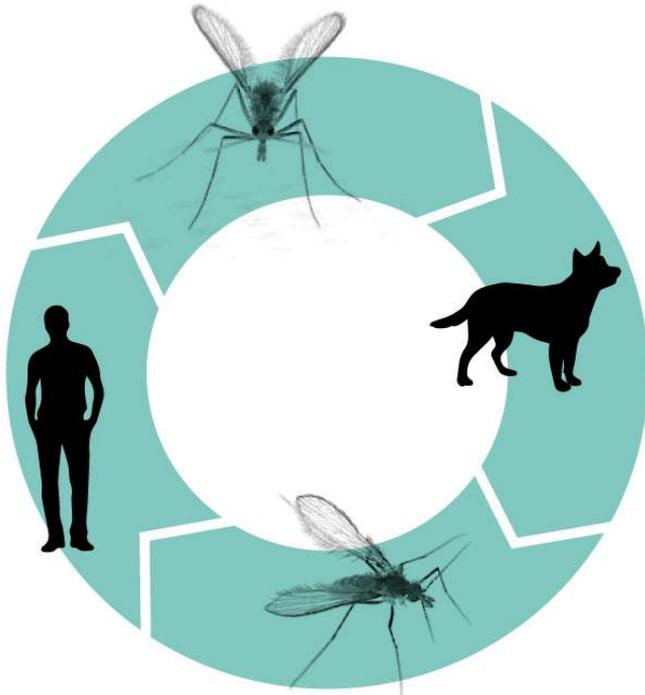


# Avanços no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral

Lara Carvalho Godoi



Simpósio Internacional

Leishmaniose visceral: Desafios para o controle no contexto da diversidade de cenários

Módulo 3 - A Leishmaniose Visceral e as Novas Ferramentas para o Controle

São Paulo, Brasil - 23 e 24 de abril de 2018

EPIDEMIOLOGIA

TRATAMENTO

CONTROLE DO  
HOSPEDEIRO

VACINAÇÃO

DIAGNÓSTICO



**Necessidade de  
aprimoramento dos  
métodos de controle e  
prevenção da doença**



**Necessidade de aprimorar o  
diagnóstico**

## ✓ **DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

## ✓ **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

### ▪ **MÉTODOS PARASITOLÓGICOS**

- ✓ **Esfregaço de punção de medula óssea, fígado, baço, linfonodo ou pele**
- ✓ Formas amastigotas
- ✓ Padrão-ouro
- ✓ Especificidade 100%
- ✓ Sensibilidade varia de acordo com a amostra
  - 54-90% na punção de medula óssea
  - 76-98% no aspirado de baço

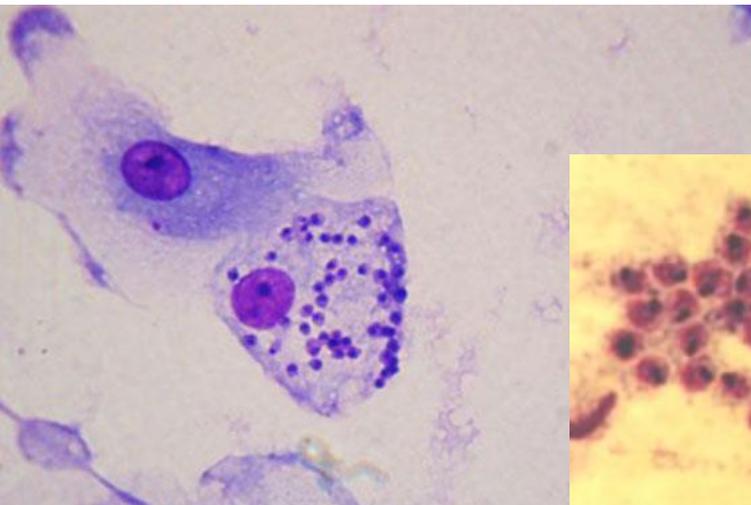
*(ZIJLSTRA et al., 2001; SUNDAR et al., 2003; SILVA, 2005)*



## ▪ OUTROS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

- ✓ Cultivo *in vivo*: inoculação do material em animal de experimentação
- ✓ Cultivo *in vitro*: semeadura em meios de cultura específicos
- ✓ Não são totalmente sensíveis
- ✓ Tempo para liberação do resultado

(SCHNUR *et al.*, 1987)





