

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ANA FLÁVIA FERREIRA SELVA

**UTILIZAÇÃO DA COMBINAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS DA
CLASSE IgG, SUBCLASSES IgG 1 E IgG 2 PARA DEFINIÇÃO DE DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL ENTRE AS INFECÇÕES POR *Trypanosoma cruzi* E *Leishmania*
spp.**

ALEGRE- ES

2022

ANA FLÁVIA FERREIRA SELVA

**UTILIZAÇÃO DA COMBINAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS DA
CLASSE IgG, SUBCLASSES IgG 1 E IgG 2 PARA DEFINIÇÃO DE DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL ENTRE AS INFECÇÕES POR *Trypanosoma cruzi* E *Leishmania*
spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE- ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S469u Selva, Ana Flávia Ferreira, 1995-
Utilização da combinação da reatividade de anticorpos da classe
IgG, subclasses IgG 1 e IgG 2 para definição de diagnóstico
diferencial entre as infecções por *Trypanosoma cruzi* e
Leishmania spp / Ana Flávia Ferreira Selva. - 2022.
63 f. : il.

Orientador: Marcos Santos Zanini.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. *Tripanossoma cruzi*. 2. *Leishmania*. 3. Imunoglobulinas.
4. Teste imunenzimático. 5. Sorologia veterinária. 6. doença de
Chagas. I. Zanini, Marcos Santos. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III.
Título.

CDU: 619

ANA FLÁVIA FERREIRA SELVA

**UTILIZAÇÃO DA COMBINAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS DA
CLASSE IgG, SUBCLASSES IgG 1 E IgG 2 PARA DEFINIÇÃO DE DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL ENTRE AS INFECÇÕES POR *Trypanosoma cruzi* E *Leishmania*
spp.**

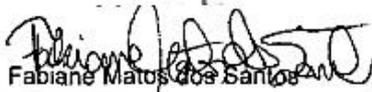
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Aprovado em 04 de agosto de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador.



Prof.ª Dr.ª Fabiane Matos dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Universidade Federal de Alfenas - MG

A Deus, por ter me capacitado a cada dia, a
minha mãe Dilceia, por toda a confiança e
apoio e ao meu esposo Jean Carlos, por
acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ter me capacitado a cada dia, me dando sabedoria, força e resignação, agradeço por todo seu amor infinito e por estar no controle da minha vida.

Ao meu Orientador **Marcos Santos Zanini**, por ter me acolhido, por toda paciência, dedicação, instruções e todo apoio. Que possa continuar sendo essa inspiração para outros alunos.

Aos membros da minha banca examinadora **Dr. Fabiane Matos dos Santos** e **Dr. Ivo Santana Caldas**, por ter aceitado o convite de compor a minha banca e fazer parte desse momento tão especial e importante para a minha vida pessoal e profissional.

Aos meus pais **Dilceia** e **Angelo** que me deram a vida e me ensinaram a vive-la com dignidade, em especial a minha mãe **Dilceia**, que esteve comigo em todos os momentos, que não mediu esforços para me apoiar, por todo amor e orações. Por acreditar em mim e nos meus sonhos.

Ao meu esposo **Jean Carlos**, por estar sempre ao meu lado, me incentivando a entrar no mestrado, por acreditar em mim e não me deixar desistir.

Aos meus irmãos **Flávio**, **João Vitor** e **Alessandro**, e as minhas amigas **Mikaela**, **Daiana**, **Mayara** e ao **Wanderson** por todo apoio que foi essencial.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a **Lígia Isabelle** por me ajudar com seus conhecimentos técnicos e a **Esther** por não medir esforços para me ajudar nos experimentos.

A Prof.^a. Dr.^a. **Fabiane Matos dos Santos** por não medir esforços em me ajudar no laboratório, com toda certeza foi essencial.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização desta dissertação.

“Guarda-me senhor, como a menina dos teus
olhos, esconde-me debaixo da sombra das
suas asas”.

Salmos 17:8

RESUMO

SELVA, A. F. F. **Utilização da combinação da reatividade de anticorpos da classe IgG, subclasses IgG 1 e IgG 2 para definição de diagnóstico diferencial entre as infecções por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.** 2022. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

Dentre as doenças infecciosas, negligenciadas de notificação compulsória e relevância em todo território nacional, tem-se a doença de Chagas (DC) e a leishmaniose, podendo serem co-endêmicas. São causadas por protozoários, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., pertencentes a mesma família Trypanosomatidae e filogeneticamente semelhantes. Possuem vários métodos de diagnóstico desde parasitológico, sorológico aos moleculares. Entre os métodos sorológicos, destaca-se o ensaio imunoenzimático indireto associado a outro teste referendado pelo Ministério da Saúde. Contudo, podem ocorrer reações sorológicas cruzadas com o gênero *Leishmania*. Assim, esse estudo objetivou avaliar pela técnica de ELISA indireta, imunoglobulinas (IgG total, IgG1 e IgG2) de soros positivos de cães para DC frente a antígeno de *Leishmania* spp. como forma de diferenciação sorológica para infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. Para tal, foram utilizados 36 soros de cães residentes em áreas de triatomíneos notificados (Iconha e Alegre, ES) como positivos pelo teste de ELISA considerando avaliação de IgG total para *Trypanosoma* spp. A partir dos resultados obtidos com anticorpos secundários IgG total, IgG1 e IgG2 foi produzido um painel dos resultados positivos para leishmaniose de soros DC positivos considerando as imunoglobulinas caninas de forma individual e em associações. Os resultados demonstraram correlação entre IgG total e subclasses quando comparados entre si e isoladamente, com Spearman igual a 1 e $p < 0,05$, entretanto não houve correlação quando comparado IgG total e subclasse isoladamente frente as associações IgG total+IgG1 e IgG total+IgG1+IgG2, com Spearman igual 0.120 e $p > 0,05$, apontando soros positivos somente para DC. Assim, cães soropositivos somente para IgG total, IgG1, ou IgG2 ou mesmo IgG total+IgG2 mesmo que positivo para ambos os parasitos, indicam negatividade para *T. cruzi* e reatividade cruzada com *Leishmania* spp. Está metodologia é dominada nos centros

de diagnósticos institucionais e pode ser utilizada como indicativo do diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades.

Palavras chave: doença de Chagas. Ensaio imunoenzimático. Leishmaniose.

ABSTRACT

SELVA, A. F. F. **Use of the combination of IgG class antibody reactivity and IgG 1 and IgG 2 subclasses to define the differential diagnosis between *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.** 2022. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

Chagas disease (CD) and leishmaniasis are among the neglected infectious diseases of compulsory notification and relevance throughout the national territory, which may be co-endemic. They are caused by protozoa, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., belonging to the same Trypanosomatidae family and phylogenetically similar. They have several diagnostic methods from parasitological, serological to molecular. Among the serological methods, the indirect enzyme immunoassay (indirect ELISA) associated with another test endorsed by the Ministry of Health, for CD screening and diagnosis, stands out. However, serological cross-reactions with the genus *Leishmania* may occur. Thus, this study aimed to evaluate, by the indirect ELISA technique, immunoglobulins (total IgG, IgG1 and IgG2) from positive sera from dogs for CD against *Leishmania* spp. as a form of serological differentiation for infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp. To this end, 36 sera from dogs residing in areas of notified triatomines (Iconha and Alegre, ES) were used as positive by the ELISA test considering the evaluation of total IgG for *Trypanosoma* spp. From the results obtained with secondary antibodies total IgG, IgG1 and IgG2, a panel of positive results for leishmaniasis from positive DC sera was produced, considering canine immunoglobulins individually and in associations. The results showed a correlation between total IgG and subclasses when compared to each other and separately, with Spearman equal to 1 and $p < 0.05$, however there was no correlation when comparing total IgG and subclass alone against the associations total IgG+IgG1 and total IgG +IgG1+IgG2, with Spearman equal to 0.120 and $p > 0.05$, indicating positive sera only for DC. Thus, dogs seropositive only for total IgG, IgG1, or IgG2 or even total IgG+IgG2, even if positive for both parasites, indicate negativity for *T. cruzi* and cross-reactivity with *Leishmania* spp. This methodology is mastered in institutional diagnostic centers and can be used as an indicator of the differential diagnosis between the two diseases.

Keywords: Chagas disease. Enzyme immunoassay. Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1 -	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2 -	Espécies de triatomíneos que podem fazer parte do ciclo de transmissão do <i>T. cruzi</i>	17
Figura 3 -	Mosquito fêmea da espécie <i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i> , conhecido popularmente como “mosquito-palha”, transmissor da <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 4 -	Espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pelas principais causas clínicas.....	28
Figura 5 -	Métodos de diagnósticos e eventos fisiopatológicos da doença de Chagas	29
Capítulo 1		
Figura 6 -	Nível sérico de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e anti- <i>Leishmania</i> em 36 cães de áreas domiciliares e peridomiciliares, pertencente aos municípios de Alegre e Iconha – ES.....	55

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

nm	Nanômetro
DAT	Teste de aglutinação direta
DC	Doença de Chagas
DPP	Teste rápido imunocromatográfico
DTUs	Discrete Typing Unit
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
g	Gramas
h	Horas
HCl	Cloreto de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Ensaio de imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
IHA	Ensaio de hemaglutinação indireta
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de sódio
NEMES	Núcleo Especial de Vigilância Epidemiológica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
PBS	Phosphate Buffered Saline

PBS – T	Phosphate Buffered Saline With Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT – PCR	Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa
SESA	Secretaria de Estado de Saúde
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
TA	Tripanossomíase Americana
T- cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tween 20	Tensoativo Hidrofílico Polisorbato 20
WHO	World Health Organization
µL	Microlitros

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A doença de Chagas no homem e animais	16
2.2 A doença de Chagas no Espírito Santo	22
2.3 A leishmaniose no homem e nos animais	23
2.4 Métodos de diagnóstico para doença de Chagas.....	28
2.5 Métodos de diagnóstico para leishmaniose	32
2.6 Reações sorológicas cruzadas entre <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp.....	35
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 1:Utilização da combinação de perfis sorológicos para definição de diagnóstico diferencial entre <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp.....	47
RESUMO	47
5. INTRODUÇÃO	48
6. MATERIAL E MÉTODOS	50
6.1 Aspectos éticos	50
6.2 Área de estudos e animais.....	51
6.3 Ensaio sorológico utilizando a imunoglobulina IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2, para <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp.....	51
6.4 Análise estatística.....	53
7. RESULTADOS	53
8. DISCUSSÃO	55
9. CONCLUSÃO	57
10. REFERÊNCIA	57

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) também conhecida como Tripanossomíase Americana é uma doença infecciosa de fase aguda e crônica, antes limitada principalmente ao continente americano devido a mais de 140 espécies de insetos que atuam como seu vetor, porém atualmente já se encontra com frequência em países de outros continentes (DIAS et al., 2016; SANTOS, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde se trata de uma enfermidade que faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas e de notificação compulsória, de importância a saúde pública gerando grande impacto social e econômico (DIAS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A DC é uma antropozoonose de elevada morbimortalidade principalmente nos países endêmicos da América Latina, causada por um protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC capaz de infectar todas as espécies de mamíferos, tais como animais silvestres e domésticos (COELHO, 2013). Está presente nas regiões endêmicas onde existem diversas espécies de triatomíneos (vetores) e mamíferos (hospedeiros vertebrados), entre os quais os cães atuam como reservatório da doença, assim apresentando uma importância epidemiológica, indicando ciclos domésticos e silvestres (FREITAS et al., 2018). Acredita-se que a DC afete de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2021).

Atualmente o agente etiológico da DC, pode ser transmitido por diversas vias, a via de transmissão vetorial, transplacentária, transfusional, por transplante de órgãos e a transmissão por via oral, sendo a vetorial considerada a forma clássica, que depende da presença do vetor infectado com o protozoário, entretanto atualmente a mais notificada no Brasil é a transmissão oral (MATOS, 2007).

Para diagnóstico da DC, existem métodos parasitológicos, sorológicos, microbiológicos e moleculares, tendo como o método parasitológico o mais facilmente implantado e de menor custo, porém apresenta baixa sensibilidade principalmente da fase crônica da doença, devido ao número de parasitas na corrente sanguínea periférica ser pequeno, dificultando o isolamento e a detecção do mesmo (COELHO, 2013).

No estado do Espírito Santo (ES), estudos anteriores indicaram a detecção sorológica da infecção natural por *T. cruzi*, em 36 cães residentes em áreas de triatomíneos notificados como positivos para *Trypanosoma* spp. pela Secretaria de Estado da Saúde do ES (SESA/ES) entre 2014 a 2017 nos municípios de Iconha e Alegre, ES (PONTES, 2020). Contudo, o gênero *Leishmania* se apresenta como principal causa de reações sorológicas cruzadas no estado do Espírito Santo para DC, devido ambos pertencerem a mesma família Trypanosomatidae e serem filogeneticamente semelhantes.

Apesar de atualmente existirem vários métodos de diagnóstico da DC, como o parasitológico que apresenta uma elevada especificidade quando comparado com os demais testes, os métodos sorológicos também tem sido bastante utilizados para seu diagnóstico no Brasil, entretanto reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania* spp. são frequentemente observadas. Levando em consideração que a técnica de ELISA já se encontra implantada em rotina pelos centros laboratoriais públicos e de pesquisas, assim como referenciada pelo Ministério da Saúde, por apresentar elevada sensibilidade e várias vantagens, como ser de fácil execução e baixo custo, ainda se faz necessário dar continuidade em pesquisas que minimizem casos de falsos positivos.

