MARCOS VINÍCIUS DE SANTANA LEANDRO JÚNIOR

**Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-
Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra
Laurenti

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Leandro Júnior, Marcos Vinícius de Santana

Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com
ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina / Marcos Vinícius de
Santana Leandro Júnior. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral/diagnóstico 2.Leishmaniose
visceral/transmissão 3.Leishmaniose visceral/veterinária 4.Leishmaniose
visceral/imunologia 5.Ensaio de imunoadsorção enzimática 6.Cães 7.Animais
8.Doenças do cão/prevenção & controle 9.Vacinas contra leishmanioses/administração
& dosage 10.Vacinas contra leishmanioses/parasitologia 11.Vacinas contra
leishmanioses/prevenção & controle 12.Saúde pública 13.Zoonoses/parasitologia
14.Zoonoses/prevenção & controle

USP/FM/DBD- 092/14

Dedico esta dissertação às pessoas mais presentes em minha vida: minha esposa Karina, sempre ao meu lado em todos os momentos, compreendendo minhas ausências e me apoiando. Minhas pequenas Larissa e Amanda, o maior presente que um pai poderia receber, sempre me alegrando. Minha querida mãe, Lúcia, pela dedicação à família e generosidade. Meu querido pai, Vinícius, pelo exemplo de pai, sempre ao meu lado. Minhas queridas irmãs, Wanisse e Wanessa, sempre presentes e incentivadoras.

Meus queridos avôs Wilson e Teresinha, que sempre acreditaram em mim, e me apoiaram, mesmo quando eu mesmo já não acreditava. Meus queridos sogros, Lilí e Hélio, pelo constante apoio e carinho.

A Deus, Eterno, Criador, Grande Arquiteto do Universo, Mantenedor e Salvador, cuja essência é a misericórdia e o amor. Fonte das minhas realizações, dos meus estímulos e da minha coragem.

AGRADECIMENTOS

À amiga e orientadora Dra. Márcia Dalastra Laurenti, pela competência apresentada, por seu apoio, pela compreensão e pela dedicação a este trabalho. Meus sinceros agradecimentos por me ajudar na realização deste sonho. Tenha certeza de minha admiração e meu respeito por tudo que fez.

Às Dra. Rita Silva e Héliid De Lucca do Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro, que auxiliaram nas reações de imunofluorescência indireta, meus agradecimentos pela dedicação e pelo incentivo.

Às Dra. Vânia da Matta e Mariana Aschar, que auxiliaram no diagnóstico parasitológico e cederam parte dos soros de cães com leishmaniose visceral, meus agradecimentos pelo auxílio e pela dedicação.

À Dra. Mary Marcondes, que auxiliou na classificação clínica dos animais e nas coletas de soros junto ao CCZ de Araçatuba, meus agradecimentos pelo empenho e pela dedicação.

À Dra. Solange Genari, que, gentilmente, disponibilizou os soros de cães positivos para neospora, toxoplasma, e coinfecção neospora e toxoplasma.

À Dra. Mitika Hagiwara, que, gentilmente, disponibilizou os soros de cães positivos para erliquiose.

À Profa. Dra. Eufrosina Umezawa, que, amavelmente, disponibilizou os soros de cães positivos para doença de Chagas.

Ào Prof. Dr. Fabio Scott, que, gentilmente, disponibilizou os soros de cães positivos para dirofilariose e babesiose.

À Profa. Dra. Edite Yamashiro, que, atenciosamente, disponibilizou os soros de cães positivos para toxocariase.

À Thaise Tomokane, que auxiliou na execução dos testes de ELISA(s) e DPP, e na análise estatística dos dados, agradeço pelo empenho e dedicação.

À BioManguinhos, em especial, à Dra. Celeste Souza, por, gentilmente, ter fornecido os kits de ELISA, RIFI e DPP® para utilização neste projeto.

Aos amigos, pelo companheirismo e apoio, um fraterno abraço.

À Valquíria Dias, pela excelente contribuição, prontidão, gentileza e competência. Muito obrigado por me atender sempre que precisei.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para elaboração desta Dissertação: sem vocês, o sonho não teria se realizado.

*“Nunca nada grandioso no mundo foi feito sem uma
grande dose de paixão”.*
(Georg Wilhelm Friedrich Hegel)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3 ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com “*List of Journals Indexed in Index Medicus*”.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Aspectos Gerais.....	2
1.2 Distribuição geográfica	4
1.3 Ciclo biológico.....	9
1.4 Patogênese da leishmaniose visceral canina	13
1.5 Aspectos clínicos e histopatológicos da leishmaniose visceral canina	14
1.6 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina	16
1.7 Utilização de antígenos recombinantes	21
1.8 Justificativa	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais	30
3.2 Diagnóstico parasitológico	31
3.3 Diagnóstico sorológico	31
3.3.1 ELISA - <i>L. chagasi</i>	32
3.3.2 RIFI - <i>L. chagasi</i>	33
3.3.3 ELISA - BioManguinhos.....	33
3.3.4 RIFI - BioManguinhos	33
3.3.5 TR-DPP Dual Path Platform.....	34
3.4 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	36
4.1 ELISA - <i>L.chagasi</i>	36

4.2 ELISA - BioManguinhos	37
4.3 RIFI - L.chagasi.....	38
4.4 RIFI-BioManguinhos	38
4.5 DPP - Dual Path Platform	39
4.6 Análise estatística	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	51
7 ANEXOS.....	53
8 REFERÊNCIAS	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DPP	<i>Dual Path Platform</i>
ELISA	Teste Imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCVL	Programa de Controle de Leishmaniose Visceral
PNCL	Programa Nacional de Controle da Leishmaniose
RIFI	Imunofluorescência Indireta
TR-DPP	Teste Rápido BioManguinhos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição mundial da leishmaniose visceral.....	6
Figura 2 -	Distribuição do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil pelas grandes regiões e unidades federadas (1990 a 2011).	8
Figura 3 -	Ciclo biológico das leishmanias.	10
Figura 4 -	Formas promastigotas (A) e amastigotas de <i>Leishmania</i> sp., coradas por Giemsa, aumento 400X.....	11
Figura 5 -	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12
Figura 6 -	Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral..	14

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Número absoluto e porcentagem de positividade dos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo e negativo para leishmaniose para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.....40
- Tabela 2** - Número absoluto e porcentagem de positividade dos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, (sintomático) e sem (assintomático) sinais clínicos da doença para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.....40
- Tabela 3** - Número absoluto e porcentagem de soros de cães portadores de outras enfermidades e reativos para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.....41
- Tabela 4** - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) frente à reatividade dos 168 soros utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP na população de estudo.....41
- Tabela 5** - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para o grupo de cães sintomáticos e controles, negativo e outras enfermidades, utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.....41
- Tabela 6** - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para o grupo de cães assintomáticos e controles, negativo e outras enfermidades, utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.....42

RESUMO

Leandro Jr MVF. *Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP – Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Com o objetivo de avaliar o desempenho do teste rápido DPP® LVC comparando com os testes de ELISA e RIFI (Bio-Manguinhos, Br), assim como ELISA e RIFI *in-house*, empregando como antígeno formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, com ênfase a reatividade cruzada com outros agentes infecciosos, soros de cães infectados por *L. (L.) infantum chagasi*, clinicamente sintomáticos (n=48) e assintomáticos (n=39), assim como soros de cães saudáveis e não infectados (n=18), e soros de cães infectados por *Babesia canis* (n=9), *Dirofilaria immitis* (n=4), *Trypanosoma cruzi* (n=6), *Ehrlichia canis* (n=17), *Neospora caninum* (n=6), *Toxoplasma gondii* (n=9), *Neospora/Toxoplasma* coinfeção (n=4) e *Toxocara canis* (n=9) foram avaliados pelas diferentes técnicas de diagnóstico. DPP e ELISA *in-house* mostraram alta sensibilidade (90.81% e 94.25%) e especificidade (95.06% e 97.53%), respectivamente para o diagnóstico de LVC sintomática e assintomática, mas apresentaram reação cruzada com *Babesia canis*, 44% para DPP e 22% para ELISA *in-house*. Os dois testes mostraram uma excelente concordância de resultados ($\kappa=0.9405$, $p<0.0001$). ELISA Bio-Manguinhos assim como o RIFI Bio-Manguinhos e RIFI *in-house* mostraram boa sensibilidade (90.81%, 96.47% e 89.41%), mas baixa especificidade (77.78%, 69.14% e 65.82%), respectivamente; e mostraram reação cruzada com soros de animais infectados com *Babesia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*. Os resultados mostraram que o DPP® CVL apresentou um bom desempenho para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina sintomática e assintomática.

Descritores: Leishmaniose visceral/diagnóstico; Leishmaniose visceral/transmissão; Leishmaniose visceral/veterinária; Leishmaniose visceral/imunologia; Ensaio de imunoabsorção enzimática; Cães; Animais; Doenças do cão/prevenção & controle; Vacinas contra leishmanioses/administração & dosage; Vacinas contra leishmanioses/parasitologia; Vacinas contra leishmanioses/prevenção & controle; Saúde pública; Zoonoses/parasitologia; Zoonoses/prevenção & controle.

SUMMARY

Leandro Jr MVF. *Comparative analysis of DPP-Biomanguinhos immunoassay with ELISA and IFAT for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis* [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, 2014.

In order to investigate the performance of the DPP® CVL rapid test comparing with ELISA and IFA (Bio-Manguinhos, Br), as well as ELISA and IFAT *in house* using *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes as antigen with emphasis in the cross-reactivity with others infectious agents, sera from clinically symptomatic (n=48) and asymptomatic (n=39) *L. (L.) infantum chagasi* infected dogs, as well as from healthy non-infected (n=18) dogs and from *Babesia canis* (n=9), *Dirofilaria immitis* (n=4), *Trypanosoma cruzi* (n=6), *Ehrlichia canis* (n=17), *Neospora caninum* (n=6), *Toxoplasma gondii* (n=9), *Neospora/Toxoplasma co-infection* (n=4) and *Toxocara canis* (n=9) infected dogs were tested for different diagnosis techniques. DPP and ELISA *in-house* showed high sensitivity (90.81% and 94.25%) and specificity (95.06% and 97.53%), respectively for symptomatic and asymptomatic CVL diagnosis, but presented cross-reactivity with *Babesia canis*, 44% for DPP and 22% for ELISA *in-house*. Both test showed an excellent agreement (kappa=0.9405, p<0.0001). ELISA Bio-Manguinhos as well as IFA Bio-Manguinhos and IFA *in-house* showed good sensitivity 90.81%, 96.47% and 89.41%) but low specificity (77.78%, 69.14% and 65.82%), respectively; and showed cross-reactivity with sera from animals infected with *Babesia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*. The results showed that DPP® CVL had a good performance for the diagnosis of both symptomatic and asymptomatic canine visceral leishmaniasis.

Descriptors: Leishmaniasis, visceral/diagnosis; Leishmaniasis, visceral/transmission; Leishmaniasis, visceral/veterinary; Leishmaniasis, visceral/immunology; Enzyme-linked immunosorbent assay; Dogs; Animals; Dog diseases/prevention & control; Leishmaniasis vaccines/administration & dosage; Leishmaniasis vaccines/parasitology; Leishmaniasis vaccines/prevention & control; Public health; Zoonoses/parasitology; Zoonoses/prevention & control.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A leishmaniose visceral (LV) é uma parasitose de caráter zoonótico, sendo apontada como uma das doenças mais importantes do ponto de vista da saúde pública em cerca de 80 países da Ásia, África e América Latina (Ashford *et al.*, 1992). Estima-se que, em todo mundo, existam, aproximadamente, 12 milhões de pessoas infectadas e outras 350 milhões vivendo em áreas de risco. Nas Américas Central e do Sul, a leishmaniose caracteriza-se por apresentar aspectos distintos das do Velho Mundo quanto a sua etiologia e epidemiologia (Grimaldi & Tesh, 1993).

A *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* é um protozoário pertencente ao chamado complexo *Leishmania donovani*, no qual estão incluídas as três principais espécies causadoras da leishmaniose visceral, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (Badaró, 1996; Sherlock, 1996).

De acordo com a taxonomia proposta por Levine *et al.*, (1980), estes parasitas possuem a seguinte posição sistemática:

Reino: PROTISTA (Haeckel, 1866)

Sub-reino: PROTOZOA (Goldfuss, 1817)

Filo: SARCOMASTIGOPHORA (Honigberg & Balamuth, 1963)

Subfilo: MASTIGOPHORA (Desing, 1866)

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA (Calkins, 1909)

Ordem: KINETOPLASTIDA (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976)

Subordem: TRYPANOSOMATINA (Kent, 1880)

Família: TRYPANOSOMATIDAE (Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Há evidências de que a *L. (L.) chagasi* possa ser a *L. (L.) infantum*, trazida para o Novo Mundo por imigrantes dos países mediterrâneos (Maurício *et al.*, 2000), porém isto ainda é muito questionável (Shaw, 2006; Silveira & Corbett, 2010).

A doença canina é considerada, do ponto de vista epidemiológico, mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas na derme, com potencial para transmitir a doença (Laurenti *et al.*, 2013). Os caninos domésticos são responsabilizados pela dispersão da doença a partir de focos enzoóticos. Segundo Badaró *et al.* (1996), a doença no cão, geralmente, precede a ocorrência da doença no homem, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos.

No Brasil, o Programa de Controle de Leishmaniose Visceral (PCVL) da Fundação Nacional da Saúde consiste em ações tomadas contra o reservatório, que são: a identificação, o diagnóstico imediato e a eliminação destes animais, visando reduzir as fontes de infecção para os flebótomos; o rápido diagnóstico e tratamento dos indivíduos doentes; e a borrifação de piretroides nos bairros nos quais há casos humanos objetivando o controle de vetores. Nas áreas nas quais ocorre um índice de soropositividade canina até 1%, recomenda-se uma vigilância epidemiológica e, em regiões em que este índice for maior que 1%, está indicada a eliminação de cães positivos e estudos entomo-epidemiológicos para determinar a abrangência do problema (Monteiro *et al.*, 1994).

Até a publicação, em 2006, da 1ª edição do manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, as estratégias de controle utilizadas estavam centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados em humanos. Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentaram efetividade para redução da incidência da doença, determinando a necessidade de

reavaliação das ações propostas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral.

Em função das ações adotadas pelo PCVL, focadas no sacrifício dos cães soropositivos, um diagnóstico eficaz de cães com leishmaniose visceral, portadores do parasita, é de extrema importância, a fim de se evitar o sacrifício desnecessário de cães com diagnóstico sorológico falso-positivo, desacreditando o programa, assim como a permanência de cães infectados com diagnóstico sorológico falso negativo no ambiente, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos vetores e auxiliando a disseminação do parasita.

1.2 Distribuição geográfica

A leishmaniose visceral ocorre em vários países do Velho e Novo Mundo. A *L. (L.) donovani* é encontrada em regiões da Índia, Bangladesh, Sudão, Paquistão, Nepal e regiões do Leste da China. Esse parasita pode provocar a leishmaniose dérmica pós-calazar, além da forma visceral clássica. Acredita-se que, na Índia, a transmissão ocorra de homem para homem, uma vez que este foi o único mamífero infectado encontrado até o momento. É possível que no Sudão a transmissão ocorra à semelhança da Índia, porém outros mamíferos foram encontrados parasitados. Dentre eles, três espécies de roedores (*Arvicanthis niloticus*, *Acomys albigena* e *Rattus rattus*) e dois carnívoros (*Genetta genetta* e *Felis cat*). O vetor da leishmaniose, na região da Índia, é o *Phlebotomus argentipes* e, na região da China, é o *Phlebotomus alexandri* (OMS, 2010).