## ▪ MÉTODOS MOLECULARES

- ✓ Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- ✓ Sangue total, medula óssea, linfonodo, pele e raspado conjuntival
- ✓ Custo mais elevado: equipamentos e corpo técnico especializados
- ✓ Sensibilidade variável durante o curso da infecção (50-88%)
- ✓ Dependente do tipo de amostra e dos alvos de amplificação



## ▪ MÉTODOS SOROLÓGICOS

### ✓ Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

- Utilização de patógeno íntegro
- Reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos,
- E em cães, reatividade cruzada com *Erlichia canis* e Ricketisias
- Sensibilidade 68 a 100% e Especificidade 74 a 100%
- Dependente de pessoal treinado
- Subjetividade na leitura

### ✓ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

- Extratos solúveis (SLA)
- Sensibilidade 71 a 100% e Especificidade 85 a 100%

(COELHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2009; ASSIS, 2013)

- Proteínas recombinantes - testes provavelmente mais sensíveis e específicos

## ▪ MÉTODOS SOROLÓGICOS

### ✓ **Imunocromatografia - Teste Rápido**

- Rapidez na obtenção do resultado
- Possibilidade de aplicação de proteínas recombinantes
- Subjetividade na leitura

### ✓ **Quimioluminescência**

- Método sensível
- Associado à automação



# Leishmaniose Visceral Humana (LVH)

## O que temos hoje, registrado perante a ANVISA?

### ✓ 14 produtos

- **ELISA IgG ou IgG+IgM:** 4 produtos
- **Imunocromatografia IgG ou IgG/IgM:** 5 produtos
- **Imunofluorescência indireta IgG ou IgM:** 4 produtos
- **Quimioluminescência indireta IgG+IgM:** 1 produto

### ✓ 2 produtos desenvolvidos/produzidos no Brasil

- **Teste imunocromatográfico:** Fundação Baiana de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico, Fornecimento e Distribuição de Medicamentos - Bahiafarma
- **Imunofluorescência Indireta:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. Disponível em:  
<<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeTecnico=leishmania%20sp>>. Acesso em:  
10 abril 2018.





## O que é ofertado pelo SUS?

### ✓ 2015 a 2017:

- **It Leish** - Bio-Rad Laboratories
- rK39
- Sensibilidade: 92 a 93%
- Especificidade: 95,6 a 97%

NOTA INFORMATIVA - CGDT/DEVIT/SVS/MS  
Brasília , 17 de dezembro de 2014

### ✓ 2018:

- **Teste Rápido OnSite Leishmania** - Beijing Genese Biotech Inc - Bio Advance Diagnósticos
- rK39
- Resultado obtido pela FUNED
  - Sensibilidade: 90,9%
  - Especificidade: 100%
- Resultado obtido pela FIOCRUZ
  - Sensibilidade: 91,2%
  - Especificidade: 94,5%

NOTA INFORMATIVA Nº 3/2018-CGLAB/DEVIT/SVS/MS  
Brasília , 01 de fevereiro de 2018

## Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

✓ **Dual Path Plataform (DPP):** Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos

- **2011: DPP** - Teste recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde no Brasil para Triagem de casos de LVC
- rK28 (rK9 + rK39 + rK26)
- Limitações para detectar cães assintomáticos

✓ **Alere Leishmaniose Ac Test Kit:** Alere™

- **2015:** Opção de teste imunocromatográfico a ser utilizado em substituição ao DPP
- K28 (rK9 + rK39 + rK26)

(MARCELINO & FILHO, 2015)



## Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

- ✓ **EIE Leishmaniose Visceral Canina:** Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos
  - Antígeno solúvel e purificado de *Leishmania* - cultura *in vitro*
  
- ✓ **ELISA/S7:** Biogene Indústria e Comércio Ltda
  - Antígeno recombinante HSP70
  - Escassez de dados da literatura em relação à avaliação de sensibilidade e especificidade e validação desse teste
  - Resultados obtidos por nosso grupo: discordantes





# DESAFIOS

- ✓ Melhor sensibilidade
- ✓ Rapidez para obtenção do resultado
- ✓ Baixo custo
- ✓ Reações cruzadas

TESTES SOROLÓGICOS  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES COM  
REPETIÇÃO



CT Vacinas



**bh.tec** Parque Tecnológico  
de Belo Horizonte

# Potenciais proteínas recombinantes

## Proteína rA2

- ✓ Elevada sensibilidade em casos assintomáticos
  - Especificidade (98%),
  - Sensibilidade: cães assintomáticos (88% em ELISA)
  - Seguido de rK39 e rK26 (66%)
  - SLA de 30%.