Desta forma, esse estudo objetivou avaliar pela técnica de ELISA indireta, um perfil de subclasses de imunoglobulinas do IgG total (IgG1 e IgG2) de soros positivos de cães para DC frente a antígeno de *Leishmania* spp. como forma de diferenciação sorológica para infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença de Chagas no homem e animais

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma doença infecciosa, caracterizada como uma antropozoonose entre as quatro maiores de impactos sociais para doenças infecciosas e parasitárias, possuindo um alto nível de morbimortalidade e considerada de notificação compulsória, no Brasil ela acomete aproximadamente de 4 a 6 milhões de indivíduos, representando um dos principais problemas médico-sociais brasileiros (MATOS, 2007; SANTOS, 2010; WHO, 2002).

Descoberta em 23 de abril de 1909 por Carlos Justiniano Chagas, que encontrou o protozoário no sangue de uma criança, a partir de então Chagas descreveu a enfermidade, seu agente etiológico, seus reservatórios naturais, forma de transmissão, que o levou a ganhar no ano de 1912 o prêmio Schaudinn (GALVÃO, 2014).

A DC é causada por um protozoário flagelado de ciclo heterógeno da espécie *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, pertencente à família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Trypanosoma*, que apresenta variações ecológicas, fisiológicas e morfológicas, como também na sua patogenicidade e infectividade (COELHO, 2013; LIMA et al., 2019), sendo que seu ciclo vital possui três formas evolutivas que está ligada ao ambiente que ela está circundando: tripomastigota forma infectante encontrada circulante no sangue de mamíferos infectados como também no intestino do vetor, epimastigota que se reproduz em mamíferos de forma intracelular e amastigota que ocorre no vetor (Figura 01) (ASSIS, 2017).

Figura 1 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.

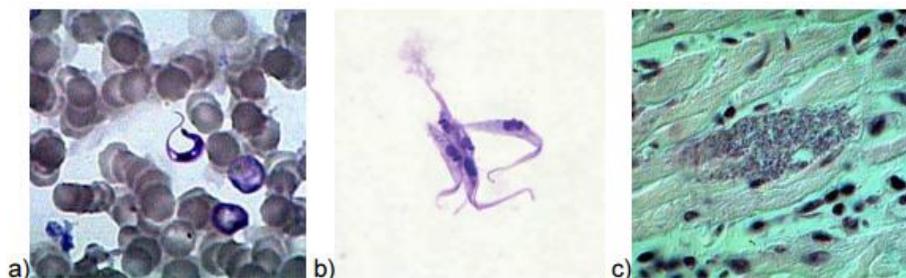


Figura 01: a) tripomastigota em lâmina de sangue; b) epimastigota em meio de cultura e c) amastigotas no interior de célula muscular. Fonte: Sonada, 2009.

Quanto ao seu ciclo epidemiológico ele pode apresentar o ciclo silvestre, doméstico e peridoméstico, dependendo do seu hospedeiro vertebrado, como também da domiciliação dos insetos que atuam como seu vetor, assim seu ciclo passa por dois hospedeiros distintos, o mamífero e o triatomíneo. Anteriormente seu ciclo era mais restrito à zona rural, porém hoje com o desmatamento, com a urbanização do homem a fim de buscar melhor qualidade de vida e alterações climáticas, vem aumentando o número de casos na zona urbana (ASSIS, 2017; DIAS et al., 2016; PONTES, 2020; REZENDE; RASSI, 1997; WHO, 2002).

O *T. cruzi* infecta diferentes espécies de mamíferos que atuam em seu ciclo biológico, como hospedeiros vertebrados, incluindo o homem e o cão, que atua como sentinela, porém para seu ciclo prosseguir é necessário a participação de um inseto hematófago, tendo os triatomíneos hematófagos como hospedeiro invertebrado, pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae e aos gêneros: *Triatoma*; *Panstrongylus*; e *Rhodnius* (LIMA et al., 2019).

Existe no mundo cerca de 148 espécies descritas de triatomíneos, porém as que são consideradas vetores competentes em transmitir o protozoário durante seu repasto sanguíneo são os *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis*. No Brasil as espécies de maior importância: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *T. sordida*, com destaque ao *T. infestans* como o principal transmissor no ciclo domiciliar até os resultados alcançados no Brasil com o programa de controle pelos países do Cone Sul quando então era a espécie mais responsável pela transmissão vetorial do parasito e consequente causador da DC no homem e nos cães (Figura 02) (GALVÃO, 2014; MONCAYO, 2003; SONADA, 2009).

Figura 2 - Espécies de triatomíneos que podem fazer parte do ciclo de transmissão do *T. cruzi*.

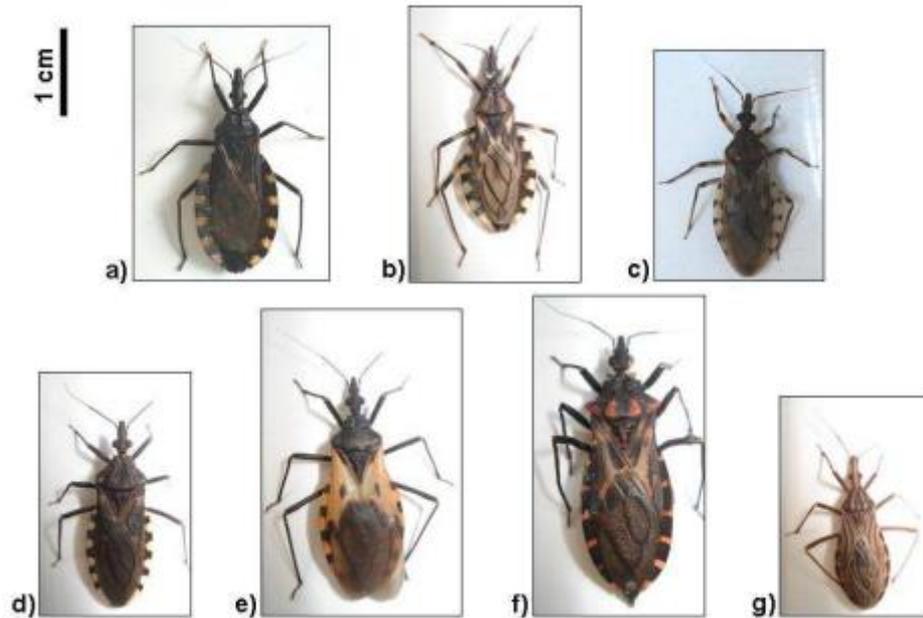


Figura 02: a) *Triatoma infestans*, b) *Triatoma brasiliensis*, c) *Triatoma sordida*, d) *Triatoma pseudomaculata*, e) *Triatoma dimidiata*, f) *Panstrongylus megistus* e g) *Rhodnius prolixus*.
Fonte: Sonada, 2009.

Popularmente esses insetos recebem o nome de “barbeiro”, “chupão”, “procotós”, “vum-vum”, “chupança”, “vinchucas”, entre outros, dependendo da região que são encontrados (FIOCRUZ, 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018), pois essas denominações populares, se dão pelo fato de o inseto possuir hábito noturno e por sua preferência em atacar a face do hospedeiro humano para se alimentar (GALVÃO, 2014; LIMA et al., 2019).

Assim, a transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer de diversas formas, sendo a principal, a vetorial, e secundariamente a transmissão por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, transplacentária e por via oral (SANTOS, 2014). A transmissão vetorial é a responsável clássica por grande parte da prevalência da doença, sendo ela responsável por 80% dos casos, porém estudos atuais têm demonstrado que a via de transmissão transfusional tem se mostrado crescente no Brasil e em outros países, como exemplo, o movimento migratório que ocorre para os Estados Unidos, onde dados indicam cerca de 300.000 imigrantes chagásicos nos Estados Unidos (COSTA et al., 2013). Paralelamente, alguns pesquisadores apontam no Brasil o crescimento pela transmissão por via oral (ASSIS, 2017). Com isto, o Ministério da Saúde tem dedicado atualmente, maior atenção as vias de transmissão secundárias (transfusional, transplante, oral, transplacentária), uma vez que tem ocorrido a erradicação do principal vetor, *T. infestans* (CARVALHO et al., 2015).

A transmissão vetorial (natural), ocorre quando o vetor (hospedeiro invertebrado), conhecido popularmente como “barbeiro” realiza seu repasto sanguíneo, sendo um processo indolor devido sua saliva apresentar propriedades anestésicas e anticoagulante, nesse momento de sua alimentação ou após, ele defeca liberando em suas fezes o protozoário, pois é no intestino do vetor que ele se desenvolve, assim realizando a transmissão do protozoário para o hospedeiro vertebrado (homem, cão, entre outros mamíferos) tendo um período de incubação de 4 a 15 dias (COSTA et al., 2013; KIRCHHOFF, 2011; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE, 2009; REZENDE; RASSI, 1997).

O Programa Nacional de Controle da Transmissão Vetorial tem se mostrado bastante eficaz, conseguindo realizar o controle em algumas regiões do Brasil onde a DC é endêmica, todavia ainda é de extrema importância se conhecer todo mecanismo e formas de transmissão da mesma, almejando todas as medidas preventivas para conseguir um melhor controle da DC (ASSIS, 2017).

A transmissão pela via oral ocorre comumente pela ingestão de alimentos (caldo de cana, açaí, carne crua ou malcozida) contaminados com dejetos dos marsupiais e triatomíneos infectados, e até mesmo pela ingestão do próprio vetor. Também, ocorre a transmissão pela ingestão de sangue de animais silvestres infectados (OPAS, 2009), muito característico para cães que possuem o hábito de caça. Esporadicamente, verifica-se a transmissão através de instrumentos contaminados com fezes de triatomíneos, utilizados para manipular alimentos contaminados ou mesmo alimentos que tiveram contato com insetos como barata e moscas contaminados com as fezes do vetor (SANTOS, 2014). Segundo Assis (2017), entre o ano de 2000 a 2013 no Brasil o número de casos acometidos pela via oral, aumentou de forma repentina, onde dados indicam um aumento de 68% pela via oral e 6,4% pela via vetorial.

Vale destacar alguns relatos regionais da enfermidade, quando em 1965 ocorreu o primeiro surto em uma Escola Agrícola no Rio grande do Sul, onde 17 pessoas que se alimentaram no local adoeceram ao mesmo tempo com sintomas da DC. Também no ano de 2005, em Santa Catarina, um ocorrido de 45 casos de DC aguda, devido a ingestão do caldo da cana de açúcar (COSTA et al., 2013; DIAS et al., 2016). Pontualmente, no ano de 2012, município de Guarapari, estado do Espírito Santo, uma criança veio a óbito com a fase aguda da DC, após apresentar contato de forma acidental com o vetor infectado (DARIO *et al.*, 2016).

A transmissão transfusional e por transplante de órgãos, vem aumentando devido ao processo de urbanização da DC no Brasil e em outros países da América Latina, associada as falhas na triagem, clínica e sorológica da infecção. Fatores como a prevalência da doença na região, nível de parasitemia do doador, juntamente com a migração de trabalhadores, são fatores que contribuem para aumento desse tipo de transmissão. Inicialmente, foi relatado no Brasil no ano de 1952 em São Paulo, por Pedreiras de Freitas dois casos de pacientes infectados pela via transfusional (COSTA et al., 2013; WHO, 2002), já por transplante ocorre principalmente pelo transplante de rins, porém pode ocorrer também pelo fígado, coração, pâncreas e medula óssea, considerando-se que essa transmissão pode ser a partir do doador com a doença ou mesmo pela reativação da parasitemia se o receptor estiver previamente infectado (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011).

A via transplacentária de transmissão pode ocorrer em qualquer fase da gestação, entretanto a chance de transmitir a infecção é maior nos últimos três meses, pois é quando ocorre o aumento da parasitemia na mãe. Esse meio de transmissão é complexo devido à na maioria das vezes ser assintomático, ocorrendo a morte prematura do feto ou até mesmo no momento de o parto ocorrer a transmissão pelo contato do feto com o sangue da mãe infectada. Estudos mostram que 70% das crianças que nascem com DC são assintomáticas (DIAS, 2006; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011).

Durante todo o processo da infecção causada pelo *T. cruzi*, os sinais clínicos e as características da DC, são descritas em duas fases, aguda e crônica (COSTA et al., 2013; SANTOS, 2014). A fase aguda inicia após a proliferação do *T. cruzi* na corrente sanguínea e sua disseminação pelo sangue e vasos linfáticos, afetando múltiplos órgãos, como também as fibras musculares cardíacas, com quadro sintomático e assintomático (LIMA et al., 2019; SANTOS, 2014). A fase aguda, pode iniciar de oito a dez dias após a inoculação do *T. cruzi* na corrente sanguínea, e ter a duração em média de seis a oito semanas. Inicialmente, não se encontra danos nos órgãos através do diagnóstico clínico, sendo detectada apenas por sorologia ou exames parasitológicos, pois é quando a carga parasitaria se encontra maior (WHO, 2002). Muitas vezes, nessa fase observa-se o chagoma de inoculação, uma reação cutânea que ocorre no local do repasto do triatomíneo, caracterizado por um pequeno nódulo eritematoso que pode ocorrer em qualquer parte do corpo do indivíduo que esteja descoberta, principalmente no rosto. Caso esse repasto do triatomíneo

infectado ocorra próximo aos olhos, pode ainda acarretar o denominado sinal de romanã, um edema bipalpebral e unilateral, evoluindo então com febre, inapetência, cefaleia, adenomegalia, icterícia, edemas faciais e de membros inferiores, entre outros (LIMA et al., 2019; NORMAN; VELEZ, 2019; WHO, 2002). Esses casos, são acompanhados em 60% das vezes por de miocardite, mesenterite e hepatite difusa (ASSIS, 2017). Segundo estudos, na fase aguda da doença, a taxa de morbimortalidade é maior quando ocorre a transmissão por via oral, se comparada à via clássica de transmissão por via vetorial (OPAS, 2009). Nos cães, essa fase pode ser fatal em até 10% dos casos, principalmente se ocorrer o quadro de meningoencefalite, particularmente em cães menores de dois anos de idade (BIGNARDE et al., 2008).

