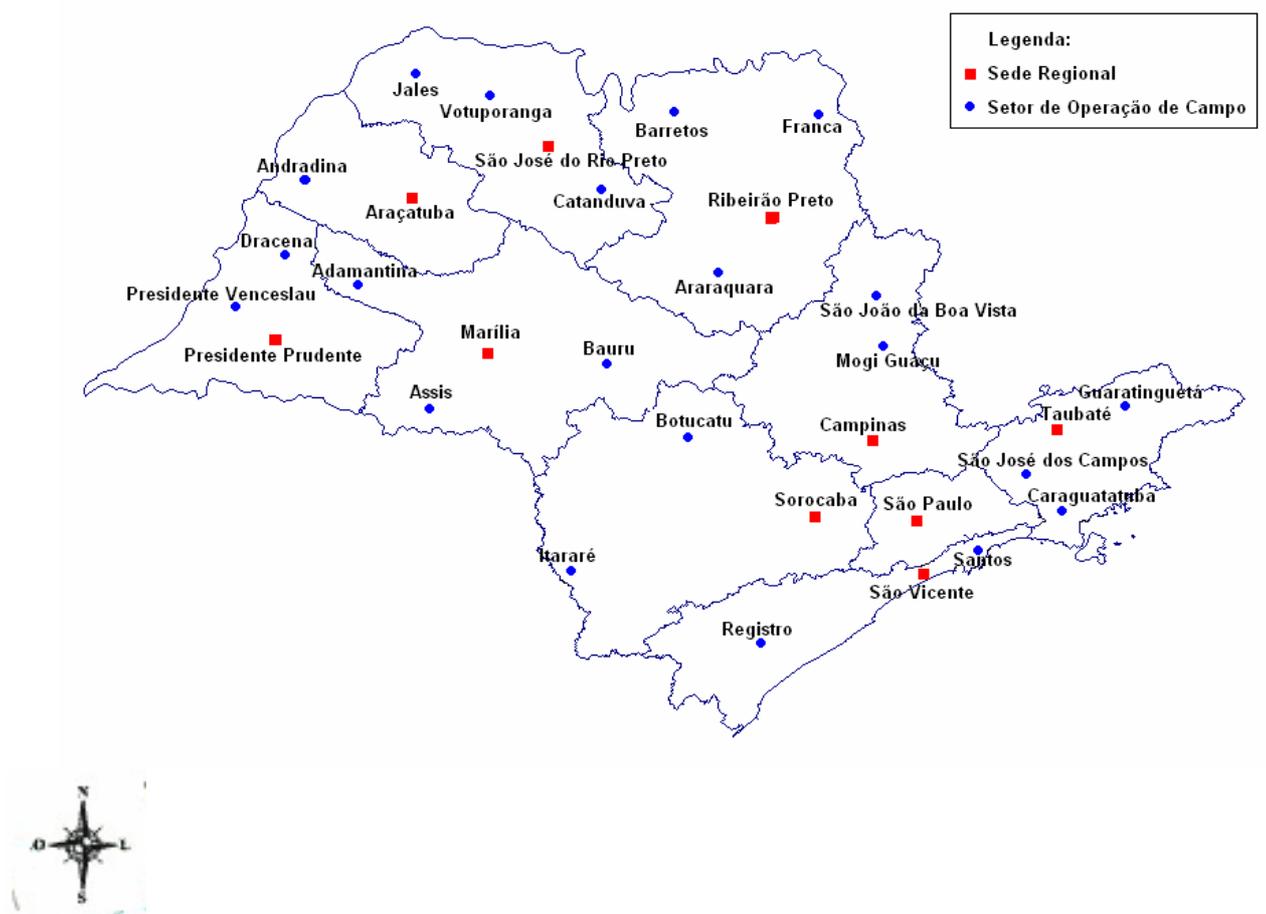


Figura 2: Municípios com sedes de Serviços Regionais e de Setores da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN no Estado de São Paulo, Brasil. Fonte: Wanderley *et al.* 2006b. Mapa sem escala.

1.2 O Programa de Controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo

Desde a implantação, a responsabilidade pelo PCDCh esteve a cargo da SUCEN. Atualmente, os moradores envolvidos com a problemática de triatomíneos vetores em suas residências dispõem de vias de encaminhamento de exemplares desses artrópodes, que resultam ações específicas, através de instâncias municipais (SUCEN 2002). Até o ano de 2002, o objetivo principal desse Programa era manter a interrupção da transmissão natural da doença de Chagas no Estado. Os objetivos específicos incluíam a investigação das manifestações humanas decorrentes do contato da população com triatomíneos potencialmente vetores; a identificação e o combate de colônias domiciliares de triatomíneos, a fim de contribuir para a redução de fontes de infecção humana na cadeia de transmissão e a identificação e encaminhamento dos portadores de infecção chagásica ao sistema de saúde. A partir de 2003 o Programa não mais prevê a realização de “buscas ativas”, isto é, pesquisa de triatomíneos nas casas da zona rural, seguindo programação prévia, porém, fornece capacitação de recursos humanos e assessoria técnica para os municípios. Além disso desempenha as atividades de vigilância vetorial, atendendo notificações de insetos vetores e providenciando sua eliminação quando indicada (Wanderley *et al.* 2006a).

A sorologia para infecção chagásica no Programa de Controle do Estado de São Paulo

A sorologia para diagnóstico da infecção chagásica é realizada em moradores de Unidades Domiciliares como parte integrante da investigação de focos de triatomíneos detectados em atividades de rotina de busca e de notificação, por parte de moradores, justificada quando observada uma das seguintes condições:

- presença de *T. infestans*;
- presença de qualquer espécie com ingesta identificada como sangue humano e positividade para *T. cruzi*;

- presença de qualquer espécie com ingesta identificada como sangue humano;
- presença de qualquer espécie positiva para *T. cruzi* dentro de casa habitada.

A partir de 1993, Carvalho (2000) relata o encontro de triatomíneo não infectado por *T. cruzi*, mesmo que reagente para sangue humano, em vastas áreas do Estado. A autora demonstra, segundo os resultados obtidos nos últimos anos, ausência de associação entre moradores reagentes sorológicos e encontro de triatomíneos infectados nas unidades domiciliares investigadas. Mesmo assim, ficou preconizada a sorologia de moradores apenas em casas onde fossem capturados triatomíneos positivos no intradomicílio. As avaliações da “atividade sorologia” no PCDCh foram feitas por Carvalho (2000), Carvalho *et al.* (2002) e Carvalho *et al.* (2003). Obtiveram esses autores, dentre os casos com resultados sorológicos positivos, comportamento distinto entre populações humanas provenientes das regiões de planalto e de litoral. Na primeira, foi observada positividade relacionada aos grupos etários mais elevados, associados a épocas em que a transmissão era ativa no Estado; na segunda, não houve essa associação, sugerindo modo de transmissão oral, assim caracterizada após cuidadosa investigação de casos.

1.3 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo

Desde o início do século XX a Leishmaniose Tegumentar Americana foi considerada um problema de saúde pública no Estado de São Paulo, envolvendo trabalhadores de construção de ferrovias nas regiões noroeste e oeste, em uma época em que o desmatamento de áreas florestadas propiciou intenso contato da população humana com os vetores da LTA. Segundo Proença e Muller (1979), à medida que essas áreas vão sendo ocupadas e integradas a um processo de desenvolvimento, o número de casos da doença tende a diminuir e até mesmo a desaparecer, recrudescendo quando novos contatos se dão em matas que mantêm focos silvestres próximos.

Sabe-se que a cobertura vegetal original do Estado de São Paulo ocupava 81,1% de seu território, no começo de século XIX e que foi reduzida a

8,3% no início da década de 1970, concentrando-se na região do Litoral e em pequenas manchas residuais espalhadas em poucas regiões (Vitor 1975). Esta condição influenciou a manutenção dos focos silvestres, em que os parasitas circulam entre animais reservatórios e insetos transmissores. Na população humana, ambos sexos são atingidos, sem diferenças significativas entre eles, e em todas as faixas etárias (Gomes 1992, Camargo-Neves 1999). Mantêm-se um padrão epidemiológico endêmico: entre 1979 e 1992 houve a notificação de 3389 casos, dos quais 70% classificados como autóctones do Estado (Tolezano 1994, Domingos 1997).

Deve-se destacar no Estado de São Paulo que, além de LTA, casos de LVA tem ocorrido em menos de dez anos em seu território, com envolvimento de cães em área urbana, como no caso de Araçatuba. *Leishmania (L.) chagasi* foi isolada e *Lutzomyia longipalpis* encontrado, tendo-se caracterizado o primeiro caso humano autóctone de LVA no Estado (São Paulo 2003).

Pode-se visualizar nos mapas do Estado, constantes das Figuras 3 e 4, a distribuição de casos notificados de LTA e das espécies vetoradas identificadas, respectivamente, nos períodos de 1986 a 1995 (Camargo-Neves *et al.* 2002).

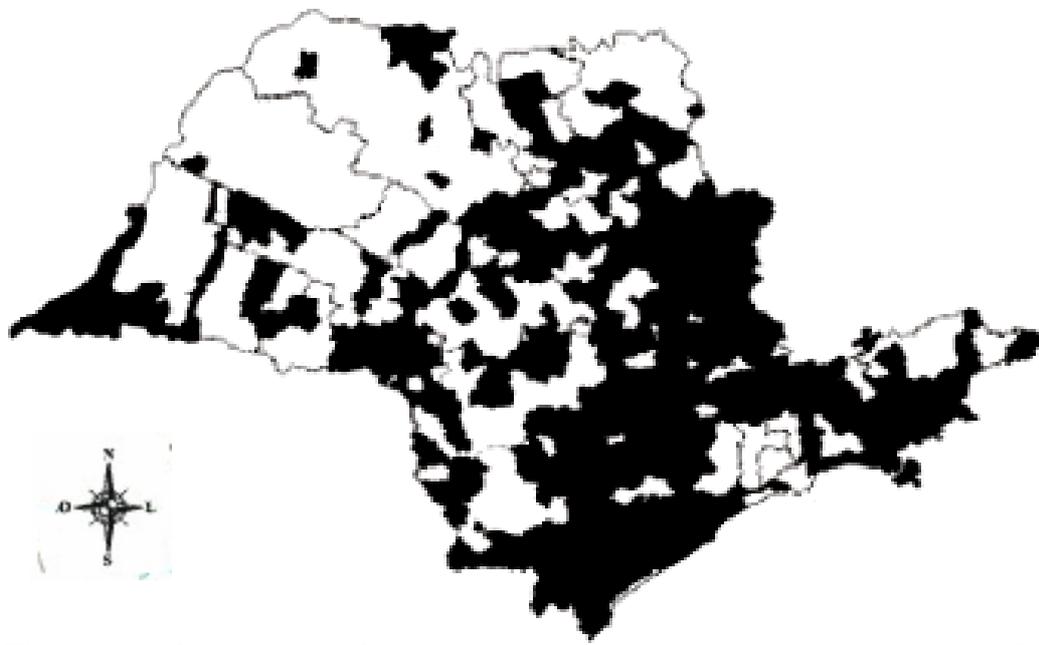


Figura 3 – Mapa identificando as áreas ocupadas pelos municípios com registro de incidência de LTA, Estado de São Paulo, 1986 a 1995.

Fonte: Camargo-Neves *et al* 2002.