(CARVALHO *et al.*, 2002; PORROZZI *et al.*, 2007)

- ✓ Proteína expressa predominantemente na fase amastigota de *L. donovani* e de *L. infantum chagasi*

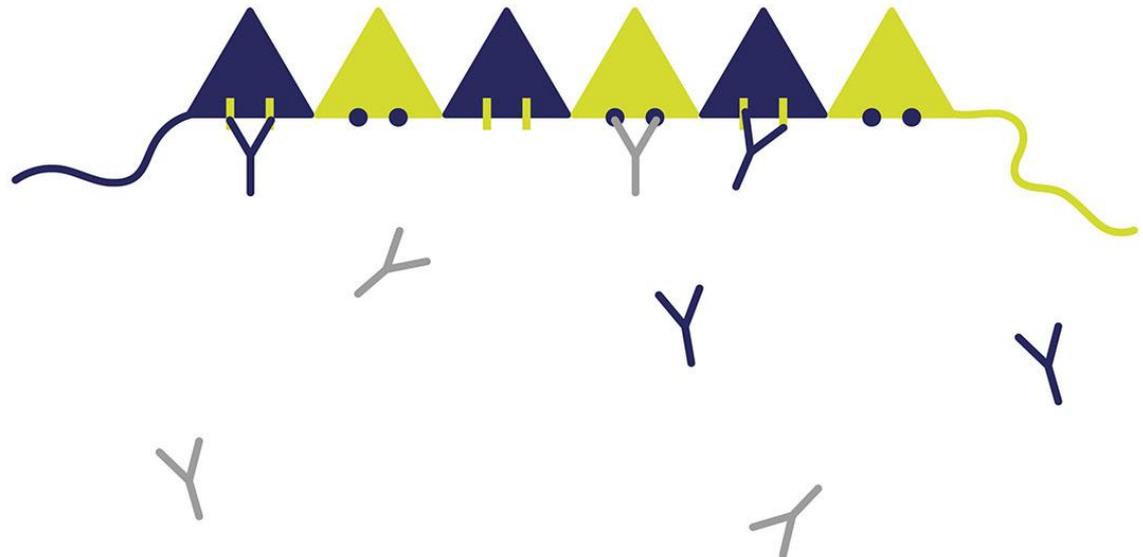
(HUGUES & MATLASHEWSKI, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2010)