Após a fase aguda, dá-se início a fase crônica da doença, caso não tenha ocorrido o óbito. Nessa fase, a parasitemia diminui para níveis indetectáveis por técnicas de diagnóstico parasitológico, e ocorre a regressão dos sintomas da fase aguda. A fase crônica, é dividida em indeterminada (assintomática) sem alterações significativas, e equivale a cerca de 50 a 70% dos indivíduos infectados, quando o paciente (homem/cão), passa então a atuar como um reservatório natural da doença, ou sintomática, com patologia cardíaca, nervosa, digestiva e mais raramente, uma forma de múltiplas patologias (OPAS, 2009; WHO, 2002). No Brasil a maioria dos casos diagnosticados encontram-se na fase crônica, representando aproximadamente três milhões de indivíduos (COELHO, 2013).

A forma cardíaca, possui alta taxa de morbimortalidade, sendo a de maior ocorrência, pois cerca de 10 a 30% dos indivíduos com sorologia positiva apresenta alguma alteração cardíaca, como fadiga, edema, dispneia, síncope, tontura, dor no peito atípica, palpitações, disfunção ventricular esquerda congestiva, insuficiência cardíaca. A forma digestiva, ocorre em menos de 10% dos casos, sendo observadas patologias de esôfago e colón, quando o paciente pode apresentar regurgitação, disfagia, constipação entre outros sintomas (COSTA et al., 2013; WHO, 2002).

Nas formas descritas acima, o paciente pode apresentar letargia, diarreia, febre, hepatomegalia, intolerância a exercícios e esplenomegalia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Em cães, esses sinais clínicos podem vir acompanhados de mucosa pálida, tempo de preenchimento capilar reduzido, pulso fraco e em animais jovens pode ocorrer morte súbita, podendo apresentar também sinais neurológicos como fraqueza, ataxia dos membros pélvicos e reflexo medulares exacerbados (BIGNARDE

et al., 2008; COELHO, 2013). A infecção nos cães é semelhante ao humano, apresentando sinais clínicos e evolução clínica similar (SOUZA et al., 2008). Desta forma, o cão é caracterizado como modelo experimental da infecção de *T. cruzi*, atuando também na função de sentinela. Assim, é relevante a detecção da doença, taxas de incidência e prevalência da infecção no cão, revelando um potencial risco de infecção e transmissão para o homem que habita o mesmo ambiente (FREITAS et al., 2018; PONTES; FREITAS; SANTOS, 2018; WHO, 2002).

2.2 A doença de Chagas no Espírito Santo

A presença de triatomíneos vetores da DC, principalmente *Triatoma vitticeps* e *Panstrongylus geniculatus*, invasores de domicílios rurais no estado do Espírito Santo é frequentemente relatada (LEITE; SANTOS; FALQUETO, 2011). A secretaria de Saúde do estado do Espírito Santo registrou desde 2007 três casos de DC no estado, inclusive com o óbito uma criança com fase aguda da DC no ano de 2012 (DARIO et al., 2016), proveniente do distrito de Todos os Santos, município de Guarapari-ES. O distrito de Todos os Santos tem uma distância de aproximadamente 44 quilômetros do distrito de São Caetano, Iconha-ES (TERRAMETRICS, 2019), local onde Pontes (2020) registrou sorologia positiva para DC em cinco de seis cães avaliados neste distrito.

A presença de *T. vitticeps* infectado com *T. cruzi* nos municípios de Castelo e Venda Nova do Imigrante-ES, cidades geograficamente próximas de Alegre e Iconha foi verificada anteriormente por Santos et al. (2005), sendo que este autor (Santos et al., 2006b) também observou exemplares de *T. vitticeps* infectados com flagelados morfológicamente semelhantes a *T. cruzi* em 27 municípios diferentes do estado do ES.

Dario et al. (2017) no município de Guarapari-ES identificou elevada diversidade genética de *Trypanosoma* spp. em triatomíneos da região. As espécies de triatomíneos *T. vitticeps* e *P. geniculatus* foram encontradas neste cenário e apresentaram formas semelhantes à *Trypanosoma* spp. por análise microscópica, sendo confirmado por PCR a presença de ampla variedade de *T. cruzi* com diferentes DTUs (Discrete Typing Unit - Unidades Discretas de Tipagem) além de outras espécies de *Trypanosoma* spp, infectando triatomíneos e morcegos capturados na

região. Adicionalmente neste estudo, amostras de soro de 25 cães foram avaliadas por ELISA e IFI para a detecção da infecção por *T. cruzi*, tendo sido verificado um total de sete animais considerados positivos e dois limítrofes à infecção, o que significou 28% de animais positivos e 72% de animais não positivos à DC. Também, Dario *et al.* (2018) realizaram a caracterização molecular de amostras de *T. cruzi* advindas de *T. vitticeps* e *P. geniculatus* da Mata Atlântica, provenientes de diversos municípios na região sudeste do ES, a qual englobou as regiões do Caparaó e Litoral Sul do estado.

2.3 A leishmaniose no homem e nos animais

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária, de ampla distribuição geográfica e grande importância a saúde pública, com alta incidência, letalidade e importância socio- econômica (SCHIMMING; SILVA, 2012), com prevalência global estimada em 12 milhões, com cerca de 1,5 a 2 milhões de casos por ano, com cerca de 20.000 a 50.000 mortes anuais (AMORIN, 2007; BLASI, 2016) e cerca de 350 milhões de pessoas estão ameaçadas em 98 países, dos quais 72 são países ainda em desenvolvimento (BASANO; CAMARGO, 2004; BLASI, 2016). Está classificada entre as seis principais endemias no mundo (PINHEIRO, 2017), sua ampla distribuição está relacionada ao desenvolvimento de seus vetores. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ela ocorre em cerca de 88 países, sendo que somente 30 países a tem como de notificação compulsória (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MATOS JUNIOR, 2004).

É uma doença causada por um protozoário tripanosomatídeo, com uma forma flagelada ou promastigota, da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que acomete o homem, os animais silvestres (raposas selvagens) e domésticos. Faz seu ciclo em hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo o homem, um hospedeiro acidental, não possuindo papel essencial na manutenção do protozoário, pois tem um ciclo de vida heteróxico, transmitido através da picada de flebotomíneos fêmea que possuem o hábito alimentar hematófago. Esses flebotomíneos de diferentes espécies, são genericamente conhecidos como “mosquito palha”, pertencentes em sua maioria aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). O flebotomíneo

de maior impacto para a saúde pública no Brasil, é o transmissor da leishmaniose visceral, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Figura 03), onde a *Leishmania* vive na luz do trato digestivo em forma promastigota (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Atualmente existem cerca de 800 espécies de flebotomíneos já descritas, porém de todas as espécies no planeta, cerca de 60 delas são capazes de transmitir a *Leishmania* spp. e 30 tem importância epidemiológica (BLASI, 2016).

FIGURA 3 - Mosquito fêmea da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, conhecido popularmente como “mosquito-palha”, transmissor da *Leishmania* spp.



Fonte: Fiocruz, 2018.

Existem mais de 20 espécies para o gênero *Leishmania*, dentre elas, as espécies de maior prevalência no homem e animais no Brasil, são *Leishmania chagasi* e *Leishmania braziliensis*. Os sinais clínicos da enfermidade, estão relacionados com a espécie infectante, se caracterizando em leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC), cutânea difusa (LCD) e visceral (LV), sendo a forma visceral considerada de maior relevância, devido a ser sistêmica com patologia diversa. A LV é considerada zoonose, onde o cão é considerado como seu principal reservatório natural no ambiente urbano (AMORIN, 2007; BLASI, 2016; MATTOS JUNIOR, 2004).

A leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar (LT) tem ocorrência nas Américas desde do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo seu maior foco o sul-americano com exceção do Uruguai e Chile. Está presente também no Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria, envolvendo diferentes espécies. No Brasil, a ocorrência é ascendente em todos os estados nos últimos anos. O Ministério da Saúde, durante o período de 2000 a 2009, registrou cerca de 24.684 casos no Sistema

de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; PELISSARI et al., 2011). A LT é doença de desenvolvimento crônico, que agride estruturas na pele e cartilaginosas da nasofaringe, se apresentando de forma localizada ou difusa, caracterizada como uma zoonose primária de mamíferos silvestres e agredindo o homem e os animais de forma secundária. O homem acaba contribuindo com a doença devido ao contato com áreas florestais, entretanto, não está definida a manutenção do parasito no meio ambiente urbano pelo cão, apesar de ter casos de infecção em animais domésticos (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2019). No Brasil, estudos mais recentes têm demonstrado serem comuns a presença de LT em cães infectados nas áreas endêmicas, especialmente na região Sudeste. No Espírito Santo, a LT é relatada de forma sistemática nos seres humanos desde 1980, quando foram registrados casos no município de Viana, sendo também observada uma alta densidade de flebotomíneo em áreas domiciliares e peridomiciliares (FALQUETO et al., 1986).

A LT nas Américas, é geralmente causada por protozoários do gênero *Leishmania*, onde no Brasil existem cerca de seis espécies reconhecidas, *L. (Leishmania) amazonenses*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiff*, *L. (Viannia) shawi* (BASANO; CAMARGO, 2004). Segundo o Ministério da Saúde as espécies de flebotomíneos mais competentes em transmitir o protozoário são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2019). Dentre as espécies de *Leishmania* spp. causadoras de LT no Brasil, a maior prevalência relatada no homem e nos animais é a *L. (Viannia) braziliensis*, presente em todo território nacional, podendo provocar lesões cutâneas e mucosas. Apresentam-se como hospedeiros silvestres, roedores e marsupiais, já em áreas peridomésticas são relatados casos em cavalos, cães, jumentos e gatos (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O paciente pode apresentar pápulas, que pode evoluir para úlceras na pele em mucosas, com bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolor, podendo ser única, múltiplas ou difusas, na boca, nariz e garganta como placas nodulares localizadas ou difusas (BRASIL, 2019; CRUZ, 2016). Os cães apresentam lesões ulcerativas nas narinas, pavilhão auricular, bolsa escrotal e na face. Sendo uma doença crônica, as lesões podem aumentar em extensão ou número, podendo se agravar e afetar a mucosa nasal, com lesões semelhantes à esporotricose (GONTIJO et al., 2011).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar, doença infecciosa com diversas implicações clínicas, é considerada mais patogênica do que a LT. É descrita como uma zoonose, acometendo vísceras, potencialmente fatal ao homem e ao cão, sendo o cão seu principal reservatório no ciclo peridoméstico, porém animais silvestres também podem atuar como reservatório da doença (MATOS JUNIOR, 2004, GONTIJO, 2004). Ela atinge cerca de 65 países, causando cerca de 59 mil mortes por ano e cerca de 500 mil novos casos (SOUZA et al., 2012), considerada a segunda maior causa de óbito no mundo por doenças parasitárias, com uma taxa de mortalidade em torno de 10% por ano, perdendo apenas para malária (BLASI, 2016). Segundo dados publicados no ano de 2001 pela Organização Mundial da Saúde, só no ano de 2000 houve cerca de 41.000 mortes atribuídas à LV no mundo (WHO, 2001).

O agente causador da LV é um protozoário do gênero *Leishmania*, sendo a espécie *Leishmania infantum chagasi* responsável pela doença nas Américas, incluindo o Brasil. Outras espécies como a *Leishmania donavani* e *L. infantum*, são os principais agentes etiológicos na África, Europa e Ásia (Figura 04) (PINHEIRO, 2017; SILVA, 2007). No Brasil, a transmissão da LV, ocorre através da picada do vetor flebotomíneo fêmea da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, sendo que neste repasto sanguíneo, irá liberar a forma promastigota metacíclica na derme do hospedeiro junto a saliva (AMORIM, 2007). Segundo Marcondes e Rossi (2013) as pulgas e os carrapatos têm sido estudados como possíveis vetores da *L. infantum*, além disso, outras formas de transmissão já foram descritas, como transplacentária, venérea e por transfusão sanguínea.

Os primeiros registros de LV ocorreram na Índia no ano de 1885, e em 1903 foi apontado o agente etiológico da doença, descrito por William Boog, associando as formas de *Trypanosoma* spp. (SILVA, 2007). Na Índia, Nepal e África, é uma doença antroponótica, ou seja, transmitida entre humanos, já em outros locais como China, Oriente Médio, Mediterrâneo e nas Américas, é considerada uma zoonose (SCHIMMING; SILVA, 2012). No Brasil, Penna no ano de 1934, foi o primeiro a registrar e detectar o parasita, e em 1937, realizou a descrição e caracterização do ciclo biológico e sua correlação com o vetor *L. longipalpis* (BLASI, 2016).