A *L. (L.) infantum* apresenta extensa distribuição pelo Velho Mundo, ocorrendo na Ásia Central, Norte e Nordeste da China, Sudoeste da Ásia (Iraque, Arábia Saudita, Iêmen, Irã e Afeganistão), África (Argélia, Etiópia, Tunísia, Líbia, Egito, República Central Africana, Congo, Chad, Gabão, Quênia, Nigéria, Malawi, Marrocos, Níger, Senegal, Somália, Sudão, Alto

Volta, Zaire e Zâmbia). Na Europa, essa espécie do parasita é encontrada nos países pertencentes à Bacia do Mediterrâneo, estendendo-se para Hungria e Romênia. O hospedeiro doméstico é o cão, *Canis familiaris*, considerado o principal reservatório da infecção para o homem. São identificados como hospedeiros silvestres o chacal, *Canis aéreos*, o lobo, *Canis lupus*, e a raposa, *Vulpes vulpes*. Na China, foi referido, também, o canídeo *Nyctereutes procyonides* como reservatório. Na Geórgia e Arzebaijão, a infecção acomete os texugos, *Meles meles*, e a raposa, *Vulpes corsak*. Os flebotomíneos responsáveis pela transmissão e disseminação da doença, de acordo com a região, são *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus*, *P. major*, *P. alexandri*, *P. chinensis*, *P. perfiliowi*, *P. tobbi*, *P. longicuspis*, *P. kandelaki*, *P. mongolensis* e *P. caucasicus* (Genaro, 2002; OMS, 2010).

A *L. (L.) chagasi* apresenta ampla distribuição no Novo Mundo, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México e El Salvador. Os hospedeiros silvestres, no Brasil, são as raposas, *Dusicyon vetulus* e *Lycalopex vetulus* na região Nordeste, *Cerdocyon thous* na região Amazônia, e o gambá *Didelphis marsupialis*. O cão doméstico é considerado como a principal fonte de infecção para o homem. O principal vetor responsável pela transmissão do parasita no Novo Mundo a *Lutzomyia longipalpis* (Genaro, 2002; OMS, 2010), embora a *Lutzomyia evansi* seja incriminada também como vetor em parte da Colômbia e Venezuela, e a *Lutzomyia cruzi* no estado do Mato Grosso no Brasil (Santos *et al.*, 1998). (Figura 1).

FONTE: OMS, 2013.

Figura 1 - Distribuição mundial da leishmaniose visceral.

Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) descritos no Novo Mundo ocorrem no Brasil, e, destes, 94% ocorrem na região Nordeste (Grimaldi *et al.*, 1989; Grimaldi; Tesh, 1993).

Essa enfermidade tem se tornado um problema crescente para as autoridades de saúde pública do Brasil devido ao aumento de sua incidência, da taxa de mortalidade, da disseminação para novas áreas e de sua urbanização (Brandão-Filho; Shaw, 1994). As formas humana e canina da LVA ocorrem endemicamente em vários estados da região Norte, Nordeste, Centro-Oeste e na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Yamamoto *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1990; Costa *et al.*, 1991; Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Tafuri *et al.*, 1996).

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (Alencar *et al.*, 1991). A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania*, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (Pena *et al.*, 1934). A

seguir, a *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães. (Brasil, 2006)

Atualmente, no Brasil, são confirmados casos de leishmaniose visceral em praticamente todas as regiões geográficas, com predominância de casos no período de 1990 a 2011 nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste do país (Brasil, 2012) (Figura 2).

Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2011

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Região Norte	35	53	99	84	118	117	133	152	112	375	366	299	333	437	543	660	684	735	815	709	636	834
Rorônia ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Acre ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Roraima	6	41	62	39	21	49	19	12	8	2	13	4	8	9	15	12	4	1	2	6	15	10
Pará	22	12	31	33	64	20	45	43	48	188	171	140	134	191	372	471	452	333	379	275	278	337
Amapá ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Tocantins	7	0	6	12	33	48	69	97	58	185	182	154	188	297	154	178	225	401	434	428	343	487
Região Nordeste	1.650	1.380	1.657	2.407	3.183	3.519	2.932	2.257	1.688	2.965	4.029	1.873	1.487	1.766	1.954	2.011	1.982	1.570	1.739	1.754	1.662	1.832
Maranhão	91	61	114	575	534	263	144	116	483	724	842	490	555	747	615	555	477	385	560	417	417	454
Piauí	201	86	196	701	778	407	239	205	185	348	404	120	127	252	348	306	242	239	252	157	151	202
Ceará	140	150	159	248	486	490	220	130	158	421	496	231	221	212	296	391	599	499	508	629	485	539
Rio Grande do Norte	74	147	236	132	135	93	71	115	126	276	332	148	68	62	55	48	70	57	72	83	67	97
Paraíba	60	92	81	46	91	127	89	72	22	61	108	94	20	31	28	31	36	23	27	16	23	30
Pernambuco	97	80	60	82	188	273	208	161	110	168	539	228	86	79	85	91	96	56	73	62	50	57
Alagoas	56	32	40	58	71	111	103	87	35	171	285	234	116	49	57	57	49	29	26	30	34	36
Sergipe	82	78	119	98	203	268	210	117	1	102	142	41	30	19	32	42	47	62	32	39	75	59
Bahia	840	654	652	467	697	1.489	1.648	1.254	568	694	881	287	264	315	438	490	366	220	189	321	360	358
Região Sudeste	243	78	96	59	90	171	166	140	89	189	314	240	425	534	782	656	704	617	723	641	629	592
Minas Gerais	226	62	96	58	88	164	166	138	88	160	218	145	298	349	620	484	430	384	471	484	469	412
Espírito Santo	15	13	0	0	0	0	0	1	1	29	4	7	1	4	4	4	1	0	2	5	3	6
Rio de Janeiro	2	1	0	1	2	7	0	1	0	0	4	4	1	2	3	3	9	2	0	3	0	1
São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	84	125	179	155	165	264	231	250	169	157	173
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	5	3	3	0	0	8	2	2
Paraná ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	3	3	3	0	0	0	0	0
Santa Catarina ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	8	2	2
Região Centro-Oeste	16	1	18	20	35	78	15	21	88	95	149	123	201	231	289	261	277	273	322	275	303	330
Mato Grosso do Sul	5	1	3	3	27	59	12	18	53	47	82	87	176	190	232	204	209	220	231	173	212	248
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	13	26	23	18	8	13	20	22	21	30	61	67	54	50
Goiás	11	0	15	17	8	19	3	3	22	22	44	18	17	28	28	26	32	20	25	30	34	24
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	15	3	5	5	3	8
UF Ignorada	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	11	2	1	7	6	1	251	253	306	294	304
Brasil	1.944	1.510	1.870	2.570	3.426	3.885	3.248	2.570	1.977	3.624	4.858	2.549	2.450	2.971	3.580	3.597	3.651	3.446	3.652	3.693	3.526	3.894

Fonte: SINAN/SINAN

¹ Estados que não apresentaram casos autóctones de leishmaniose visceral. O registro de casos refere-se à UF de residência, ou seja, pacientes que residem nesses estados porém adquiriram infecção em outro.

Até 2006 os casos referem-se à UF de residência, a partir de 2007 foram considerados casos segundo UF Fonte de Infecção.

FONTE: Ministério da Saúde, Brasil.

Figura 2 - Distribuição do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil pelas grandes regiões e unidades federadas (1990 a 2011).

O último relatório oficial do número de casos diagnosticados no Brasil, informa que, no ano de 2011, ocorreram um total de 3.894 casos, sendo 834 na região Norte (21,41%), 1.832 na região Nordeste (47,04%), 592 na região Sudeste (15,20%), 2 na região Sul (0,05%), 330 na região Centro-Oeste (8,47%) e 304 em UF não informada (7,8%), demonstrando um deslocamento do percentual de novos casos do Nordeste para outras regiões do Brasil.

Até 1998, não havia referência de casos autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC) ou humana no estado de São Paulo. Em maio de 1998, foi descrito um foco de LCV no município de Araçatuba, localizado na região Noroeste de São Paulo (Luvizotto *et al.*, 1999). Posteriormente, verificou-se que a LVC ocorria de forma endêmica não só no referido município, mas, também, em municípios circunvizinhos. Nos anos de 2010, 2011 e 2012, foram registrados no estado de São Paulo, respectivamente, 146, 187 e 202 casos de LVA, com 14, 18 e 12 óbitos. O número de casos e de óbitos no estado de São Paulo tem aumentado constantemente, o que demonstra a importância da doença no Estado, o deslocamento da incidência de novos casos da região Nordeste, e a necessidade de pesquisas que possam auxiliar na prevenção e no controle da doença (Divisão de Zoonoses-CVE/SP, 2011).

1.3 Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema fagocitário

mononuclear. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos, as leishmânias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (Figura 3), sendo, posteriormente, inoculadas na pele dos mamíferos durante um novo repasto sanguíneo (Gontijo, 2003).

FONTE: Centro de Controle de Doenças, EUA.

Figura 3 - Ciclo biológico das leishmanias. 1 - Repasto sanguíneo do vetor – liberação de forma promastigota no hospedeiro vertebrado; 2 - Divisão intracelular de formas amastigotas; 3 - Ruptura de macrófago infectado, com liberação de formas amastigotas; 4 - Repasto com absorção de macrófagos contaminados com formas amastigotas; 5 - Lise dos macrófagos na luz intestinal do vetor com liberação de parasita; 6 - Transformação para forma promastigota; e 7 - Multiplicação das formas promastigotas do parasita na luz intestinal do vetor.

A transmissão da leishmaniose se dá durante o repasto sanguíneo do vetor, que, ao se alimentar em um hospedeiro infectado, ingere macrófagos parasitados por *Leishmania* em sua forma amastigota (esférica ou ovoide, com núcleo arredondado, cinetoplasto, aflagelada). No flebotomíneo, as amastigotas sofrem processos de divisão, multiplicação e diferenciação até chegarem a promastigotas (alongada, com núcleo arredondado, cinetoplasto, flagelada), as quais são inoculadas por meio da picada. No hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas (Figura 4) e disseminam-se em seu organismo (Silva, 2007).

FONTE: A – Bruno Luiz Soares Campos, B – Thaise Yumie Tomokane

Figura 4 - Formas promastigotas (A) e amastigotas de *Leishmania* sp., coradas por Giemsa, aumento 400X.

Os reservatórios de *Leishmania* podem variar conforme a espécie envolvida, incluindo animais silvestres, como a preguiça, *Choloepus didactylus*, o tamanduá, *Tamandua tetradactyla*, e roedores. Também foi descrito que animais domésticos, como o cão, equinos e mulas, podem ser reservatórios. O cão doméstico é considerado, por vários autores, como o principal vertebrado reservatório do parasita, participando ativamente da cadeia epidemiológica de transmissão ao homem (Solano-Gallego *et al.*, 2001). A doença canina é considerada, do ponto de vista epidemiológico, mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando

parasitas na derme, com potencial para transmitir a doença (Marzochi *et al.*, 1985; Laurenti *et al.*, 2013).

No Brasil, os trabalhos realizados indicam que a transmissão de *Leishmania (L.) chagasi* se dá pela picada do vetor flebotomíneo *L. longipalpis* (Figura 5) em animais portadores. Acredita-se que *L. cruzi* e *L. forattinii* sejam também responsáveis pela transmissão em algumas áreas do nosso país (de Pitta-Pereira *et al.*, 2008).

FONTE: Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine*

Figura 5 - *Lutzomyia longipalpis*.

Alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina pela ingestão de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* infectados (Coutinho, 2005; Dantas-Torres *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2011), bem como a transmissão venérea (Silva *et al.*, 2009).

Atualmente, é comum encontrarmos animais da fauna silvestre brasileira habitando parques dentro das cidades brasileiras, como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o gambá (*Didelphis* sp.), os quais podem ir e vir do ambiente silvestre para o urbano, carreando o agente.

1.4 Patogênese da leishmaniose visceral canina

A patogênese da leishmaniose visceral canina induzida pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, nas nossas condições ambientais, ainda necessita de estudos mais aprofundados, pois a maior parte da literatura se refere à patogênese da doença causada pela *L. (L.) infantum* em condições experimentais de infecção ou, por analogia, a estudos da medicina humana (Kontos; Koutinas, 1993; Quinell *et al.*, 2003). Em cães, a *Leishmania* coloniza quase todos os órgãos, em contraste com que ocorre em seres humanos, nos quais o parasita está total ou quase totalmente restrito ao sistema hematopoiético (Berrahal *et al.*, 1996).

As formas promastigotas inoculadas na pele por meio do flebótomo vetor são fagocitadas pelas células monocíticas, podendo ser destruídas ou escapar da lise e proliferar em seu interior. Esta etapa é crucial para o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (Kontos; Koutinas, 1993). Como a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, a defesa imunológica dependerá da atividade das células T que, por sua vez, é determinada pela produção de citocinas que as subdivide em células T auxiliares 1 (Th-1) e células T auxiliares 2 (Th-2). (Quinell *et al.*, 2001). Uma resposta efetiva contra o parasita baseia-se numa resposta Th-1 que consiste na produção de citocinas, como IL-2, IFN-gama e TNF-alfa, que, dentre diversas ações, ativa macrófagos, estimulando a lise do parasita (Quinell *et al.*, 2001).

A maioria dos cães desenvolve uma resposta Th-2, inefetiva contra o parasita, e caracterizada pela produção de IL-4 e IL-10. Citocinas imunossupressoras que inibem a destruição de *Leishmania* pelo macrófago e permitem a disseminação das formas amastigotas.

Ao mesmo tempo, há o aumento da proliferação e ativação de linfócitos B que promovem uma alta produção de anticorpos específicos e inespecíficos sem ação no controle da doença (Slappendel; Greene, 1990).

1.5 Aspectos clínicos e histopatológicos da leishmaniose visceral canina

Em cães, o diagnóstico clínico isolado da doença não é suficiente para detectar animais positivos, devido ao largo espectro de sinais clínicos, que vai de animais assintomáticos a casos em estágio avançado da doença (Feitosa, 2000; Camargo; Langoni, 2006). A leishmaniose visceral canina causa grande variedade de sinais clínicos, incluindo febre intermitente, letargia, onicogribose, emaciação, hepatoesplenomegalia, alterações do apetite variado, anemia, linfadenopatia, e lesões cutâneas, dentre elas: descamação, alopecia, dermatite pustular, dermatose ulcerativa, entre outras (Torrel; Pool, 1982; Longstaffe *et al.*, 1983; Ferrer *et al.*, 1988; Almeida; Oliveira, 1997; Burraco *et al.*, 1997) (Figura 6). Outros sintomas são observados como problemas locomotores (Torrel; Pool, 1982), diarreia, alopecia periocular, epistaxe (Longstaffe *et al.*, 1983), uveíte (García-Alonso *et al.*, 1996), osteosinovite, artrosinovite, (Burraco *et al.*, 1997) e paresia de posteriores (Almeida; Oliveira, 1997).

FONTE: Larangeira, 2008 e Moreira, 2003.

Figura 6 - Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral. (A) Emagrecimento; (B) e (C) Lesões de pele, úlcera e alopecia, respectivamente; (D) Onicogribose.

Em cães, o parasita acomete, principalmente, as células da medula óssea, linfonodos, baço, fígado, pulmões, intestino e pele (Ashford *et al.*, 1995). As alterações histopatológicas viscerais encontradas na LVC são similares às descritas na doença humana (Keenan *et al.*, 1984), embora as lesões cutâneas presentes na maioria dos cães infectados não sejam descritas na doença humana causada pela *L. (L.) infantum chagasi*.