- ✓ Proteína aplicada na vacina LeishTec

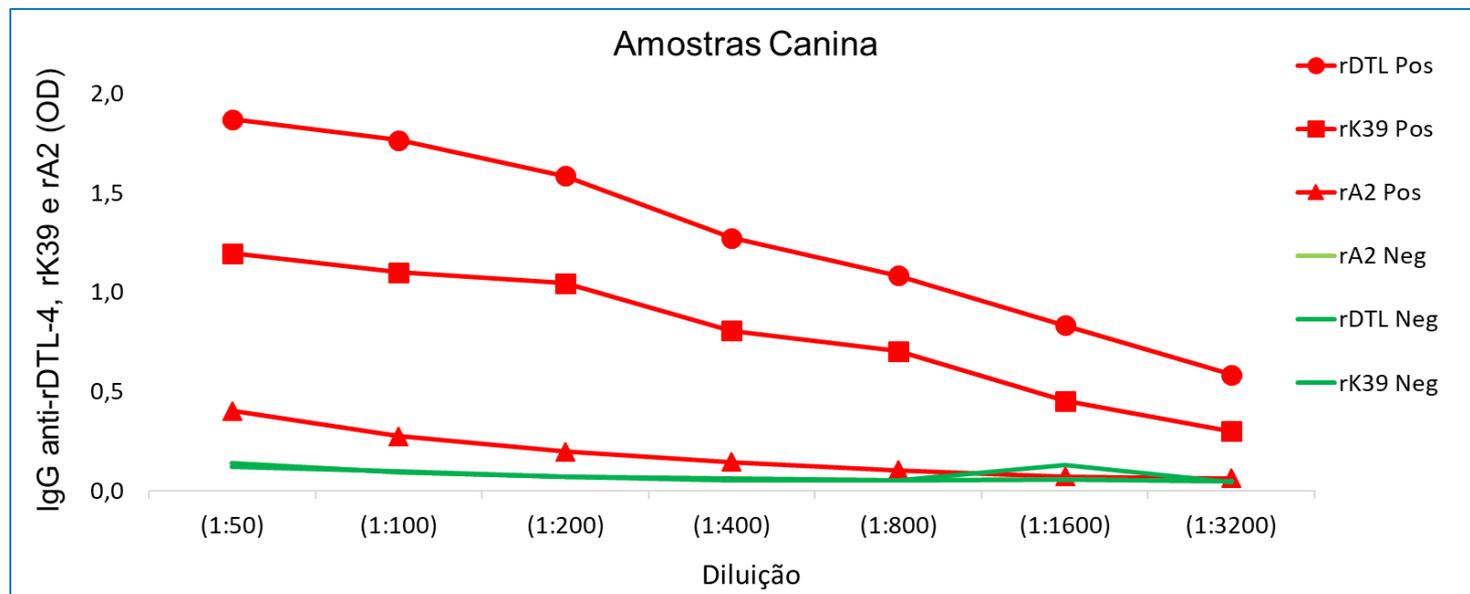
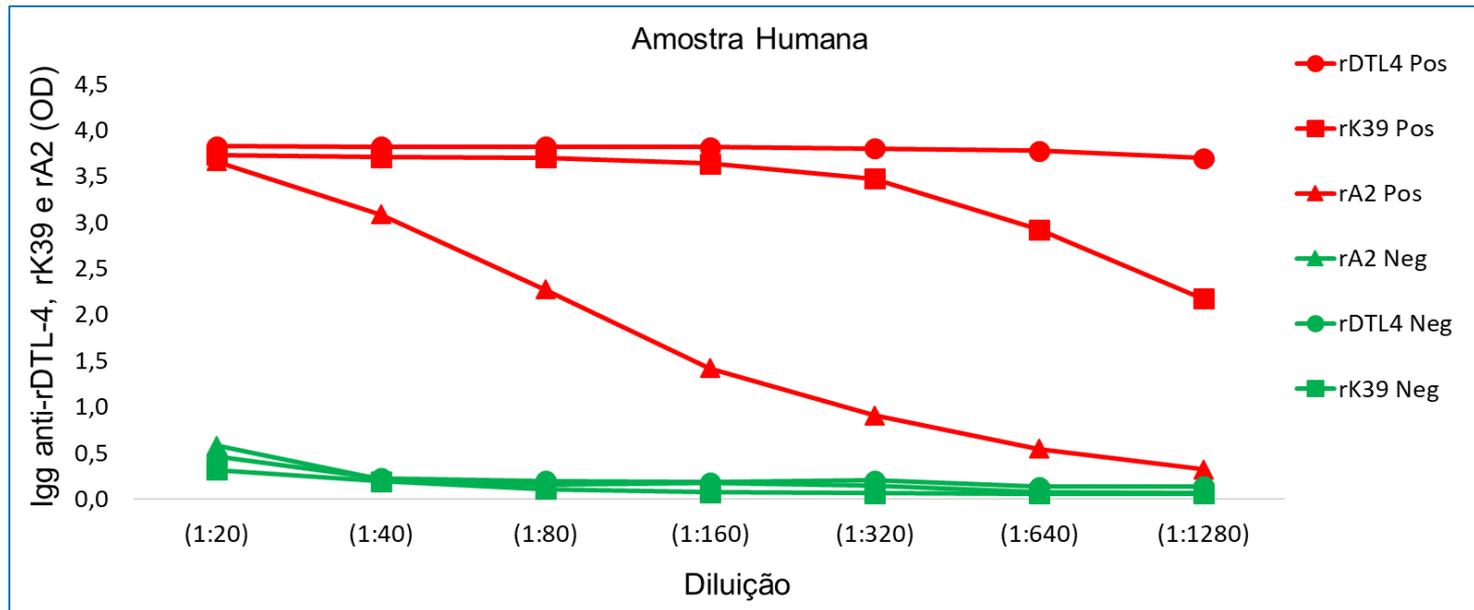


## Proteína rDTL4

- ✓ Quimera
- ✓ Sob sigilo - Em processo de registro de patente
- ✓ **A2** + proteína com repetição
- ✓ Aumenta número de alvos e epítomos