Inicialmente, a LV no Brasil, era conhecida por infectar indivíduos que residiam em áreas rurais e próximo às florestas, em condições socioeconômicas rudimentares. Mais recentemente, casos começaram a ser notificados também em áreas urbanas,

nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, sendo hoje observada em quase todo território brasileiro (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Os cães atualmente, são os principais reservatórios da LV, sendo então, os principais alvos de controle da doença no Brasil. Dados indicam que na América do Sul existem milhões de cães infectados, possuindo o Brasil e a Venezuela, a maior taxa de infecção (AMORIM, 2007). No Brasil, aproximadamente 70 % dos casos humanos, são registrados nas regiões Norte e Nordeste (BLASI, 2016), onde cães sintomáticos e assintomáticos, atuam como fonte de infecção para flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

Pesquisas indicam que a maior parte dos cães, desenvolve a doença de forma sub-clínica. A forma clínica, geralmente implica em anemia, perda excessiva de peso, lesões oculares como ceratoconjuntivite bilateral e blefarite, lesões cutâneas com alopecia, descamação seca, que geralmente se inicia na cabeça e se espalha por todo corpo, linfadenopatia local ou generalizada, alterações renais como falência renal, locomotoras, neurológicas (convulsão, tremores, andar em círculo, paralisia da mandíbula e etc.), epistaxe, hepatoesplenomegalia, miocardite multifocal, lesões osteolíticas, diarreia e até mesmo lesões cutâneas ulcerativas (AMORIM, 2007; MARCONDES; ROSSI, 2013, SILVA, 2007).

A importância dos cães na epidemiologia da doença, deve-se a altas taxas de infecção quando se compara ao homem, como também ao elevado número de animais assintomáticos fonte de infecção para flebotomíneos (MARCONDES; ROSSI, 2013). Já no homem, a LV ocorre principalmente em crianças com idade de um a quatro anos com sinais clínicos inespecíficos, verificados também em outras enfermidades como DC, Tuberculose, Malária, entre outras. Os quadros clínicos variam de assintomáticos a patologias sistêmicas, quando o paciente inicia com febre prolongada, anemia, tosse, diarreia, dor abdominal, manifestações hemorrágicas, perda de peso, caquexia, esplenomegalia, hepatomegalia e taquicardia, tendo como os principais órgãos atingidos o baço, fígado, rins, pulmão e tecido hematopoiético, podendo levar a morte em algumas semanas ou meses. Apresenta-se também com queda de cabelo, edema periférico, alterações na pele e unhas (GONTIJO; MELO, 2004; PASTORINO et al., 2002, SOUZA et al., 2012). A Figura 04 apresenta as formas clínicas das leishmanioses e respectivas espécies do gênero *Leishmania* que são atribuídas como agentes etiológicos das mesmas.

Figura 4 – Formas clínicas e principais espécies de *Leishmania*.

Formas clínicas	Espécies de <i>Leishmania</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>
Leishmaniose Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) i. infantum</i> <i>L. (L.) i. chagasi</i>

Fonte: Blasi, 2016.

2.4 Métodos de diagnóstico para doença de Chagas

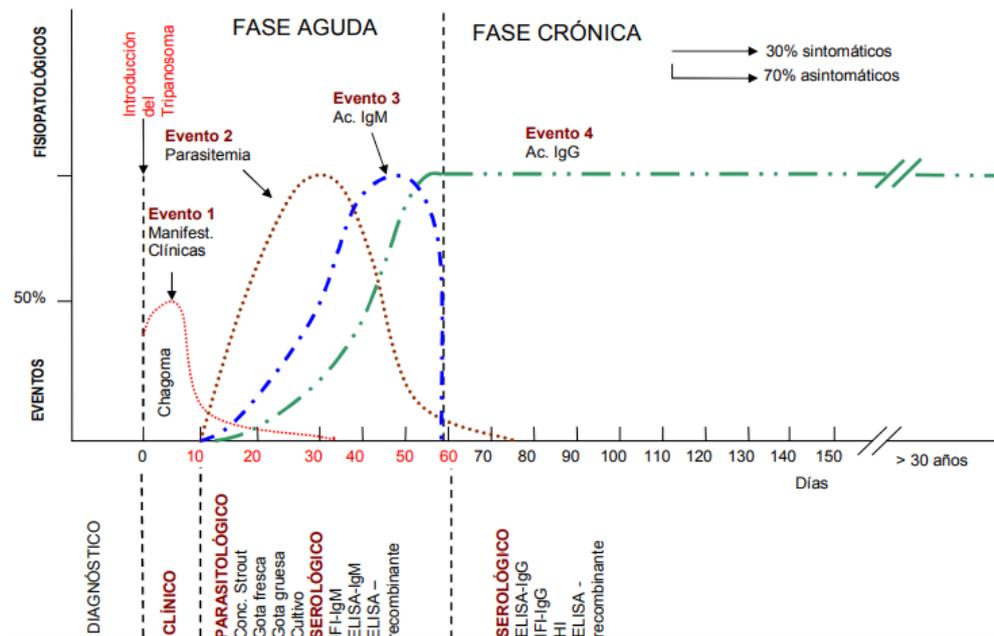
O diagnóstico da DC deve ser realizado em todos os pacientes suspeitos, sendo o diagnóstico final, acompanhado de investigação de evidências epidemiológicas, exame clínicos e laboratoriais (DIAS et al., 2016). Inicialmente, é realizado o diagnóstico clínico, acompanhado de uma triagem, que investiga casos antecedentes e contato com o vetor ou com algum material contaminado, assim como, transfusão ou transplante de órgãos recentemente. Deve ser investigada também, a ingestão de alimento artesanal ou cru que pode ter entrado em contato com o vetor ou reservatório do protozoário. Ainda clinicamente, deve-se avaliar lesões que indicam porta de entrada do protozoário no paciente, como o sinal de romanô ou chagoma de inoculação, presentes principalmente na fase aguda (COSTA et al., 2013; PAHO, 2019). O diagnóstico clínico, deve ser acompanhado do diagnóstico laboratorial por métodos diretos e indiretos, sendo essencial a escolha do método adequado para

cada fase da doença. Dentre os métodos parasitológicos, destaca-se o esfregaço sanguíneo e secundariamente o xenodiagnóstico e hemocultura. Como diagnósticos sorológicos, são citados principalmente o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA), o ensaio de hemaglutinação indireta (IHA) e citometria de fluxo. Além destes, ainda são utilizados métodos moleculares para identificar fragmentos de ácidos nucleicos do parasito, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), (ALVES et al., 2018; PAHO, 2019).

O exame parasitológico direto, é feito principalmente na fase aguda da doença, devido a elevada parasitemia, permitindo identificar a forma tripomastigota do protozoário na circulação. Para tanto, a coleta deve ser realizada dentro dos 30 dias de surgimento dos sintomas e com o paciente febril. A técnica de xenodiagnóstico, é realizada preferencialmente na fase crônica da doença, e indica o parasito nas fezes e no conteúdo intestinal do vetor após exposição ao material infectado; pode ser utilizada como confirmatória da doença, entretanto sua sensibilidade é baixa. A hemocultura, utiliza-se de meio de cultura para a multiplicação do protozoário, não sendo utilizada de forma rotineira, devido também a sua baixa sensibilidade (ALVES et al., 2018; PONTES; FREITAS; SANTOS 2018).

Na fase crônica da doença, os níveis de parasitemia são considerados baixos e o exame parasitológico direto apresentam baixa sensibilidade, assim nessa fase se tem preferência pelos métodos sorológicos e moleculares. Os métodos sorológicos, apresentam alta sensibilidade e são de fácil execução, sendo preferidos os de baixo custo, rápidos e com uma única etapa, sem necessidade equipamentos de alto custo (PAHO, 2019). Os métodos sorológicos, são indiretos, uma vez que detectam anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG e IgM. A presença de IgM está relacionado à fase aguda, enquanto a IgG, à fase crônica. Para o diagnóstico laboratorial conclusivo, são indicadas a confirmação de positividade de pelo menos duas técnicas para descartar resultados falsos-positivos (ALVES et al., 2018; BRASIL, 2019; COSTA et al., 2013; PONTES, 2020). A Figura 05 ilustra os métodos diagnósticos recomendados segundo os eventos fisiopatológicos e fases evolutivas da doença de Chagas.”

Figura 5 – Métodos diagnósticos e eventos fisiopatológicos da doença de Chagas.



Fonte: Chile, 2007.

A Imunofluorescência Indireta (IFI), pode ser aplicada para diagnosticar a fase aguda da doença com conjugado anti-IgM, utilizando antígeno com formas epimastigota do protozoário. É uma prova realizada em lâmina de microscópio, a partir da reação do antígeno com o anticorpo do soro do paciente mais o conjugado (anticorpo secundário) marcado com substância fluorescente, revelando a presença do anticorpo específico do paciente (COELHO, 2013; COSTA et al., 2013). Esse método possui sensibilidade de 99%, porém apresenta algumas desvantagens como uma leitura subjetiva, baixa especificidade, necessidade de um microscópio de luz UV, além de resultados falsos-positivos (WHO, 2002). Outro método sorológico, é o teste imunoenzimático (ELISA), que oferece vantagens frente aos outros métodos sorológicos, pois permite realizar vários testes de forma simultânea, com sensibilidade de 97,7% a 100%, fácil execução e possui uma leitura objetiva (ALVES et al., 2018; LIMA et al., 2019; MATOS, 2007; PONTES; FREITAS; SANTOS, 2018). A técnica de hemaglutinação indireta (IHA), avalia a ligação de anticorpos a antígenos utilizando a aglutinação de hemácias como sistema revelador, também é de fácil execução e rapidez na leitura (2 horas), não necessita de equipamentos sofisticados, apresenta uma sensibilidade de 96 a 98%, mas apresenta probabilidade de falsos negativos, não detectando de 1,6 a 2,5% dos indivíduos infectados (MATOS, 2007; PONTES; FREITAS; SANTOS, 2018; WHO, 2002).

Para maioria dos testes sorológicos, é utilizada uma mistura complexa de antígenos lisados do parasita como o caso do ELISA e IHA ou o parasito inteiro para a IFI, aumentando a chance de diagnosticar a infecção. Entretanto, as chances de resultados falsos positivos também aumentam, devido a presença de reações cruzadas a outras espécies que pertencem à família Trypanosomatidae, como *Leishmania* spp., devido a isso em muitos estudos é preconizado o uso de dois testes sorológicos positivos, afim de se obter um resultado conclusivo (LIMA et al., 2019; MATOS, 2007). Entretanto, de acordo com WHO (2002), um único teste positivo seja ele o IFI ou ELISA é o suficiente, pois apresentam sensibilidade de aproximadamente 99%, desde que os reagentes tenham sido armazenados de forma adequada e seguindo os protocolos de controle de qualidade da prova.

Entre, os métodos de biologia molecular, o mais utilizado é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que apresenta elevada especificidade e sensibilidade, onde ocorre uma reação in vitro de amplificação de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, possibilitando identificar pequenas quantidades de DNA do *T. cruzi* na fase crônica. Esse método pode ser utilizado complementar ao ELISA e dados indicam 83 a 100% de positividade nos pacientes chagásicos (LIMA et al., 2019; MATOS, 2007). Deve-se considerar que, é um método com custo mais elevado, e sua execução exige laboratórios com tecnologia apropriada e espaço exclusivo (ALVES et al., 2018).

Como exames complementares aos métodos laboratoriais e ao diagnóstico clínico, se utiliza o hemograma completo, pois em casos mais graves da doença pode-se encontrar trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose discreta, com desvio à esquerda, linfocitose e anemia hipocrômica, como também por avaliação dos parâmetros bioquímicos de urinálise, função hepática (principalmente em casos de transmissão pela via oral), radiografia torácica e eletrocardiograma (COELHO, 2013; OPAS, 2009).

Outro método para diagnóstico de *T. cruzi*, utilizado quando o diagnóstico parasitológico é negativo repetidamente e o quadro clínico é bastante sugestivo de *T. cruzi*, assim como, para aferir a eficácia do tratamento efetuado em humanos, é o método de citometria de fluxo. Este método possui elevada sensibilidade, e permite reconhecer antígeno anti- *T. cruzi* em tripomastigotas vivos ou em epimastigotas fixados, sendo uma análise rápida e objetiva (MATOS, 2007; NAKAGE et al., 2005). Em contrapartida, possui elevado custo devido aos equipamentos, técnicos especializados, não sendo uma técnica de rotina, principalmente na medicina

veterinária (NAKAGE et al., 2005; PISSINATE et al., 2008). Cordeiro *et al.* (2001), utilizou o teste de IFI e a citometria de fluxo para soros de pacientes chagásicos na fase crônica da doença que apresentavam as formas clínicas indeterminada, ou cardíaca ou digestiva e soros de pacientes não chagásicos, independente da preparação do parasita utilizado. Os resultados mostraram que a curva de titulação do IgG total foi maior nos pacientes chagásicos, quanto a reatividade das subclasses IgG1 e IgG3 mostraram-se positivos para os soros chagásicos e negativos para os soros não chagásicos, permitindo diferencia-los quando utilizada a forma tripomastigota fixos.