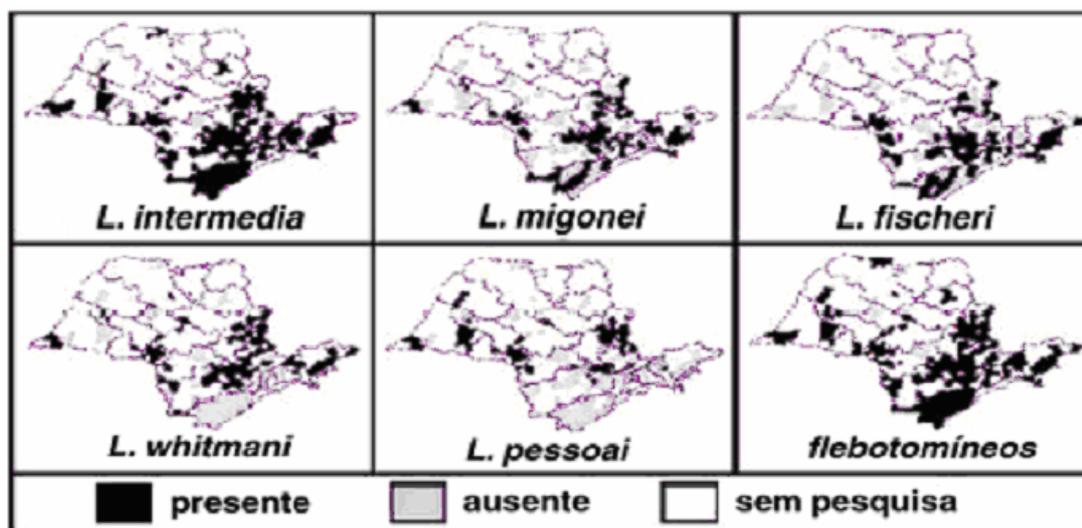


Figura 4 – Mapas identificando as áreas ocupadas pelos municípios com pesquisa de flebotomíneos, Estado de São Paulo, 1986 a 1995.

Fonte: Camargo-Neves *et al* 2002.

1.4 O Programa de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo

As ações de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana estão a cargo do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da SUCEN. A primeira é responsável pela investigação epidemiológica de casos suspeitos e confirmados, o IAL, pelo diagnóstico laboratorial executando as técnicas de Montenegro (IRM), imunofluorescência indireta e imunoensaio enzimático e a SUCEN, por identificação e controle de flebotomíneos vetores (São Paulo 1995, Brasil, 2006b). Diferentemente do que ocorreu com o Programa de Controle da Doença de Chagas, que esteve sob comando de uma única instituição durante várias décadas, facilitando o desenvolvimento de ações de controle, o Programa de Controle da LTA foi organizado em anos recentes (segunda metade da década de 1980). Os casos são notificados e fazem parte de um sistema de vigilância epidemiológica: as informações são padronizadas e contidas em fichas de investigação, sob responsabilidade do CVE. Da boa articulação entre as instâncias dependerá a

efetividade das ações do Programa, incluindo-se aí a atenção para a superposição de resultados para as infecções chagásica e de LTA.

Diagnóstico sorológico de Doença de Chagas e de Leishmaniose

O diagnóstico sorológico de doença de Chagas e de leishmaniose, como o de outras doenças parasitárias, teve início no começo do século passado, com o desenvolvimento da reação de fixação de complemento (RFC) (Kagan 1973). Largamente aplicada à doença de Chagas, recebeu o nome de reação de Guerreiro & Machado, aperfeiçoada de tal modo que mereceu uma publicação da Organização Panamericana da Saúde em 1976, com as autorias de Almeida e Fife Jr. (Carvalho 2000).

Com a evolução dos estudos dessa área, diversos testes foram sendo avaliados e disponibilizados para uso da comunidade científica, ocupando a intradermorreação lugar de destaque, até os dias atuais, no diagnóstico da leishmaniose.

No final da década de 1950 e início da de 1960, as reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e de hemaglutinação indireta (HAI) foram amplamente utilizadas em estudos soropidemiológicos de protozooses. Os resultados comparáveis entre os usos de RIFI, HAI e RFC, com vantagens operacionais nas duas primeiras, pela disponibilidade de “kits” comerciais, ampliaram as possibilidades de seus usos. Na SUCEN, a RIFI foi selecionada para uso em diferentes inquéritos sorológicos populacionais e na avaliação do Programa de Controle sobre doença de Chagas (Carvalho 2000). Na leishmaniose, a RIFI, preconizada por Walton *et al.* (1972), é indicada para ser utilizada em associação a outros testes, principalmente quando a evidenciação de formas parasitárias é falha (Brasil 2006a).

No final da década de 1970 e início da de 1980, a técnica de imunoensaio enzimático (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) passou a ser utilizada para infecção chagásica. Por permitir leitura instrumental dos resultados, em colorímetro fotoelétrico, eliminando componente subjetivo na avaliação, mostrou-se adequada ao seu uso em epidemiologia (Carvalho 2000). Para a leishmaniose, se suficientemente padronizada, fornece resultados comparáveis à RIFI (Silva 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A preocupação com o diagnóstico diferencial entre doença de Chagas e leishmaniose não é recente. Craig & Faust (1943) alertavam para a possibilidade de diferenciar ambas as infecções, diante da “recente descoberta do kala-azar no Brasil”, tomando-se cuidado em caracterizá-las por culturas ou por xenodiagnóstico. Na sorologia, reações cruzadas vem sendo observadas desde as primeiras experimentações, entre antígenos de leishmânias e de tripanossomas, conforme relatado por Pessoa & Martins (1974), para as diversas provas utilizadas nas décadas de 1950 e 1960, desde as de floculação até as de fixação de complemento e de imunofluorescência. As reações sorológicas convencionais para o diagnóstico da tripanossomíase americana e das leishmanioses, como a imunofluorescência indireta (RIFI), o imunoenensaio enzimático (ELISA), a hemaglutinação indireta (HAI), e a aglutinação direta, usam como antígeno tanto parasitas totais como extratos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp..

Tais reações cruzadas são previsíveis, pois ambos os protozoários pertencem à ordem Kinetoplastida. O teste diagnóstico baseado em antígenos de uma espécie pode fornecer reações positivas na presença de outras espécies de *Leishmania* ou mesmo de *Trypanosoma* (Schmidt & Roberts 1977). O parentesco próximo demonstrado por estes protozoários sugere que antígenos comuns possam ser encontrados entre estas espécies (El-Sayed *et al.* 2005). De fato, estudos recentes têm mostrado algum grau de reação cruzada sorológica entre estes agentes etiológicos distintos (Vexenat *et al.* 1996).

Para efeito de Programa de Controle, a implicação desse tipo de ocorrência é preocupante, quanto às avaliações de estimativas de prevalência para as infecções chagásica e leishmaniótica. A região Oeste do Estado de São Paulo, reconhecida como sendo infestada por triatomíneos, principalmente pelas espécies *T. sordida* e *R. neglectus* (Silva *et al.* 2003), tem presença concomitante do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Embora os casos detectados na sorologia do Programa de Controle da Doença de Chagas se

associem, nessa região, à aquisição da infecção chagásica, tanto em outros Estados da federação, endêmicos para a doença, quanto autóctones, conseqüentes de épocas em que se alastrava a doença em nosso Estado, a possibilidade de transmissão das leishmanioses nessa área não pode ser desconsiderada. Desse modo pode haver o aparecimento simultâneo das infecções por *T. cruzi* e por *Leishmania* sp. Em outras regiões do planalto paulista verifica-se também a ocorrência de superposição de áreas de triatomíneos e flebotomíneos.

Ainda que tradicionalmente seja considerada indene para doença de Chagas, a região Litorânea apresenta casos de infecção chagásica detectados por sorologia. Supõe-se que parte desses casos possa ser relacionada à infecção por leishmanias, pois há relato de casos de LTA descobertos a partir de reação cruzada com antígeno de *T. cruzi* (Carvalho, 2000). Domingos (1997) demonstrou que a incidência da LTA no Vale do Ribeira é responsável por até 40% dos casos notificados no Estado.

Como conseqüência, as estimativas da prevalência da infecção chagásica sofrem a influência dos baixos valores preditivos que as reações sorológicas apresentam em áreas de compartilhamento de ocorrência de ambos agravos. Além disso, é difícil justificar o encontro de reações sorológicas positivas em casos não associados a histórias epidemiológicas compatíveis com a transmissão.

Embora reações cruzadas possam ser observadas com títulos próximos ao utilizado como corte entre reagentes e não reagentes (Malchiodi *et al.* 2003), espera-se que a quantificação do teor de anticorpos frente a antígenos homólogos permita uma avaliação mais acurada da especificidade do diagnóstico (WHO 1999, Badaró *et al.* 1983) e, conseqüentemente, dos valores de predição negativos dos testes sorológicos.

Como forma de aumentar a especificidade das reações sorológicas têm sido estudado o emprego de antígenos recombinantes, como o “rk-39”, que detecta somente anticorpos circulantes da forma ativa da LVA (Badaró 1996) e de outros antígenos purificados (Malchiodi *et al.* 1994). Também pode ser utilizada uma técnica para eliminar os anticorpos não específicos, que consiste

no uso, como diluente, de um agente dissociante para ELISA, de alta avides, que permita obter resultados mais confiáveis (Hedman *et al.* 1989).

O Laboratório de Imunoepidemiologia da SUCEN, que realiza rotineiramente a sorologia para infecção chagásica das amostras obtidas em decorrência do atendimento das normas do PCDCh, as tem mantido sob congelamento a -70°C , após processamento. Assim, pareceu-nos interessante adotar uma alternativa para contornar os efeitos de possíveis reações cruzadas entre ambas as infecções, com o uso de uma técnica que permita eliminar os anticorpos não específicos (de baixa avides) e manter a reação com os anticorpos específicos (alta avides ou afinidade). Pode ser utilizado um ensaio imunoenzimático com agente dissociante (caotrópico, no caso a uréia) para eluir as amostras e romper as pontes de hidrogênio das ligações de anticorpos de baixa avides (Hedman *et al.* 1989).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e padronizar um diluente de amostra que possibilite diferenciar, em reações sorológicas, anticorpos IgG específicos no diagnóstico de doença de Chagas e de Leishmaniose.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a sororreatividade para anticorpos IgG, por meio das técnicas de imunofluorescência indireta qualitativa e de imunoensaio enzimático (ELISA), adaptadas ao uso de eluatos de sangue total, por meio de antígenos purificados de *Leishmania (L.) amazonensis*, em amostras obtidas durante o período de 1996 a 2003, procedentes de regiões do Estado de São Paulo, para as quais o sorodiagnóstico de infecção chagásica havia sido realizado.

3.2.2 Realizar uma técnica de imunoensaio enzimático (ELISA) de alta avidéz, em amostras que se apresentaram simultaneamente reagentes para infecção chagásica e leishmaniose, obtidas durante o período de 1996 a 2003, procedentes de algumas regiões do Estado de São Paulo, para as quais o sorodiagnóstico de infecção chagásica havia sido realizado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

O estudo foi com 1333 amostras de sangue obtidas durante o período de 1996 a 2003, no Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) no Estado de São Paulo, procedentes dos Serviços Regionais (SRs), dos quais um, o de São Vicente (SR-02), representa região de litoral e os demais, de áreas de planalto.