## ELISA rA2, rDTL4 e rK39: titulação do pool de amostras



# Leishmaniose visceral humana



## ELISA rA2, rDTL4 e It Leish: **SENSIBILIDADE**

Painel amostras provenientes  
do Instituto de Medicina  
Tropical - RN  
Dra Selma Jerônimo

Diagnóstico e acompanhamento clínico - LVH  
Diagnóstico laboratorial - ELISA rK39 *in house*  
Submetidos a tratamento

**ELISA rA2**  
Sensibilidade: **78,3%**

**It Leish (rK39)**  
Sensibilidade: **90,4%**

**ELISA rDTL4**  
Sensibilidade: **93,9%**

## ELISA rA2, rDTL4 e It Leish: **ESPECIFICIDADE**

**Painel amostras  
provenientes do  
LACEN Palmas - TO**

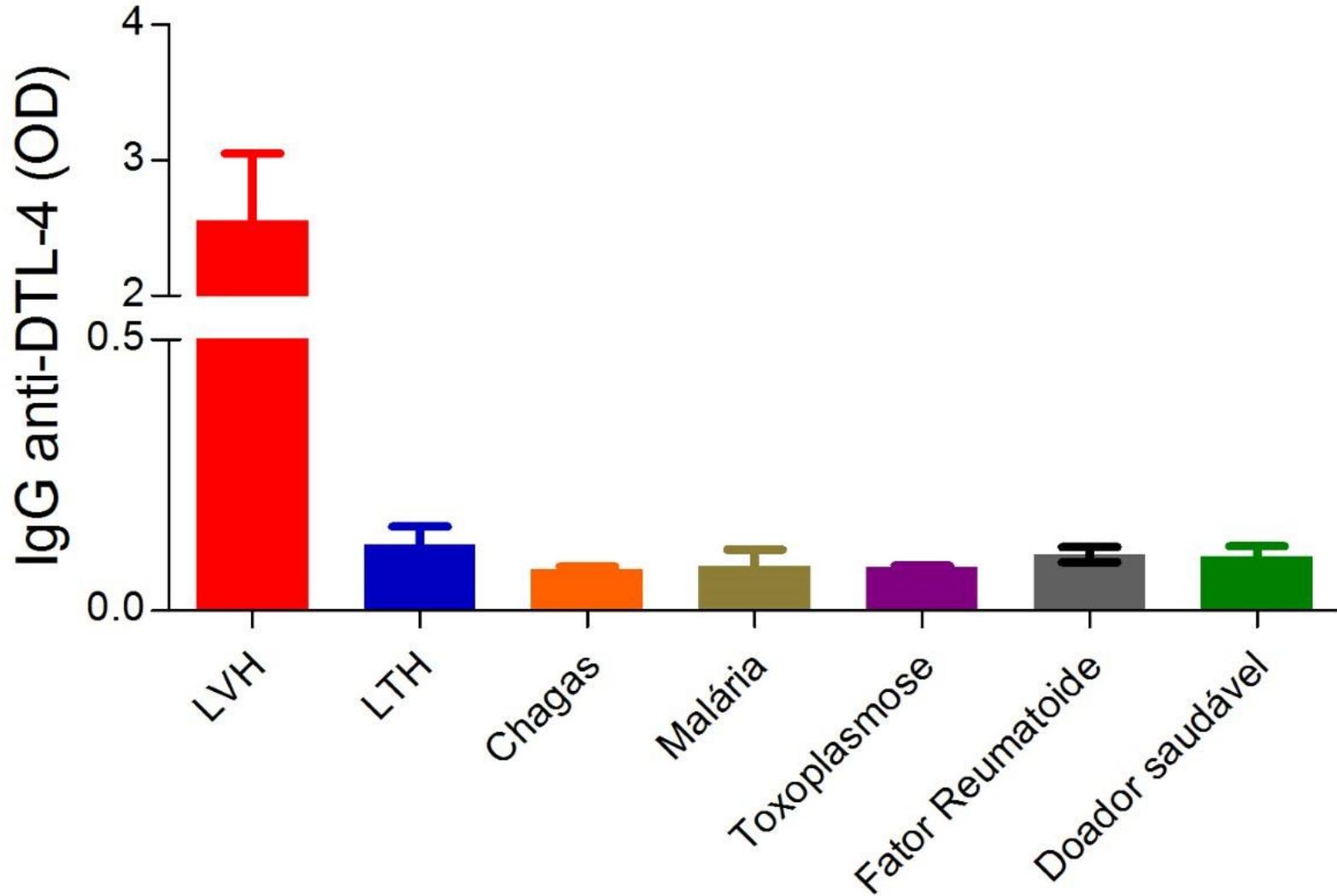
**RIFI - LACEN TO  
ELISA - Extrato total - Instituto René  
Rachou (FIOCRUZ)**