Faz necessário como diagnóstico diferencial da DC principalmente em sua fase aguda, para a exclusão de tais doenças como leishmania visceral, malária, dengue, toxoplasmose, febre tifoide, doenças autoimunes, leptospirose, entre outras doenças (BRASIL, 2019). Caso confirmado o quadro de DC, deve-se imediatamente iniciar o protocolo de tratamento, com a finalidade de minimizar os sinais clínicos, eliminar o parasito e impedir a evolução para a fase crônica da doença. Para a fase aguda da doença, existe um tratamento padrão, com o uso do antiparasitário Benzonidazol ou com o antiprotozoário Nifurtimox, juntamente com o tratamento suporte, já para a fase crônica da doença, não existe tratamento específicos e nem vacina aprovada para enfermidade (ASSIS, 2017; OPAS, 2009).

2.5 Métodos de diagnóstico para leishmaniose

O diagnóstico de Leishmaniose é baseado em uma série de fatores, como o estado clínico, anamnese, presença de lesões pelo corpo e ponto de inoculação do parasito pelo vetor. Leva em consideração também a epidemiologia da área acometida, exames laboratoriais como testes parasitológicos, sorológicos e moleculares (AMORIM, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O diagnóstico clínico acaba sendo um pouco subjetivo, devido os sinais clínicos serem inespecíficos e ocorrer para outras doenças parasitológicas. Para o cão o diagnóstico é complexo, devido à variedade de sinais clínicos que podem apresentar, podendo ficar de forma inaparente por um longo período (cl clinicamente saudável) ou

até mesmo se agravar levando o animal ao óbito em semanas (GONTIJO; MELO, 2004).

Utilizar métodos de diagnóstico laboratoriais associado ao diagnóstico clínico, visa não somente a confirmação da doença, como também fornece informações epidemiológicas de extrema importância, que irá cooperar com a identificação da espécie circulante, como também orientar sobre as medidas a serem tomadas quanto ao controle do agravo (BRASIL, 2010).

O diagnóstico parasitológico, na maior parte das vezes é o de primeira escolha devido ser de fácil execução, mais rápido e apresentar um menor custo. Caracteriza-se, pela identificação do parasito no material biológico, que pode ser obtido através de punção hepática, esplênica, de linfonodos, biopsia da pele e punção da medula óssea (AMORIM, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Esse material biológico pode ser usado para realizar o esfregaço sanguíneo, impressão em lâmina, histopatológico, isolamento em meio de cultura e inoculação em animais de laboratório de preferência em hamster, nas patas posteriores e focinho, diagnóstico esse que, demanda tempo para ocorrer a evolução da lesão no modelo experimental (SCHIMMING; SILVA, 2012).

Apesar da inoculação em animais de laboratório apresentar especificidade de 100%, possui uma sensibilidade variável, pois depende da carga parasitaria, pois é dependente da fase que se encontra a doença, o número de amostras coletadas de cada paciente. A técnica de xenodiagnóstico, também considerada um método parasitológico, permite isolar e identificar o parasito no vetor artrópode, apesar de não ser considerada a técnica primaria e ser pouco utilizada, possui importância na resolução dos pontos epidemiológicos (AMORIM, 2007).

Os métodos sorológicos são utilizados para diagnosticar leishmaniose em cães e humanos, onde o paciente desencadeia resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti- *Leishmania* (SCHIMMING; SILVA, 2012), entretanto os métodos sorológicos visa detectar anticorpos anti- *Leishmania* circulantes no soro (BRASIL, 2010). Atualmente existem várias técnicas que se diferenciam quanto a sua sensibilidade, especificidade e execução, sendo as mais utilizadas a reação de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação direta (DAT) e o teste rápido imunocromatográfico (DPP), sendo que no Brasil as técnicas mais utilizadas são o IFI e ELISA (DIAS, 2016; GONTIJO; MELO, 2004).

Após o cão se infectar por *Leishmania* spp., alguns podem desenvolver sintomas da enfermidade com um título crescente de anticorpos, apesar disso os métodos sorológicos podem apresentar algumas dificuldades quanto ao diagnóstico, como reações cruzadas com *T. cruzi*, prejudicando a interpretação do resultado obtido, como também pode ocorrer a mudança da resposta humoral, levando a não significância nos títulos de anticorpos (LUCIANO et al., 2009).

A técnica de IFI apresenta elevada sensibilidade variando de 90% a 100%, mesmo quando se utiliza outras espécies de antígenos de *Leishmania* spp., porém com uma especificidade limitada à 80%, podendo levar a reações cruzadas, interferindo no resultado. Exige também, um profissional devidamente qualificado para sua execução e aparato de equipamentos e reagentes, sendo na Europa considerado o método “padrão ouro” (AMORIM, 2007; GONTIJO; MELO, 2004; SCHIMMING; SILVA, 2012). Por volta da década de 60, começou a ser utilizada e considerada a metodologia de referência, porém devido suas limitações, como a ocorrência de reações cruzadas, principalmente com DC (LUCIANO et al., 2009) o Ministério da Saúde modificou o protocolo de diagnóstico, substituindo pelo teste rápido imunocromatográfico (DPP) como teste de triagem e o ELISA como confirmatório (DIAS, 2016).

Já o ELISA, é um método que apresenta maior sensibilidade quando comparada ao IFI, permitindo detectar baixos títulos de anticorpos. Contudo, também possui especificidade variada (AMORIM, 2007; LIRA, 2005), tratando-se de um teste de fácil execução, rápido e que permite a avaliação de uma grande quantidade de amostras com leitura relativamente precisa (BRASIL, 2010; DIAS, 2016). Em estudo realizado nos estados da Bahia e Pernambuco, áreas endêmicas para LV, foi realizado estudo com cães infectados naturalmente por *L. chagasi* seguido de avaliação sorológica desses animais pelos métodos de ELISA e IFI. Foi observado então que, o método RIFI possuía sensibilidade de 100% e especificidade de 83%, quando comparado ao ELISA com sensibilidade de 94% e especificidade de 90%, concluindo-se a necessidade de utilizar dois testes diferentes, para um diagnóstico mais preciso (AMORIM, 2007).

Os antígenos empregados para os testes de RIFI e ELISA são derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis, podendo apresentar reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae e até mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes. Isso indica a necessidade

de atentar-se também aos sinais clínicos caso o animal apresente, e aspectos epidemiológicos para considerar a ocorrência de reações cruzadas pelos métodos sorológicos utilizados (LUCIANO et al., 2009).

As técnicas moleculares foram introduzidas a partir da década de 80 para o diagnóstico de *Leishmania* spp., tais como o PCR convencional, RT-PCR ou PCR em tempo real (qPCR), baseadas na identificação do parasito por amplificação e identificação de fragmentos de ácidos nucleicos por variadas modalidades (SCHIMMING; SILVA, 2012). O PCR convencional é o mais utilizado dentre as técnicas moleculares, sendo uma técnica altamente sensível e de elevada especificidade, diminuindo os riscos de reações cruzadas e possibilitando detectar a infecção antes mesmo da soroconversão. Entretanto, possui custo elevado, demanda equipamentos específicos, reagentes e é dependente da presença de ácidos nucleicos do parasito no material coletado, o que pode implicar em uma sensibilidade variável (BRASIL, 2010; DIAS, 2016; LIRA, 2005).

No homem a principal forma de tratamento é medicamentoso, dependendo da forma clínica da doença, o que vai determinar seu tempo de uso, dose e via de aplicação. Especialmente, pacientes infectados com LV tem até 90% de chance de mortalidade se não tratados corretamente. Para o cão hoje existe tratamento medicamentoso para leishmaniose tegumentar, já nos casos de leishmaniose visceral, de acordo com o Ministério da Saúde é indicada a eutanásia ou tratamento com medicamento a base de miltefosina. (BRASIL, 2019; SOUZA et al., 2012).

2.6 Reações sorológicas cruzadas entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.

Apesar dos métodos sorológicos serem bastante utilizados na rotina de diagnóstico e controle dessas doenças, eles possuem algumas limitações. Por exemplo, os métodos sorológicos não conseguem detectar a doença em pacientes que apresentam baixos níveis de imunoglobulinas, podendo gerar casos de falso-negativos ou reações cruzadas com outras doenças crônicas como LV, LT, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), sífilis entre outras doenças infecciosas e parasitárias (BRASIL, 2010; CARVALHO et al., 2015; SANTOS et al., 2012).

Os relatos de reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania* spp. são frequentes nos testes sorológicos, devido à proximidade filogenética entre os dois parasitos,

levando a casos de falsos-positivos (VIOL, 2011). Diversos estudos têm apresentado propostas de diferenciação no diagnóstico dessas parasitoses, mas não há ainda um protocolo consolidado para esta diferenciação. Alguns autores como Malchiodi *et al.* (1994) apontam que os métodos sorológicos como o ELISA são importantes para realizar o diagnóstico da DC em cães, levando em consideração que os níveis de anticorpos permanecem por vários anos.

De acordo com Santos *et al.* (2012) em *T. cruzi* o uso de antígeno recombinante demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade no ELISA, sem a presença de reatividade cruzada, já o ELISA convencional mostrou reatividade cruzada com LV. Utilizando o ELISA para avaliação de reação cruzada entre *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, Zanette (2006) observou que de 14 soros avaliados, 64,3% (nove) apresentaram reação cruzadas entre as duas parasitoses, enquanto que para a técnica de RIFI das 14 amostras utilizadas, 42,9% (4) apresentaram reações cruzadas.

Luciano *et al.* (2009) analisou 150 soros de cães, utilizando a técnica de RIFI, onde os soros apresentaram positividade tanto para *Leishmania* spp. quanto para *T. cruzi*, demonstrando uma alta incidência de reação cruzada por essa técnica. Já Aguiar *et al.* (2009), relatou que para 26 soros positivos para *T. cruzi* pela técnica de ELISA, 12 (46,1%) deles apresentaram reações sorológicas cruzada com a *Leishmania chagasi*.

Berrizbeitia *et al.* (2012) relata em seu estudo que de 49/50 soros avaliados, apresentaram positividade para a DC, sendo que quatro já eram positivos para *Leishmania*, 3 para ascaridíase, um para estrogiloidíase e 6 pacientes saudáveis, assim indicando reações cruzadas, não possibilitando a sua diferenciação.

Souza *et al.* (2009) avaliou através de métodos sorológicos 75 amostras de cães, sendo 17/75 foram consideradas positivas de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, a partir dessas 17 amostras positivas para *T. cruzi*, 10 pelo método de IFI apresentaram sorologia positiva para *Leishmania chagasi*, sem o animal apresentar nenhuma sintomatologia clínica, demonstrando uma possível reação cruzada ou até mesmo a presença das duas infecções. Costa *et al.* (1991) também relata altas taxas de reações cruzadas em seu estudo entre leishmaniose tegumentar e DC, confirmando a preocupação de falsos-positivos, levando a tratamento muitas das vezes de forma errônea, como a eutanásia desses animais no caso de leishmania visceral.

Já Passos *et al.* (1997) demonstrou que 23 soros de pacientes com leishmaniose, também apresentaram sorologia positiva para DC, sendo que 3 soros passaram por três diferentes testes sorológicos, e quatro soros apresentou positividade somente pelo teste de ELISA para DC, podendo ser explicado devido à alta sensibilidade apresentada no teste de ELISA.

Além do mecanismo patogênico, deve-se compreender as respostas imunológicas, onde a resposta humoral desempenha um importante papel na eliminação e resistência dos parasitas circulantes, de acordo com Becerril *et al.* (2001), os primeiros estudos realizados, indicam que anticorpos IgG2 estavam implicados na resistência, relatando também títulos elevados das subclasses IgG1 e IgG3 anti-*T. cruzi* observados na fase crônica da DC na forma indeterminada.

O autor citado acima avaliou 30 soros pela técnica de ELISA e IFI, onde todos os soros apresentaram valores altos, sendo que das quatro subclasses de IgG total anticorpos anti-*T. cruzi*, a IgG1 e IgG2 apresentaram números mais elevados. Um artigo publicado por Cordeiro *et al.* (2001), descreveu que as subclasses IgG1 e IgG2 são as principais imunoglobulinas presentes nos testes sorológicos. Verçosa (2006) analisou a resposta imune humoral produzida pelos pacientes chagásicos, verificou que diversos isotipos de IgG são produzidas em resposta a presença do antígeno, porém o isótipo IgG1 que se apresentou de maior índice de reatividade, de acordo com o autor a principal subclasse produzida, sugerindo seu uso para fins de diagnóstico.

Quanto a reatividade sorológica de IgG e suas subclasses em pacientes com a DC, alguns autores relatam concentrações iguais de IgG1, IgG2 e IgG3 em todos pacientes chagásicos e positivos para leishmaniose, independente da forma clínica. Outros estudos observaram níveis aumentado de IgG1 e IgG2 em todos pacientes chagásicos, independente da forma clínica apresentada (SANTOS *et al.*, 2012). Neste mesmo estudo, analisando a reatividade sorológica das subclasses de IgG total, como também sua aplicabilidade como diagnóstico diferencial, demonstrou reatividade cruzada com as amostras de LV e LT, sendo a IgG2 com maior nível de reação cruzada com a LT, e quando comparado a outras doenças infecciosas e parasitárias, o IgG total não apresentou reação cruzada com os soros sem a infecção com *T. cruzi*.

