

Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária
Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos

**APLICAÇÕES DOS SOROTESTES ELISA E WESTERN BLOTTING NA AVALIAÇÃO
DE REATIVIDADE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE INFECÇÕES
CAUSADAS POR *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* EM SOROS CANINOS DE
ÁREA ENDÊMICA NA BAHIA**

Salvador - Bahia
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CRISTIANE SILVA AGUIAR

**APLICAÇÕES DOS SOROTESTES ELISA E WESTERN BLOTTING NA
AVALIAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DE INFECCÕES CAUSADAS POR *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* EM
SOROS CANINOS DE ÁREA ENDÊMICA NA BAHIA.**

Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos, na área de Patologia e Clínicas e Doenças Parasitárias.

Orientador: Prof. Dra. Stella Maria Barrouin Melo

**Salvador - Bahia
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

AGUIAR, Cristiane Silva.

Aplicações dos sorotestes ELISA e Western Blotting na avaliação de reatividade cruzada no diagnóstico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* em soros caninos de área endêmica na Bahia/ Cristiane Silva Aguiar – Salvador, Bahia, 2008, 65 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2008.

Professor Orientador – Prof. Dra. Stella Maria Barrouin Melo

Palavras-chave: Doença de Chagas, leishmaniose, peso molecular, reação cruzada

**APLICAÇÕES DOS SOROTESTES ELISA E WESTERN BLOTTING NA
AVALIAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* EM
SOROS CANINOS DE ÁREA ENDÊMICA NA BAHIA.**

CRISTIANE SILVA AGUIAR

Dissertação de Mestrado apresentada e aprovada pela banca examinadora.

Salvador, 30 de Julho de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Stella Maria Barrouin Melo
Orientador

Prof. Dr. Carlos Roberto Franke– UFBA

Dra. Simone Garcia Macambira – FIOCRUZ/Bahia

Dedicatória:

*Aos meus pais Wilson Alberto Aguiar e Maristela Silva
Aguiar;*

*Às minhas irmãs e sobrinhos Tatiane, Viviane, Ícaro Luiz,
Kael e Kauan;*

À Benito, meu cunhado e irmão de longas datas.

À Benivan, meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À todos os meus Deuses, por estarem sempre ao meu lado me orientando;

À minha família, por sempre me apoiarem e ajudarem, cada um a sua maneira, mas nenhuma menos importante para a minha caminhada;

Ao Prof Paulo Henrique Palis Aguiar pela confiança no meu potencial, pelas oportunidades de crescimento profissional e por acreditar que eu fosse capaz, pela dedicação, paciência e incentivo enquanto estive como meu orientador, responsável pelo primeiro passo nessa etapa de minha vida profissional;

Aos amigos do Laboratório de Infectologia Veterinária da UFBA – LIVE pela paciência e auxílio em toda a minha passagem por lá, especialmente a minha amiga Bárbara Paraná, que sempre foi capaz de me dizer uma palavra de incentivo e ânimo quando me encontrava desanimada com tudo e todos; Aninha Silveira por dividir agruras e ter me ajudado nas tarefas desenvolvidas á campo, bem como o amigo Rafael Odilon. A Diana Veloso por ter me ajudado nos exames laboratoriais;

Ao amigo Adriano Alcântara por estar sempre ao meu lado nessa luta, nunca me deixando desanimar, sempre me dando palavras de incentivo, ouvindo minhas lamentações, além de ter me passado grandes ensinamentos, ter tido eterna paciência e me dedicado orientação e colaboração na realização dos exames laboratoriais, sem seu auxílio esse sonho não seria possível;

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia – LETI da Fiocruz/Bahia por terem cedido o local de trabalho, equipamentos e reagentes para a realização de parte desse estudo, em especial a pessoa de Ricardinho que sempre foi muito amável e disposto a ajudar, sem ele parte desse trabalho não teria acontecido, Cris por seu bom humor e alto astral e Simone pela sua agradável companhia. Além de Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos e Dra. Milena Botelho por permitirem que parte desse trabalho fosse realizado neste laboratório;

Aos meus amigos que passaram por mim em algum momento dessa caminhada e me deram palavras de incentivo como: Daniela Freitas, Ana Karine, Lídia, Débora, Vanessa Guedes, Belmiro, Mauricéia, Gustavo, Prof. Maurício, Profa. Eugênia (*in memoriam*), Tia Lu, Leo banana, Lívia, Danilo, Marcinha, Val e outros que não estão aqui mas não menos importantes;

Ao Dr. Heitor Miraglia Herrera (IOC) pelos soros caninos controle positivo e negativo de *Trypanosoma cruzi*;

Ao curso de Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos e todos os seus professores, funcionários e colegas que me proporcionaram inesquecíveis momentos de prazer em busca do conhecimento;