**ELISA rA2**  
Especificidade: **81,1%**  
n= 180

**It Leish (rK39)**  
Especificidade: **95,5%**  
n= 155

**ELISA rDTL4**  
Especificidade: **93,5%**  
n=138

## ELISA rDTL4: INTERFERENTES



# ELISA rDTL4 - LVH



**Estabilidade: 15 meses**

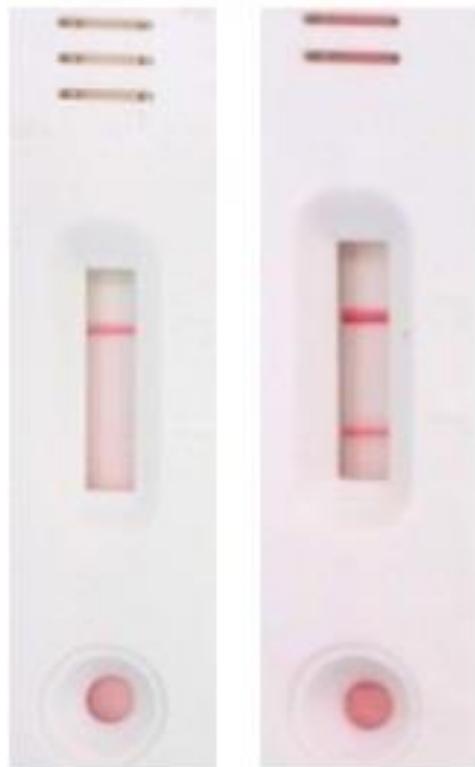
**Sensibilidade: 93,9%**

**Especificidade: 93,5%**

**Interferentes: OK**

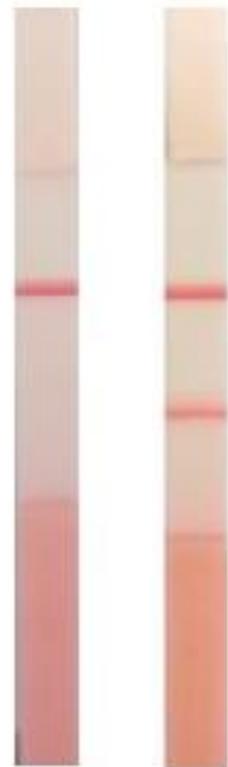
- ✓ Protótipo desenvolvido e validado, tendo como referência as exigências da RDC Nº 36 de 26 de agosto de 2015
- ✓ Produto pronto para registro perante a ANVISA
- ✓ Produto pronto para transferência de tecnologia/comercialização
  - Microplaca sensibilizada com DTL4
  - Conjugado - anti IgG humano
  - Diluente de amostra
  - Substrato - TMB
  - Solução de lavagem 10X
  - Controles (positivo e cut-off)
  - Solução de parada

## TESTE RÁPIDO rDTL4 LVH: em desenvolvimento



(-)

(+)



(-)

(+)