Todas as amostras foram armazenadas sob a forma de eluatos de sangue total absorvido em papel-filtro, mantidos sob congelamento (-70 °C). Haviam sido testadas anteriormente por ensaio imunoenzimático e reação de Imunofluorescência Indireta para doença de Chagas, como preconizado no PCDCh do Estado de São Paulo.

4.2 Técnicas sorológicas convencionais adotadas

As técnicas sorológicas utilizadas nos experimentos foram as preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1999): reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de anticorpos IgG humanos anti-*Leishmania (L.) amazonensis*.

4.2.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)

A pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania (L.) amazonensis* foi realizada por Imunofluorescência Indireta, assim descrita: o antígeno (formas parasitárias promastigotas formolizadas) foi distribuído em espaços delimitados de lâminas para microscopia de fluorescência, de modo a conter de 20 a 30 elementos parasitários por campo microscópico. As amostras, na diluição de 1/8, foram depositadas sobre a superfície do antígeno (10µL por espaço) e estas foram incubadas a 37 °C, em câmara úmida, por 30 minutos.

Decorrido o período de incubação, as lâminas foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, com solução salina tamponada fosfatada (SSTF) 0,01M pH 7,2. Após cuidadosa secagem foram adicionados 10 µL de conjugado anti-IgG humano marcado com Isotiocianato de Fluoresceína, na diluição de sua máxima reatividade, 1:400, sobre cada espaço e as lâminas foram novamente incubadas a 37 °C, em câmara úmida, por 30 minutos. O conjugado foi diluído em solução de Evans 0,01% em SSTF, utilizado como contra-coloração.

Após incubação com o conjugado, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes com SSTF e uma em água destilada e secadas ao ar. Em seguida foi acrescentada solução de glicerina tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 8,5. O material, coberto com lamínula, foi mantido ao abrigo da luz até o momento da observação sob o microscópio.

A avaliação de intensidade de fluorescência foi feita em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioskop[®]) com sistema de filtros para derivados de Fluoresceína e lâmpada de vapor de mercúrio de 100W. Objetiva 40X. Foram consideradas positivas as reações em que as formas promastigotas apresentaram uma clara fluorescência verde na membrana celular, contra um fundo vermelho-acastanhado fornecido pela coloração de contraste. A ausência de fluorescência ou sua presença apenas na extremidade ou núcleo dos parasitas, conhecida como fluorescência polar, caracteriza reação negativa.

4.2.2 Imunoensaio enzimático (ELISA)

O ensaio foi baseado na metodologia descrita na literatura por Hedman *et al.* (1989). Brevemente, placas de poliestireno de 96 cavidades para microtitulação, certificadas para alta ligação de proteínas (Costar[®]), foram sensibilizadas com 100 µL/poço de antígeno protéico solúvel de *Leishmania (L.) amazonensis* na concentração de 10 µg/mL, suspenso em solução caotrópica neutra contendo tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 (SSTF) e Uréia 8M, por 20h a 4 °C em câmara úmida. A seguir, foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com SSTF 0,02M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (SSTF-T) e bloqueadas com solução de leite desnatado (Molico[®]) a 0,3% em SSTF-T durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após bloqueio e três lavagens nesse

diluídas em diferentes concentrações de Uréia (0,125M, 0,25M, 0,5M, 1M e 2M). A placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após três novas lavagens, foram aplicados 100 µL/cavidade de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®), na diluição de 1:20000, e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37 °C.

Após lavagem, a revelação da reação foi feita adicionando-se solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8 contendo OPD 0,4 mg/mL e H₂O₂ 0,03% e interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. A leitura de absorbância (ou densidade óptica – D.O.), a 492 nm, foi feita em colorímetro dotado de sistema de avaliação automática de microplacas (Labsystems Multiskan MS®).

4.3 Padronização do ELISA avides

As figuras 6 a 12 representam os organogramas de experimentação e ilustram, de modo simplificado, a padronização realizada do teste ELISA avides, explicados nos itens a seguir.

4.3.1 Soros

Na padronização da técnica de ELISA para detectar a avides de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania*, foram utilizados 20 soros selecionados a partir de triagem prévia pela reação de imunofluorescência indireta, sendo que dez soros foram obtidos de pacientes portadores de doença de Chagas e dez soros foram obtidos de pacientes com leishmaniose. Os soros de portadores de doença de Chagas foram fornecidos, respectivamente, pelo Setor de Xenodiagnóstico do Instituto “Dante Pazzanese” de Cardiologia de São Paulo, disponibilizados para o Laboratório de Imunoepidemiologia da Sucep, em São Paulo e pelo Departamento de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da USP. Todos os soros foram mantidos à temperatura de – 20 °C até o momento do uso.

4.3.2 Parasitas

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram mantidas em garrafas de cultura (Corning®), em meio RPMI® 1640 (Trager & Jensen 1976)

(Cultilab®), enriquecido com 20% de soro fetal bovino inativado e estéril, hemina bovina 1µg/L e 0,01mg/mL de antibiótico (gentamicina) e mantidas em estufa tipo B.O.D. com temperatura controlada de 24 °C. As culturas foram monitoradas diariamente por microscopia de contraste de fase, com objetiva de 40X.

4.3.2.1 Purificação dos parasitas

Após cinco dias de crescimento em meio RPMI® (Trager & Jensen, 1976), as formas promastigotas foram recuperadas através de centrifugação do meio a 3000 RPM por 20 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as promastigotas, foi utilizado para preparo dos antígenos para as reações RIFI e ELISA.

4.3.2.2 Produção do extrato antigênico solúvel de *Leishmania (L.) amazonensis* para reação imunoenzimática (ELISA)

Suspensões purificadas de *Leishmania amazonensis* receberam adição de 5mL de água destilada e foram submetidas à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc, USA), a 40 ciclos por períodos de 30 segundos, em banho de gelo. Após a certificação microscópica da lise total dos parasitas, acrescentaram-se 5 mL de NaCl 0,3M, que têm por função isotonzar a solução, que foi centrifugada a 10000g por 30 minutos a 4 °C, segundo metodologia descrita por Camargo *et al.* 1978 a, b. O sedimento foi aliquoteado e mantido a -70 °C.

4.3.2.3 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para obtenção da curva padrão com 7 pontos, utilizou-se uma solução padrão de γ -globulina humana (Behring®) na concentração de 1 mg/mL. Um volume de 20 µL do extrato antigênico foi adicionado a 1 mL de reagente de Bradford e 50 µL de solução de NaOH 1M. A leitura espectrofotométrica foi feita a 595 nm (Ultrospec 3000 - Pharmacia Biotech) e de acordo com a curva de calibração realizada com a γ -globulina humana [(D.O. 595 nm X 0,9352) - 0,065] obteve-se a concentração protéica.

4.3.3 Padronização da concentração de agente caotrópico

Para a padronização da concentração ideal de agente dissociante (caotrópico), foram utilizados 20 soros previamente testados, de acordo com o mencionado no item 4.3.1.

O agente caotrópico utilizado na padronização do ELISA Aidez foi a solução de Uréia nas seguintes concentrações: 0,125M, 0,25M, 0,5M, 1M e 2M. As amostras foram utilizadas nas diluições 1:100, 1:400, 1:1600 e 1:6400. A concentração de Uréia que melhor eliminou as reações cruzadas foi a 0,5M.

4.3.4 Ensaio para determinação da concentração ideal de antígeno para a reação imunoenzimática (ELISA)

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação, certificadas para alta ligação de proteínas (Costar®). As placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço de concentrações de 1 µg e 10 µg de antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis*, que foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,5. Após incubação por 20 horas à temperatura de 6 °C, foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com SSTF 0,02M pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (SSTF-T) e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico®) em SSTF-T durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após bloqueio e três lavagens com SSTF-T, foram aplicados 100 µL/poço de amostras de soros controle positivo e negativo, em duplicata, nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400 e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após 3 novas lavagens, foram aplicados 100 µL por cavidade de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®), na diluição de 1:20000, e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37 °C.

Após a lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução de citrato de sódio 0,05M pH 5,8 contendo OPD 0,4mg/mL e H₂O₂ 0,03% e interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. A leitura das absorbâncias (ou densidades ópticas - D.O.) foi feita a 492 nm, em colorímetro dotado de sistema de avaliação automática de microplacas (Labsystems Multiskan MS®).

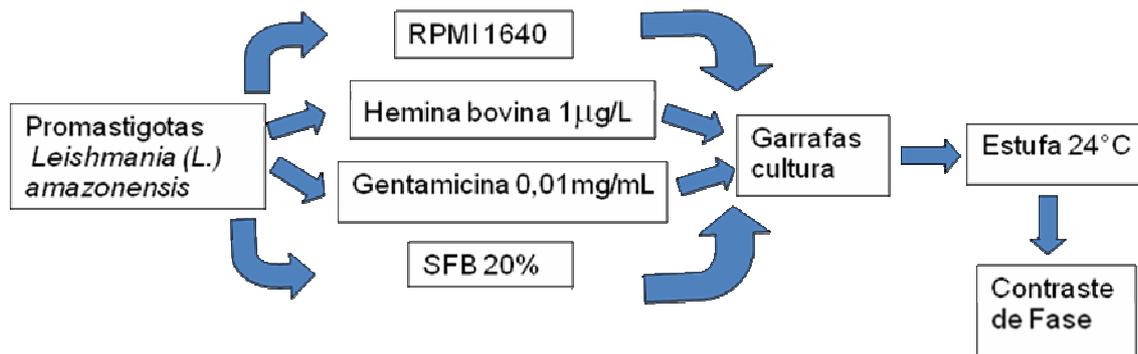


Figura 6: Organograma de experimentação - Cultivo de *Leishmania (L.) amazonensis*.

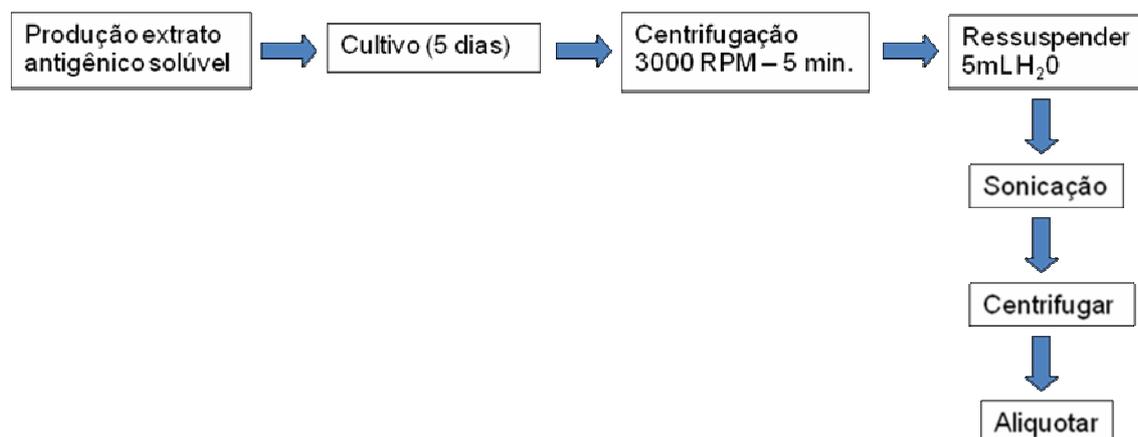


Figura 7: Organograma de experimentação - Produção do extrato antigênico solúvel.

