

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PARA O DIAGNÓSTICO, O CONTROLE E O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Andreza Pain Marcelino¹, Paula Monalisa Nogueira²,
Aline Priscila Batista³, Tatiane Campos Ferreira⁴,
Daniel Moreira de Avelar¹, Janete Soares Coelho dos Santos⁴,
Maria Norma Melo², George Luiz Lins Machado-Coelho³,
Sophie Yvette Leclercq⁴

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada com uma incidência estimada de 400.000 casos anuais (300.000 de leishmaniose cutânea e 100.000 de leishmaniose visceral), especialmente presente em áreas de clima temperado a tropical, incluindo o Brasil. Do ponto de vista clínico, especial atenção tem sido dada à forma visceral, já que, na maioria das vezes, leva à morte quando não tratada adequadamente. Por outro lado, a leishmaniose tegumentar apresenta espectro de manifestações cutâneas de cura prolongada. O protozoário é transmitido pela picada de fêmeas de flebotomíneos, e o cão é considerado o principal reservatório do parasito em meio urbano. Assim, as estratégias de controle estão centradas e dirigidas verticalmente no diagnóstico e no tratamento adequado dos casos humanos, controle do reservatório canino através de inquérito sorológico e eutanásia dos animais sororreagentes, bem como aplicação de inseticidas de ação residual para combate ao vetor. Dos entraves identificados na execução dessas ações, o diagnóstico sorológico da LV canina configura-se como um dos principais. O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral recomenda para o diagnóstico sorológico da LV Canina a utilização de teste rápido

imunocromatográfico-DPP como triagem e ELISA como teste confirmatório, produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz-FioCruz, único reconhecido até o momento pelo Ministério da Saúde. Essa limitação pode interferir nas ações de diagnóstico laboratorial se ocorrerem problemas técnico-operacionais ou descontinuidade no fornecimento por demandas maiores que a capacidade instalada pela unidade produtora. Por isso, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de um kit alternativo para suprir a necessidade da rede laboratorial ligada ao programa de controle da LVC.

Nesse contexto, o projeto propôs a transferência de dois produtos para tratamento e diagnóstico de leishmaniose, desenvolvidos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a Fundação Ezequiel Dias (Funed) para produção-piloto e validação. Este resumo dará enfoque ao segundo produto, o antígeno preparado com a cepa BH400 *L. chagasi*, crescida em meio LIT-NN para o diagnóstico de LVC por ELISA.

Primeiramente, todas as etapas de produção do antígeno foram transferidas da UFMG para a Funed em escala de bancada, e dois lotes de placas de ELISA foram sensibilizados e conservados a - 20°C. A

¹ Serviço de Doenças Parasitárias – Fundação Ezequiel Dias

² Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias – Universidade Federal de Ouro Preto

³ Laboratório de Leishmaniose – Universidade Federal de Minas Gerais

⁴ Serviço de Biotecnologia e Saúde – Fundação Ezequiel Dias

sophie.leclercq@funed.mg.gov.br

seguir, foi desenhado um ensaio triplo cego entre a Funed (Laboratório de Referência), a UFOP e a UFMG, a fim de avaliar a validade e a estabilidade do antígeno ao longo de um ano, quando conservado a essa temperatura. Na Funed, os ELISAs foram realizados em paralelo com a placa sensibilizada com o antígeno UFMG, e o Kit Bio-Manguinhos atualmente utilizado na rede de laboratórios públicos. Na UFOP e na UFMG, os ELISAs foram realizados apenas com o antígeno UFMG. Oitenta e um soros (48 positivos e 33 negativos) foram fornecidos pela UFOP, codificados, aliquotados e distribuídos igualmente entre as três instituições para ser testados em tempo de conservação da placa de ELISA previamente determinados (3, 6, 9, 12 e 15 meses) e dois tipos de substrato para revelação da reação, OPD e TMB.

Por ser o laboratório de referência estadual para leishmaniose visceral, avaliamos primeiramente os resultados obtidos pela Funed para os dois ELISAs (Kit Bio-Manguinhos e Antígeno UFMG) com o substrato OPD em relação à definição prévia das amostras, determinada pelo resultado parasitológico (*imprint* ou mielocultura) ou resultado sorológico obtido por dois ou três métodos sorológicos diferentes (ELISA e IFI Bio-Manguinhos e Kalazar Detect InBios). No tempo inicial (três meses de conservação), os índices de sensibilidade foram 89,6% e 93,8%, respectivamente, e os de especificidade foram de 87,9% e 84,8%, com índice Kappa de concordância 0,8 para os dois testes. A concordância entre os resultados Funed e Bio-Manguinhos foi considerada alta com índice de copositividade

de 94% e conegatividade de 100%. Quando avaliada a conservação da placa ao longo de 15 meses, o índice de copositividade se mostrou muito estável (entre 94% a 100%), mas a conegatividade diminuiu um pouco em função do tempo, passando de 100% para 84% a 88%.

Quando a placa foi revelada com TMB (mesmo substrato usado no Kit Bio-Manguinhos), os resultados da Funed mostraram sensibilidade de 89,4% e especificidade de 84,8% no tempo inicial de conservação. A concordância entre os resultados Funed e Bio-Manguinhos também foi considerada alta, com índice de copositividade de 93,9% e conegatividade de 96,9%. Quando avaliada a conservação da placa ao longo de um ano, os índices de copositividade e conegatividade se mostraram muito estáveis (entre 94% a 100%), exceto para o tempo T3.

Quando avaliada a reprodutibilidade interlaboratorial, os resultados mostraram muita discordância entre as instituições, principalmente quando o TMB foi usado para a revelação. Os problemas de reprodutibilidade entre as instituições podem ser devido a diversos fatores que ainda devem ser investigados.

Em conclusão, os resultados da Funed demonstraram que o antígeno avaliado é muito semelhante ao do de Bio-Manguinhos e possui uma estabilidade a -20°C. No desenvolvimento de um futuro kit de diagnóstico, o TMB, que não possui toxicidade comparada ao OPD, poderia ser usado na revelação. ■

Financiamento: Fapemig, PPSUS APQ-00013-10