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa de estudos e auxílio dissertação concedida durante o curso;

Ao Professor Adelmo Ferreira de Santana por sempre me incentivar na vida acadêmica, sempre me apoiar em meus projetos, pela confiança e carinho e por acreditar sempre no meu potencial;

À minha grande amiga, hoje mestranda, mas futuramente Mestre, Catarina Nunes Bittencourt pelos momentos de partilha das dificuldades, pelo apoio, pelos conselhos, por estar presente nos momentos mais importantes de minha vida profissional, por torcer sempre pelo meu sucesso e pela grande amizade e confiança;

Ao meu eterno companheiro e amigo Benivan Novais Brazil (Beni) por toda a paciência nesse período, por entender minha ausência em alguns momentos, pelos momentos de amor e carinho, pelo bom humor e alto astral sempre presente, pela dedicação e confiança, pelas palavras de incentivo e pela compreensão;

A todos aqueles que participaram de alguma forma na construção deste caminho, deste sonho que hoje se torna uma realidade, meus sinceros agradecimentos!

"Não peço riquezas nem esperanças, nem amor, nem um amigo que me compreenda. Tudo o que eu peço é um céu sobre mim e um caminho aos meus pés."

Stevenson

ÍNDICE	Páginas
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. História da Doença de Chagas	6
2.2. Epidemiologia da infecção em humanos e no cão	7
2.3. O parasito	8
2.3.1. <i>Caracterização e ciclo evolutivo do Trypanosoma cruzi</i>	8
2.3.2. <i>Formas evolutivas</i>	11
2.3.3. <i>Interação do parasito com o sistema imune do hospedeiro</i>	14
2.3.4. <i>Fisiopatologia da infecção por T. cruzi nos hospedeiros mamíferos</i>	17
2.4. A tripanossomíase humana e canina: o quadro clínico	18
2.5. Diagnóstico laboratorial da infecção	21
2.5.1. <i>ELISA para sorodiagnóstico de Tripanossomíase: sensibilidade e especificidade dependentes da qualidade do antígeno</i>	23
2.5.2. <i>Reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de DNA do parasito em amostras biológicas de cão: realidade da rotina em Medicina Veterinária e saúde pública</i>	26
2.5.3. <i>Eletroforese em gel e reação de Western Blotting como alternativa mais eficaz para a detecção de anticorpos anti-T. cruzi no soro</i>	27
2.6. Hipótese do trabalho	28
3. ARTIGO CIENTÍFICO	29
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados	38
Discussão	42
Agradecimentos	47
Referências Bibliográficas	47
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
6. ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
FIGURA 2 Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
FIGURA 3 Formas amastigotas intracelulares do <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
FIGURA 4 Formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	13
FIGURA 1. ARTIGO Análise de soros de cão por WB em papel de nitrocelulose com antígenos de <i>T. cruzi</i> (cepa Y). Soros segundo os resultados em ELISA indireto: (1) controle positivo; (2) controle negativo; (3), (4), (5), (9) e (10) duplamente positivos; (6) positivo somente com antígeno de <i>L. chagasi</i> ; (7) e (8) duplamente negativo.	40
FIGURA 2. ARTIGO Análise de soros de cão por WB em papel de nitrocelulose com antígenos de <i>L. chagasi</i> . Soros segundo os resultados em ELISA indireto: (1) controle positivo; (2) controle negativo; (3), (4), (5), (9) e (10) duplamente positivos; (6) positivo somente com antígeno de <i>L. chagasi</i> ; (7) e (8) duplamente negativo..	41

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Amostras de soro canino com reação positiva nos ELISAs para <i>T. cruzi</i> e <i>L. chagasi</i> e seus respectivos resultados no Western Blotting (WB) em kDa.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Doença de Chagas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GPI – glicosil-fosfatidil-inositol