Segundo Carvalho *et al.* (2015), que utilizou IFI e citometria de fluxo, para detectar LV, LT e DC, através da reatividade da imunoglobulina da subclasse IgG,

obtendo resultados satisfatórios com precisão de 95%, de 76/80 amostras demonstrou diferenciação da DC.

Assim quando se apresenta resultados sorológicos positivos, não indica necessariamente infecção por *T. cruzi*, pois outras doenças podem indicar reações cruzadas, apresentando resultados falsos positivos, como no caso da *Leishmania*, devido apresentarem um repertório antigênico semelhante com epítomos comuns que pode induzir a produção de anticorpos, levando a reações cruzadas (CARVALHO et al., 2015). Contudo, deve-se considerar que existem áreas endêmicas, onde a presença de *Leishmania* spp. e as incidências de *T. cruzi* são superpostas e a presença da co-infecção pode ocorrer nos cães como também no homem, assim os testes sorológicos podem apresentar a ocorrência de infecção pelos dois protozoários ao invés de reações cruzadas (TRONCARELLI et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar pelo painel de subclasses das imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG total uma forma de diferenciação da infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp., utilizando a técnica sorológica de ELISA indireta aplicada a soros de cães soropositivos e soronegativos para DC.

3.2 Objetivo específico

- Comparar resultados de soropositivos para IgG total frente a antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. com resultados obtidos para IgG1, IgG2 e associação de resultados positivos destas imunoglobulinas.
- Comparar resultados de soropositivos para IgG1 frente a antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. com resultados obtidos para IgG2, IgG total e associação de resultados positivos destas imunoglobulinas.
- Comparar resultados de soropositivos para IgG2 frente a antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. com resultados obtidos para IgG1, IgG total e associação de resultados positivos destas imunoglobulinas.

4. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. S. *et al.* Resposta Imune humoral aos antígenos de *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* em cães de área endêmica para leishmaniose. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.2, p.470-478, 2009.

ALVES, D. F. *et al.* Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 4, p. 330-333, 2018.

AMORIM, I. F. G. de. **Avaliação do perfil humoral de cães vacinados com Leishmune® e de cães naturalmente infectados procedentes de área endêmica de Leishmaniose Visceral canina.** 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ASSIS, R. D. **Patogênese da Doença de Chagas humana por transmissão oral.** 2017. 21f. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2017.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BECERRIL, N. H. *et al.* Reatividade da subclasse de IgG ao *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos. **Investigação Clínico-Experimental**, v. 71, n. 3, p. 199-205, 2001.

BERRIZBEITIA, M. *et al.* Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1-7, 2012.

BIGNARDE, J. M. P. *et al.* Doença de chagas em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, s/v, n. 11, p. 1-5, 2008.

BLASI, T. D. **A complexidade da interação Leishmania-flebotomíneo:** do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao tubo digestivo à análise do papel de citocinas - like na modulação da resposta imune do vetor. 2016. 87f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** 2. ed, Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

_____. **Guia de Vigilância em Saúde.** 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

CARVALHO, A. T. *et al.* FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-15, 2015.

CHILE. Ministerio de Salud Pública e Asistencia Social, Dirección de Regulación. Dirección de la Vigilancia en la Salud. **Norma técnica de prevención y control de la enfermedad de Chagas**. San Salvador: Ministerio de Salud Pública, 2007

COELHO, A. R. B. **Tripanossomíase Americana**: uma revisão com ênfase na medicina veterinária. 2013. 27f. Monografia (Graduação em Ciências Veterinárias) – Curso de Graduação em Agronomia e Ciências Veterinárias, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013.

CORDEIRO, F. D. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 112-118, 2001.

COSTA, C. A. da. *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1991.

COSTA, M. *et al.* Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2013.

CRUZ, G. S. **Leishmaniose tegumentar americana**: aspectos clínicos, epidemiológicos e influência de fatores predisponentes. 2016. 20f. Monografia (Graduação em Enfermagem) – Curso de Graduação de Enfermagem, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro Brasileira, Acarape, 2016.

DARIO, M. A. *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, v.9, n.477, p. 1-14, 2016.

_____. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. **PLOS ONE**, v.12, n.11, p. 1-22, 2017.

_____. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the Atlantic rainforest, southeast Brazil. **Parasite**, v.25, n.59, p. 1-9, 2018.

DIAS, Á. F. L. R. **Leishmaniose visceral canina em Barão de Melgaço, Mato Grosso**: sorologia e análise espacial. 2016. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2016.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 83-84, 2006.

DIAS, J. C. P. *et al.* Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015, **Epidemiol e Serv Saúde**, v. 25, s/n, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO-NETO, V.; LUNA, E. J. de. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

FALQUETO, A. *et al.* Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.

FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz. **Vetores da doença de Chagas no Brasil** (Região Sudeste). 4 ed. RV Impressão Digital LTDA: Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2015.

FREITAS, Y. B. N. *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 190-197, 2018.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. 1. Ed., Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 289 p.

GONTIJO, B. B. *et al.* Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **Pubvet**, v. 5, n. 38, p. 1245-1250, 2011.

GONTIJO, B. B.; CARVALHO, M. de. L. R. de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Advances in parasitology**, v. 74, s/n, p. 1-18, 2011.

LEITE, G. R.; SANTOS, C. B.; FALQUETO, A. Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 38, s/n, p. 651-663, 2011.

LIMA, G. B. de. *et al.* Métodos de prevenção e tratamento para a doença de chagas. **Ciência & Inovação**, v. 4, n. 1, 2019.

LIRA, R. A. de. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. 43f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

LUCIANO, R. M. *et al.* Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

MALCHIODI, E. L. *et al.* 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). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 97, n. 3, p. 417-423, 1994.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MATOS, C. S. **Pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* por citometria de fluxo**: otimização e análise de desempenho, aplicada ao diagnóstico e monitoração de cura da doença de chagas. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007.

MATTOS JUNIOR, D. G. *et al.* Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

NAKAGE, A. P. M. *et al.* Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NORMAN, F. F.; VÉLEZ, L. R. Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. **Journal of travel medicine**, v. 26, n. 7, 2019.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: OPAS, p. 92, 2009.

_____. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington: OPAS, p. 1-160, 2019.

PASSOS, V. M. A. *et al.* Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 791-793, 1997.

PASTORINO, A. C. *et al.* Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease, **The Lancet**, v.391, p.82-94, 2018.

PINHEIRO, J. T. **Investigação de populações do complexo *Lutzomyia longipalpis* em Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro e Mossoró, estado do Rio Grande do Norte**. 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

PISSINATE, J. F. *et al.* Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

PONTES, B. G. **Avaliação da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* e estado nutricional de cães em área endêmica de triatomíneos monitorados pela vigilância epidemiológica no sul do Espírito Santo**. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santos, Alegre, 2020.

PONTES, B. G; FREITAS, L. A. de.; SANTOS, F. M. dos. Métodos diagnósticos para a doença de Chagas canina. In: TRIVILIN, L. O. *et al.* **Tópicos Especiais em Ciência Animal VII**, 1. Ed. Alegre: CAUFES, 2018. p. 108-124.

RESENDE, J. M. de.; RASSI, A. Doença de chagas. In: DIAS, J. C. P; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 20. Ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p. 38- 72.

SANTOS, C. B. *et al.* Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.5, p.471-473, 2005.

_____. Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por flagelados morfologicamente semelhantes a *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p. 89-91, 2006.

SANTOS, F. M. dos. **Evolução da cardiopatia chagásica em cães tratados com Benznidazol na fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. 2010. 126f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

SANTOS, I. F. M. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 13, n. 2, p. 226-235, 2014.

SANTOS, L. da. S. *et al.* In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 35-44, 2012.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 19, p. 1-17, 2012.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SONODA, I. V. **Triatoma infestans e Triatoma brasiliensis: avaliação da resistência ao piretróide deltametrina e análise intraespecífica da variabilidade genética**. 2009. 96f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

SOUZA, A. I. de. *et al.* Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1351-1356, 2008.

SOUZA, A. I. *et al.* Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 150-152, 2009.

SOUZA, M. A. de. *et al.* Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 10, n. 2, p. 61-70, 2012.

TERRAMETRICS. **Deslocamento São Caetano, Iconha - ES a Todos os Santos, Guarapari - ES**. Disponível em:

<<https://www.google.com/maps/dir/Igreja+de+S%C3%A3o+Caetano,+Iconha++ES/Todos+os+Santos,+Guarapari++ES/@-20.6441037,-40.9271238,36153m/data=!3m1!1e3!4m14!4m13!1m5!1m1!1s0xb90d791a095525:0xeb76a16d3040fedf!2m2!1d-40.9072779!2d-20.7184666!1m5!1m1!1s0xb9ad05f6753395:0xf6ea86a57ac785f1!2m2!1d-40.669267!2d-20.5211819!3e2>>. Acesso em: 25 abril. 2022.

TRONCARELLI, M. Z. *et al.* Leishmania spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 164, p. 118-123, 2009.

VERÇOSA, A. F. A. **Caracterização do perfil isotípico das imunoglobulinas G de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

VIOL, M. A. **Detecção de reações cruzadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em cães pelo ensaio imunoenzimático indireto, pela reação de**

imunofluorescência indireta e reação em cadeia de polimerase. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2001.** Geneva: WHO, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Controle da doença de Chagas.** Brasília: WHO, n. 902, p. 1-110, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. La enfermedad de chagas (trypanosomiasis americana). 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 15 ABR. 2022.

ZANETTE, M.F. **Comparação entre métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

CAPÍTULO 1

Utilização da combinação de perfis sorológicos para definição de diagnóstico diferencial entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.

Use of the combination of serological profiles to define the differential diagnosis between *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.

Artigo científico a ser apresentado a revista **Cadernos de Saúde Pública**, ISSN 1678-4464, <http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/>.

Ana Flávia Ferreira Selva^a, Beatriz Gosti Pontes^a, Fabiane Matos dos Santos^a, Wanderson Lopes Andrade^a, Marcos Santos Zanini^{ab}

¹Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), para obtenção do título de Mestre.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia (CCAIE), AV. Alto Universitário, s/n, Guararema, 29.500-000 Alegre, ES, Brasil.

^bLaboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), AV. Alto Universitário, s/n, 29500-000, Guararema, Alegre – ES.

Correspondência: M.S. ZANINI, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia - CCAIE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, sem número, Caixa Postal 16, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil. E-mail: zaninims@gmail.com.

Resumo: A doença de Chagas (DC) e a leishmaniose, podem ser co-endêmicas, causadas por protozoários, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. respectivamente, pertencentes a família Trypanosomatidae, filogeneticamente semelhantes. Contudo, são os principais gêneros

causadores de reações sorológicas cruzadas. Assim, esse estudo avaliou pela técnica de ELISA indireta as imunoglobulinas (IgG total, IgG1 e IgG2) de soros cães para DC, frente a antígenos de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* para diferenciação sorológica. Utilizou-se 36 soros de cães de áreas endêmicas e notificadas para triatomíneos (Iconha e Alegre, ES), sendo 11 soros previamente reconhecidos como positivos para DC, pelo método imunoenzimático. Os soros foram aplicados em placas com antígeno de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, e avaliados com anticorpos secundários para IgG total e sub-classes IgG1, IgG2. Para o painel de IgG total de soros positivos e negativos frente ao antígeno DC, verificou-se em sua maioria, resultados idênticos para antígeno de *Leishmania* spp. com uma concordância Kappa =1. Entretanto, quando comparados resultados de associações de IgG total+IgG1+IgG2, verificou-se concordância de positivos para quatro associações (11,11%) e diferença para 32 associações entre positivos e negativos (88,88%), indicando um potencial uso destas associações para diferenciação entre soros positivos para as duas enfermidades. Por fim, esta metodologia mostrou possuir potencial utilização para diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades.

Palavras chaves: doença de Chagas. Ensaio Imunoenzimático. Leishmaniose.

1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* compreendem em parasitos hemoflagelados, que pertencem à mesma família Trypanosomatidae, responsáveis por causar a doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana e a Leishmaniose, respectivamente. São importantes endemias, por se tratarem de doenças infecciosas, parasitárias e possuírem caráter zoonótico, podendo acometer o homem e diversas espécies de animais domésticos e selvagens, dentre elas o cão que atua como o principal reservatório da doença no ambiente peridomiciliar. Ambas enfermidades, possuem em seu ciclo biológico vetores hematófagos ^{1,2}, são doenças consideradas negligenciadas e de notificação compulsória, que afeta principalmente populações mais carentes e marginalizadas ³.

Ambas, são causadas por protozoários flagelados da espécie *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e *Leishmania* spp., agentes etiológicos da doença de Chagas e Leishmaniose, respectivamente^{4,5}, apresentam em seu ciclo biológico insetos hematófagos. O principal responsável pela transmissão da DC é a espécie *T. infestans*, popularmente conhecido como “barbeiro”, era maior responsável pela doença no homem e nos cães, devido apresentar

ampla distribuição geográfica, incluindo o Brasil^{6,7}, entretanto o mais encontrado no Espírito Santo é a espécie *T. vitticeps*, principalmente após o programa de controle e vigilância da transmissão vetorial ter obtido sucesso na erradicação do *T. infestans*. Já para Leishmaniose Visceral (LV) causada pela *Leishmania infantum chagasi* e Leishmaniose Tegumentar (LT) causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que representam a maioria das infecções por leishmaniose no Brasil, tem na espécie *Lutzomyia longipalpis* o flebotomíneo fêmea de maior importância no Brasil para LV, também conhecido como “mosquito palha”, enquanto que para LT, temos como vetor diversas espécies de flebotomíneos^{8,9}.