Testes preliminares

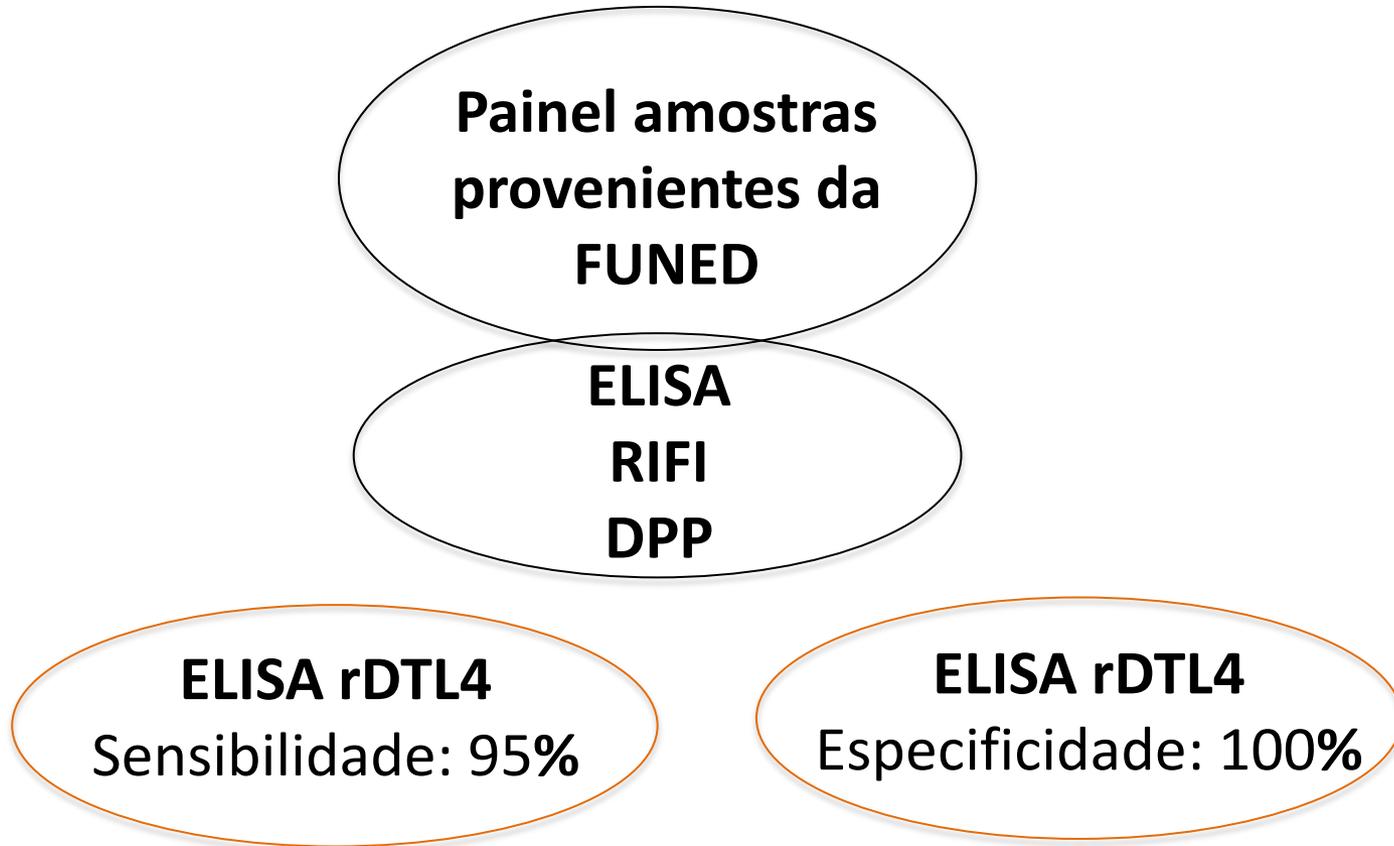
✓ Sensibilidade: 90%

✓ Especificidade: 89%

# Leishmaniose visceral canina



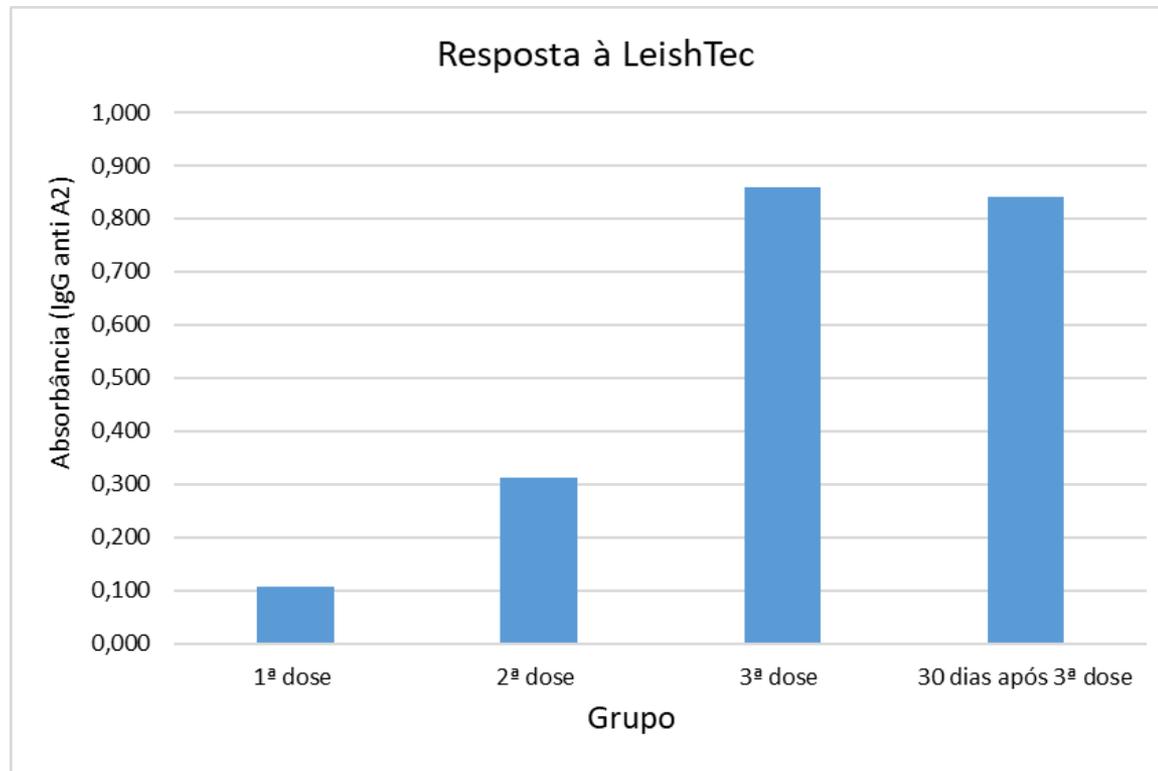
## ELISA rDTL4 LVC



Sem diferenciação: **VACINADO x INFECTADO**

# VACINADO $\neq$ INFECTADO

rA2 e rDTL5