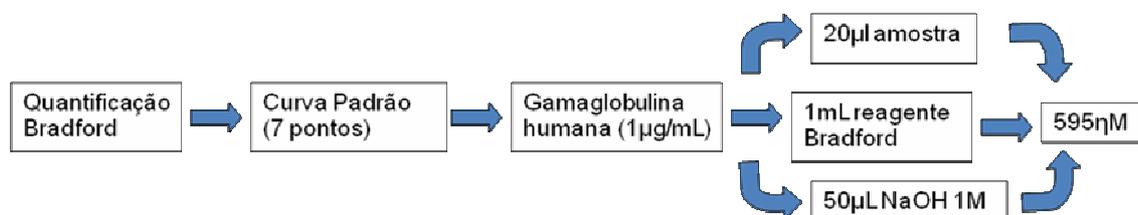


Figura 8: Organograma de experimentação - Quantificação de proteínas.

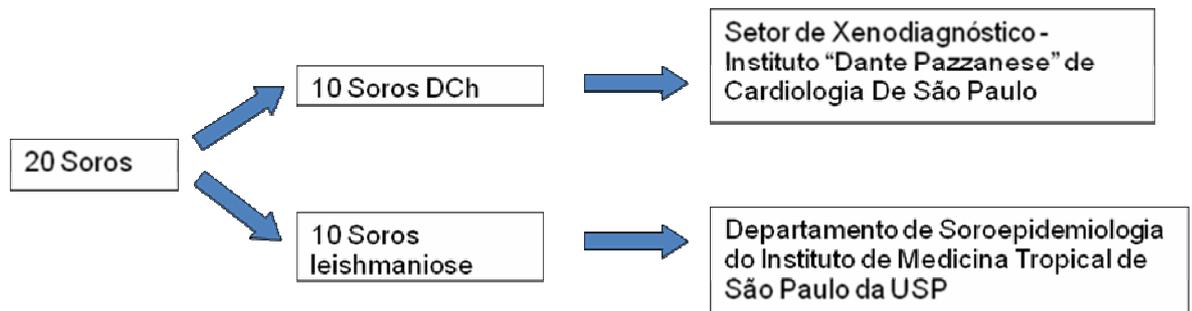


Figura 9: Organograma de experimentação - Soros controles para padronização.

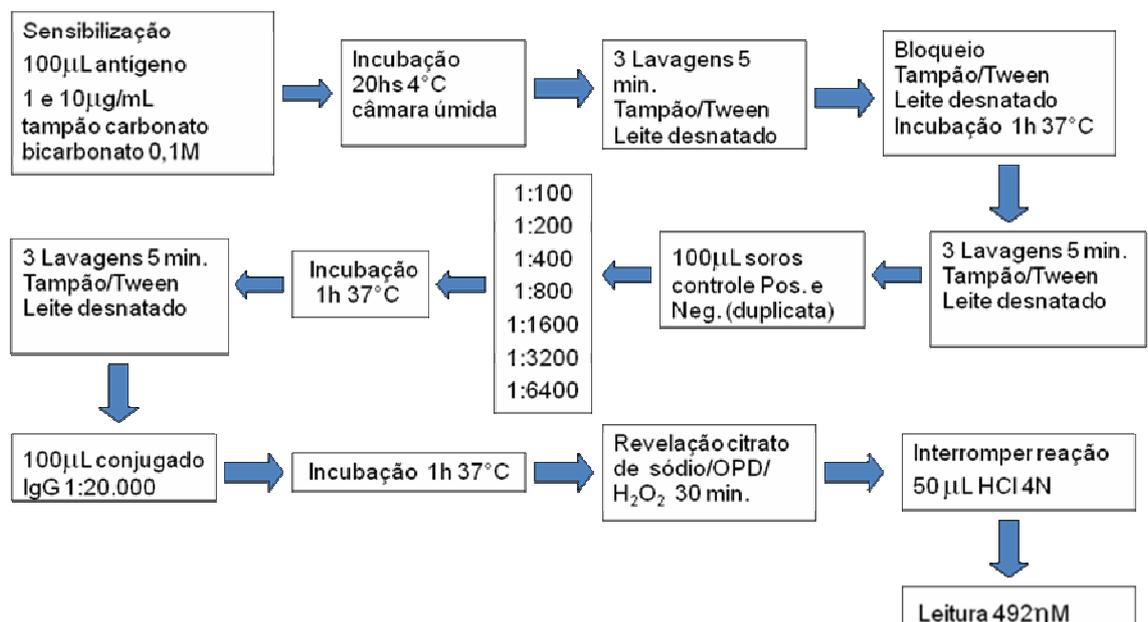


Figura 10: Organograma de experimentação - Determinação da concentração de antígeno para ELISA.

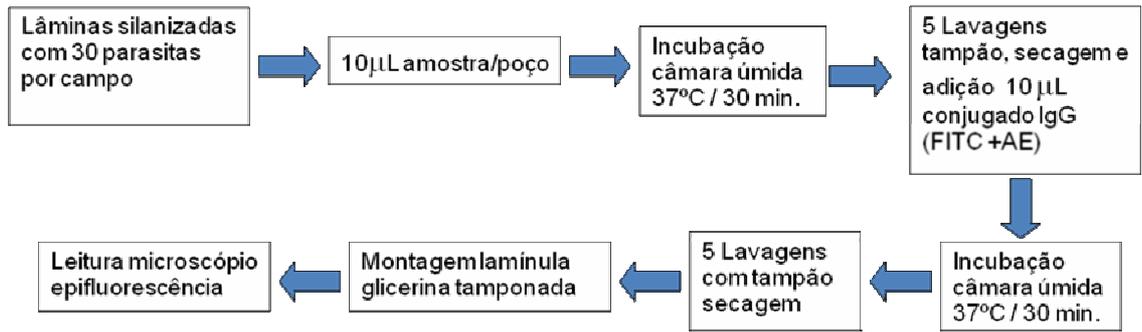


Figura 11: Organograma de experimentação da Reação de Imunofluorescência Indireta.

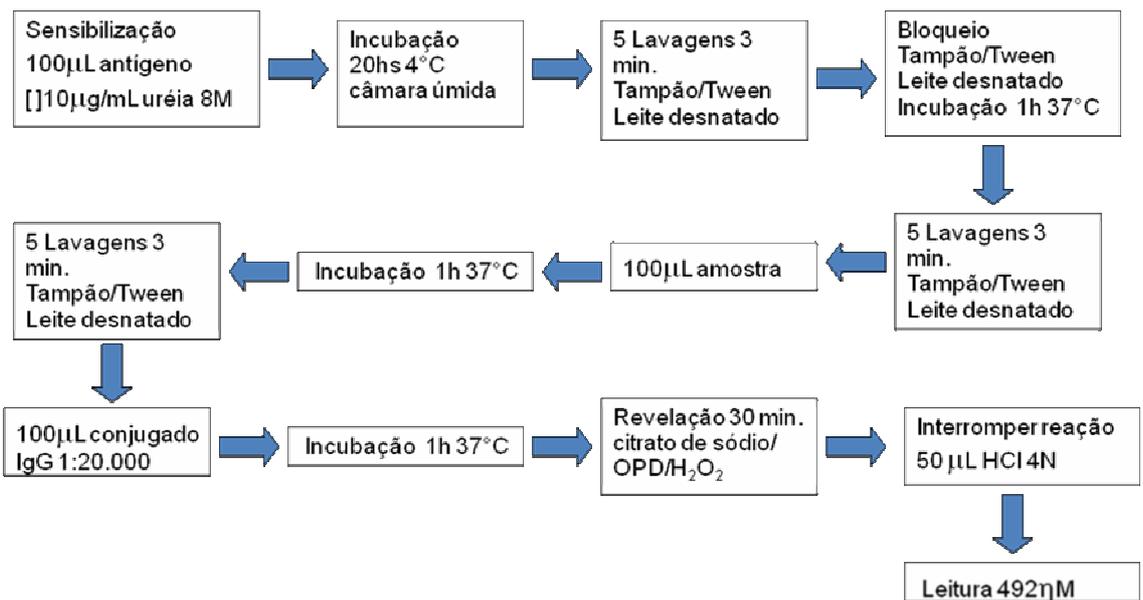


Figura 12: Organograma de experimentação da Reação Imunoenzimática.

4.4 Critério para adoção de resultado positivo e negativo

O resultado foi considerado positivo quando ambas reações, RIFI e ELISA, apresentaram-se reagentes. Resultados discordantes obtidos, independentemente se em reação de imunofluorescência indireta ou em imunoenensaio enzimático, foram considerados como negativos.

4.5 Organização dos dados

Um banco de dados foi elaborado em programa “Excel”, contendo as seguintes variáveis: identificação da amostra, resultado de RIFI para doença de Chagas (Negativo ou Positivo), resultado de RIFI para Leishmaniose (Negativo ou Positivo), resultado de ELISA para doença de Chagas (Negativo ou Positivo), resultado de ELISA para Leishmaniose (com valores de absorbância e resultado Negativo ou Positivo), idade e sexo.

As análises de frequências simples, de Qui quadrado e a análise de gráficos foram realizadas com a aplicação dos programas EPI INFO (Dean *et al.* 1994), STATA - *Stata version 10 for Windows (32-bit)-15 Oct 2007 update* e Graph Pad Prisma 3, respectivamente, todos programas de domínio público, disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde.

4.6 Aspectos éticos da pesquisa

A obtenção de amostras de sangue foi decorrência de atividades programáticas da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN. No momento da colheita de sangue a necessária autorização foi requerida dos pacientes, em consentimento livre e esclarecido. O sigilo da identificação das pessoas foi mantido, trabalhando-se com as amostras codificadas. Respeitando, ainda, o que é preconizado no Tratado de Helsinque, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Unicamp, CEP Grupo III, obtendo **Parecer favorável** (Parecer projeto n.º 158/2006 - CAA; 0393.0.000. 146-06).

5 RESULTADOS

Utilizamos 585 amostras de sangue provenientes dos seguintes Serviços Regionais: São Vicente (SR-02), São José do Rio Preto (SR-08), Araçatuba (SR-09) e Presidente Prudente (SR-10). As regiões envolvidas estão assinaladas na FIGURA 5

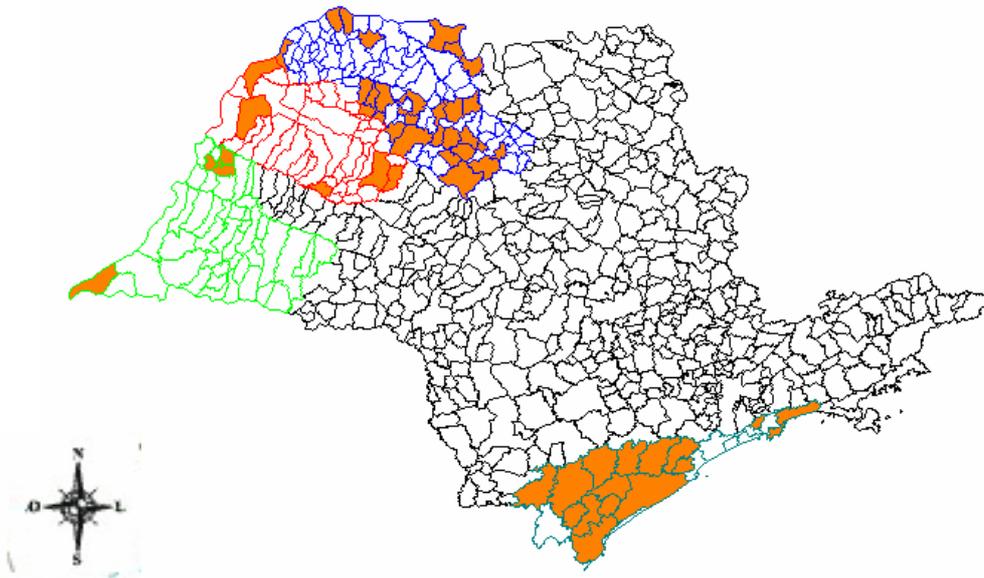


Figura 5. Mapa do Estado de São Paulo, Brasil, com a localização dos municípios trabalhados (laranja) em sorologia para infecção chagásica, de 1996 a 2003. Mapa sem escala.