Os órgãos linfoides são os principais alvos na doença, uma vez que o parasita acomete, principalmente, as células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Os linfonodos encontram-se, frequentemente, enfartados, com perilinfoadenite, hipertrofia dos cordões e dos folículos, intensa fibrose, seios dilatados e hiperplasia de macrófagos (Alencar, 1959). População reduzida de linfócitos e proliferação de macrófagos nas áreas paracorticais e cordões medulares, hiperplasia folicular e plasmocitose intensa foram também observadas (Keenan *et al.*, 1984; Moreira, 2003).

A esplenomegalia nem sempre está presente, ou pode ser discreta, moderada ou intensa (Alencar, 1959). Outra alteração frequentemente encontrada é a periesplenite. O baço apresenta uma diminuição de linfócitos na bainha linfóide periarteriolar e proliferação de macrófagos nesta região; hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e plasmócitos (Keenan *et al.*, 1984; Tafuri, *et al.*, 2001; Moreira, 2003).

Na medula óssea, pode-se observar aumento na celularidade, decorrente da proliferação de macrófagos, que podem ou não conter parasitos (Keenan *et al.*, 1984). A hipoplasia medular, principalmente de células brancas, associada à identificação de macrófagos parasitados foi referida por Tafuri e colaboradores (2001).

O fígado, geralmente, encontra-se aumentado de volume (Alencar, 1959), apresentando um infiltrado linfoplasmocitário e hiperplasia das células de Küpffer (Keenan *et al.*, 1984), porém sendo raro o achado do parasita (Duarte, *et al.*, 1989). Geralmente, ocorre uma hepatite difusa acompanhada de reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais (Tafuri, *et al.*, 2001; Moreira, 2003).

1.6 Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico laboratorial da LVC se baseia em métodos parasitológicos e sorológicos. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste-ouro para o diagnóstico da doença. A observação direta de formas amastigotas do parasita em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados por Giemsa, Leishman ou Panótico é uma forma segura, simples, rápida e pouco traumática para o diagnóstico da enfermidade. A especificidade deste método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento, da coloração, além do observador. A sensibilidade pode ser de 50 a 83% em amostras de medula óssea, entre 30 e 85% em amostras de linfonodo e entre 71 a 91% quando ambos os tecidos estão combinados (Ferrer, 1999; Koutinas *et al.*, 2001).

Quando o parasitismo é intenso, não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro, contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais apenas poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, o diagnóstico parasitológico torna-se difícil e duvidoso. Este problema pode ser solucionado com a utilização de técnicas mais sensíveis para a detecção de parasitas, tais como a imunofluorescência direta (Moreira, *et al.*, 2002), a imunoistoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Em 2007, Moreira e colaboradores mostraram que a detecção de parasitas foi mais eficaz em linfonodos poplíteos quando comparado a outros órgãos, tanto em corte histológico corado por hematoxilina eosina como por imunoistoquímica. A reação de imunoistoquímica empregando anticorpo específico proporcionou uma maior sensibilidade na detecção das formas amastigotas no tecido, a qual pode ser ainda aumentada com o emprego da reação da PCR, que mostrou praticamente 100% de sensibilidade na detecção de DNA de *Leishmania* em aspirado de linfonodo em cães com diferentes sinais clínicos da doença.

Infelizmente, o elevado custo dos métodos moleculares não permite que sejam realizados de forma rotineira pelos laboratórios oficiais de diagnóstico de leishmanioses, por requerer laboratórios bem equipados e habilidade técnica (BRASIL, 2006).

O diagnóstico parasitológico pode também ser estabelecido por meio da detecção do parasita por cultivo em meios específicos. Biópsias ou punções aspirativas de diferentes órgãos ou tecidos são colocadas em meios de cultivo, em geral, bifásicos (ágar sangue de coelho com LIT, RPMI ou Schneider) no qual forma amastigotas do parasita, presentes no material biológico, transformam-se em formas promastigotas podendo ser observadas em microscopia de contraste de fase. O crescimento das formas promastigotas leva de 4 a 6 dias, desta forma, a leitura das culturas é feita semanalmente, sendo que, após a terceira semana de observação, o resultado final já é concluído. Como os meios de cultivo são ricos, a falta de adequação na esterilidade durante o processo da coleta de material e semeadura nos meios pode levar ao crescimento de bactérias e fungos que impedem o crescimento de *Leishmania*, diminuindo, assim, a sensibilidade do teste. Embora as culturas sejam úteis para o isolamento e identificação do parasita, elas são pouco utilizadas na rotina diagnóstica (Laurenti, 2009).

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas constitui-se em um instrumento importante no diagnóstico da LVC. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (Ferrer, 1999). A soroconversão ocorre, aproximadamente, três meses após a infecção. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, e falham em detectar cães infectados no período pré-patente da doença (Ferrer *et al.*, 1995).

Animais com menos de três meses de idade não devem ser avaliados por meio de métodos sorológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (Braga *et al.*, 1998).

Uma das desvantagens de testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos que podem infectar cães (Alves *et al.*, 2012).

Existem contradições na literatura quanto a uma possível correlação entre os títulos de anticorpos e a severidade dos sintomas. Muitos testes sorológicos podem ser utilizados, tais como fixação de complemento, aglutinação direta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste imunoenzimático (ELISA) com diferentes modificações, *western blot*, entre outras. Porém, os testes sorológicos de imunofluorescência indireta e ELISA representam os principais instrumentos usados no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina no Brasil, uma vez que tem sido empregados no programa nacional e estadual de controle da leishmaniose visceral para identificação de reservatórios infectados. Entretanto, apesar da doença estar associada, habitualmente, a apenas uma espécie de parasito, a *L. (L.) infantum chagasi*, o que, teoricamente, deveria facilitar a padronização de um antígeno específico para ser usados nesses testes, ainda hoje, não existe um consenso na literatura especializada quanto ao emprego de um antígeno para o uso no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina.

Dependendo do antígeno empregado e das condições da RIFI, sua sensibilidade pode variar entre 90 e 100% e a especificidade entre 80% a 100% (Mancianti *et al.*, 1995; Mancianti *et al.*, 1996). A especificidade desta prova, assim como de outras provas sorológicas, é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, principalmente aquelas causadas por tripanossomatídeos, tais como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção específica por *Leishmania*, particularmente em áreas nas quais a doença de Chagas é endêmica.

Zanette (2006) trabalhando com 50 cães parasitologicamente positivos mostraram sensibilidade de 98% e especificidade de 91% para a RIFI utilizando como antígeno promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, e ótima concordância com o diagnóstico parasitológico (Kappa=0,893). Com relação

à ocorrência de reações cruzadas, mostrou que 42,9% das amostras de soros de cães chagásicos foram reagentes para RIFI com antígeno de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, assim como 50% das amostras de soros de cães com toxoplasmose. Não houve reação cruzada com erliquiose, babesiose e neosporose.

Na tentativa de aperfeiçoar os testes sorológicos empregados no programa de controle da leishmaniose visceral, Silva e colaboradores (2008) trabalharam com amostras de soro em papel de filtro colhidas de cães de área endêmica para leishmaniose visceral com diagnóstico clínico e parasitológico positivo. A RIFI foi avaliada quantitativamente, pelo número de formas promastigotas marcadas, nas diluições de 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160 utilizando-se o kit comercial produzido por BioManguinhos e um ensaio *in house* utilizando promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. O ensaio *in house* com os soros mostrou-se capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos verdadeiros positivos e apontou para uma eficiência de 60 a 76% para o kit comercial. Quando se comparou os resultados da RIFI do kit comercial empregada em soros e papel de filtro, observou-se que o melhor ponto de corte para o papel de filtro seria a diluição de 1/80, o que, seguramente, diminuiria o número de falsos positivos.

Em um estudo comparando-se a reatividade entre as técnicas de RIFI e ELISA utilizando como antígeno formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, preparadas no Instituto Evandro Chagas por aposição de fragmentos de baço de hamster infectado cronicamente, e as mesmas técnicas realizadas com kits da BioManguinhos, utilizados no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina no estado do Pará, mostrou soropositividade de 8,5% pela RIFI BioManguinhos e 0% pela RIFI preparada no Instituto Evandro Chagas com amastigotas, diferença esta estatisticamente significativa. O ELISA BioManguinhos mostrou reação positiva em 4,2% das amostras ($p < 0,05$). Considerando que, na área estudada não há relatos da ocorrência de leishmaniose visceral humana e canina, ao contrário da situação da leishmaniose tegumentar, a qual tem elevada incidência, concluiu-se que o teste da RIFI preparada pelo Instituto

Evandro Chagas utilizando amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* como antígeno foi mais específico, pois não apresentou nenhum resultado falso-positivo. É possível que as taxas de 8,5% e 4,2% de soropositividade obtidas com a RIFI e ELISA produzidos pelo BioManguinhos, respectivamente, representem reações falso-positivas de cães infectados com leishmanias dermatópicas (de Jesus *et al.*, 2003).

O teste de ELISA pode apresentar, dependendo também do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 80% e 99,5% e uma especificidade entre 81% e 100% (Mancianti *et al.*, 1995; Mancianti *et al.*, 1996). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado e de mudanças no protocolo. As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanossomatídeos, mas, também, com organismos filogeneticamente distantes (Zanette, 2006). A utilização de antígenos recombinantes ou purificados melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica (Scalone *et al.*, 2002).

Moreira e colaboradores (2007) empregando antígeno específico, lisado total de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, no ensaio de ELISA para o diagnóstico sorológico de cães positivos parasitologicamente, mostrou sensibilidade de 87,8% para cães sintomático, 68% para cães oligossintomáticos e 95,65% para cães assintomáticos; e especificidade de 100%. A reação de ELISA mostrou boa correlação com o diagnóstico parasitológico, principalmente quando técnicas de imunomarcção foram utilizadas. Já Zanette (2006) mostraram sensibilidade de 94% e especificidade de 84,4% para o ensaio de ELISA utilizando também antígeno específico, em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* com boa concordância com o diagnóstico parasitológico (Kappa=0,788). Porém reações cruzadas foram observadas com doença de Chagas (64,3%), erliquiose (7,7%) e coinfeção por erliquiose e babesiose (83,3%).

1.7 Utilização de antígenos recombinantes

A utilização de antígenos recombinantes tem sido empregada por alguns grupos de pesquisa tanto no diagnóstico da leishmaniose visceral humana como canina como alternativa para aumentar a especificidade e sensibilidade de métodos diagnósticos e reduzir reação cruzada.

Badaró (1996) mostrou sensibilidade de 99% com ELISA utilizando antígeno rK39 em soros de cães com leishmaniose visceral aguda. Em 467 soros coletados em inquérito canino realizado em área endêmica para LVA, somente os animais com rK39 positivo tinham evidência parasitológica de infecção por *Leishmania*. De acordo com os autores, esses resultados indicam que o antígeno rK39 pode ser usado como indicador da presença de LVC aguda.

Seguimentos clonados de genes de *L. infantum* têm sido usados para produzir porções de proteínas antigênicas em bactérias, e muitas destas proteínas sozinhas ou combinadas têm sido usadas como antígenos em ensaios para diagnóstico sorológico. Carvalho *et al.* (2002) utilizaram antígeno recombinante A2 de *L. donovani* no diagnóstico de leishmaniose visceral americana em humanos e em cães. Em áreas endêmicas do Brasil, anticorpos anti-A2 foram detectados por ELISA em 77% de soros provenientes de pacientes com sintomatologia de leishmaniose visceral, e em 87% de soros provenientes de cães positivos por metodologia de RIFI ou por avaliação parasitológica. Adicionalmente, anticorpos anti-A2 também foram encontrados em 14/15 cães sintomáticos e 10/13 cães assintomáticos. Entre os animais assintomáticos positivos para anticorpo anti-A2, nove foram também positivos para presença de parasitas, e não foi encontrada reação cruzada significativa com outras doenças (Gomes *et al.*, 2008).

Segundo Burns e colaboradores (1993), 98% (56/57) de pacientes no Brasil e 100% de pacientes no Sudão com leishmaniose visceral mostraram reação sorológica positiva para a proteína rK39 em avaliação sorológica empregando o método de ELISA. Adicionalmente, não foram detectados

anticorpos anti-K39 em pacientes com leishmaniose cutânea ou mucosa, e em indivíduos infectados com *T. cruzi*. Estes resultados, entre outros, estimularam a avaliação de do antígeno rK39 como marcador diagnóstico para leishmaniose visceral canina (Gomes *et al.*, 2008).

Em estudo realizado em Minas Gerais, com 1.798 cães, o desempenho do teste rápido anti-rK39 realizado em campo e no laboratório foi comparado. O teste rápido em campo demonstrou sensibilidade de 85% e especificidade de 88%; já em laboratório, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade foi de 94%, com aumento de valores preditivos frente ao diagnóstico parasitológico. Genaro e colaboradores (1997) utilizando animais experimentalmente e naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* mostraram que, quando um animal é positivo para o antígeno rK39, ele realmente tem leishmaniose, sendo que a sua utilização poderia gerar uma diminuição dos animais sacrificados que apresentassem outras patologias. Comparando-se a utilização do teste imunocromatográfico rK39 com o ELISA antígeno bruto, concluiu-se que o teste imunocromatográfico é capaz de detectar infecção ativa em cães com diferentes formas clínicas da doença, uma vez que sua sensibilidade foi de 83% e especificidade de 100% (Lemos *et al.*, 2008).

Quinell *et al.*, em 2013, verificaram que a especificidade do método diagnóstico rápido imunocromatográfico utilizando proteína recombinante rK39 variava em função do tempo passado desde o momento da infecção, e do estado clínico dos cães avaliados. A sensibilidade em detectar cães positivos assintomáticos foi de 46%, elevando-se para 77% em cães sintomáticos. A resposta sorológica de cães naturalmente infectados quando avaliados por este método vai aumentando lentamente, sendo extremamente baixa nos estágios iniciais da infecção e chegando ao ápice, aproximadamente, 6 a 8 meses após o início da infecção.

Zanette (2006), trabalhando com amostra de 50 soros de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, mostrou sensibilidade de 86% e especificidade de 91,1%. O teste imunocromatográfico apresentou uma boa concordância com o diagnóstico parasitológico (Kappa=0,769);

porém reações cruzadas foram observadas com erliquiose (7,7%), coinfeção por erliquiose e babesiose (50%), toxoplasmose (10%), neosporose (12,5%), e coinfeção toxoplasmose e neosporose (23%).

Recentemente, foi registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BioManguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) o teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina que promete facilitar o diagnóstico da leishmaniose em cães, dispensando estrutura laboratorial e equipamentos, facilitando o uso no campo e com a emissão de resultados em cerca de 15 minutos. O teste DPP® utiliza duas proteínas recombinantes K26 e K39 como antígeno, o que, aparentemente, pode promover maior sensibilidade e especificidade ao teste. No teste DPP® Leishmaniose Visceral Canina, pode ser utilizado com sangue, soro ou plasma de cães e por ser indicado como um teste de triagem, permitiria que apenas os casos positivos fossem levados para confirmação pelo ELISA, desonerando de maneira surpreendente o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose (PNCL), e permitindo uma ação mais rápida por parte dos agentes públicos envolvidos no programa.

Desta forma, o PNCL que, até o final de 2011, empregava o ensaio de ELISA BioManguinhos como teste de triagem e o RIFI BioManguinhos como teste comprobatório, passou a utilizar do teste rápido de DPP® como triagem e o ELISA BioManguinhos passou a ser o método comprobatório para o diagnóstico da leishmaniose canina. Decorrente destas mudanças, a partir de 2012, alguns grupos de pesquisa no país tem reportado resultados referentes à avaliação deste teste em comparação com os outros ensaios anteriormente utilizados na rotina diagnóstica.