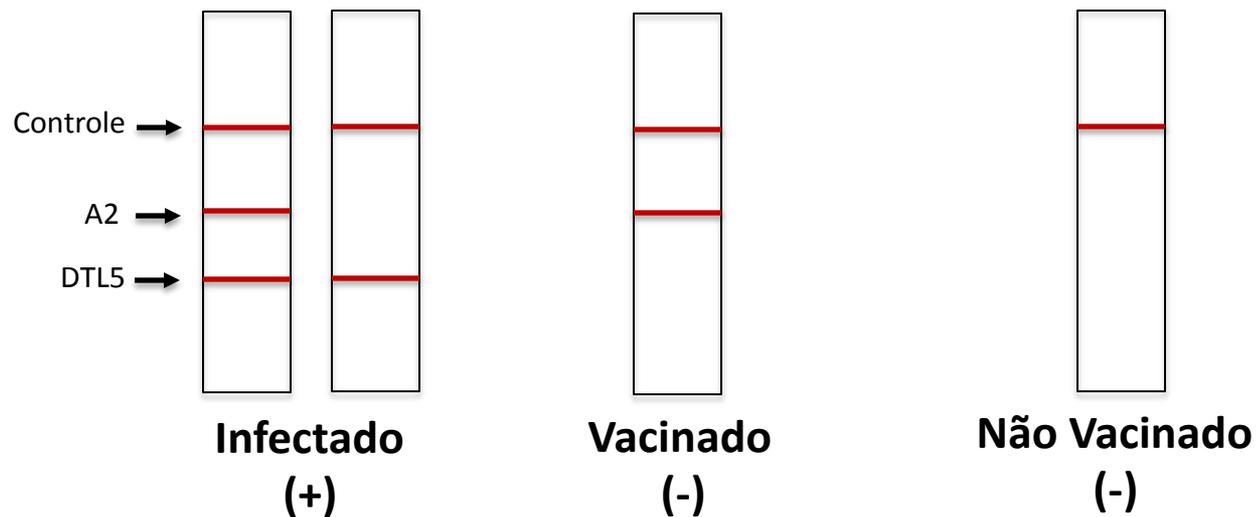
✓ rA2 diferencia cão saudável **vacinado** e **não vacinado**

# rA2 e rDTL5

## ELISA rDTL5

- ✓ Cão **vacinado** e cão **não infectado**: **NEGATIVO**
- ✓ Cão **infectado**: **POSITIVO**
  - Sensibilidade: 99%
  - Especificidade: 96,7%

## Proposta - Teste rápido



**OBRIGADA!**