Legenda de cores: Azul – Serviço Regional de São José do Rio Preto; Vermelho – Serviço Regional de Araçatuba; Verde claro – Serviço Regional de Presidente Prudente; Verde escuro – Serviço Regional de São Vicente.

Na Tabela 1 discrimina-se o total de amostras por Serviço Regional considerado e algumas informações a elas pertinentes.

Tabela 1: Amostras de sangue colhidas entre 1996 e 2003 em alguns Serviços Regionais do Estado de São Paulo, para diagnóstico sorológico de infecção chagásica, com discriminação por sexo e idade.

Serviço Regional	N.º amostras examinadas	Média de idade em anos ± desvio padrão (IC-95%)	Sexo	
			Feminino (%)	Masculino (%)
02 - São Vicente	363	26±19,2 (42,2-52,6)	191 (52,6)	172 (47,4)
08 - São José do Rio Preto	169	36,6±20,9 (44,2-59,8)	81 (47,9)	88 (52,1)
09 - Araçatuba	35	30,9±21,8 (44,9-78,5)	13 (37,1)	22 (62,9)
10- Presidente Prudente	18	41,2±22,1 (30,7-78,4)	8 (44,4)	10 (55,6)
TOTAL	585	29,9±20,6 (50,4-58,6)	293 (50,1)	292 (49,9)

(IC-95%)=Intervalo de Confiança a 95%.

5.1 Determinação da concentração ideal de antígeno

Para a determinação da concentração ideal de antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* foram utilizadas concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL de extrato antigênico solúvel, a partir de um concentrado de 186 µg/mL e os resultados obtidos estão representados na Figura 13. O conjugado anti-IgG humano foi diluído a 1:3000 e os controles foram utilizadas, em duplicata, nas seguintes diluições: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400.

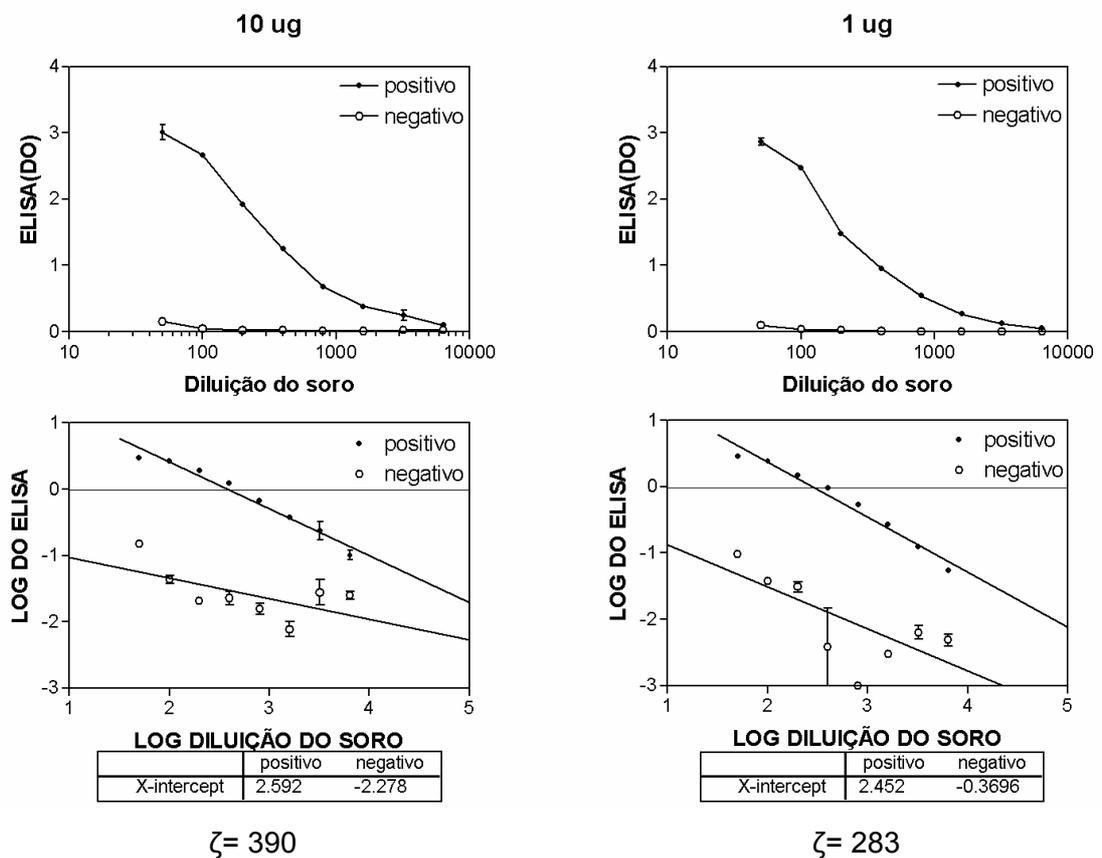


Figura 13: Titulação do antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* aplicado à reação imunoenzimática (ELISA).

Observando os gráficos (Figura 13), pode ser verificado que as respostas das concentrações de 1 µg e 10 µg de antígeno responderam de

forma semelhante, discriminando bem os controles positivo e negativo, com valores de absorvâncias semelhantes. Desse modo, para a realização da técnica de ELISA, utilizou-se a concentração de 1 µg de antígeno/mL.

5.2 Determinação da concentração ideal do caotrópico

Para determinar a concentração ideal do agente caotrópico a ser utilizado nas reações de ELISA de alta avidéz, foram utilizados 20 soros selecionados a partir de uma triagem prévia pela reação de imunofluorescência indireta, sendo 10 soros reagentes para a doença de Chagas (representados pelos símbolos fechados no gráfico) e 10 soros reagentes para leishmaniose (representados pelos símbolos abertos na Figura 14).

Os resultados obtidos com os soros reagentes para doença de Chagas e leishmaniose para determinar a concentração ideal de caotrópico para eliminar as reações cruzadas estão expostos nas Figuras 14A, 14B e 14C.

O conjugado anti-IgG humano foi diluído a 1:20000. Os poços da microplaca de ELISA foram sensibilizados com 1µg de antígeno. Os soros foram utilizados nas seguintes diluições: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. O agente caotrópico foi utilizado nas seguintes concentrações: 0,125 M, 0,25 M, 0,5 M, 1 M e 2 M.

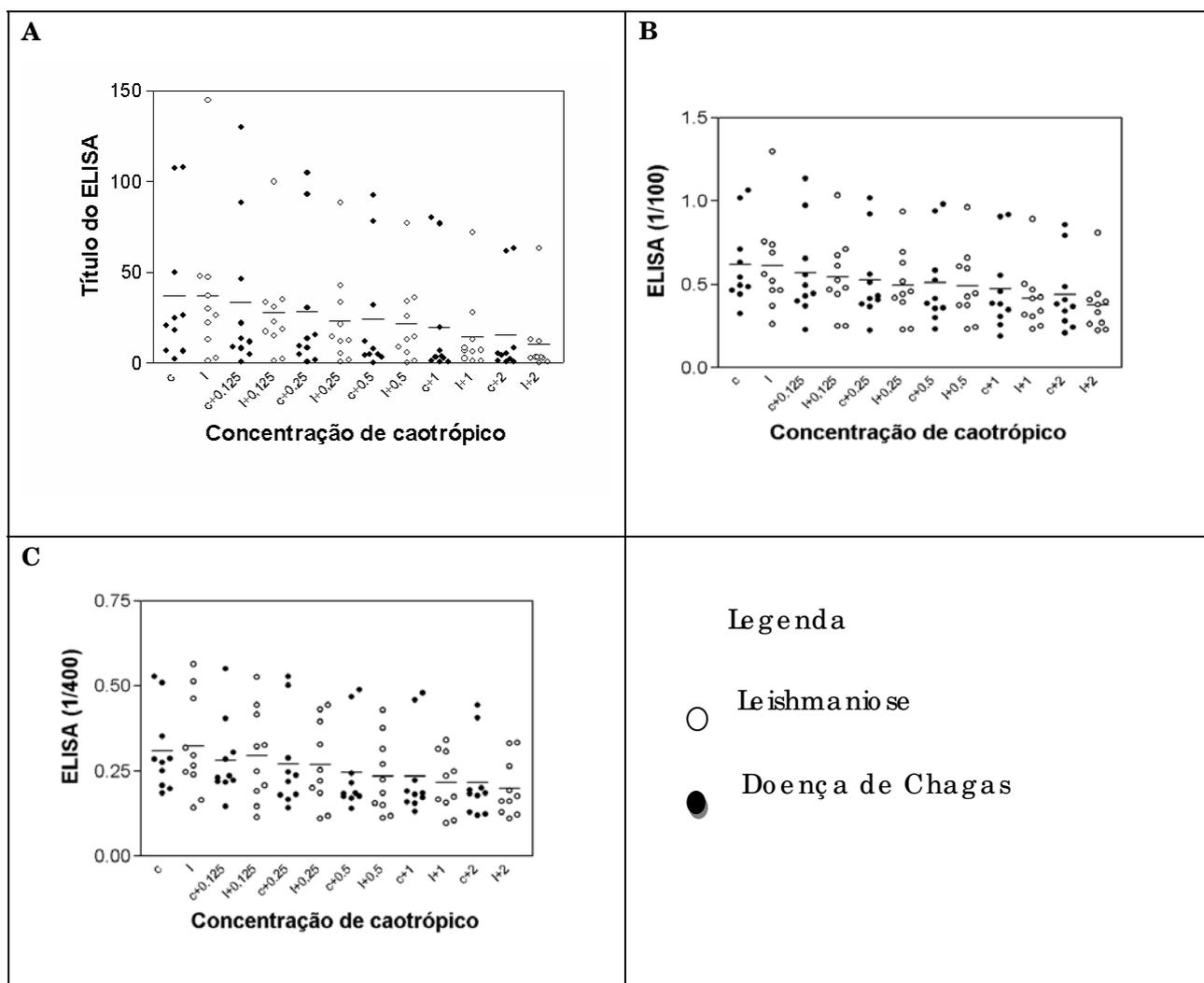


Figura 14: Variação da reação ELISA usando antígeno de *Leishmania amazonensis* de acordo com o tipo de mensuração e a concentração de caotrópico na diluição. A - em soro não diluído. B - Absorbância na diluição 1:100; C - Absorbância na diluição 1:400. c= soro positivo para *Trypanosoma cruzi*, l= soro positivo para leishmaniose. Barras representam média dos valores.