A DC apresenta duas fases, aguda e crônica, com diferentes formas clínicas da doença (indeterminada, cardíaca, digestiva e mista). Na fase aguda da doença é indicado o diagnóstico através de métodos diretos, como os parasitológicos, porém na fase crônica onde os níveis de parasitemia são baixos, são preconizados principalmente métodos sorológicos, como o ELISA indireto (ensaio imunoenzimático), IFI (ensaio de imunofluorescência indireta) e IHA (hemaglutinação indireta), sendo o ELISA o mais utilizado¹⁰. As leishmanioses também apresentam fase aguda e crônica, sendo a identificação direta por métodos parasitológicos da *Leishmania* spp., realizada mais facilmente durante a fase aguda e inicial da enfermidade, enquanto os métodos de biologia molecular e sorológicos são os preferenciais para a fase crônica¹¹.

Contudo, apesar dos testes sorológicos serem muitos utilizados para ambas as enfermidades, apresentam algumas limitações, como expressivas reações cruzadas com anticorpos para outros protozoários que possuam antígenos em comum¹². A possibilidade de reações cruzadas nos testes sorológicos entre *T. cruzi* e *Leishmania* spp., leva a resultados falso-positivos, ocorrendo frequentemente em regiões onde as duas doenças são prevalentes. Pacientes assintomáticos com a fase crônica da DC, podem ser diagnosticados sorologicamente de forma errônea como portadores de leishmaniose, enquanto que pacientes com *Leishmania infantum chagasi* que apresentam problemas cardíacos, podem ser diagnosticados com *T. cruzi*. Falsos-negativos também podem ocorrer devido os testes sorológicos falharem em detectar pacientes com baixos níveis de imunoglobulina⁷. Essas reações cruzadas, podem ocorrer devido a mistura complexa de antígenos dos parasitos comuns a mais de um protozoário, e mesmo pertencerem à mesma família sendo morfologicamente semelhantes^{7,13}.

De acordo com Barcelos *et al.*³ utilizando o método de RIFI (imunofluorescência indireta), obteve resultado de reação cruzada entre LV e DC, o mesmo observado por Luciano *et al.*². Matos *et al.*¹⁴ em levantamento sorológico, também relatou que 17% dos soros de cães avaliados, apresentaram sorologia para ambas as doenças.

Aguiar *et al.*¹ analisou pelo método de ELISA e Western Blotting, 265 soros de cães domiciliares, observando 26 resultados positivos (9,8%) para *T. cruzi*, onde 12 amostras (46,15%) foram soropositivas para *L. chagasi*, indicando uma sensibilidade de 83,3 e 90% e especificidade de 46,4 e 75%, para *T. cruzi* e *L. chagasi* respectivamente. Já Viol⁹, avaliando 408 animais pela técnica de ELISA, observou 8,33% soros (34/408) com reação sorológica positiva para ambas as doenças, enquanto que para a RIFI 7, 60% (31/408) de reações cruzadas.

Diante da infecção, ocorre a produção de imunoglobulinas G, que se tem a produção de quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), que são importantes tanto para a destruição do parasito pelo sistema complemento, quanto por fagocitose por macrófagos, sendo que o IgG1 e IgG4 realizam a defesa por células efetoras não fagocitárias, como os mastócitos¹⁵. De acordo com Verçosa¹⁶ a subclasse IgG1 se mostrou em níveis mais elevados em pacientes chagásicos e com a forma cardíaca da doença, que corrobora com Caldas¹⁷ que demonstrou relação entre os níveis de IgG1 e a presença inflamatória no miocárdio.

Considerando essas informações, e a possibilidade de ocorrência de infecção por ambos os protozoários, este estudo objetivou utilizar o perfil de subclasses de imunoglobulinas (IgG total, IgG1 e IgG2) pelo ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) como forma de diferenciação entre *T. cruzi* e o gênero *Leishmania*, parasitas estes considerados como principal causa de reações sorológicas cruzadas no estado do Espírito Santo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação das reações sorológicas cruzadas entre *T. cruzi* e a *Leishmania* spp., utilizou o método sorológico de ELISA indireta, avaliando a classe de IgG e subclasses de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2) de 36 soros de cães previamente diagnosticados como positivos e negativos pela técnica de ELISA indireta, com utilização de anticorpo secundário para IgG total frente a porção FC do anticorpo primário oriundo dos soros dos cães. Estes cães foram classificados em sua maioria como sem raça definida e de ambos os sexos, domiciliados em áreas rurais dos municípios de Iconha e Alegre – ES.

2.1 Aspectos éticos

Os protocolos e procedimentos foram realizados de acordo com a conduta preconizada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a execução dos mesmos foi condicionada à aquisição prévia do parecer favorável da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número de protocolo 20/2018.

2.2 Área de estudos e animais

As amostras de soros dos cães utilizados para a realização desse estudo, foram coletadas no município de Iconha e Alegre- ES, durante o período de 2018 a 2019 por Pontes¹⁸. Esses cães habitavam áreas domiciliares e peridomiciliares de áreas notificadas para presença de triatomíneos infectados por *T. cruzi*, registrado pela vigilância sanitária do Núcleo Especial de Vigilância Epidemiológica (NEMES) da secretaria de Estado de Saúde (SESA) do Espírito Santo. Além disso, os 36 cães no presente estudo, tiveram a devida autorização dos tutores acompanhada da avaliação clínica e nutricional desses animais. A coleta em volume mínimo de 2 mL de sangue, foi por punção da veia cefálica, com assepsia do local, sendo logo após realizada a separação do soro através da centrifugação e acondicionado em microtubos estéreis, etiquetados e conservados entre uma temperatura inicial para transporte entre 0°C a 4°C e posteriormente, 80°C negativos. A reatividade sorológica inicialmente mensurada pela técnica de ELISA indireta, utilizando como antígeno a forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, para detectar a presença de imunoglobulinas G totais anti-*T. cruzi*, através dos resultados obtidos e pela análise do ponto de corte (*cut-off*), revelou um total de 10 cães positivos (27,77%) para a infecção e um cão com reatividade final limítrofe (2,79%), sendo os demais animais considerados negativos¹⁸.

2.3 Ensaio sorológico utilizando a imunoglobulina IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2, para *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

A técnica sorológica realizada foi o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) descrita por Voller *et al.* (1976)¹⁹ e para obtenção do antígeno, foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania (infantum) chagasi*. Proteínas foram dosadas pelo método de Lowry *et al.*²⁰ e realizado a titulação em bloco, visando definir

a concentração mínima de proteínas para realizar a sensibilização das placas (Catalog number 2595, Costar, Cambridge, USA). O conjugado utilizado para a dosagem do IgG total foi uma anti-imunoglobulina de cão do isotipo IgG obtida de soro imune de cabra e marcada com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). Já para as subclasses do IgG, foram utilizados anticorpos anti-IgG canino das subclasses IgG1 e IgG2 conjugadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA).

As placas foram separadas de poliestireno contendo 96 poços, foram sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi* e *L. chagasi* com 12 horas de antecedência, adicionando-se em cada poço 100 microlitros (μL) do antígeno solúvel diluído em uma solução tampão carbonato/bicarbonato pH (potencial hidrogeniônico) 9.6, seguida de incubação a 4°C por 12 horas. Após a incubação, o excesso da solução antigênica foi removido por uma série de quatro lavagens com uma solução salina contendo tensoativo hidrofílico polisorbato 20 (Tween-20) a 0,05% (Phosphate Buffered Saline with Tween 20 - PBS-T), chamada de solução de lavagem. Posteriormente foi realizado o bloqueio, adicionando 100 μL /poço da solução contendo 5% do soro fetal bovino (SFB) e PBS-1X (Phosphate Buffered Saline), e incubado por 45 minutos à 37°C . A seguir, as placas foram lavadas com solução de lavagem, e adicionados 10 μL de cada soro teste em duplicata, diluído em PBS-Tween 20 na concentração de 1:80, e incubadas novamente a 37°C por 45 minutos. Seguiu-se, com quatro lavagens e adição de 100 μL /poço do conjugado anti-IgG total de cão, conjugada à peroxidase e diluído em PBS-T (1:4000), sendo novamente incubadas a 37°C por 45 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com as subclasses IgG1 e IgG2, porém na titulação do conjugado (1:500 e 1: 1000 respectivamente). Por fim, foram novamente lavadas, e adicionados 100 μL da solução de substrato de revelação, contendo 15mL de ácido cítrico, 0,01g de ortofenilenodiamino (OPD) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) e 9 μL de peróxido de hidrogênio. As placas foram então, incubadas por 20 minutos a 37°C , e a reação foi interrompida com 32 μL de uma solução de ácido sulfúrico 2,5M.

A leitura das reações foi efetivada em espectrofotômetro, com filtro de 490 (ηm) e os resultados expressos em absorbância. Utilizou-se para realizar a diferenciação sorológica entre os dois parasitos, soros de cães positivos para *Leishmania* spp. diagnosticados com a presença do parasito pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em paralelo a soros de cães infectados experimentalmente com o *T. cruzi*, mantidos em cativeiros experimental de Ouro Preto. O ponto de corte (*cut off*), foi determinado com soros controles de três cães comprovadamente negativos e 3 cães comprovadamente positivos. Para o cálculo, utilizou-se a média da absorbância dos soros controles, acrescidos de dois desvios-padrões como realizado

por Caldas *et al.*²¹ e Tannus *et al.*²². Os soros dos animais com absorvância acima do cut-off calculado indicaram positividade para a infecção.

2.4 Análise estatística

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para avaliação entre resultados com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Quando comparados o somatório de resultados positivos (Tabela 1) das colunas do teste de ELISA indireto para IgG totais, verifica-se positivos 11 soros (30,55%) para *T. cruzi* e 11 soros para *Leishmania*, indicando um coeficiente de correlação de Spearman igual a 1 de completa correlação e p menor 0,05. Mesmo, quando realizada a paridade entre esses resultados frente aos diferentes antígenos, se obtêm nove resultados com concordância e quatro soros divergentes, confirmando o $p < 0,05$.

Entretanto, quando considerada a paridade de resultados entre as duas colunas (=), é constatada a concordância dos resultados quando feito a associação do IgG total, IgG1, IgG2, sendo dos 36 soros, quatro casos positivos (2, 9, 11, 31) entre os dois antígenos e três casos de resultados negativos (16,18, 23), e 29 resultados que discordam entre os antígenos, quando associados os resultados de IgG total, IgG1, IgG2. Isso resulta em um coeficiente de correlação de Spearman 0.120 (muito baixo) e p maior que 0,05 (0,485), ou seja, que não há correlação entre a coluna IgG total, IgG1, IgG2/antígeno *T. cruzi* e IgG total, IgG1, IgG2/antígeno *Leishmania*.

Observa-se também que houve elevado índice de resultados positivos para os 36 soros para a sub-classe de IgG2 frente aos antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp., 34 (94,44%) e 14 (38,88%) respectivamente, sem correlação direta com os resultados de IgG totais de soros positivos e negativos. Para a sub-classe IgG 1, foi verificada positividade de 31 soros (86,11%) para antígeno de *T. cruzi* e somente sete soros positivos (19,44%) para antígeno de *Leishmania*, também sem correlação direta com os resultados de IgG totais de soros positivos e negativos. Entretanto a subclasse IgG 1 se mostrou mais promissora quando comparado ao IgG 2, avaliando estatisticamente quando associada ao IgG Total.

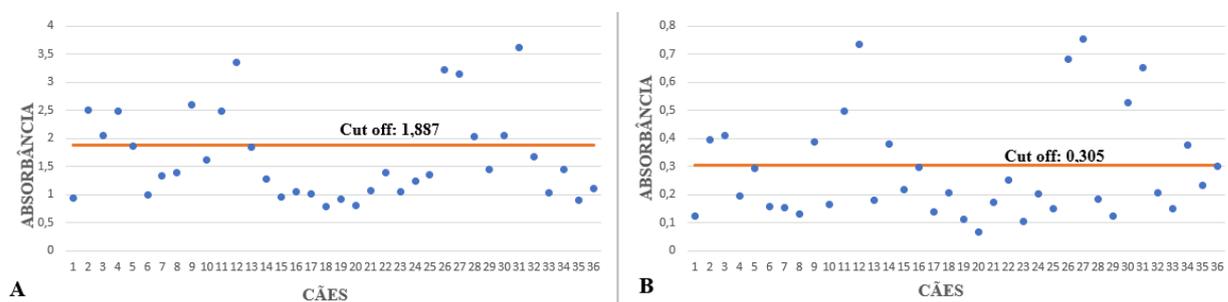
Tabela 01. Comparação de resultado do teste de ELISA indireto frente a antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. para soros de cães de região endêmica para triatomíneos.

soro canino e paridade de resultados	IgG total antígeno <i>T.cruzi</i>	IgG total Antígeno <i>Leishmania</i>	IgG total, IgG1, IgG2 antígeno <i>T.cruzi</i>	IgG total, IgG1, IgG2 antígeno <i>Leishmania</i>
1 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
2 =	1	1	1 1 1	1 1 1
3 ≠	1	1	1 1 1	1 0 1
4 ≠	1	0	1 1 1	0 0 1
5 ≠	0	0	0 1 1	0 0 1
6 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
7 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
8 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
9 =	1	1	1 1 1	1 1 1
10 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
11 =	1	1	1 1 1	1 1 1
12 ≠	1	1	1 1 1	1 0 1
13 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
14 ≠	0	1	0 1 1	1 1 1
15 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
16 =	0	0	0 1 1	0 1 1
17 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
18 =	0	0	0 0 0	0 0 0
19 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
20 ≠	0	0	0 0 1	0 0 0
21 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
22 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
23 =	0	0	0 0 0	0 0 0
24 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
25 ≠	0	0	0 0 0	0 1 0
26 ≠	1	1	1 1 1	1 0 1
27 ≠	1	1	1 1 1	1 0 1
28 ≠	1	0	1 1 1	0 0 0
29 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0
30 ≠	1	1	1 1 1	1 0 1
31 =	1	1	1 1 1	1 1 1
32 ≠	0	0	0 1 1	0 1 0
33 ≠	0	0	0 0 1	0 0 0
34 ≠	0	1	0 1 1	1 0 0
35 ≠	0	0	0 1 1	0 0 1
36 ≠	0	0	0 1 1	0 0 0

Comparação de resultado do teste de ELISA indireto entre soros de cães de região endêmica para triatomíneos, 0 e 1, negativo ou positivo, ≠ e = igualdade e desigualdade de resultados nas colunas IgG total, IgG1, IgG2/antígeno *T. cruzi* e IgG total, IgG1, IgG2/antígeno *Leishmania*.