HAI – Hemoaglutinação indireta

IFI - Imunofluorescência indireta

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

kDa – kilodaltons

LIT - meio de infusão com triptose

M - molar

mA – miliamper

mg – miligrama

mL – mililitro

NK – Natural Killer

NPGB - 4-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate

OPD – o-phenylenediamin

PBS- Phosphate Buffered Saline

PBS-T - Phosphate Buffered Saline Tween 20

PBS-T-M - Phosphate Buffered Saline Tween 20 com leite molico desnatado

PCR – Polymerase Chain Reaction

PMSF - phenylmethanesulfonyl fluoride

RAPD – Amplificação aleatória do DNA polimórfico

RFLP – Polimorfismo de produto de ingestão de DNA

ROC - Receiver Operating Characteristics

SAPA - Shed Acute Phase Antigen

SFB - soro fetal bovino

TEMED – Tetramethylethylenediamine

TESA - Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen

TLCK - N alfa-p-tosyl-l-lisyne chloromethyl ketone

TPCK - N-p-tosyl-l-phenylalanine chloromethyl ketone

Tris-HCl- Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride

TTBS – Tris Tween Buffered Saline

VPN – valor preditivo negativo

VPP – valor preditivo positivo

WB – Western Blotting

Z1, Z2, Z3, ZA, ZB, ZC, ZD – Zimodemas

μL – microlitro

RESUMO

Leishmania e *Trypanosoma* são gêneros de hemoflagelados que ocorrem de forma endêmica em regiões da América Central e do Sul. O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas (DC) podendo ser transmitido ao homem e aos animais através da picada de insetos hematófagos triatomíneos, transfusão sanguínea, transplacentária, transplante de órgãos, aleitamento, ingestão de alimentos contaminados e formas acidentais. A DC é considerada a quarta principal endemia no Continente Americano onde se estima que o *T. cruzi* infecte de 16 a 20 milhões de pessoas. A *Leishmania chagasi* é o agente causador da leishmaniose visceral americana, transmitido os mamíferos através da picada flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Tanto *T. cruzi* quanto *L. chagasi* têm sido detectados em ampla variedade de espécies de animais domésticos e selvagens incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais, sendo que o cão é considerado o principal reservatório doméstico da infecção humana por esses dois parasitos. Com o objetivo de verificar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em cães de Barra do Pojuca, Bahia e avaliar a possível ocorrência de reação cruzada ou infecção mista com *Leishmania sp.*, foram testados 265 soros utilizando ELISA indireto com antígenos brutos de ambos os parasitos. Dentre os 265 soros, 26 (9,8%) apresentaram reação positiva no ELISA para anticorpos anti-*T. cruzi*, sendo destes, 12 (46,1%) também positivos no teste utilizando o antígeno de *L. chagasi*, resultando em dupla positividade sorológica por essa técnica. Trinta e quatro amostras de soro, selecionadas pelos resultados no ELISA, sendo 11 positivos apenas para anticorpos anti-*T. cruzi*, 6 apenas para anticorpos anti- *L. chagasi*, 9 duplos positivos e 8 duplos negativos foram também testados por Western Blotting (WB). No teste WB utilizando membrana de nitrocelulose com antígeno de *T. cruzi* 6 (17,6%) soros apresentaram reação positiva, identificando 12 bandas visíveis com peso molecular (PM) variando de 49 a 104 kDa, sendo as bandas de 87 e 104 kDa identificadas com maior frequência observadas em 33,3% dos soros positivos. Em membranas de nitrocelulose contendo antígenos de *L. chagasi*, 9 (26,4%) soros identificaram 48 bandas visíveis, com PM variando de 7 a 181 kDa, sendo que a de 83 kDa foi identificada com maior frequência (55,5 % das amostras). De um total de 60 bandas visíveis, 7 (11,3%) foram comuns aos dois antígenos (com PM entre 53 e 100 kDa), 6 (10 %) foram visualizadas somente no antígeno de *T. cruzi* (entre 49 e 104 kDa) e as outras 47 (78,3 %) foram visualizadas somente no antígeno de *L. chagasi* (entre 7 e 181 kDa). Vinte dos 34 (58,8 %) soros apresentaram divergência entre os resultados do ELISA e WB. Utilizando o teste WB como referência, o índice Kappa encontrado foi de 0,155 com o antígeno de *T. cruzi* e de 0,57 para o antígeno de *L. chagasi*., a sensibilidade e especificidade do ELISA com antígeno de *T. cruzi* foi de 83,3 e 46,4 % e com o antígeno de *L. chagasi* foi de 90 e 75 %, respectivamente. Nossos estudos mostram que houve detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-*L. chagasi* nas amostras de soro canino da área estudada, porém as técnicas de ELISA e WB utilizando antígeno bruto não foram concludentes para identificar com segurança infecções mistas e reações cruzadas entre ambas às enfermidades.

ABSTRACT

Leishmania and *Trypanosoma* are genres of hemoparasites occurring as endemic infections in parts of Central and South America. The *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas Disease (CD) and can be transmitted to humans and animals through the bite of insects hematophagous triatomines, blood transfusion, transplantation of organs, breastfeeding, intake of contaminated food and incidental ways. The CD is considered the fourth major endemic in the American Continent where it is estimated that the *T. cruzi* infect 16 to 20 million people. The *Leishmania chagasi* is the causative agent of American visceral leishmaniasis, transmitted to mammals by the bite of phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Both *T. cruzi* and *L. chagasi* have been detected in a wide variety of species of wild and domestic animals including dogs, cats, rodents and marsupials, while the dog is considered the main reservoir of domestic human infection by these two parasites.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)