O gráfico que representa a relação dos títulos entre os soros de pacientes chagásicos e os de leishmaniose pode ser observado na Figura 15. Os soros foram utilizados nas diluições de 1:100 e 1:400. As diluições acima

desses valores não foram contempladas no gráfico devido à baixa resposta que apresentaram.

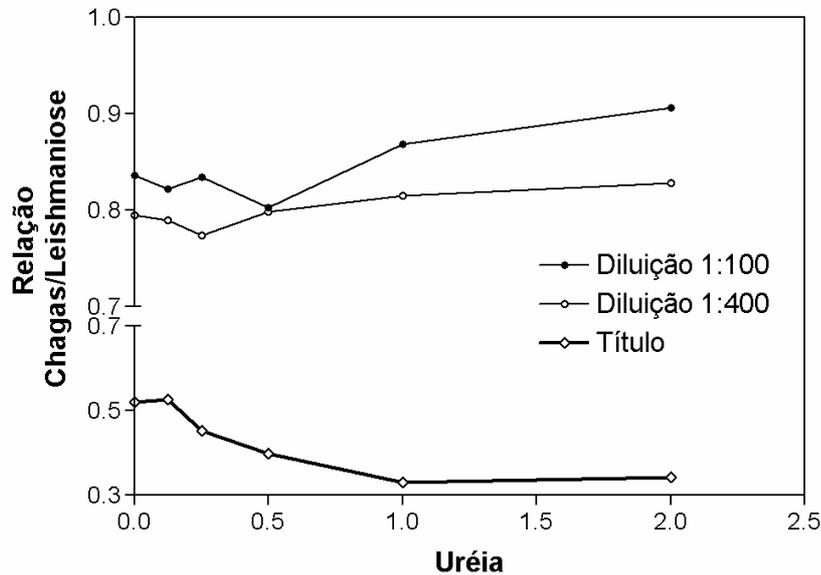


Figura 15: Variação da média dos títulos de ELISA na relação entre os soros Doença de Chagas (símbolo fechado) e Leishmaniose (símbolo aberto) de acordo com a concentração de caotrópico.

Como pode ser observado pelo título (linha espessa), a concentração de 0,5 M é a mais indicada para ser utilizada como diluente de amostra e diminuir a ocorrência de reações cruzadas (é onde se inicia a queda do título). Concentrações acima de 1M de Uréia não responderam bem, ficando os valores da curva do gráfico constantes.

5.3 Imunofluorescência Indireta e Imunoensaio Enzimático

Todas as amostras foram processadas para doença de Chagas e leishmaniose, por ELISA e RIFI, e os resultados positivos destes ensaios imunológicos podem ser observados na Tabela 2.

Para a doença de Chagas, do total de 585 amostras, 17 (2,9%) foram reagentes somente na RIFI e 18 (3,1%) para ELISA, mas somente 13 dessas amostras foram consideradas como positivas para infecção chagásica, pois foram reativas em ambas as técnicas. Essas 13 amostras representam 2,2% do total, estando distribuídas da seguinte forma entre as regiões: 8 amostras (61,54%) pertencem ao SR-08, 4 amostras (30,77%) pertencem ao SR-02 e 1 amostra (7,69%) pertence ao SR-09.

Tabela 2: Amostras positivas nas reações de Imunofluorescência Indireta e ELISA para doença de Chagas (Ch), com antígenos de *Trypanosoma cruzi* e de leishmaniose (L), com antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis*, por região do Estado de São Paulo.

Reações positivas	Região				Total
	S. Vicente	S. José Rio Preto	Araçatuba	Presidente Prudente	
	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)
RIFI-Ch	7 (41,2)	8 (47,1)	2 (11,7)	0 (0,0)	17 (100,0)
ELISA-Ch	9 (50,0)	8 (44,4)	1 (5,6)	0 (0,0)	18 (100,0)
D. de Chagas	4 (30,8)	8 (61,5)	1 (7,7)	0 (0,0)	13 (100,0)
RIFI-L	15 (51,7)	11 (37,9)	3 (10,4)	0 (0,0)	29 (100,0)
ELISA-L	54 (60,0)	19 (21,1)	5 (5,6)	12 (13,3)	90 (100,0)
Leishmaniose	9 (47,4)	9 (47,4)	1 (5,2)	0 (0,0)	19 (100,0)
D. Chagas e Leishmaniose	4 (36,4)	6 (54,5)	1 (9,1)	0 (0,0)	11 (100,0)

Com relação à leishmaniose, do total de 585 amostras, 29 amostras foram reagentes somente na RIFI e 90 em ELISA, mas somente 19 delas foram consideradas como positivas para leishmaniose, pois resultaram reativas em ambos os testes. As 19 amostras representam 3,25% do total e estão distribuídas da seguinte forma entre as regiões: 9 amostras (47,4%) pertencem à região de São Vicente, 9 amostras (47,4%) pertencem à região de São José do Rio Preto e 1 amostra (5,2%) pertence à região de Araçatuba. A região de Presidente Prudente não apresentou nenhuma amostra reagente para ambos os agentes.

Observando as 13 amostras reagentes para doença de Chagas e as 19 reagentes para leishmaniose verificou-se que, entre elas, 11 apresentaram-se reagentes para ambas as infecções. Essas 11 amostras, representando 1,9% do total examinado, foram consideradas como tendo reações cruzadas e foram reprocessadas com o ELISA Avidex.

A tabela 3 mostra a média de idade, por região, dos pacientes com amostras reagentes para doença de Chagas e leishmaniose.

TABELA 3: Média de idade, por região do Estado de São Paulo, dos pacientes com amostras reagentes para doença de Chagas e leishmaniose.

Média das idades (anos)	Região		
	São Vicente	S. José Rio Preto	Araçatuba
D. de Chagas	36	38	25
Leishmaniose	24	37	25

As amostras que apresentaram reações cruzadas foram reavaliadas utilizando-se uréia 0,5M como diluente, com o objetivo de avaliar o grau de redução das reações cruzadas. Foi observado que 11 amostras apresentaram uma redução nos valores das densidades ópticas e uma manteve-se invariante

(amostra 2). Três amostras que estavam com o título no limiar de reatividade não foram consideradas como co infecções (amostras 3, 4 e 10), apesar de não ter havido diferença nos títulos, com e sem caotrópico.

As amostras foram diluídas em SSTF e em uréia 0,5M, concentração que mais eliminou as reações cruzadas. Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 16.

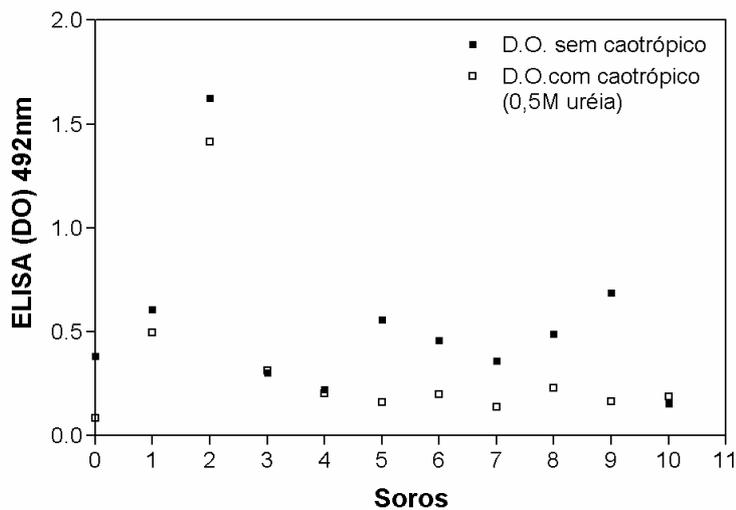


Figura 16: Variação das absorbâncias (densidades ópticas) das amostras com reação cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose, com e sem a utilização de agente caotrópico como diluente de amostra.

6 DISCUSSÃO

A sorologia aplicada à doença de Chagas no Programa de Controle do Estado de São Paulo apresenta valores decrescentes da positividade ao longo do tempo, como reflexo da eliminação das infestações domiciliares de seu principal vetor, *Triatoma infestans* (Carvalho, 2000). Embora não se descarte a possibilidade de transmissão da infecção chagásica por outras espécies de vetores, cuja importância epidemiológica é considerada secundária, apesar da ampla distribuição, o monitoramento das possibilidades de formação de focos e aparecimento de casos é bem acompanhado com a participação da população, que notifica a descoberta de “barbeiros” nas suas residências. O atendimento dessas notificações, quando confirmada a espécie dos vetores, desencadeia a obtenção de amostras de sangue de moradores.

Em relação à situação epidemiológica, foram selecionadas para o trabalho, as amostras correspondentes às áreas de planalto e de litoral, que apresentam distintas respostas sorológicas, conforme a idade dos reagentes sorológicos. No litoral, área de Mata Atlântica, onde a circulação de *T. cruzi* é silvestre, os casos de infecção oral pelo parasita assumem papel relevante na manutenção da doença em níveis endêmicos (Carvalho *et al.* 2003). As infecções distribuem-se em todas as idades, observando-se os casos com idades acima das médias, geralmente associados a migrantes, com possibilidade de terem adquirido a infecção em outros Estados da Federação. E, entre os nativos infectados, a distribuição das idades segue padrões determinados pelo *modus vivendi* da população, que tem hábitos alimentares peculiares às condições do ambiente em que vivem, praticando caça de animais sabidamente reservatórios silvestres de *T. cruzi*, manipulando-a e ingerindo-a crua ou mal cozida (Carvalho, 2000, *op. cit.*). No planalto, a investigação epidemiológica dos casos conduz à indicação de que a infecção chagásica autóctone foi adquirida em épocas importantes de transmissão vetorial no Estado, até o final da década de 1960 e início da de 1970. Por outro lado, associam-se os casos com idades inferiores às médias, àqueles adquiridos em outras unidades da federação, cuja transmissão vetorial ainda permanecia importante em relação ao nosso Estado.

É interessante notar o descobrimento, na área de litoral, de casos de leishmaniose a partir dos inquéritos sorológicos para infecção chagásica entre escolares da primeira série do ensino fundamental, devido à ocorrência de reações cruzadas entre antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* (Carvalho, 2000, *op. cit.*), identificando a importância que assume a investigação epidemiológica rigorosa de casos reagentes sorológicos na prática da rotina de trabalho em regiões com possibilidades de apresentar ambas as infecções. Tais regiões apresentam a superposição de vetores, *P. megistus* e *T. tibiamaculata*, infectados por *T. cruzi*, no caso da infecção chagásica (Carvalho, 2000) e diversas espécies de *Lutzomyia*, com predomínio de *Lu. intermedia*, no caso da leishmaniose, lembrando ainda que 40% de casos de leishmaniose do Estado concentram-se nessa região, segundo Domingos (1997).

Outro fato que merece destaque na área de litoral, ou SR-02, é a procedência majoritária das amostras de sangue colhidas no Estado. Há que se destacar que, nessa região, instalou-se uma rede de postos de identificação de “focos” de triatomíneos (PIFTs) no início da década de 1980, que contribuiu para o atendimento às notificações desses insetos feitas por moradores. Esses PIFTs permitiram envolvimento da população local com as ações de controle de vetor, mantendo-se, com isso, um fluxo contínuo de informação, atendimento e colheita de amostras de sangue para diagnóstico da infecção chagásica, que permaneceu, por muitos anos, ativada. Na vigência do Programa de Controle da doença de Chagas, o interesse permaneceu até que os recursos orçamentários destinados ao PCDCh se deslocaram ao controle da dengue, tendência observada para os demais Programas desenvolvidos na SUCEN (Carvalho, 2000).

