

Aula Prática

Diagnóstico laboratorial da leishmaniose

MSc. Edite Hanashiro Kanashiro

Farmacêutica Mussya Cisotto Rocha

Dra. Kelly Aparecida Kanunfre

Profa. Thelma Suely Okay

Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT

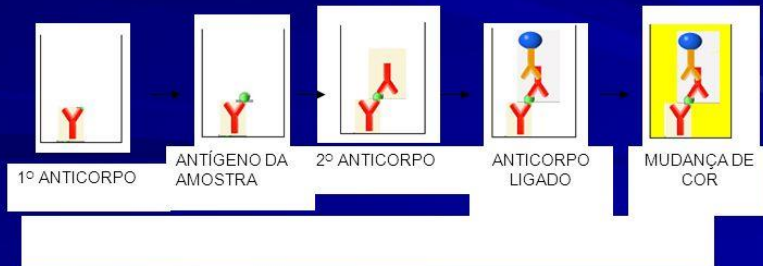
Prédio II – quarto andar

Diagnóstico da leishmaniose por sorologia (ELISA)

ELISA

Adição de substrato para revelação. É um substrato incolor que, quando ativado pela enzima ligada ao sistema Ac-Ag, produz um produto final corado. A mudança de cor pode ser lida diretamente em aparelho apropriado.

Em geral, bloqueia-se a reação para evitar que o produto final fique muito escuro e atrapalhe a leitura do teste. Além de bloquear a reação, é possível adicionar um ácido que provoque mudança para uma cor cuja absorbância é melhor detectada pelo leitor de ELISA.



ELISA INDIRETO

1 Interpretação dos resultados:

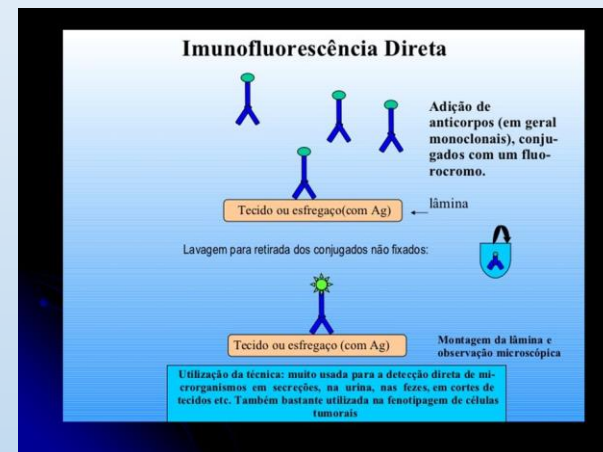
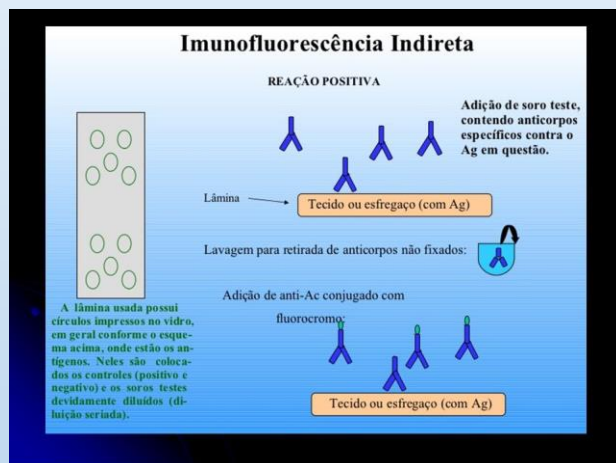
2 A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de Ac da amostra pesquisada.

3 Para determinar quais indivíduos são positivos ou negativos para a doença pesquisada, deve-se calcular um ponto de corte ("cut-off") para aquele ensaio. Acima dos limites do cut-off, encontram-se os indivíduos positivos e abaixo os negativos.

O ELISA Indireto não determina se o indivíduo ESTÁ ou não doente naquele momento. Ele apenas afirma se aquele animal/paciente já teve ou não contato com o agente causador da enfermidade em algum momento de sua vida.



Diagnóstico da leishmaniose por Imunofluorescência



Negativo

Positivo

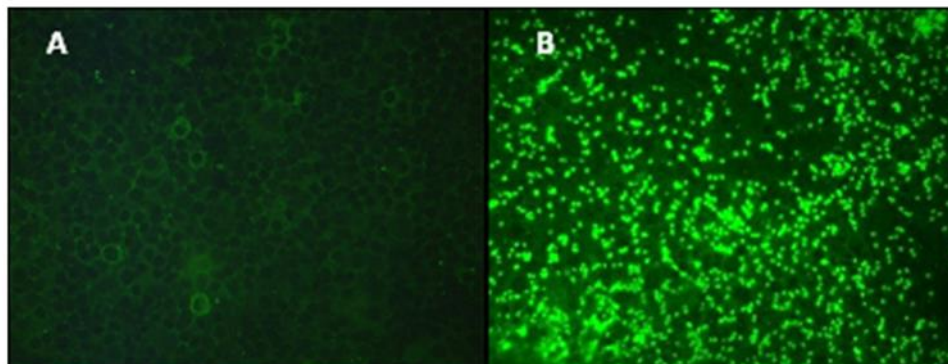
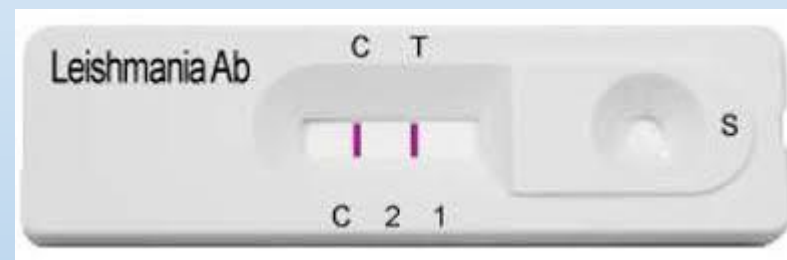