Contudo avaliando os resultados obtidos pelo IgG total, teve 11 soros positivos para *T. cruzi* (2, 3, 4, 9, 11, 12, 26, 27, 28, 30, 31) e onze soros positivos para *Leishmania* (2, 3, 9, 11, 12, 14, 26, 27, 30, 31, 34) (Figura 01), sendo dos soros positivos para ambos os antígenos, nove estão em paridade entre eles (2, 3, 9, 11, 12, 26, 27, 30, 31), de acordo com Pontes¹⁸ desses onze soros positivos para DC, dez eram positivos e um limítrofe, em concordância com o resultado obtido. Já analisando as associações das subclasses, se obteve onze soros positivos para *T. cruzi* (2, 3, 4, 9, 11, 12, 26, 27, 28, 30, 31) e cinco para *Leishmania* (2, 9, 11, 14, 31), porém somente quatro estão em concordância entre os antígenos (2, 9, 11, 31). Para DC os onze soros positivos para o IgG total, também se apresentaram positivo para as associações das subclasses, já para leishmaniose dos onze soros positivos para o IgG total, cinco foram positivos para as associações das subclasses, mostrando uma maior especificidade quando analisamos as subclasses associadas, quando comparado ao IgG total isoladamente, apresentando-se uma maior sensibilidade.

Figura 01: Nível sérico de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania* em 36 cães de áreas domiciliares e peridomiciliares, pertencente aos municípios de Alegre e Iconha – ES.



a) resultados em absorbância anti-*Trypanosoma cruzi* b) resultados em absorbância anti-*Leishmania*

Fonte: Autor

4 DISCUSSÃO

Deve se destacar que, os municípios (Iconha e Alegre) do presente estudo são considerados de baixo risco para casos de DC e leishmaniose pelo Ministério da Saúde (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2019), apesar de haverem notificações da presença de triatomíneos transmissores da DC em ambos os municípios, sendo a espécie *Triatoma vitticeps* a mais encontrada. A secretaria de Saúde do estado do Espírito Santo²³, registrou desde 2007 três casos clínicos de DC no estado, inclusive com o óbito de uma criança com fase aguda da DC no ano de 2012²⁴. Em estudo de infecção de triatomíneos por *T. cruzi*, Dario *et*

al.²⁵ no município de Guarapari – ES, distante 40 km do município de estudo, Iconha, identificou elevada diversidade genética de *Trypanosoma* spp. em triatomíneos da região. Quanto a leishmaniose, flebotomíneos infectados de diversas espécies, principalmente transmissores da LT, estão presentes em toda região sul do estado do Espírito Santo, tornando o estado endêmico para leishmaniose²⁶. Esses achados epidemiológicos, corroboram com a amostragem de animais soropositivos identificados neste estudo.

Os resultados encontrados, coeficiente de correlação de Spearman 0.120 e $p > 0.05$, ou seja, que não há correlação entre a coluna IgG total + IgG1 + IgG2/antígeno *T. cruzi* e IgG total + IgG1 + IgG2/antígeno *Leishmania*, expressam que há diferença entre as duas colunas de associações de subclasses somadas ao resultado de IgG total, com somente 4 soros positivos para ambas as enfermidades, entretanto quando analisamos os resultados positivos do IgG total, ou seja, a junção de todas as subclasses para ambos os antígenos, o número de soros positivos que diferem em resultados positivos frente aos dois antígenos é somente quatro (4, 14, 28, 34) e nove resultados com concordância, resultando em $p < 0.05$, o que indica que está junção de imunoglobulinas, no IgG total não permite discriminar soropositivos entre as duas parasitoses, além de ser uma amostragem pouco expressiva. Indicando uma elevada sensibilidade quando utilizado o IgG total, porém baixa especificidade, ao contrário das associações do IgG total e as subclasses indicando uma maior especificidade. Ao contrário de Santos *et al.*¹⁰, que utilizando o IgG total pela técnica de ELISA com soros diluído 1:40 de seis pacientes comprovadamente chagásicos demonstraram 100% de sensibilidade e especificidade e ausência de reação cruzada com HIV, hepatite C, sífilis, LV e LT.

Deve-se considerar que, diversos estudos sorológicos com diferentes protocolos, ao longo do tempo têm confirmado que patógenos da família Trypanosomatidae (*Leishmania* spp. e *T. cruzi*) compartilham repertório antigênico imunodominante semelhante, possuindo epítomos comuns e podendo em maior ou menor grau, dependendo da técnica utilizada, induzir a produção de anticorpos de reação cruzada. Os métodos sorológicos convencionais geralmente não diferenciam totalmente as infecções por esses patógenos, especialmente em áreas onde a leishmaniose e a DC são co-endêmicas^{27, 28}. Contudo, a Pan American Health Organization (PAHO)²⁹ continua recomendando como forma de diagnóstico a utilização de dois testes sorológicos distintos e sucessivos para indicar a infecção por *T. cruzi*, pois o método parasitológico direto, padrão ouro, apresenta baixa sensibilidade principalmente para a fase crônica da doença, devido ao número reduzido de parasitas na corrente sanguínea periférica, dificultando o isolamento e a detecção do mesmo^{5, 29}. Também para as leishmanioses, nas apresentações crônicas, verificam-se uma sensível diminuição dos parasitos na circulação (LV)

e mesmo em lesões por LT³⁰, o que torna as técnicas sorológicas um recurso para indicar a infecção acompanhado do quadro clínico³¹. Estudos mais recentes, com propostas de novos protocolos sorológicos, têm indicado alguma reação cruzada, pois até mesmo com o uso de proteínas quiméricas de *T. cruzi*³² para teste imunocromatográfico, foi verificada reatividade cruzada com *Anaplasma platys*, *Crithidia mellificae*, *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria immitis*. Mesmo a utilização de tecnologias mais sofisticadas e onerosas, como a citometria de fluxo não tem resultado em 100% de especificidade e sensibilidade, pois Teixeira-Carvalho¹² na análise de 80 amostras de soros de DC, LV e LT verificou quatro reações cruzadas.

Esta diversidade de antígenos comuns encontrados entre os parasitos pode justificar a falta de concordância de resultados principalmente para o elevado número de resultados positivos encontrados para subclasses de imunoglobulinas quando avaliadas isoladamente, pois os resultados positivos encontrados principalmente para *T. cruzi* (IgG1=31 e IgG2=34) superaram em muito os soros positivos para IgG total (11 soros). Outro estudo¹⁰, em análise das subclasses de IgG em soros diluídos 1:10 de pacientes comprovados para DC também mostrou reação cruzada principalmente com LV e LT com sensibilidade 100% e especificidade 90,7% para 5/54 soros, com quatro soros falso-positivos, e especificidade de 89,8% para IgG2. Contudo, quando analisamos de forma estatística o IgG total + IgG 1, a IgG 1 se mostra mais promissora. Em concordância com CALDAS *et al*³³. que apresentou níveis mais elevados dos anticorpos IgG e IgG1 em cães e camundongos infectados com o *T. cruzi*.

Por outro lado, cães soropositivos somente para IgG total, IgG1, ou IgG2 ou mesmo IgG total+IgG2 mesmo que positivo para ambos os parasitos, indicam negatividade para *T. cruzi* e reatividade cruzada com *Leishmania* spp, sugerindo esta metodologia como indicativo do diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades.

5 CONCLUSÃO

Por fim, apesar dos vieses apontados para a técnica de ELISA, entende-se que sendo recomendada pela PAHO associada aos dados clínicos, e por ser uma metodologia já dominada nos centros de diagnósticos institucionais, esta técnica pode ser apresentada como método de diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades, apresentando uma maior especificidade.

6 REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, C. S. *et al.* Resposta Imune humoral aos antígenos de *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* em cães de área endêmica para leishmaniose. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.2, p.470-478, 2009.
2. LUCIANO, R. M. *et al.* Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.
3. BARCELOS, L. S. Diagnóstico da doença de Chagas: Avaliação da reação cruzada em pacientes com leishmaniose visceral. **Research, Society and Development**, vol. 10, n. 4, p. 1-6, 2021.
4. BLASI, T. D. **A complexidade da interação Leishmania-flebotomíneo**: do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao tubo digestivo à análise do papel de citocinas - like na modulação da resposta imune do vetor. 2016. 87f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.
5. COELHO, A. R. B. **Tripanossomíase Americana**: uma revisão com ênfase na medicina veterinária. 2013. 27f. Monografia (Graduação em Ciências Veterinárias) – Curso de Graduação em Agronomia e Ciências Veterinárias, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013.
6. GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. 1. Ed., Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 289 p.
7. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Controle da doença de Chagas**. Brasília: WHO, n. 902, p. 1-110, 2002.
8. GONTIJO, B. B.; CARVALHO, M. de. L. R. de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
9. VIOL, M. A. **Deteção de reações cruzadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em cães pelo ensaio imunoenzimático indireto, pela reação de imunofluorescência indireta e reação em cadeia de polimerase**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2011.
10. SANTOS, L. da. S. *et al.* In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 35-44, 2012.
11. GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

12. Teixeira-Carvalho, A. *et al.* FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0122938.
13. OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: OPAS, p. 92, 2009.
14. MATOS, H. J. de. *et al.* Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 1, p. 51-54, 2015.
15. GUEDES, P. M. da. M. **Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça Beagle infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi***. 2006. 105f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
16. VERÇOSA, A. F. A. **Caracterização do perfil isotípico das imunoglobulinas G de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.
17. CALDAS, I. S. **Avaliação da eficácia do tratamento específico com Benznidazol na progressão da doença de Chagas Experimental e a correlação entre a eficácia do tratamento nos modelos canino e murino**. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-graduação de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.
18. PONTES, B. G. **Avaliação da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* e estado nutricional de cães em área endêmica de triatomíneos monitorados pela vigilância epidemiológica no sul do Espírito Santo**. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santos, Alegre, 2020.
19. VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull World Health Organ**, v. 53, n. 1, p.55-65, 1976.
20. LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
21. CALDAS, I. S. *et al.* Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. **Acta Tropica**, v.189, s/n, p.30–38, 2019.
22. TANNUS, M. M. *et al.* Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de Leishmania. **Horizonte Científico**, p. 11-28, 2007.

23. SESA. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESPÍRITO SANTO. Secretaria de Estado da Saúde confirma óbito causado por doença de Chagas, 2015. Disponível em: <<http://saude.es.gov.br/secretaria-de-estado-da-saude-confirmaobito>>. Acesso em: 25 abril. 2022.
24. DARIO, M. A. *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, v.9, n.477, p. 1-14, 2016.
25. DARIO, M. A. *et al.* High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. **PLOS ONE**, v.12, n.11, p. 1-22, 2017.
26. ROCHA, L. S. *et al.* Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 7, p. 461- 466, 2010.
27. ARAUJO, F G. “Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids.” **Infection and immunity**, v. 53, n. 1, p. 179-185, 1986.
28. JAESCHKE, R.; GUYATT, G.; SACKETT, D. L. Users’ guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid. **Evidence-Based Medicine Working**, v. 271, n. 5, p. 389–39, 1994.
29. OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington: OPAS, p. 1-160, 2019.
30. AMORIM, I. F. G. de. **Avaliação do perfil humoral de cães vacinados com Leishmune® e de cães naturalmente infectados procedentes de área endêmica de Leishmaniose Visceral canina**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
31. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed, Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
32. Rodrigues, E. S. *et al.* Chagas Immunochromatographic Rapid Test in the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Wild and Domestic Canids. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.12, s/n, p. 835-383, 2022.
33. CALDAS, I. S. *et al.* Myocarditis in different experimental models infected by *Trypanosoma cruzi* is correlated with the production of IgG1 isotype. **Acta Tropica**, v. 167, s/n, p. 40-49, 2017.