Assim, por um lado, temos o diagnóstico realizado em pessoas que não necessariamente adquiriram a infecção no Estado, ou a adquiriram em épocas importantes da transmissão vetorial e, por outro, em focos silvestres atuais. Daqueles que já vinham positivos, autóctones ou não, a possibilidade de albergar agentes etiológicos de leishmaniose também não pode ser ignorada. As áreas de ocorrência de ambas as doenças não são levadas em conta quando se faz investigação epidemiológica para cada uma separadamente. O Estado de São Paulo, por ser grande centro industrial, atrai trabalhadores de

várias regiões do Brasil e, alguns procedentes de áreas endêmicas, preservam os riscos de geração de novos casos, em função da existência e ampla disseminação das espécies de vetores.

A maioria das amostras procedeu do SR-02, São Vicente (363 ou 62,1%), de pessoas cuja média de idade foi 26 anos. Do conjunto de amostras, 4 (30,8%) foram reagentes para doença de Chagas e 9 (47,4%) para leishmaniose. Para doença de Chagas, a média de idade dos casos reagentes, foi maior que para leishmaniose, sugerindo padrões de aquisição distintos para ambas as infecções. Pelas características dessa região, que abrange o Vale do Ribeira e possui algumas áreas remanescentes de Mata Atlântica, os contatos com os focos selvagens de reservatórios para doença de Chagas e de vetores dos agentes etiológicos da leishmaniose seguem padrões distintos.

Na área de planalto, representada pelas regiões do oeste do Estado, distinguiu-se o SR-08, São José do Rio Preto, como segunda região com o maior número de amostras examinadas (169 ou 28,9%), com 8 reagentes (61,5%) para doença de Chagas e 9 amostras (47,4%) reagentes para leishmaniose. Localizada no oeste do Estado de São Paulo, a região possui clima quente e seco, característica de cerrado, onde são encontrados triatomíneos da espécie *T. sordida*, conhecido vetor da doença de Chagas.

O SR-09, Araçatuba, está na terceira colocação no número de amostras (35 ou 6%) e possui apenas um caso reagente para doença de Chagas (7,7% do total) e um caso de leishmaniose (5,3% do total das amostras reagentes). O SR-09 localiza-se próximo ao SR-08, igualmente com clima quente e seco e paisagem característica de cerrado. Nos últimos anos descreve-se um grande aumento no número de casos de leishmaniose visceral, juntamente com o aumento de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, principal vetor da LVA no Estado de São Paulo.

O SR-10, região de Presidente Prudente, possui 18 amostras, o que equivale a 2,92% do total de amostras. Não apresentou casos reagentes de doença de Chagas nem de leishmaniose, o que não exclui a possibilidade da existência de ambas as endemias. A influência de pequena amostra proveniente dessas áreas reflete-se na baixa probabilidade de encontro de

reagentes sorológicos em ambos os casos de doença de Chagas e leishmaniose. Essa região representa grande importância para as migrações humanas, por conter assentamentos do Movimento dos Sem Terra (MST), locais que, segundo Silva *et al.* (2007), foram encontrados vetores de ambas as infecções, porém, com população assentada proveniente de outras áreas do Estado de São Paulo e dos demais da Federação.

As médias de idades das amostras submetidas à sorologia na área de planalto foram 37 anos, 31 anos e 41 anos, respectivamente para o SR-08, São José do Rio Preto, SR-09, Araçatuba e SR-10, Presidente Prudente. Para os reagentes sorológicos as idades foram compatíveis com a aquisição, no passado, da doença transmitida por vetor, quando grassava a doença de Chagas nessas regiões. No caso da leishmaniose, implicações da média de idades dos reagentes são difíceis de interpretar à luz da soroepidemiologia, devido ao fato de não se dispor de investigação epidemiológica para essa endemia quando se investigam os casos reagentes sorológicos no PCDCh. Nas quatro regiões estudadas foi verificado que o número de indivíduos do sexo masculino não difere estatisticamente dos de sexo feminino, com exceção da região de Araçatuba (SR-09).

Relatos na literatura sobre a ocorrência de reações sorológicas cruzadas entre agentes etiológicos da leishmaniose com os da lepra, da malária, da tuberculose (Chakraborti *et al.* 2003) e entre os da leishmaniose, da toxoplasmose e da doença de Chagas (Abramo *et al.* 1995), levam à preocupação com as falhas de especificidade que os testes apresentam. No caso em pauta, entre doença de Chagas e leishmaniose, os resultados do diagnóstico laboratorial com a técnica de “western blot” indicam que o compartilhamento de muitas bandas, tanto para antígenos homólogos como para heterólogos, sugerem a disponibilidade de epítomos comuns entre as espécies de protozoários, explicando as reações cruzadas observadas nos testes imunodiagnósticos (Mott *et al.* 1976, Vexenat *et al.* 1996).

Assim, o imunodiagnóstico dessas enfermidades perde confiabilidade, quando se trata de uma ou de outra a resposta imune específica, que propicie o diagnóstico preciso. Do ponto de vista clínico, a dúvida acarreta problemas,

como o retardo do tratamento e o uso de medicação inapropriada (Franck *et al.* 2003), além da distorção dos indicadores epidemiológicos, como prevalência, incidência, entre outros. Logo, tanto em São Paulo como em outros Estados, o diagnóstico diferencial de *T. cruzi* e *Leishmania* é relevante, porque a sobreposição das regiões endêmicas é um evento relativamente comum, condição que dificulta a vigilância e o delineamento dos riscos. Camargo & Rebonato (1969) e Vexenat *et al.* (1996) sugerem que uma das alternativas da resolução do problema é o desenvolvimento de uma técnica de imunodiagnóstico que possibilite a diferenciação das infecções e a redução do falso diagnóstico.

As estratégias disponíveis para a superação das dificuldades vão desde a utilização de títulos de corte para leishmaniose, inferiores aos adotados para doença de Chagas (Rodríguez-Bonfante *et al.* 2007), até o uso de diferentes antígenos em reações sorológicas (Guimarães *et al.* 1981; Vale *et al.* 2005), incluindo-se o uso de antígenos recombinantes (Passos *et al.* 1997), análises de diferentes antígenos de *Leishmania* por “western blot”, aplicáveis ao diagnóstico sorológico da LTA (Gonçalves *et al.* 2002) e a pesquisa de antígenos com a reação em cadeia por polimerase – PCR (Degrave *et al.* 1994).

O uso de diluente de amostra como agente caotrópico ainda não havia sido aplicado ao imunodiagnóstico de doença de Chagas e de leishmaniose, com a finalidade de estabelecer distinção entre as reações com os anticorpos e eles específicos. Meireles (2005) relata exaustivamente trabalhos objetivando a distinção entre anticorpos de diferentes fases evolutivas de doenças infecciosas aplicados à toxoplasmose e a viroses, estas, de forma mais expressiva em termos de estudos publicados. Três agentes caotrópicos são mais utilizados como diluentes de amostra: Dietilamina, Guanidina e Uréia. No caso presente a Uréia mostra-se mais conveniente do que as outras duas, por seu custo inferior e também pelo perigo devido à elevada toxicidade que as demais apresentam. Desse modo, como alternativa, o presente estudo propõe o uso do agente caotrópico, solução de Uréia na concentração 0,5M, com a qual se obteve melhor rendimento das reações imunoenzimáticas para o

objetivo de reduzir a produção de reações cruzadas, resultando em um diagnóstico mais preciso do que o até então verificado.

Na sensibilização das placas de titulação, para a padronização da concentração ideal de antígeno, foram testadas duas concentrações. Os resultados indicaram que os da menor concentração, não diferiram na resposta com relação com as da concentração maior, permitindo maior economia de reagentes.

A análise dos resultados obtidos mostrou que a diluição do soro em agente caotrópico é apropriada para a eliminação ou redução das reações cruzadas. Presume-se que o agente caotrópico promova a redução da quantidade de ligações inespecíficas, melhorando a confiabilidade do diagnóstico sorológico.

Os experimentos proporcionaram uma significativa redução nos valores de absorbância (D.O.) das amostras inicialmente diluídas em SSTF, que apresentaram reações cruzadas. Após a diluição das mesmas amostras em Uréia 0,5M, apenas uma não apresentou redução do valor de D.O. (visualizada na Figura 9). Em 11 amostras com reações cruzadas para a doença de Chagas e leishmaniose, o uso do agente caotrópico induziu o rompimento das ligações “fracas” e inespecíficas. Uma amostra não apresentou redução na D.O., dada a presença de anticorpos específicos, o que sugere co-infecção entre doença de Chagas e leishmaniose. A maior parte das amostras que apresentaram reações cruzadas foi do lote procedente da região de São José do Rio Preto (6 amostras ou 54,6%), seguido por São Vicente (4 amostras ou 36,4%) e 1 amostra (9,0%) pertence à região de Araçatuba.

O uso do caotrópico como diluente da amostra mostra-se útil, portanto, para a realização de estudos sobre a incidência e a prevalência da leishmaniose. Gomes & Camargo-Neves (1998) referindo-se aos programas de controle que preconizam as medidas que devem ser observadas quanto aos elos da cadeia epidemiológica, destacam a fragilidade representada pela adoção de medidas emergenciais, em ocasiões de surtos, que ocorrem em nosso meio, quando não se dispõe de dados estatísticos em bases confiáveis.

Camargo-Neves *et al.* (2006) expressam sua preocupação com o que hoje representa um desafio ao estudo epidemiológico da LTA no Estado de São Paulo: a participação de reservatórios silvestres na cadeia de transmissão da doença no ambiente domiciliar. Trata-se de novo componente a ser considerado na eventualidade de realização de inquéritos sorológicos dessa endemia. No caso específico da LVA em cães, que tem assumido aspecto relevante na transmissão e manutenção da endemia no Estado, a técnica adotada para triagem no diagnóstico de casos é a do imunoenensaio enzimático, ficando a de imunofluorescência indireta para a confirmação de reagentes na primeira (São Paulo, 2006). O uso de caotrópico na diluição de amostras, não só nesses casos como também nos de investigações por meio de inquéritos sorológicos envolvendo a pesquisa de participação de outros animais reservatórios na cadeia epidemiológica, proporcionará mais uma opção adicional de melhoria na qualidade do exame sorológico e de sua interpretação.