Fig.2. Reação de Imunofluorescência Indireta utilizando-se antígeno de formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi*. (A) Amostra não reagente; (B) Amostra reagente.

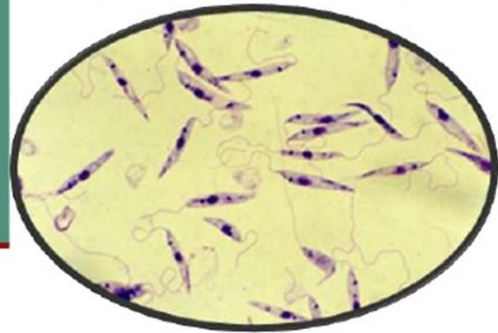
Imunocromatografia



Microscopia ótica

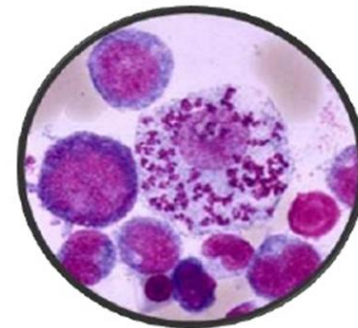
FORMAS PARASITARIAS

PROMASTIGOTES
(Extracelular – Insecto)



http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_2/Car_dona_Pascual_2/leishmania.jpg

AMASTIGOTES
(Intracelular - Vertebrado)



<http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/joiner/fig4.jpg>

PCR convencional

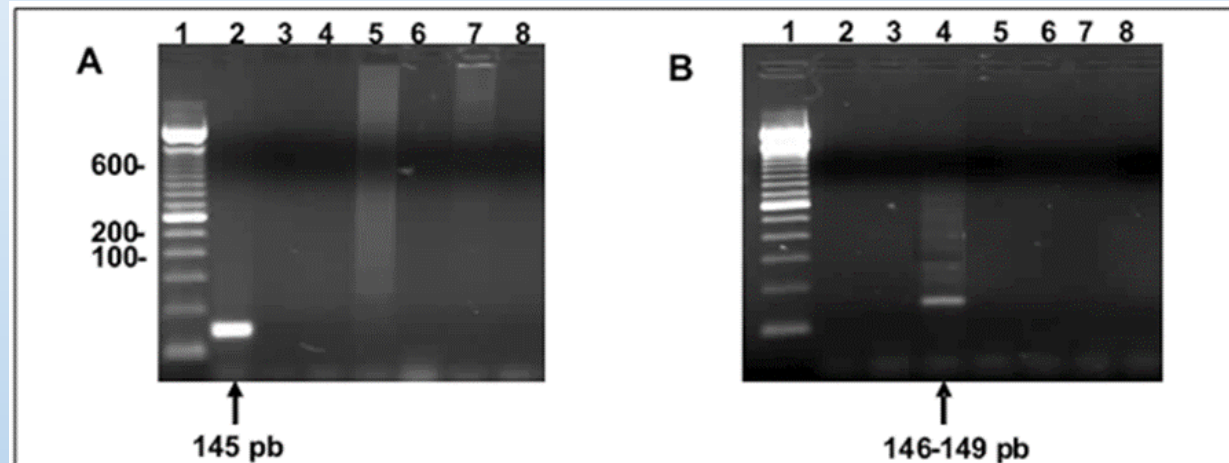


Figura 3. Espécie-especificidade das PCR para *L. (L.) chagasi* (A) e *L. (V.) braziliensis* (B). *L. (L.) chagasi* foi identificada com dois iniciadores (sense e anti sense) que amplificam um produto de 145pb de uma região específica (fragmento LT1) dos minicírculos de kDNA de *L. donovani*. *L. (V.) braziliensis* foi identificada com dois iniciadores que amplificam um produto de 145-149 bp do gene SL-RNA. Um iniciador provém da região conservada e o outro, da região variável do gene e específica para o grupo *Viannia*. As amostras de DNA indicadas na figura foram utilizadas na PCR na concentração de 85-90 ng. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em géis de 2% agarose. Linha 1, marcador de massa molecular (100pb); linha 2, *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD); linha 3, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8); linha 4, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); linha 5, *Trypanosoma cruzi* (cepaY); linha 6, *Rickettsia rickettsia* (FMVUSP); linha 7, *Rickettsia canis* (FMVUSP); linha 8, *Ehrlichia canis* (FMVUSP).

PCR em Tempo Real (quantitativo)