Um dos primeiros estudos publicados avaliou o potencial do DPP® em soros de cães sintomáticos (n=60) e assintomáticos (n=60) infectados com *L. (L.) infantum chagasi* (Grimaldi *et al.*, 2012). Para a avaliação da especificidade, os ensaios foram realizados utilizando amostras de soros de cães negativos para LVC (n=59) e soros de cães com outras enfermidades (n=11). O ensaio mostrou alta especificidade (96%), mas baixa sensibilidade

(47%) na identificação de cães infectados e assintomáticos. No entanto, a sensibilidade do teste foi significativamente maior (98%), nos sintomáticos, o que indica que este teste pode ser útil para identificar os cães mais doentes. Os autores concluíram que esforços devem ser feitos para se obter um parâmetro de teste mais sensível para um diagnóstico sorológico eficaz de cães no início da infecção, pois isso permitiria a remoção de cães mais rapidamente do que os testes atualmente utilizados na prática dos serviços de saúde pública.

Com o objetivo de avaliar a reatividade cruzada para *Trypanosoma caninum* no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, Alves e colaboradores (2012) empregaram os kits BioManguinhos de ELISA, RIFI e DPP® em soros de cães infectados por *T. caninum*, *L. (L.) infantum chagasi* e não infectados mostrando que a sensibilidade dos testes de RIFI, ELISA e DPP BioManguinhos foi de 100% e a especificidade foi de 70,5%, 68% e 97,5%, respectivamente. A concordância entre os testes foi considerado como satisfatório. As especificidades da RIFI, ELISA e DPP® BioManginhos foram maiores quando o grupo infectado com *T. caninum* foi excluído, sugerindo que a infecção pelo *T. caninum* pode confundir o diagnóstico da LVC.

Da Silva e colaboradores (2013) avaliaram o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígenos homólogo e heterólogo, ELISA-*L. chagasi*, ELISA-*L. major*-like, RIFI-*L. chagasi* e RIFI-*L. major*-like, juntamente com o teste imunocromatográfico rápido DPP® no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. As sensibilidades dos testes sorológicos foram de 93%, 100%, 73%, 60% e 93%, com as especificidades de 87%, 92%, 77%, 96% e 92% para o ELISA-*L. major*-like, ELISA-*L. chagasi*, RIFI-*L. major*-like, RIFI-*L. chagasi* e o DPP®, respectivamente; mostrando que o ELISA-*L. chagasi* foi o melhor teste para o diagnóstico da LVC, mas o teste imunocromatográfico poderia ser uma alternativa útil, pois oferece diagnóstico simples e rápido, sem a necessidade de um laboratório especializado.

1.8 Justificativa

Depois de duas décadas de tentativas de controle da leishmaniose visceral no Brasil, o número de casos no país aumentou nitidamente e invadiu áreas urbanas.

O programa brasileiro, iniciado há mais de 40 anos, é composto pela integração de três medidas de saúde pública: a distribuição gratuita do tratamento específico, o controle de reservatórios domésticos e o controle vetorial.

O controle de reservatórios tem sido feito por meio do diagnóstico sorológico de cães domésticos em que existe transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* para seres humanos. Para isto, a rede nacional de laboratórios referenciados empregava, até 2011, os testes de ELISA para triagem e de RIFI para confirmação, utilizando-se kits comerciais de BioManguinhos em soro ou em eluato de papel de filtro; e todos os cães com resultado positivo deveriam ser sacrificados.

Hoje, a triagem tem sido feita com o teste imunocromatográfico DPP® e a confirmação por meio do ELISA, ambos produzidos por BioManguinhos.

Em relação aos métodos sorológicos empregados em inquéritos epidemiológicos com o objetivo de se conhecer a prevalência da doença em áreas endêmicas ou com potencial de transmissão da LVA, os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos das técnicas sorológicas empregadas são de extrema importância, para se evitar interpretações errôneas, com resultados falsos positivos ou negativos. Embora a sorologia seja apenas um método indireto de verificar se há infecção, não definindo o grau de parasitismo, e a presença da doença, ou, ainda, o potencial de transmissão que o cão possa ter para o vetor, diminuir o número de resultados falsos positivos e/ou negativos seria muito importante para a eficiência e confiabilidade do programa.

Outra medida de incremento ao programa seria identificar os demais mamíferos que possam albergar o agente no ambiente e sua importância na disseminação da leishmaniose, bem como avaliar se as metodologias de diagnóstico hoje disponíveis se mostrariam eficazes para avaliação desses.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a eficácia de diferentes métodos sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral em cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

2.2 Específicos

- Determinar a especificidade e sensibilidade do ELISA, e RIFI *in house* no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina;
- Determinar a especificidade e sensibilidade do ELISA e RIFI BioManguinhos no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina;
- Determinar a especificidade e sensibilidade do teste rápido BioManguinhos (DPP® LVC) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina;
- Correlacionar os resultados obtidos com os diferentes métodos sorológicos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, neste estudo, um total de 168 soros de cães, sendo 87 com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, 18 com diagnóstico negativo para leishmaniose e oriundos de área não endêmica para a doença, e 63 soros de animais experimentalmente ou naturalmente infectados e com diagnóstico parasitológico e/ou sorológico positivo para outras enfermidades.

Dentre os animais positivos para leishmaniose, 48 eram sintomáticos e 39 assintomáticos. Este grupo de animais foi composto de cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses, do município de Araçatuba (SP), área endêmica para LVA na região Noroeste do Estado de São Paulo. Os animais foram escolhidos aleatoriamente, de ambos os sexos e diversas idades.

Com o intuito de avaliar a especificidade dos diferentes testes sorológicos empregados neste estudo, além dos 18 soros de animais negativos para leishmaniose, foram também utilizados soros de cães com diagnóstico comprovado de erliquiose (n=17), babesiose (n=9), toxocaríase (n=9), toxoplasmose (n=9), neosporose (n=6), coinfeção neosporose/toxoplasmose (n=4), doença de Chagas (n=6) e dirofilariose (n=4).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética, para uso de Experimentação Animal, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o Protocolo 119/11 (Anexo A).

3.2 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico dos cães oriundos de área endêmica para leishmaniose visceral foi feito empregando-se a técnica de imunohistoquímica segundo Moreira *et al.*, 2007. Cortes histológicos de pele, linfonodo e baço foram submetidos à reação de imunohistoquímica para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, utilizando-se como anticorpo primário soro total de camundongo infectado cronicamente com *L. (L.) amazonensis*, e kit LSAB (DakoCytomation, USA) para amplificação e detecção da reação.

Resumidamente, após a desparafinização a frio, os cortes foram hidratados e a recuperação antigênica foi feita em banho Maria, à temperatura de 96° - 99°C em solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, e as ligações inespecíficas com solução a 6% de leite em pó desnatado. Seguiu-se incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:500 em solução de albumina bovina a 1% em PBS em câmara úmida, *overnight* a 4°C. Para revelação da reação, foi empregado o kit LSAB (DakoCytomation, USA) e o substrato cromogênico DAB líquida (DakoCytomation, USA). A contracoloração foi feita com Hematoxilina de Harris. Seguiu-se desidratação dos cortes e montagem das lâminas com bálsamo do Canadá e lamínula de vidro. Os cortes histológicos foram observados em microscopia de luz, em objetiva de 40X para detecção de formas amastigotas do parasita coradas em castanho.

3.3 Diagnóstico sorológico

3.3.1 ELISA - *L. chagasi*

Microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL de antígeno solúvel de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, na concentração de 10µg/mL de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH9,5 e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C. Seguiu-se lavagem das placas com solução tampão fosfato 0,15M pH7,2 contendo 0,05% de tween-20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS-T e incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T. Amostras dos soros teste, assim como dos soros sabidamente positivos e negativos foram adicionadas à placa, em duplicata, na diluição de 1:400 em PBS-T e incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Conjugado anti-IgG (A40-123AP) de cão ligado a fosfatase alcalina (Bethyl, USA) foi adicionado na diluição de 1:2000 em PBS-T, sendo as placas incubadas a 37°C, durante 45 minutos em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T. O revelador contendo o substrato e o cromógeno [1,0 mg/mL de pNPP (Sigma, USA), em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH9,5] foi adicionado e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida com NaOH 3M, sendo a leitura da absorbância feita em filtro de 405 nm. O cut-off da reação foi calculado pela média da absorbância dos soros negativos somados a três desvio-padrões.

3.3.2 RIFI - *L. chagasi*

As lâminas foram preparadas com formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e estocadas em freezer -20°C. Foram preparadas diluições dos soros testes e dos controles positivo e negativo no *cut-off* da reação (1:40) e adicionados nas lâminas, seguindo-se incubação por 30 minutos na estufa 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com PBS pH 7,2 por 5 minutos cada. Seguiu-se incubação com o conjugado anti-IgG de cão fluoresceinado [anti-dog IgG (whole molecule) FITC conjugate, F-7884, SIGMA, USA] na diluição de 1:100 em azul de Evans, por 30 minutos a 37°C. Após lavagem por 3 vezes com PBS pH 7,2; por 5 minutos cada, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada e lamínula de vidro, e, imediatamente, observadas em microscopia de fluorescência.

3.3.3 ELISA - BioManguinhos

Foi utilizado do kit EIE-LVC produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ, BR), que emprega antígenos solúveis de *Leishmania major*-like (Lira *et al.*, 2005) para sensibilização das placas de microtitulação. O ensaio foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo B).

3.3.4 RIFI - BioManguinhos

Foi utilizado o kit IFI-LVC produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ, BR), que utiliza como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major*-like (Lira *et al.*, 2005). O ensaio foi feito de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo C).

3.3.5 TR-DPP *Dual Path Platform*

O teste imunocromatográfico qualitativo produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ, BR), que emprega como antígeno duas proteínas recombinantes k26/k39, o ensaio foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo D).

Resumidamente, 5 μ L de soro foi adicionado no orifício intitulado Sample+Buffer, seguido da adição de 2 gotas do tampão. Quatro gotas do tampão foram adicionadas no orifício intitulado Buffer. A leitura dos resultados foi realizada após 15 minutos da colocação das amostras e tampão. Foi verificado o aparecimento de uma linha vermelha o qual reflete resultado negativo e o aparecimento de duas linhas vermelhas como resultados positivos.

3.4 Análise estatística

Os diferentes métodos de diagnóstico foram submetidos à análise estatística para obtenção da sensibilidade, da especificidade e de valores preditivos. Para descrever a intensidade da concordância entre dois métodos de diagnóstico, foi utilizada a medida Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo nos dois métodos. O Kappa corresponde à medida de concordância em que o valor 0 indica nenhuma concordância e o valor 1 total concordância.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ELISA - *L.chagasi*

Os resultados referentes ao teste de ELISA-*L.chagasi*, empregando como antígeno formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* mostraram que, dos 87 soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, 82 apresentaram resultado positivo e 5 resultado negativo. Os soros controle negativo (n=18), de animais de área não endêmica, não mostraram positividade no teste de ELISA-*L.chagasi* (Tabela 1). Porém, em relação aos soros de animais com outras enfermidades (n=63), 2/9 soros de animais com babesiose (22%) reagiram neste teste (Tabela 3). Estes resultados refletiram em uma sensibilidade de 94,25%, especificidade de 97,53%, valor preditivo positivo de 97,62% e valor preditivo negativo de 94,05% para o teste de ELISA-*L.chagasi* quando se analisou a população de animais positivos para leishmaniose visceral como um todo (Tabela 4).

Quando se avaliou os resultados por grupo clínico, dos 48 animais sintomáticos, 45 mostraram-se positivos e 3 negativos para o ELISA-*L.chagasi*, refletindo em uma sensibilidade de 93,75%, especificidade de 97,53%, valor preditivo positivo de 95,75% e valor preditivo negativo de 96,34% (Tabelas 2 e 5). Dos 39 animais assintomáticos, 37 apresentaram resultado positivo e 2 negativo, levando a uma sensibilidade de 94,87%, especificidade de 97,53%, valor preditivo positivo de 94,87% e valor preditivo negativo de 97,53% para o teste ELISA-*L.chagasi* nos cães assintomáticos (Tabelas 2 e 6).

4.2 ELISA - BioManguinhos

Os resultados referentes ao teste comercial de ELISA-BioManguinhos mostraram que dos 87 soros de cães de área endêmica e com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose 79 foram positivos e 8 negativos. Dos 18 soros de animais negativos, oriundos de área não endêmica para a enfermidade, 2 mostraram-se reativos (11%) para este teste (Tabela 1). Em relação aos soros dos animais com outras enfermidades, observamos que 4/6 dos soros dos animais com doença de Chagas (67%), 3/6 dos soros dos animais com neosporose (50%), 6/17 dos soros dos animais com erliquiose (35%) e 3/9 dos soros dos animais com babesiose (33%) apresentaram resultados positivo para o ELISA-BioManguinhos (Tabela 3). A análise destes resultados apontaram para uma sensibilidade de 90,81%, especificidade de 77,78, valor preditivo positivo de 81,44% e valor preditivo negativo de 88,73% para o ELISA-BioManguinhos quando se analisou os animais positivos para leishmaniose sem separação por grupo clínico (Tabela 4).

Quando se avaliou os resultados separados por grupo clínico, dos 48 animais sintomáticos, 44 mostraram-se positivos e 4 negativos para o ELISA-BioManguinhos, refletindo em uma sensibilidade de 91,67%, especificidade de 77,78%, valor preditivo positivo de 70,97% e valor preditivo negativo de 94,03% (Tabelas 2 e 5). Dos 39 animais assintomáticos, 35 apresentaram resultado positivo e 4 negativo, levando a uma sensibilidade de 89,74%, especificidade de 77,78%, valor preditivo positivo de 66,04% e valor preditivo negativo de 94,03% para o ELISA-BioManguinhos em animais infectados mas sem sinais clínicos da doença (Tabelas 2 e 6).

4.3 RIFI - *L.chagasi*

Os resultados referentes ao teste de RIFI-*L.chagasi* mostraram que, de 85 soros positivos parasitologicamente para leishmaniose, 76 apresentaram resultado positivo e 9 resultado negativo (Tabela 1). De 17 soros dos cães controle negativo, foi observada reatividade em 8 (47%). Em relação aos soros de animais com outras enfermidades, foi observada reação positiva em 5/5 soros de cães com neosporose (100%), em 4/4 soros de cães com coinfeção neosporose/toxoplasmose (100%), em 4/6 soros de cães com doença de Chagas (67%), em 3/9 soros de cães com toxoplasmose (33%), e em 3/17 soros de cães com erliquiose (18%) (Tabela 3). A análise destes resultados mostrou uma sensibilidade de 89,41%, especificidade de 65,82%, valor preditivo positivo de 73,79% e valor preditivo negativo de 85,25% para o teste RIFI-*L.chagasi* quando se analisou o grupo como um todo (Tabela 4).

Quando se avaliou os resultados por grupo clínico, de 47 animais sintomáticos, 44 mostraram-se positivos e 3 negativos para o ELISA-*L.chagasi*, refletindo em uma sensibilidade de 93,627%, especificidade de 65,82%, valor preditivo positivo de 61,97% e valor preditivo negativo de 94,55% (Tabelas 2 e 5). De 38 animais assintomáticos, 32 apresentaram resultado positivo e 6 negativo, levando a uma sensibilidade de 84,21%, especificidade de 65,82%, valor preditivo positivo de 54,24% e valor preditivo negativo de 89,66% para a RIFI-*L.chagasi* nos animais infectados e sem sinais clínicos (Tabelas 2 e 6).

4.4 RIFI-BioManguinhos

Os resultados referentes ao teste comercial de RIFI-BioManguinhos mostraram que, dos 85 soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, 82 foram positivos e 3 negativos para este teste

(Tabela 1). Para os 18 soros dos cães controle negativo, oriundos de área não endêmica para leishmaniose visceral, 1 apresentou reatividade (6%). Para os soros dos animais com outras enfermidades, observamos que 10/17 soros de cães com erliquiose (59%), 5/9 de soros de cães com babesiose (56%), 3/6 soros de cães com doença de Chagas (50%), 3/9 soros de cães com toxoplasmose (33%), 2/6 soros de cães com neosporose (33%) e 1/3 soro de cão com dirofilariose (33%) mostraram-se reativos para o teste de RIFI-BioManguinhos (Tabela 3). Estes resultados refletiriam em uma sensibilidade de 96,47%, especificidade de 69,14%, valor preditivo positivo de 76,64% e valor preditivo negativo de 94,92% quando se analisou o conjunto de todos os soros (Tabela 4).

Quando se avaliou os resultados por grupo clínico, dos 47 animais sintomáticos, 44 apresentaram resultado positivo e 3 negativo, levando a uma sensibilidade de 93,62%, especificidade de 69,14%, valor preditivo positivo de 63,77% e valor preditivo negativo de 94,92% (Tabelas 2 e 5). Dos 38 animais assintomáticos, todos apresentaram resultado positivo para o RIFI-BioManguinhos, refletindo em uma sensibilidade de 100%, especificidade de 69,14%, valor preditivo positivo de 60,32% e valor preditivo negativo de 100% para este teste nos animais infectados sem sinais clínicos da doença (Tabelas 2 e 6).

4.5 TR-DPP *Dual Path Platform*

Os resultados referentes ao teste rápido DPP para leishmaniose canina mostraram que, dos 87 soros de cães oriundos de área endêmica e com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, 79 foram reagentes e 8 não reagentes. Para os soros dos cães controle negativo, oriundos de área não endêmica e com diagnóstico parasitológico negativo para leishmaniose, não foi observado nenhuma reação positiva (Tabela 1). Em relação aos soros dos animais com outras enfermidades, só foi observada reação

positiva em 4/9 soros de cães com babesiose (44%) (Tabela 3). A análise dos resultados apresentados por este teste mostrou uma sensibilidade de 90,81%, especificidade de 95,06%, o valor preditivo positivo de 95,18% e o valor preditivo negativo de 90,59% para o desempenho TR-DPP no grupo todo de animais infectados, sintomáticos e assintomáticos (Tabela 4).

Quando se avaliou os resultados separando por grupo clínico, dos 48 animais sintomáticos, 43 mostraram-se positivos e 5 negativos para o TR-DPP, refletindo em uma sensibilidade de 89,58%, especificidade de 95,06%, valor preditivo positivo de 91,45% e valor preditivo negativo de 93,90% para o grupo de animais sintomáticos (Tabelas 2 e 5). Dos 39 animais assintomáticos, 36 apresentaram resultado positivo e 3 negativo, levando a uma sensibilidade de 92,31%, especificidade de 95,06%, valor preditivo positivo de 90% e valor preditivo negativo de 96,25% para o teste imunocromatográfico DPP neste grupo de animais (Tabelas 2 e 6).

Tabela 1 - Número absoluto e porcentagem de positividade dos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo e negativo para leishmaniose para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.

Teste Grupos	ELISA <i>L.chagasi</i> N (%)	ELISA BioMang N (%)	RIFI <i>L.chagasi</i> N (%)	RIFI BioMang N (%)	TR-DPP N (%)
Infectados	82/87 94,25	79/87 90,80	76/85 89,41	82/85 96,49	79/87 90,80
Não infectados	0/18 (0)	2/18 (11)	8/17 (47,06)	1/18 (5,56)	0/18 (0)

Tabela 2 - Número absoluto e porcentagem de positividade dos soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose, com (sintomático) e sem (assintomático) sinais clínicos da doença para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.

Teste Grupos	ELISA <i>L.chagasi</i> N (%)	ELISA BioMang N (%)	RIFI <i>L.chagasi</i> N (%)	RIFI BioMang N (%)	TR-DPP N (%)
Infectados	45/48	44/48	44/47	44/47	43/48
Sintomáticos	(93,75)	(91,67)	(93,62)	(93,62)	(89,58)
Infectados	37/39	35/39	32/38	38/38	36/39
Assintomáticos	(94,87)	(89,74)	(84,21)	(100)	(92,31)

Tabela 3 - Número absoluto e porcentagem de soros de cães portadores de outras enfermidades e reativos para os testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.

Teste Enfermidades	ELISA <i>L.chagasi</i> N (%)	ELISA BioMang N (%)	RIFI <i>L.chagasi</i> N (%)	RIFI BioMang N (%)	TR-DPP N (%)
Babesiose (n=9)	2 (22)	3 (33)	0 (0)	5 (56)	4 (44)
Dirofilariose (n=3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)
D. Chagas (n=6)	0 (0)	4 (67)	4 (67)	3 (50)	0 (0)
Erliquiose (n=17)	0 (0)	6 (35)	3 (18)	10 (59)	0 (0)
Neosporose (n=6)	0 (0)	3 (50)	5 (100)*	2 (33)	0 (0)
Toxoplasmose (n=9)	0 (0)	0 (0)	3 (33)	3 (33)	0 (0)
Toxo/Neo (n=4)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Toxocaríase (n=9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* testado somente 5 soros

Tabela 4 - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) frente à reatividade dos 168 soros utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP na população de estudo.

Teste Valores	ELISA <i>L.chagasi</i>	ELISA BioMang	RIFI <i>L.chagasi</i>	RIFI BioMang	TR-DPP
S	94,25	90,81	89,41	96,47	90,81
E	97,53	77,78	65,82	69,14	95,06
VPP	97,62	81,44	73,79	76,64	95,18
VPN	94,05	88,73	85,25	94,92	90,59

Tabela 5 - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para o grupo de cães sintomáticos e controles, negativo e outras enfermidades, utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.

Teste Valores	ELISA <i>L.chagasi</i>	ELISA BioMang	RIFI <i>L.chagasi</i>	RIFI BioMang	TR-DPP
S	93,75	91,67	93,62	93,62	89,58
E	97,53	77,78	65,82	69,14	95,06
VPP	95,75	70,97	61,97	63,77	91,45
VPN	96,34	94,03	94,55	94,92	93,90

Tabela 6 - Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para o grupo de cães assintomáticos e controles, negativo e outras enfermidades, utilizados neste estudo pelos testes de ELISA-*L.chagasi*, ELISA-BioManguinhos, RIFI-*L.chagasi*, RIFI-BioManguinhos e TR-DPP.

Teste Valores	ELISA <i>L.chagasi</i>	ELISA BioMang	RIFI <i>L.chagasi</i>	RIFI BioMang	TR-DPP
S	94,87	89,74	84,21	100	92,31
E	97,53	77,78	65,82	69,14	95,06
VPP	94,87	66,04	54,24	60,32	90
VPN	97,53	94,03	89,66	100	96,25

4.6 Análise estatística

Quando se analisou a concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico para LVC nos 168 soros empregados neste estudo, observamos que o teste TR-DPP e o ELISA-*L.chagasi* mostraram uma concordância excelente com um índice kappa de 0,9405 e um valor de $p < 0,0001$. Já com todos os outros métodos, o TR-DPP mostrou uma concordância boa, ELISA-BioManguinhos ($k=0,6910$ e $p < 0,0001$), RIFI-*L.chagasi* ($k=0,5380$ e $p < 0,0001$), RIFI-BioManguinhos ($k=0,6171$ e $p < 0,0001$). Em relação ao ELISA-BioManguinhos, também foi observada uma boa concordância com o ELISA-*L.chagasi* ($k=0,7500$ e $p < 0,0001$), RIFI-*L.chagasi* ($k=0,5424$ e $p < 0,0001$) e RIFI-BioManguinhos ($k=0,6228$ e $p < 0,0001$). O teste de ELISA-*L.chagasi* também mostrou uma boa concordância como o teste de RIFI-*L.chagasi* ($k=0,5732$ e $p < 0,0001$) e com o teste de RIFI-BioManguinhos ($k=0,6758$ e $p < 0,0001$). Já os testes de RIFI-*L.chagasi* e de RIFI-BioManguinhos mostraram uma concordância fraca com valor de $k=0,3651$ e $p < 0,0001$).

Quando analisamos a concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico por grupo clínico, sintomáticos e assintomático, obtivemos os mesmos resultados embora os valores do índice kappa ligeiramente diferentes.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Uma vez que o programa de controle da leishmaniose visceral (PCVL) em nosso país é baseado no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, no controle vetorial nas áreas de transmissão e na eliminação de reservatórios canídeos soropositivos (Brasil, 2006), um confiável diagnóstico sorológico destes animais se faz necessário para que não ocorra eliminação desnecessária de animais com diagnóstico falso-positivo, assim como a manutenção de animais com diagnóstico falso negativo, podendo estes últimos se tornar uma importante fonte de infecção para o homem. Deste modo, tem sido incessante a busca por metodologias mais apropriadas, confiáveis e rápidas, assim como candidatos a antígenos com potencial para alcançar maiores índices de sensibilidade e especificidade (Yamamoto *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1990; Quinnell *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Zanette, 2006; Moreira *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o desempenho do teste cromatográfico rápido, DPP, recentemente desenvolvido e produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ, Brasil), o qual emprega antígenos recombinantes. Para isto, foi comparado o seu desempenho com os ensaios tradicionalmente empregados no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCVL) no Brasil até o final de 2011, a reação imunoenzimática de ELISA (kit EIE-LVC – BioManguinhos) e a reação de Imunofluorescência Indireta (kit IFI-LVC – BioManguinhos), que empregam como antígeno formas promastigotas de *L. major*-like. Os ensaios, imunoenzimático de ELISA e reação de Imunofluorescência Indireta *in house*, padronizados no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) com o emprego de antígeno específico, formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, também foram utilizados para comparação com o desempenho do TR-DPP.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o TR-DPP teve um bom desempenho, apresentando bons índices de sensibilidade e especificidade, 95,18% e 90,59%, comparáveis aos obtidos com o ELISA - *L.chagasi*, 97,62% e 94,05%, respectivamente. O TR-DPP não mostrou reatividade para 8/87 soros sabidamente positivos, sendo 5 de cães sintomáticos e 3 de assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo para leishmaniose; e o ELISA - *L.chagasi* para 5/87 soros sabidamente positivos, 3 sintomáticos e 2 assintomáticos, apontando para um baixo índice de resultados falso negativos. Ambos os ensaios não mostraram reatividade com os soros controle negativo, de animal de área não endêmica para LVC, porém mostraram reatividade cruzada com soros de animais com babesiose, 4/9 (44%) no DPP e 2/9 (22%) no ELISA - *L.chagasi*. Ambos os ensaios, TR-DPP e ELISA-*L.chagasi*, que empregam antígenos específicos, apresentaram uma excelente concordância com um índice kappa de 0,9405 e um valor de $p < 0,0001$.

Quando analisamos nossos resultados por grupo clínico, observamos que o TR-DPP apresentou em bom desempenho tanto para o diagnóstico sorológico dos animais sintomáticos como dos assintomáticos, apresentando uma sensibilidade de 89,58% para os animais sintomáticos e de 92,31% para os animais assintomáticos com especificidade de 95,06% para ambos os grupos. Já Grimaldi *et al.*, 2012, trabalhando com soros de cães sintomáticos (n=60) e assintomáticos (n=60) infectados com *L. (L.) infantum chagasi* mostraram alta especificidade (96%), mas baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães infectados sem sinais clínicos da doença. No entanto, a sensibilidade do teste foi significativamente maior (98%) nos cães infectados e sintomáticos, o que indica que este teste pode ser útil para identificar os cães mais doentes.

Um pior desempenho para o TR-DPP foi descrito por Queiroz Junior (2011), o teste apresentou elevada sensibilidade somente para o diagnóstico de cães sintomáticos (88,9%); baixa sensibilidade foi observada em cães assintomáticos (12%) e oligossintomáticos (52,4%); porém o autor conclui que o teste pode ser usado para triagem sorológica do programa de controle

da leishmaniose visceral canina, uma vez que ele apresentou desempenho superior aos obtidos pelo EIE-LVC (BioManguinhos). Importante salientar que o autor trabalhou com soros de animais de área endêmica e selecionou a população pelo exame clínico sem comprovação de diagnóstico parasitológico; além disto, para o cálculo do desempenho do teste, a IFI-LVC (BioManguinhos), que foi empregada como padrão-ouro, não tem mostrado bons resultados (Silva *et al.*, 2008).

Quanto à reatividade cruzada, Zanette (2006), usando o teste imunocromatográfico rápido, Kalazar Detect Test que emprega o antígeno recombinante rK39, mostraram reações cruzadas com erliquiose (7,7%), coinfeção por erliquiose e babesiose (50%), toxoplasmose (10%), neosporose (12,5%) e coinfeção toxoplasmose e neosporose (23%). A casuística empregada em nosso estudo mostrou que o teste imunocromatográfico TR-DPP apresenta um melhor desempenho que o Kalazar Detect Test, uma vez que apresentou reatividade cruzada apenas com soros de babesiose.

Em relação ao ensaio de ELISA BioManguinhos, apesar de boa sensibilidade (90,81%), a especificidade foi baixa (77,78%), provavelmente explicada pelo emprego de antígeno heterólogo, formas promastigotas de *L. major*-like. Neste ensaio, foram observados resultados falso-positivos em 2/18 (11,11%) dos soros de animais de área não endêmica para leishmaniose visceral, além de reatividade cruzada com soros de cães com doença de Chagas 4/6 (67%), neosporose 3/6 (50%), erliquiose (35%) e babesiose (33%). O mesmo ocorreu com ambos os ensaios de Imunofluorescência Indireta, tanto quando empregado o kit RIFI-LVC da BioManguinhos como quando empregado o ensaio *in house* com formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Estes ensaios, apesar de haver boa sensibilidade, 96,47% para o RIFI-BioManguinhos e 89,41% para o RIFI-*L. chagasi*, mostraram baixas taxas de especificidades 69,14% e 65,82%, respectivamente. O RIFI-BioManguinhos reagiu com 1/18 soros de animais de área não endêmica para leishmaniose visceral, porém o RIFI-*L. chagasi* reagiu com 8/17 destes soros. Além disto, forte reatividade

cruzada foi observada para soros de animais com erliquiose 10/17 (59%), babesiose 5/9 (56%), doença de Chagas 3/6 (50%), toxoplasmose 3/9 (33%), 2/6 neosporose (33%) e dirofilariose 1/3 (33%) com a RIFI-Bio; e neosporose 5/5 (100%), coinfeção toxoplasmose/neosporose 4/4 (100%), toxoplasmose 3/9 (33%), doença de Chagas 4/6 (67%) e erliquiose 3/17 (18%) com a RIFI - *L. chagasi*.

Importante salientar que, em nosso estudo, os ensaios de RIFI mostram concordância fraca entre os métodos, RIFI-BioManguinhos e RIFI-*L. chagasi*, apresentando um índice kappa de 0,3651 ($p < 0,0001$), provavelmente em função dos diferentes antígenos utilizados.

O TR-DPP mostrou uma boa concordância com o ELISA-BioManguinhos ($k = 0,6910$ e $p < 0,0001$), e uma concordância excelente com o ELISA-*L. chagasi* ($k = 0,9405$ e um valor de $p < 0,0001$). Em relação ao ELISA-BioManguinhos e ELISA-*L. chagasi* também foi observada uma boa concordância ($k = 0,7500$ e $p < 0,0001$), apesar da diferença dos antígenos utilizados.

Comparando-se os resultados encontrados relativos aos grupos positivos sintomáticos e positivos assintomáticos, verificamos que o ELISA-*L. chagasi* encontrou 93,75 e 94,87%, o ELISA-BioManguinhos 91,67 e 89,74%, o RIFI-*L. chagasi* 93,62 e 84,21%, o RIFI-BioManguinhos 93,62 e 100%, e o TR-DPP 89,58 e 92,31%, respectivamente. Estes dados sugerem que as técnicas utilizadas tem uma boa capacidade de detecção de cães infectados, apesar de não termos avaliado o período transcorrido pós-infecção.

Recentemente, resultados bastante concordantes com os nossos foram publicados (da Silva et al., 2013). Os autores avaliaram o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígenos homólogo e heterólogo, ELISA-*L. chagasi*, ELISA-*L. major*-like, RIFI-*L. chagasi* e RIFI-*L. major*-like, juntamente com o teste imunocromatográfico rápido DPP® no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. As sensibilidades dos testes serológicos foram de 93%, 100%, 73%, 60% e 93%, com as especificidades de 87%, 92%, 77%, 96% e 92% para o

ELISA-*L. major*-like, ELISA-*L. chagasi*, RIFI-*L. major*-like, RIFI-*L. chagasi* e o DPP®, respectivamente; mostrando que o ELISA-*L. chagasi* foi o melhor teste para o diagnóstico da LVC, mas o teste imunocromatográfico poderia ser uma alternativa útil, pois oferece diagnóstico simples e rápido, sem a necessidade de um laboratório especializado.

De uma maneira geral, todos os testes utilizados no presente estudo apresentaram boa sensibilidade, porém nem todos apresentaram boas especificidades. As melhores especificidades foram obtidas com o teste TR-DPP e o ELISA - *L. chagasi*. Estes dados mostram o melhor desempenho dos antígenos específicos, uma vez que o ELISA-*L. chagasi* emprega formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, parasita causador da leishmaniose visceral em nosso país e o TR-DPP emprega os antígenos recombinantes k26 e 39k, isolados de *L. (L.) donovani*, parasita causador da leishmaniose visceral no Velho Mundo. Importante salientar que os resultados mostraram-se ainda melhores para o ELISA-*L. chagasi*. Porém, não é somente o emprego de um antígeno específico que leva um teste para um bom desempenho, visto que a RIFI-*L. chagasi* mostrou baixa especificidade e forte reatividade cruzada com soros de cães acometidos com outras enfermidades.

Estes resultados mostram que pode ocorrer o diagnóstico de animais falso-positivos nas metodologias atualmente utilizadas, sendo importante o aprimoramento dos kits empregados no diagnóstico para LVC, tornando-os mais sensíveis e específicos, e que sofram menos interferência da presença de anticorpos de outras doenças e variações durante sua utilização, principalmente devido ao fato de que a principal ação do Programa de Controle de Leishmaniose Visceral (PCVL) consiste na identificação, diagnóstico imediato e a eliminação do reservatório doméstico, visando reduzir as fontes de infecção para os flebotomíneos; medida esta que tem encontrado uma grande resistência da população.

Tendo em vista que os sinais clínicos da leishmaniose são inespecíficos, não havendo um sinal patognomônico da doença, podendo estes sinais ou sintomas serem confundidos com os de outras enfermidades

de cães, inclusive com as avaliadas neste estudo, um diagnóstico laboratorial preciso seria um importante passo para evitar a eutanásia desnecessária de cães, e todos os custos financeiros e emocionais que isto acarreta, e a redução na transmissão da doença, evitando-se que o cão infectado permaneça no ambiente como fonte de infecção.

Seria interessante, ainda, o desenvolvimento de métodos diagnósticos que diferenciem os cães que apresentem resposta imune tipo Th1 ou Th2, o que poderia levar ao desenvolvimento de protocolos de prevenção e tratamentos específicos para os cães que possam desenvolver resposta efetiva contra o parasita ao invés de se aplicar o sacrifício nesses cães. No Brasil, ainda não existem produtos de uso veterinários aprovados para o tratamento de leishmaniose, mas já existem duas vacinas registradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as quais poderiam ser avaliadas neste sentido.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os testes TR-DPP e ELISA-*L.chagasi* apresentaram o melhor desempenho para o diagnóstico da LVC com altos valores de sensibilidade e especificidade, e baixa reatividade cruzada, apenas com soros de animais infectados por *Babesia canis*;
- Os testes de ELISA-BioManguinhos, RIFI-BioManguinhos e RIFI-*L.chagasi* apesar de mostraram valores altos de sensibilidade, revelaram-se de baixa especificidade, apresentando reatividade cruzada com soros de animais infectados com: *Babesia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, e *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*.

7 ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/04/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 119/11 intitulado: **“AVALIAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”**, apresentado pelo **Departamento de PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti
Pesquisador (a) Executante: Marcos Vinicius de S. Leandro Jr.

CEP-FMUSP, 14 de Abril de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fmusp@hcnnet.usp.br

ANEXO B – Especificações do ELISA-BioManguinhos.

EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
(material fornecido para 384 reações)

INDICAÇÃO DE USO
O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* like, em soro ou plasma de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE
O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soro ou plasma de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* like obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/ "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soro controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.
Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).
A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

ESQUEMA DO TESTE

Reagente

FASE SÓLIDA **REAÇÃO COLORIDA**

Não Reagente

FASE SÓLIDA **AUSÊNCIA DE COLORAÇÃO**

MATERIAL FORNECIDO

Dilúente Amostras/ Conjugado [5X]	2 frascos com 45mL
Lectina de leite	1 saco - 10g
Tampão de lavagem [20X]	2 frascos com 60mL
Dilúente do Substrato	1 frasco com 60mL
Cromógeno (TMB)	1 frasco com 0,7mL
Substrato H ₂ O ₂	1 frasco com 0,2mL
Ácido Sulfúrico 2M	1 frasco com 30mL
Controle Positivo	1 frasco com 0,25mL
Controle Negativo	1 frasco com 0,25mL
Conjugado	1 frasco com 0,4mL
Molduras com 6 "strips" dupla sensibilizadas	4 molduras
Folhas adesivas	8 folhas
Manual de Instrução de Uso	1 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Bequeres ou reservatórios;
- Estufa a 37°C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm;
- Balança semi-analítica;
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

Manter entre 2°C e 8°C: Dilúente de amostra/conjugado [5X], Lectina de leite, Tampão de lavagem [20X], Dilúente do Substrato, Cromógeno (TMB), Substrato H₂O₂, Ácido Sulfúrico 2M.

Manter a -20°C: Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado, "Strip" Sensibilizada.

Todos os componentes do kit devem ser conservados nas respectivas temperaturas indicadas em seus rótulos, desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico "In vitro".
Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manipular qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.
A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas laboratoriais, tais como:

- As amostras e os controles devem ser manipulados com cuidado;
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Aconselha-se só utilizar componentes do mesmo conjunto.
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte interna dos strips;
- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- Soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Os componentes do kit armazenados na temperatura de 2°C a 8°C, assim como os componentes armazenados na temperatura de -20°C, soros controles e as strips sensibilizadas, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso.

Importante: Retirar apenas a quantidade de "Strips" a serem utilizadas no teste.

O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retornando para conservação imediatamente, após seu uso.

Importante: Este insumo não tolera variações de temperatura, evitar prolongar sua permanência fora da temperatura de -20°C.

1. Preparo do diluente de amostras/conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lecitina de Leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2. Diluir em tubos, 5 µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

3. Distribuir na placa sensibilizada, 100 µL dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma: na coluna 1 fileiras "A" e "B" o controle positivo; na "C", "D" e "E" o controle negativo; "F" e "G" sem soro (controle do conjugado - SS). Nos demais orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos orifícios correspondentes (seguinte protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 1	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 20	Amostra 20	Amostra 24	Amostra 24	Amostra 28	Amostra 28	Amostra 32	Amostra 32
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
H	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

SS - Sem Soro

4. Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

5. Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	até 16	2 mL	38 mL
02	até 32	3 mL	57 mL
03	até 48	4 mL	76 mL
04	até 64	5 mL	95 mL
05	até 80	7 mL	133 mL
06	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

n° STRIPS duplas	n° PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
até 03	1/2	20 mL	380 mL
até 06	1	25 mL	475 mL
até 09	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

6. Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7. Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	até 16	5 mL	5 µL
02	até 32	5 mL	5 µL
03	até 48	10 mL	10 µL
04	até 64	10 mL	10 µL
05	até 80	15 mL	15 µL
06	até 96	15 mL	15 µL

8. Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

9. Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10. Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

11. Preparo do substrato:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluyente do Substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato H ₂ O ₂
01	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

12. Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min

14. Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos, para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca de teste) e, em seguida, iniciar a leitura.

Obs.: Caso a leitura seja feita com filtro de 450nm, tendo como referência outro de 620-630nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do cut-off e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

Para o cálculo do cut-off deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO

Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do Cut-Off (CO)

$CO = XCN \times 2$

XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade ótica

CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO CN 1 = 0,100

DO CN 2 = 0,098

DO CN 3 = 0,101

$CO = XCN \times 2$

$0,099 \times 2 = 0,199$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

Exemplo 2:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,090

DO CN 3 = 0,131

$CO = XCN \times 2$

$0,100 \times 2 = 0,200$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

DO CN 3 = 0,131 → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$CO = XCN \times 2$

$0,100 \times 2 = 0,200$

Exemplo 3:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,080

DO CN 3 = 0,040

$CO = XCN \times 2$

$0,095 \times 2 = 0,190$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

DO CN 3 = 0,040 → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$CO = XCN \times 2$

$0,095 \times 2 = 0,190$

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

$FC = CO \times 1,2$

Exemplo: $CO = 0,322$

$FC = CO \times 1,2$

$FC = 0,322 \times 1,2$

$FC = 0,386$

CO

AMOSTRAS NÃO REATIVAS

FAIXA CINZA

AMOSTRAS REATIVAS

RESULTADOS

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o Cut-Off e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs. 3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO

1. Preparo do diluyente de amostras/conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluyente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lecitina de Leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2. Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman nº1 ou 1 picote (6 mm) para papel filtro Klabin 80 e nos tubos correspondentes.

3. Adicionar 400 µL de diluyente de amostra/conjugado, por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500 µL de diluyente para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4. Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar eluir durante a noite na geladeira ou agitar 1 hora no agitador, rotação de 90 Rpm a 125 Rpm.

5. Diluir em tubos, 5 µL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µL do diluyente de amostra/conjugado (1:100).

6. Distribuir na placa sensibilizada 100 µL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A", "B", o soro controle positivo, na "C", "D", "E" o controle negativo, na "F" e "G", somente o diluente da amostra/ conjugado (sem soro). Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras teste já eluídas, seguindo o protocolo abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
H	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

SS - Sem Soro

7. Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

B. Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: Este tampão é sujeito a cristalização, neste caso, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	até 16	2 mL	38 mL
02	até 32	3 mL	57 mL
03	até 48	4 mL	76 mL
04	até 64	5 mL	95 mL
05	até 80	7 mL	133 mL
06	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº STRIPS duplas	nº PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
até 03	1/2	20 mL	380 mL
até 06	1	25 mL	475 mL
até 09	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

9. Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10. Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	até 16	5 mL	5 µL
02	até 32	5 mL	5 µL
03	até 48	10 mL	10 µL
04	até 64	10 mL	10 µL
05	até 80	15 mL	15 µL
06	até 96	15 mL	15 µL

11. Homogeneizar e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

12. Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13. Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz)

14. Preparo do substrato:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente do Substrato	Cromógeno TMB	Substrato H ₂ O ₂
01	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

15. Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

17. Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceda a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630 nm). Após alguns minutos, para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca de teste) e, em seguida, iniciar a leitura.

Obs.: caso a leitura seja feita com filtro de 450nm, tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do cut-off e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

Para o cálculo do cut-off deve-se calcular a média das densidades óticas dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

Controle Positivo: ≥ 0,500 de DO

Controle Negativo: ≥ 0,050 ≤ 0,120 de DO

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do Cut-Off (CO)

CO = XCN x 3

XCN = Média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade ótica

CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO CN 1 = 0,100

DO CN 2 = 0,098

DO CN 3 = 0,101

CO = XCN x 3

0,099 X 3 = 0,297

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

Exemplo 2:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,090

~~DO CN 3 = 0,101~~ → Fora da faixa de validação do teste = descartar

CO = XCN x 3

0,100 X 3 = 0,300

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

Exemplo 3:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,080

~~DO CN 3 = 0,101~~ → Fora da faixa de validação do teste = descartar

CO = XCN x 3

0,095 X 3 = 0,285

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

FC = CO x 1,2

Exemplo: CO = 0,322

FC = CO x 1,2

FC = 0,322 x 1,2

FC = 0,386

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

Obs.: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

RESULTADOS

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o Cut-Off e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs. 3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de Leishmania Visceral Americana (LVA) dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras coletadas em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no EIE. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard"), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os índices de sensibilidade e especificidade foram de 79,45% e 90,24% respectivamente.

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período mínimo de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad.S.Pub. RJ; 2004; 20(1)jan-fev: 259-265.
- ASFORD, D.A., BADARÓ, R., EULALIO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FASTEIE) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Amer.J.Trop.Med.Hyg.1993;Jan:48(1):1-8.
- BADARÓ, R., DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2ed. 2002; 1254-79.
- BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
- CARVALHO, F.A., CHAREST, H., TAVARES, C.A.P. Et Al. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. Diag. Microb. And Infect. Disease. 2002; 43: 289-295.
- CUBA, C.A., MARSDEN, P.H.D., BARRETO, A., C. ROCHA, R., SAMPINO, R.R., PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. Of sanit. Param.1980; 89: 95-208.
- MEDRONHO, R.A. Et Al. Epidemiologia.2003.Cap 18,p 259-270.
- MONTOYA, A., CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. J. Immun. Meth.1978; 99: 13-20.
- MORENO, J., ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology. 2002; 18(9): 399-405.
- NARANE, P.K., KAWAI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. J. Histochem Cytochem.1974; 22(12):1084-1091.
- PAPPAS, M.G., HAJDOSWSKI, R., HOCHMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbent assay (DOT- EISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol.Method. 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
- REITHINGER, R., DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. Trends in Parasitology. 2002; 18(7): 289-290.

Licenciado no Ministério da Agricultura sob o nº 8968/04, em 22/09/2004.

Responsável Técnico: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055/00015-30
 SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
 Indústria Brasileira

Aprovação da Arte: dezembro/11

Arte: BM-BUL-030-02-R-14810

Texto: MI_EIE_LVC_07

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA MODELO DE PROTOCOLO: SORO

Produto: Partida n°: Vencimento: / /
 Seção: EIE n°: Data: / /
 Início: h min Término: h min

Disposição das Amostras	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

Densidade Ótica das Amostras	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

Cálculo do Cut-Off (CO)

$CO = XCN \times 2$
 XCN = média da densidade ótica
 dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO.
 DO = Densidade ótica.
 CN = Controle Negativo.

$$CO = \frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} \times 2 = XCN \times 2 = X$$

Técnico Responsável:

Observações:

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA MODELO DE PROTOCOLO: FILTRO

Produto: Partida n°: Vencimento: / /
 Seção: EIE n°: Data: / /
 Início: h min Término: h min

Disposição das Amostras	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

Densidade Ótica das Amostras	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	
H	

Cálculo do Cut-Off (CO)

$CO = XCN \times 3$
 XCN = média da densidade ótica
 dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO.
 DO = Densidade ótica.
 CN = Controle Negativo.

$$CO = \frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} \times 3 = XCN \times 3 = X$$

Técnico Responsável:

Observações:

EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA
 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
 (material fornecido para 384 reações)

Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia
 em Imunobiológicos
 Bio-Manguinhos

ANEXO C – Especificações do RIFI-BioManguinhos.

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

Tel.: (21) 3882.9393
FAX: (21) 2561.0277
SAC: 0800.210.310
www.bio.fiocruz.br

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos
IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
(material fornecido para 2000 determinações)

PRINCÍPIO DO TESTE:
O conjunto apresentado é utilizado na detecção de anticorpos contra Leishmania em soros de cão. O teste de imunofluorescência indireta consiste na reação de soros com parasitas (Leishmania), fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente, para evidênciação da reação.
A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultra-violeta, sendo considerado reagente os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

ESQUEMA DO TESTE:

Reação Positiva

parasita + antissoro + conjugado = fluorescência positiva

Reação Negativa

parasita + antissoro + conjugado = ausência de fluorescência negativa

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 3

MATERIAL FORNECIDO:

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Antígeno de Leishmania	4 Fc 6 mL
R-02	Conjugado Anti-cão / FITC	1 Fc 1 mL
R-03	Glicerina Tamponada pH 9,0 ± 0,5	1 Fc 25 mL
R-04	Azul de Evans 0,1%	1 Fc 2,5 mL
R-05	Controle Negativo	1 Fc 0,5 mL
R-06	Controle Positivo	1 Fc 0,5 mL
	Caixas com 50 Lâminas	4 caixas
	Manual de Instruções de Uso	

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

- Água destilada.
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc).
- Pipetador monocal ajustável e ponteiros.
- Luvas descartáveis.
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária.
- Estufa a 37°C.
- Tampão fosfato/salina (PBS) - pH 7,2.
- Lâminulas.
- Microplacas.
- Câmara úmida e cubas de lavagem.
- Microscópio para fluorescência.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:
Manter entre 2° e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06.
Todos os componentes do kit devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:
Somente para uso "IN VITRO".

4 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas normas de segurança do laboratório, tais como:

- as amostras, assim como lâminas e outros insumos devem ser estocados e manipulados adequadamente;
- homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial em todas as etapas do teste;
- desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, lâminas usadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte superior da lâmina;
- nunca reaproveitar as lâminas;
- não usar os reativos após sua data de validade;
- utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação;
- nunca misturar componentes de lotes diferentes.

PREPARO DO TAMPÃO FOSFATO pH 7,2 (PBS):

Sal	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) PA - 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) PA - 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH_2PO_4) PA - 0,0028M	0,34 g
Água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

ATENÇÃO: os sais descritos acima, quando não utilizados na forma anidra, deverão ter suas quantidades recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verifique sempre no rótulo dos produtos a composição dos sais e o peso molecular.

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 5

Exemplo de correção de peso para preparo de PBS quando se utiliza o fosfato dibásico hidratado com 12 moléculas de água. Cálculo:

$$\begin{array}{lcl} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ Anidro} - \text{Peso Molecular} = 142 & \text{pesar} & 1,02 \text{ g} \\ \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{Peso Molecular} = 358 & \text{pesar} & X \text{ g} \\ \frac{142 - 1,02}{358 - X} & X = & \frac{1,02 \times 358}{142} = 2,57 \text{ g} \end{array}$$

Neste exemplo, onde o Fosfato Dibásico é hidratado com 12 moléculas de água, devem-se pesar 2,57 g para preparar o PBS.

TITULAÇÃO DO CONJUGADO:

O título do conjugado varia em função das condições de trabalho, do microscópio utilizado e do operador.

O laboratório deverá repetir a titulação do conjugado sempre que houver troca de lote do kit, do microscópio, ou quando se observar queda da intensidade da fluorescência no controle positivo ao longo do tempo.

- 1- Ferver as lâminulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição, e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.
- 2- Separar 3 lâminas e pingar 10 µL do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo.
- 3- Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente ou duas horas a 37°C, para uma boa fixação dos parasitas.

ATENÇÃO: evitar atrito com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados.

- 4- Fazer um protocolo de trabalho, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), e do Controle Negativo (CN), além dos controles do conjugado (PBS).

6 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Ex:

5- Diluir em PBS o controle positivo 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, e diluir o controle negativo 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada a seguir:

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 7

ATENÇÃO: homogeneizar o conteúdo de cada tubo antes de transferir o volume de 200 µL para o tubo seguinte.

- 6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

ATENÇÃO: evitar que a ponta da ponteira toque ou raspe a superfície da lâmina, pois este procedimento provocará a retirada dos parasitas. Tomar cuidado para que o conteúdo de diferentes poços não se misturem. Utilizar uma ponteira para cada tubo a ser utilizado ou utilizar uma ponteira para cada controle na ordem da maior para menor diluição.

- 7- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em estufa.

8 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

8- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.

9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

10- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C, em estufa, para secar. No entanto não exceder muito nesta etapa.

11- Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

12- Diluir o conjugado anti-Ig cão marcado com fluoresceína, conforme descrito a seguir:

20 µL de Conjugado + 980 µL PBS-AE
dil. 1:50

13- Adicionar 15 µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes conforme esquema a seguir:

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 9

14- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em estufa.

15- Lavar as lâminas 3 (três) vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.

16- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C para secagem. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

17- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lâminula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

10 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO

Para a leitura, utilizar o microscópio de Imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado será a diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo (vide rótulo do frasco), e ausência de fluorescência nas diluições correspondentes ao controle negativo e ao PBS (controle de conjugado).

Os limites aceitáveis da titulação do conjugado para aprovação do teste de Imunofluorescência indireta estão em torno de 1:100 até 1:640.

PROCEDIMENTO DO TESTE:

1- Ferver as lâminulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

2- Fazer o protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).

Obs. 1: conforme recomendação de especialistas, as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de Imunofluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80.

Obs. 2: os controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 11

3- Pingar 10 µL do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente, ou duas horas a 37°C, para uma boa fixação dos parasitas.

ATENÇÃO: evitar atrito com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados.

4- Diluir os soros amostra e teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), em PBS, conforme esquema a seguir:

5- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.

6- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C.

7- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

8- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

9- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

10- Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE, conforme tabela a seguir:

ANEXO D – Especificações do DPP-BioManguinhos.

TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA LEISHMANIA
(material fornecido para 20 determinações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para Leishmania, em soro, plasma ou sangue total venoso.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero Leishmania. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A Leishmania está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1984 a 1999, 37.294 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV, algumas vezes referida como Kalazar é uma doença crônica e potencialmente letal se não tratada antes do aparecimento de sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no baço, fígado e gânglios linfáticos⁴.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotômios através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimônio pentavalente ou estibogluconato de sódio⁵.

A LV é uma zoonose na qual os canídeos têm sido implicados como importantes reservatórios para o parasita⁶. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebótomo fêmea infectado. Programas de controles para LV incluem a eutanásia de cães infectados identificados através de teste sorológico. Este procedimento tem provado ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil⁷.

Vários ensaios como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para este diagnóstico^{8,9} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem, imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para Leishmania, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2 a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para Leishmania. Em sequência, reage com antígenos recombinantes de Leishmania ligados a uma membrana (fase sólida).

A amostra é aplicada ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPÃO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço #2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para Leishmania produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para Leishmania a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Suportes DPP® contendo Antígenos de Leishmania e o Conjugado de Ouro Coloidal adsorvidos em Membranas Especiais	20 unidades
Tampão de Corrida	01 frasco (6 mL)
Alças Coletoras Descartáveis (5 µL)	20 unidades
Lancetas Estéreis Descartáveis	20 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Cronômetro ou relógio
- Micropipeta calibrada para 5 µL. (como alternativa à alça coletora)
- Luvas descartáveis

- Recipiente seguro para descarte de material biológico
- Álcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. Não congele o kit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Somente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observar as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde, segundo as instruções contidas neste manual;
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados;
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso;
- As amostras de sangue não testadas imediatamente após a coleta, devem ser refrigeradas entre 2 e 8°C, podendo ser usadas em até 3 dias;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2 e 8°C por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro deste período, as amostras devem ser congeladas (-20°C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Componentes de kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, separe o Kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os kits;
- Não pingar sangue diretamente no suporte de teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações abaixo (ver Procedimento do Teste);
- Cuidado ao adicionar a amostra: a alça deve ser mantida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste;
- Cuidado ao adicionar o tampão de corrida: o frasco deve ser mantido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser dispensadas ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste onde se encontra a amostra;
- Aguardar cinco minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar quatro gotas do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO);

ATENÇÃO: Alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

- Após o uso, suportes, ponteiros, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartadas em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfeito funcionamento do teste, usar 5 µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

Sangue total

Utilizar a lanceta para obter sangue a partir da orelha, patas ou rabo do animal. Para teste imediato utilizar as alças coletoras.

Sangue Total Venoso

Coletar o sangue assepticamente nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Certifique-se que o tubo de sangue foi bem misturado antes da amostragem. Siga corretamente o procedimento do teste.

Soro

obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma

Coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS

1. Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retirar o número necessário de componentes do TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO - MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam a temperatura ambiente no momento do uso.

3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.

4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

5. Encostar a alça coletora de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.

6. Segurar a alça coletora na posição vertical e tocar na área de aplicação da amostra, poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte para liberar 5 µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste.

7. Virar o frasco de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO). Adicionar 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO).

8. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.

9. Virar o frasco de tampão e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 2 (TAMPÃO). Adicionar 4 (quatro) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 2 (TAMPÃO).

10. Deixar o teste correr por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos, descartar o teste.

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida no poço # 2 (TAMPÃO).

Leitura Visual

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50 cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de testes.

Leitura com Equipamento - Leitor de Testes DPP®

Alternativamente pode-se fazer a leitura dos testes DPP® com equipamento específico. Seguir as instruções de uso do equipamento para obtenção do resultado.

ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser interpretados tanto visualmente ou com a ajuda de um leitor DPP®. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para Leishmania na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por Leishmania.

Resultado REAGENTE

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para Leishmania foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.

Resultado INVÁLIDO

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.

CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.
- Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.
- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.
- Proceda a leitura do teste em, no máximo, 25 minutos.
- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.
- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para leishmanias na amostra testada.
- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição a leishmanias ou infecção por leishmanias.
- Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.
- Um animal infectado com Leishmanias que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade para Leishmanias foram determinadas pela avaliação da capacidade do teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos de detectar anticorpos específicos para Leishmanias em amostras clínicas de cães. Comparado ao teste parasitológico, para estas amostras, o teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 98,3% (167/171), sendo 1 amostra indeterminada. Quando comparado ao Teste EIE (Bio-Manguinhos), para amostras de cães sem suspeita de leishmaniose, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou uma especificidade de 97,4% (175/186), sendo 6 amostras indeterminadas.

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a simplicidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a evidência da infecção por Leishmanias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm, 2004.
3. PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. Impact of Canine Control of the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 65: 510-517, 2001.
4. ASHFORD, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., da Conceicao Eulalio, M., Sampaio, D.P., Badaro, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57, 1998.
5. REITHINGER, R., Quinell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of Leishmania infantum Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356, 2002.
6. DO ROSARIO, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 197-203, 2005.
7. PORROZZI, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 544-548, 2007.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055/0001-35
 SAC: 0800.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
 Indústria Brasileira

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Abbas A, Lichtman AH, Jordan SP. *Cellular and molecular immunology*. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 242-243, 1997.

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CI. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1991;13:537-50.

Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*. 1991;77(4):557-61.

Adler S, Theodor O. Investigation on Mediterranean kala-azar. VI – Canine visceral leishmaniasis. *Proc Royal Soc*. 1932;110:402-12.

Alencar JE. *Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil* [tese]. Faculdade Federal do Ceará, Fortaleza, 1959.

Alencar JE. Leishmaniose visceral no novo mundo. *Publ Médicas*. 1956;196:71-87.

Almeida IC, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clin Veterinária*. 1997 Nov/Dec;II(11).

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*. 2005;127:227-32.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.

Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, San Andres MD, Boggio J, Rodriguez F, Sainz A, Escacena C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88(4):371-8.

Alves AS, Mouta-Conforto E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res Vet Science*. 2012;93:1329-33.

Amaral ADF, Torrealba JW, Henriquez LCE, Kowalenko W, Barrios RPA. Consideraciones sobre Kala-azar en el mundo y su presencia comprobada en Venezuela desde 1941. *Rev Venez Sanid*. 1961;26:350-6.

Amusategui I, Sáinz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Tratamiento de la leishmaniosis canina. *Med Veterinária*. 1995;12(5):289-98.

Anderson DC, Buckner RG, Glenn BL, Macveam DW. Endemic canine leishmaniasis. *Vet Pathol*. 1980;17(1):94-6.

Arjona AC, Osorno-Mesca L, Marquez JP. Contribución al estudio epidemiológico del Kala-azar en Colombia. *Rev Fac Med (Bogotá)*. 1971;37:90-1.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Bakker Junior RH. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:251-5.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(1):53-7.

Ashford RW, Desjeux P, Raadt P. Estimation of Risk of Infection and Number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today*. 1992;5(3):104-5.

Atta AM, De-Oliveira A, Correa J, Atta MLB, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmania IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *J Trop Med Hygiene*. 1998;59(3):426-30.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, E Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol*. 1999;85(2):181-7.

Azadeh B, Sells PG, Ejeckam GC, Rampling D. Localized Leishmania lymphadenitis. Immunohistochemical studies. *Am J Clin Pathol*. 1994;102(1):11-5.

Azazy AA, Chance ML, Devaney E. A time-course study of circulating antigen and parasite-specific antibody in cotton rats infected with Leishmania donovani. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997;91(2):153-62.

Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire MC, Cunha S, Netto EM *et al*. rk39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1996;173:758-61.

Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Editora Ateneu; 1996. p. 1234-59.

Badaró R. *Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de Leishmania chagasi (rK39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral*. São Paulo [Tese]. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 1996.

Barral A, Costa MD, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol*. 1995;34(7):474-8.

Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995;17(1):21-8.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992;24(257):545-8.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1097-1106.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*. 1997;24:684-703.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carries by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(3):273-7.

Bertocco BP, Bertocco CP, Neves MF. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. *Rev Cient Elet Med Veterinária*, www.revista.inf.br. 2008 Jan;VI(10).

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Dadoré JL, Bourdoiseau G. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Veterinary J*. 2001;162(2):108-20.

Bogdan C, Gressner A, Solbach W, Röllinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Op Immunol*. 1996;8(5):517-25.

Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*. 1998;28(1):121-34.

Boom WH, Liebster L, Abbas AK, Titus RG. Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: correlation with disease progression or resolution. *Infect Immun*. 1990;58(12):3863-70.

Braga M, Coêlho IC, Pompeu MM, Evans TG, Macaullife IT, Teixeira MJ, Lima JW. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(5):419-24.

Brandão-Filho S, Shaw J. Leishmaniasis in Brasil. *Parasitol Today.* 1994;10(9):329-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral*, Brasília; 2006. 120 p.

Brener Z. *Calazar canino em Minas Gerais* [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 1957.

Brittingham A, Morrison JC, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the Leishmania surface gp63 in complement fixation, cell adhesion, resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1996;155:3102-11.

Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with leishmania donovani infection in a dog. *J Small An Pract.* 1997;38:29-30.

Cabrera GP, Da Silva VO, Da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Sousa CB. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(2):296-301.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(3):273-7.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden P, Costa JML, Steven R, Rocha H. Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1985;135(6):4144-8.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane G, Guimarães FN, Paugarten MJ, Von e Sá B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral Americana em 1937. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1938;33:89-229.

Chagas E. Leishmaniose Visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem da América do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1937;32:325-32.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Record*. 1997;141(21):539-43.

Corbett CE, Duarte MI, Bustamante SE. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(5):616-24.

Corbett CE, Paes RA, Laurenti MD, Andrade Júnior HF, Duarte MI. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*. 1992;73(4):417-33.

Corbett CEP, Laurenti MD. Early detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in draining lymph node after subcutaneous inoculation in hamster. *Parasitol Internat*. 1998;47(4):307-10.

Corbett CEP, Paes RA, Laurenti MD, Andrade Junior HF, Duarte MIS. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*. 1992;73(4):417-33.

Corbett CEP, Laurenti MD, Nunes EV, Gama-Rodrigues JJ, Okumura M. Cytokines and Chagas disease in mice. *Rev Hosp Clin Fac Med*. 1998;53(1):1-2.

Correnti M, Ortega G. Differences in the lymphoproliferative pattern to *Leishmania mexicana* antigens recognized by immunized and infected mice. *Acta Tropica*. 1994;58(3-4):243-53.

Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick SM, Melo MN, Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991;24(1):21-5.

Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil. *Rev Saúde Públ*. 1990;24(5):361-72.

Cowell RL, Tyler RD. *Diagnostic cytology of the dog and cat*. 3a. ed. Goleta, American Veterinary Publications. 1989;1-260.

Cunha AM. Infecções experimentais na leishmaniose visceral americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1938;33:581-98.

Cunha RV, Alencar JR, Andrade FB. Uso da reação de fixação de complemento para diagnóstico de calazar canino em inquéritos de massa. *Rev Bras Malariol Doenc Trop*. 15:405-10.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic diversity in natural populations of new world leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(5):663-8.

De Jesus RCS *et al*. Comparação das técnicas de RIFI (ag. IEC x ag Bio-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), Estado do Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(Sup I):311.

Deane LM, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang KP & Bray RS. *Leishmaniasis*. Amsterdam, Ed. Elsevier Science Publishers B. U. (Biomedical Division). 1985;247-81.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceará. *Rev Bras Malariol Doenc Trop*. 1955;7(1):131-41.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral Ceará, 1955. *O Hospital*. 1955;47:75-87.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. *O Hospital*. 1955;48:61-76.

Dos-Santos LR, Barrouin-Melo SM, Chang YF, Olsen J, McDonough SP, Quimby F, Dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira GG. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;98(1):43-8.

Dos-Santos WLC, David J, Badaró R, De-Freitas LAR. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2004;94:84-94.

Duarte MI, Da Matta VL, Corbett CEP, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(1):73-6.

Duarte MIS, Corbett CE. Histopathology patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987;29(3):131-6.

Duarte MIS, Laurenti MD, Brandão Nunes VL, Rego Jtjúnior AF, Oshiro ET, Corbett CE. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1986;28(6):43-6.

Duarte MIS, Mariano ON, Corbett CEP. Liver parenchymal cell parasitism in human visceral leishmaniasis. *Virchows Archiv. A. Pathol Anat*. 1989;415:1-6.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(2):125-30.

Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42(2):118-23.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin Veterinária*. 2000;28:36-44.

Fernandes-Perez MT, Gomes-Munoz T, Mendez S, Alunda JM. Leishmania – specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*. 2003;86:83-91.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Record*. 1995;136:514-6.

Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin-lesions in canine Leishmaniasis. *J Small Anim Pract*. 1988;29(6):381-8.

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: an update. *Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum* Barcelona-Spain. 1999;6-10.

Fiorentino DF, Bond MW & Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081-95.

Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997;56(3-4):319-27.

Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29(2):165-80.

García-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C, Nieto CG. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1996;18(12):617-23.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Nat Acad Scien.* 1993;1(90):6115-9.

Genaro O, Costa RT, França Silva JC, Reis AB, Vieira EP, Arias JR. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. *Acta Parasitol Turcica.* 1997;21(suppl.I):93.

George JW, Nielsen SW, Shively JM, Hopek S, Mroz Z. Canine Leishmaniasis with amyloidosis. *Vet Pathol.* 1976;13(5):365-73.

Giles GMJ. A report of an investigation into the causes of the diseases known in asma as kala-azar and beri-beri. *Shillong.* 1890;156.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Veterinary JI.* 2008;175:45-52.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.

Gontijo CM, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:338-49.

Gradiner CH, Fayer R, Dubey JP. *An atlas of protozoan parasites in animal tissue.* United States, Department of Agriculture. 1988;83.

Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):568-71.

Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol.* 1987;1(4):339-42.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum* (Sevilla, Spain). 2002;7-14.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687-725.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(3):230-50.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Alvar J, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Science.* 2000;69:249-53.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MG, Castillo JA. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;88:13-20.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world leishmania complexes. *J Clin Microb.* 1998 July;1989-95.

Hermeto MV, Vieira-Dias D, Genaro O, Da Costa CA, Toledo VP, Michalick MS, Tafuri WL, Chaves KM, Mayrink W. Delayed hypersensitivity skin-test using Leishvacin for epidemiological survey of canine cutaneous leishmaniasis in a rural area of Minas Gerais state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88(4):635-6.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996;26(3):659-80.

Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;1:55-73.

Iniesta L, Gállego M, Portus M. Immunoglobulins G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;103:77-81.

Jaffe CL. Recent trends in vaccine development and immunization. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):339-44.

Jarvis EK, Rutledge LC. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 1992;29:171-7.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006;22(9):439-45.

Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201:239-53.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathology*. 1984;21(1):74-9.

Kemp M, Theander TG, Kharazmi A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immunol Today*. 1996;17(1):13-6.

Killick-Kendrick R, Maroli M, Killick-Kendrick M. Bibliography on the colonization of phlebotomine sandflies. *Parasitologia*. 1991;33:321-33.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*. 1990;4:1-24.

Kontos VJ, Koutinas AF. Old world canine leishmaniasis. *Cont Educat Articles*. 1993;15(7):949-59.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitology*. 2001;98:247-61.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):210-5.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press. 1987;1:1-120.

Laurenti MD, Corbett CEP, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*. 1996;77:15-24.

Laurenti MD, Lemos EM, Reis AB, Moreira MAB, Luvizotto MCR, Corbett CEP, Dietze R. Evaluation of Kalazar DetectTM Rapid Test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Third World Congress on Leishmaniosis* (Abstract Book), Palermo-Terrasini, Sicily, Italy. 2005;160.

Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CE, Da Matta VL, Duarte M. 1. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int J Exp Pathol*. 1990;71(6):291-7.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*. 2008;107:205-7.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 1990;71(4):556-9.

Liew FY, Millot S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S. Macrophage Killing of *Leishmania* parasite "in vivo" is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. 1990;144(12):4794-7.

Lima HC, Tius RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1996;64(12):5442-5.

Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987;138(5):744-9.

Longstaffe JA, Guy MW. Canine leishmaniasis, United Kingdom update. *J Small An Pract*. 1996;27(10):663-71.

Longstaffe JA, Jefferies AR, Kelly DF, Bedford PGC, Herrtage ME, Darke PGG. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *J Small An Pract*. 1983;24:23-30.

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(3):348-56.

Lopez R, Lucena R, Novales M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *J Vet Medicine*. 1996;43:469-74.

Luvizotto MCR, Biazzone LI, Eugenio FR, Andrade AL, Moreira MAB. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba - SP. *Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*. Anais. 1999;2.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008;158:274-87.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 1995;59:13-21.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:566-7.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol*; 1996;65(1-2):1-9.

Manetti R, Parronchi P, Giudizi M, Piccinni M, Maggi E, Trichieri G, Romagnani S. Natural Killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 – specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med*. 1993;177:1199-1204.

Manson-Bahr PEC. East African Kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1959;53:123-37.

Marzochi MC, Coutinho SG, Sabroza PC *et al.* Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro- Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1985;1(4):432-46.

Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. In diagnostics samples from human and dogs. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1145-9.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999;119(3):237-46.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16(5):188-9.

Mayrink W, Nascimento E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop*. 1996;38(2):81-9.

Mc Conville MJ, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contain an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:8941-5.

Migone LE. Um caso de Calazar em Assuncion (Paraguai). Bull. Soc. Path. Exot. Et. SeS. Fil., p. 118-120, 1973. In: Leason R, Shaw JJ. *Leishmaniasis*. 1913;115.

Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, DF; 2006.

Molineuz DH, Killick-Kendrick R. *Morphology, ultrastructure and life cycles. The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London: Eds Peters W, Killick-Kendrick R. Academic Press. 1987;1:121-76.

Moll H, Fucs H, Blank C, Hofman F. Langerhans cells transport *Leishmania major* from infected skin to the draining lymph node presentation to antigen-specific T cells. *Euro J Immunol*. 1993;23:1565-1601.

Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994;27(III):67-72.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4):245-52.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. *Braz J Vet Res. Anim. Sci*. 2002;39(2):103-6.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002;18(9):399-405.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barrer DC, Alva J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;71:181-95.

Mosmann T, Cherwinsky H, Bond M. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-57.

Mosmann T, Coofman R. Two types of mouse helper T – cell clone – implications for immune regulation. *Immunol Today*. 1987;8:223-7.

Mossalayi MD, Arok M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today*. 1999;15(8):342-45.

Natami A, Sahibi H, Lasri S, Boudouma M, Guessouss-Idrissi N, Rhalem A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Vet Res.* 2000;31(3):355-63.

Natami A, Sahibi H, Lasri S, Boudouma M, Guessouss-Idrissi N, Rhalem A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Vet Res.* 2000;31(3):355-63.

Neogy AB, Vouldoukis I, Da Costa JM, Monjour L. Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. Veterinary group of Lupino. *Vet Parasitol.* 1994;54:367-73.

Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;67(2):117-30.

Noli C. Leishmaniasis canina. *Waltham Focus.* 1999;9(2):16-24.

Noronha F, Nunes AC, Souza K, Melo MN, Pinto JR. Differential sensitivity of New world *Leishmania* spp. Promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Tropica.* 1998;69:17-29.

Nunes VLB, Yamamoto YI, Junior FAR, Dorval MEC, Galatj EAB, Oshiro ET, Rodrigues M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras.* 1988;8(1/2):17-21.

Oliveira-Mendes C, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Maria Melo Batista L, Aparecida dos Santos M, Elmer Parra L, Men ZI, Palatinik M, Palatinik de Sousa CB. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2003;21:2589-97.

Osman OF, Kager PA, Zijlstra EE, El-Hassan AM, Oskam L. Use of PCR on lymph-node samples as test of cure of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997;91(7):850-4.

Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NCM, Schoone GJ, Khalil EAG, El-Hassan AM, Kager PA. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2454-2457.

Pampiglione S, Placa ML, Shlick G. Studies on Mediterranean leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1974;68:349-59.

Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr G, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *L. Chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(1):39-44.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Med*. 1934;48:949-53.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, Del Real G, Ruitenberg EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol*. 1995;6:1594-600.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitenberg EJ. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immunity*. 1994;62:229-335.

Pinelli E, Rutten VPMG, Ruitenberg EJ. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. *Proceedings of the international Canine leishmaniosis*. 1999;60-4.

Pinelli E, Van Der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenberg EJ, Bernardina W, Rutten VP. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;69(2-4):121-6.

Pinto AR *et al*. Identification of a 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. *Int J Parasitol*. 2000;30:599-607.

Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*. 1991;57(4):444-52.

Pozio E, Grandoni L, Bettini S, Granicia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): IV Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario. *Acta Tropica*. 1981;38:383-93.

Prasad LS. Kala azar. *Indian Journal of Pediatrics*. 1999;66(4):539-46.

Prophet EB, Mills B, Arrington JB. *Métodos de histotecnológicos*. Washington; Afip. 1992;280p.

Quijada L, Requena JM, Soto M, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Letters*. 1996;52(2-3):73-9.

Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1992.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol.* 2001;122:253-61.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez ML, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91:161-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001;183(9):1421-4.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Ramos P, Kaye PM, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;10:161-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Shaw MA, Dye C, Day MJ, Kaye PM. Tissue cytokine response in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001;183:1421-4.

Ramos CC, Duarte MI, Ramos AM. Fatal visceral leishmaniasis associated with acquired immunodeficiency syndrome: report of a case with necropsy findings and immunohistochemical study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(4):245-50.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):293-5.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112:102-16.

Reis LC. Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico [Dissertação] - Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; Recife, 2007.

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol.* 2002;18(7):289-90.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(4):530-41.

Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1486-93.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 1999;81(3):173-84.

Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;71(1):69-76.

Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrio J, Alberola J, Arboix M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 1999;84:33-47.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990;71:267-75.

Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Altet L, Solano-Gallego L, Sanchez-Robert E, Francino O, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007;37:683-93.

Rogers L. A peculiar intralobular cirrhosis of the liver produced by the protozoal parasite of kala-azar. *Ann Trop Med Parasit*. 1908;2:147-52.

Rogers ME, ILG T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004;430(6998):463-7.

Rosario EY, Genaro O, Franca-Silva JC, Da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:197-203.

Ross R. Further notes on leishman's bodies. *Brit Med J*. 1903;2:1401.

Roura X, Fondevida D, Sanchez A, Ferrer L. Detection of Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diag Invest*. 1999;11(4):385-7.

Roura X, Sanchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec*. 144:262-4.

Santa Rosa ICA. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana notificados na região metropolitana de Belo Horizonte [Dissertação] - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais; 1997.

Santos WLC, Badaro JDR, De Freitas LAR. Association between skin and parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2004;92:89-94.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002;104:275-85.

Schilling S, Glaichenhaus N. T cell that react to the immunodominant *Leishmania* major LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun.* 2001;69(2):1212-4.

Sherlock IA, Maia H, Dias-Lima AG. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores de leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996;29(2):207-14.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(6):671-83.

Silva DA, Cabral DD, Bernardina BL, Souza MA, Mineo JR. Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(6):785-9.

Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Barbosa Filho CJ, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary J.* 2013;195:252-3.

Silva MR. Estudo comparativo entre os métodos de ELISA e IFI na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para LVC [Tese]. Universidade de São Paulo – Faculdade de Saúde Pública, 2005.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B.Saunders Co. 1990;450-8.

Slappendel RJ, Greene CE. Leishmaniasis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1990;769-77.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review basead on 95 cases in the Nertherlands. *Vet Quarterly*. 1988;10:1-16.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Quarterly*. 1988;10(1):1-16.

Solano-Fallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001;39:560-3.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. *J Comp Pathol*. 2004;130:7-12.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009;165:1-18.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*. 2001;96:265-76.

Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, Da Matta VL, De Brito T. Cutaneous leishmamasís of the new world: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop*. 1989;46(2):121-30.

Souza VL, Souza JA, Silva TC, Veras PT, Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. *Microbes Infect.* 2000;2:1807-15.

Tafuri WL, De Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitolol.* 2001;96(3):203-12.

Tafuri WL, Michalick MS, Dias M, Genaro O, Leite VH, Barbosa AJ, Bambirra EA, Da Costa CA, Melo MN, Mayrink W. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop.* 1989;31(3):139-45.

Tafuri WL, Tafuri WL, Barbosa AJA, Michalick MSM, Genaro O, França-Silva JC, Mayrink W, Nascimento E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop.* 1996;38(2):81-9.

Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(3): 287-92.

Torrel JM, Pool RR. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Radiol.* 1982;23:243-9.

Torres CM. Alterações cutâneas do cão no kala-azar sul-americano. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1941;36:37-67.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: Relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:119-24.

Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today.* 1993;14(7):335-8.

Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med*. 1977;41(1):1-12.

Vianna G. Sobre urna nova espécie de Leishmania. *Brazil-Medico*. 1911;25(41):41-2.

Vieira, J.B.F.; Coelho, G.E. (1998). Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop*. 31(II):85-92.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassay. In: *Manual of clinical immunology*, Rose, N & Friedman, H. (Editors). Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol. 1980;359-71.

Yamamoto YI, Nunes VLB, Junior FAR, Oshiro ET, Dorval MEMC. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. *Ver Fac Med Vet. Zootec. Univ. S. P.*

Zafra R, Jaber JR, Pérez-Écija RA, Barragán A, Martínez-Moreno A, Pérez J. 2008. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Vet Immunol Immunopathol*. 123:353-9.

Zanette MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [Dissertação] – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba; 2006.