Como este trabalho utilizou apenas parte das amostras colhidas nas rotinas do Programa de Controle da doença de Chagas do Estado de São Paulo, sugere-se a continuidade do re-processamento das amostras que estão mantidas sob congelamento no Laboratório de Imunepidemiologia da Sucen, utilizando testes de avidéz com o diluente de amostra estudado. Diversos municípios do SR-04, Sorocaba, que fazem fronteira com o Estado do Paraná, representantes de áreas sabidamente envolvidas com a transmissão de leishmaniose (Silveira *et al.* 1999, Lonardoní *et al.* 2006), não puderam ser avaliadas nesse momento, assim como os representados pela região de Campinas, hoje importante para a transmissão de leishmaniose. Estudos comparativos dos resultados obtidos entre todas as regiões do Estado de São Paulo certamente trarão informações relevantes para a epidemiologia de ambas as doenças.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 O uso de diluente de amostra, solução de Uréia 0,5 M, padronizada como agente caotrópico, permite a discriminação de casos da doença de Chagas e da leishmaniose, por meio de ELISA-IgG.
- 7.2 O re-processamento (RIFI e ELISA) das amostras de sangue procedentes de quatro regiões do Estado de São Paulo, colhidas entre 1996 e 2003 revelou, quando usados antígenos de *T. cruzi* e de *Leishmania (L.) amazonensis*, positividade para ambos os agentes em 11 amostras (1,9% do total examinado).
- 7.3 ELISA de alta avidéz, aplicada às 11 amostras previamente positivas para ambas as infecções, levou à confirmação de um caso, admitido como sendo de co-infecção.
- 7.4 Esta foi a primeira oportunidade para o uso de agente caotrópico como diluente de amostra, associado a ELISA-avidéz de anticorpos IgG, em amostras obtidas no Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo. Sua adoção mostra-se um procedimento adequado para os levantamentos epidemiológicos de casos em regiões onde a ocorrência de vetores da doença de Chagas e da leishmaniose é simpátrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramo C, Fontes CJF, Krettli AU 1995. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by Indirect Immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 53: 202-205.
- Altamirano-Enciso AJ 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes pré e pós-colombianas. *Hist Ci Saúde-Manguinhos* 10: (3).
- Amato VS 2006. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Bol Ep Paul (BEPA)*. www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa (fevereiro). Ano 3, número 26.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. *Int J Parasitol* 30: 1262-1281.
- Badaró RJS 1996. *Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de Leishmania chagasi (rk39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral*. [tese doutorado] São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. 153 p.
- Badaró RJS, Reed SG, Carvalho EM 1983. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg* 32: 480-484.
- Barbosa RD, Luiz MMG, Zacarias AN *et al.* 2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Laborat Immunol* 9: 1361-1366.
- Bradford MN 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem* 72: 248-254.

- Brasil 1991. *Guia de controle da leishmaniose tegumentar americana*. Brasília, Ministério da Saúde.
- _____. 1999. *Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): normas técnicas*. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). 85 p.
- _____. 2006a. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ª ed rev. Brasília: Ministério da Saúde.
- _____. 2006b. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde.
- Buralli GM 1985. *Estudo do controle dos triatomíneos domiciliados no Estado de São Paulo*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 242p.
- Camargo ME, Rebonato C 1969. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Amer J Trop Med Hyg* 18: 500-505.
- Camargo ME, Leser PG, Rocca A 1978a. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. III. Hemagglutination titers paradoxical decrease in acute infections. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 20: 41-44.
- Camargo ME, Leser PG, Kiss MH, Amato Neto V 1978b. Serology in early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 20: 152-160.
- Camargo-Neves VL 1999. *Características da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- Camargo-Neves, VLF, Gomes AC, Antunes JLF 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 299-306.

- Camargo-Neves VLF, Mayo RC, Rangel O 2006. Leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo: um breve histórico e a descrição das espécies de flebotomíneos. *Bol Ep Paul 3 (Supl 1)*: 31-35.
- Carvalho ME 2000. *Sorologia da infecção chagásica no Programa de Controle do Estado de São Paulo, Brasil*. [tese] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 219p.
- Carvalho ME, Silva RA, Rodrigues VLCC, Barata JMS, Oliveira CD 2002. Programa de controle da doença de Chagas no Estado e São Paulo: sorologia de moradores como parte de investigação de unidades domiciliares com presença de triatomíneos vetores na década de 1990. *Cad Saúde Pública 18*: 1695-1703.
- Carvalho ME, Silva RA, Barata JMS, Domingos MF, Ciaravolo RMC, Zacharias F 2003. Soroepidemiologia da tripanosomíase americana na região do litoral sul, São Paulo. *Rev Saúde Pública 37*: 49-58.
- Chakraborti T, Sarkar D, Ghosh DK 2003. Immune complex antigens as a tool in serodiagnosis of kala-azar. *Mol Cel Bioch 253*: 191-198.
- Craig CF, Faust EC 1943. *Clinical Parasitology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 3 ed.
- Dean AG, Dean JA, Colomlier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Arner TG 1994, *Epi Info, Version 6: a world processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia.
- Degrave W, Fernandes O, Thiemann O *et al.* 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the Polimerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz 89*: 367-368.
- Dias JCP 1999. O desafio da doença de Chagas nos centros urbanos. *Rev Soc Bras Med Trop 32 (Supl 2)*: 45-47.
- Domingos MF 1997. *Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, no*

período de 1981 a 1995. [dissertação]. São Paulo: São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 85 p.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G *et al.* 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.

Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS 2003. *Fundamentos biológicos da Parasitologia humana*. Barueri, SP: Manole.

Forattini OP 1973. *Entomologia médica*. 4º volume. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda.

Franck FM, Fernández MM, Taranto NJ *et al.* 2003. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitol* 126: 31-39.

Ghose AC, Halder JP, Pal SC *et al.* 1980. Serological investigation on Indian kalazar. *Clin Exp Immunol* 40: 318-326.

Gomes AC 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Ann Bras Dermatol* 67: 55-60.

Gomes AC, Camargo-Neves VLF 1998. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 553-558.

Gonçalves CCM, Vissoci EMR, Abreu BAF *et al.* 2002. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western Blot for diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 66: 91-102.

Guimarães MCS, Celeste BJ, Castilho EA, Mineo JR *et al.* 1981. Immunoenzymatic Assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, Kala-azar, and Chagas disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-trypanosoma and anti-leishmania antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 30: 942-947.

Hedman K, Lappalainen M, Makela O 1989. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Inf Dis* 159: 736-740.

- Kagan IG 1973. Parasitic diseases. In: Paul JR, White C. *Serological epidemiology*. New York, Academic Press, p.155-167.
- Lana M, Tafuri WL 1995. *Trypanosoma cruzi*. In: Neves DP. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu, 9 ed, p.82-114.
- Lauletta JAL, Goto H 2006. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. *Bol Ep Paul (BEPA)*. www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa 26_lva.htm (fevereiro).
- Lonardoní MVC, Silveira TGV, Alves WA, Maia-Elkhoury ANS *et al.* 2006. Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública* 22: 2713-2716.
- Lumsden WHR, Marsden PD 1971. Trypanosomiasis and leishmaniasis. *The Practitioner* 207: 181-185.
- Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ *et al.* 1994. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol* 97: 417-423.
- Malchiodi EL, Fernández MM, Taranto NJ *et al.* 2003. Characterization of human infections by *Leishmania spp* in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitol* 126: 31-39.
- Meireles LR 2005. *Padronização e aplicações da avidéz de anticorpos IgG no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose animal*. [tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 117p.
- Mott KE, Lehman Jr JS, Hoff R *et al.* 1976. The epidemiology and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Amer J Trop Med Hyg* 25: 552-562.
- Nogueira JPN, Basso G, Cipoli AP *et al.* 1998. American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil – Epidemiology in transformation. *Ann Agric Environ Med* 5: 1-5.

- Passos VMA, Volpini AC, Braga EM *et al.* 1997. Diferencial serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. using ELISA with a recombinant antigen (rTc 24). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 791-793.
- Pessoa SB, Martins AV 1982. *Parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 11 ed.
- Proença NG, Muller H 1979. Nota sobre a ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana na Serra da Cantareira, São Paulo, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública* 13: 56-59.
- Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB 2004. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Ped* 80: 141-146.
- Rodríguez-Bonfante C, Amaro A, García M *et al.* 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad Saúde Pública* 23: 1133-1140.
- São Paulo 1995. *Manual de vigilância epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana. Normas e instruções*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde. 28p.
- _____ 2003. *II Informe Técnico sobre Leishmaniose Visceral Americana*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde.
- _____ 2005. *Manual de Vigilância Epidemiológica, Leishmaniose Tegumentar Americana*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 28 p.
- _____ 2006. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias e Coordenadoria de Controle de Doenças, 158 p.
- Schmidt GD, Roberts LS 1977. *Foundations of Parasitology*. Saint Louis: The C.V. Mosby Co, 604p.

- Silva RM 2005. *Estudo comparativo entre os métodos ELISA e Imunofluorescência Indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para leishmaniose visceral americana*. [tese]. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- Silva RA, Rodrigues VLCC, Carvalho ME, Pauliquévis Jr C 2003. Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo: persistência de alta infestação por triatomíneos em localidades na década de 1990. *Cad Saúde Pública* 19: 965-971.
- Silva RA, Sampaio SMP, Koyanagui PH, Poloni M, Carvalho ME, Rodrigues VLCC 2007. Infestação por triatomíneos em assentamentos e reassentamentos rurais na Região do Pontal do Paranapanema, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 527-532.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 36: 15-312.
- Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U *et al.* 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 413-423.
- SUCEN 2002. *Relatório do Grupo de Trabalho, revisão do Programa de Controle da Doença de Chagas*. São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias.
- Telles S, Abate T, Slezzynger T *et al.* 2003. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *FEMS Imm Med Microbiol* 37: 23-28.
- Tolezano JE 1994. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 427-434.

- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673 – 675.
- Vale AM, Silva-Neto AF, Fujiwara RT, Araújo RN, França-Silva JC, Costa RT, Mayrinck W, Nascimento E 2005. Identificação de antígenos de reatividade cruzada em diferentes espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (Supl 1): 412.
- Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 38: 177-185.
- Viñas PA 2008. *Transmissão silenciosa*.
[www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?data\[id_materia_boletim\]=8445](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?data[id_materia_boletim]=8445)
Notícia de 21/02/2008.
- Vitor MAM 1975. *A devastação florestal*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura.
- Walton BC, Wiley HB, Arjona I 1972. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 21: 296-299.
- Wanderley DMV, Carvalho ME, Silva RA, Rodrigues VLCC, Barbosa GL, Curado I 2006a. Programa de Controle da Doença de Chagas – PCDCh. *Bol Epidemiol Paul* 3 (Supl 1): 13-18.
- Wanderley DMV, Glasser CM, Silva B, Teles FB 2006b. Superintendência de Controle de Endemias – Sucec: 30 anos de trajetória. *Bol Epidemiol Paul* 3 (Supl 1): 3-9.
- Wanderley DMV, Silva RA, Carvalho ME, Barbosa GL, 2007. Doença de Chagas: A vigilância entomológica no Estado de São Paulo. *Bol Epidemiol Paul* 4 (38): 10-14.
- World Health Organization (WHO) 1960. *Chagas' disease. Report of a study group*. Technical Report Series nº 202. Geneva: WHO.

1997. *Tropical Disease Research*. Progress
rep, p. 95-96.

1998. *Leishmania and HIV in Gridlock*.
Geneva: CTD/Leish/98.9, UNAIDS/98.2.

1999. *Procedimentos laboratoriais em
Parasitologia Médica*. São Paulo, Livraria Ed. Santos, 2ª edição, 114 p.



CEP, 18/12/07.
(PARECER PROJETO: Nº 158/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "SOROLOGIA DE LEISHMANIOSES EM ÁREAS DE AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO CHAGÁSTICA NO ESTADO DE SÃO PAULO, NO PERÍODO DE 1996 A 2003".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Anderson Pacheco dos Santos

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Parcial, apresentado em dezembro de 2007, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de dezembro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP