

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS ELISA E
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE
SANGUE DE CÃES PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS ENDÊMICOS E
ENZOÓTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA**

RITA MARIA DA SILVA

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade São Paulo para obtenção
do Grau de Doutor.**

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Almério de Castro Gomes

**São Paulo
2005**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS ELISA E
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE
SANGUE DE CÃES PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS ENDÊMICOS E
ENZOÓTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA**

RITA MARIA DA SILVA

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade São Paulo para obtenção
do Grau de Doutor.**

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Almério de Castro Gomes

**São Paulo
2005**

*Dedico este trabalho à Noca e ao Milton,
meus pais*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Almério de Castro Gomes, orientador, pela possibilidade da realização deste trabalho na Faculdade de Saúde Pública e pelo apoio.

À Dra. Yeda Lopes Nogueira, pela amizade e incentivo, e pela inestimável contribuição na interpretação e análise dos resultados.

À Profa. Dra. Márcia D. Laurenti, do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FMUSP/LIM-50, pela gentileza em ceder o antígeno de *L. chagasi*, bem como as amostras de sangue e à Thaise Y. Tomakame, pelo apoio técnico.

À Dra. Elisa San Martin, do CCZ de São Paulo, por ceder as amostras de sangue dos animais sadios.

As Dras. Regina Gomes de Almeida, e Vânia Lúcia Pessoa Fiório, diretoras da Divisão dos Laboratórios Regionais e do IAL-Rio Claro, por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho na Instituição.

Ao Dr Antonio P. Ferreira, chefe do Laboratório de Produção e Reagentes de Biomanguinhos-Fundação Oswaldo Cruz e sua equipe, pela colaboração e parceria.

Ao PqC. José Antonio Pistarini Berra, da Seção de Sorologia, pelo auxílio na execução dos testes sorológicos.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia do IAL-Rio Claro: Sumaia B. Abdalla, Jane Ap. S. Batista, Marta L. G. Fischer e Fátima L. C. Tosini, pelo apoio técnico na realização do diagnóstico sorológico canino.

As amigas Graça e Lúcia, pelo apoio e carinho e em especial pela revisão do manuscrito.

À PqC. Vera Lúcia F. Camargo Neves da SUCEN, pela coordenação dos inquéritos sorológicos caninos e fornecimento das amostras de sangue.

Aos colegas da SUCEN de Araçatuba, Lílian e Neuzinha pelo envio do material do campo.

À Carmem S. Graciani, pelo companheirismo e pela dedicação na revisão do texto.

Aos membros da Pré-Banca, pelas valiosas contribuições na versão final do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação e em especial ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelo apoio e incentivo.

As secretárias do Departamento de Epidemiologia, pelo apoio as questões administrativas.

Aos professores do curso de Pós-graduação, pelo estímulo e ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do IAL-Rio Claro, pela colaboração sempre que necessária.

Aos amigos Augusto, Helo, Izilda e Liliana, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao Luiz Carlos, pelo amor, companheirismo e principalmente pela paciência em muitos momentos desta jornada.

E finalmente a todos os amigos e à minha família, pela paciência e apoio durante estes anos, e a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1. Casuística	21
5.1.1. Descrição dos inquéritos sorológicos	22
5.2. Coleta e processamento das amostras de sangue	23
5.2.1. Reação de imunofluorescência indireta	23
5.2.2. Ensaio imunoenzimático ELISA	24
5.2.3. Preparo das amostras de sangue para a análise da RIFI semi-quantitativa com o kit Biomanguinhos e com o antígeno de <i>L.chagasi</i>	25
5.2.4. Critério para a leitura dos resultados da RIFI	25
5.3. Obtenção dos antígenos de <i>L.chagasi</i>	29
5.3.1 Procedimentos	29
5. 4. Variáveis do estudo	30
5. 5. Análise estatística	31
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÕES	66
9. RECOMENDAÇÕES	68
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
11. ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

CMDT	Computer Methods for Diagnostic Tests
DAT	Teste de aglutinação direta
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NNN	Meio de Cultura para Leishmania NNN (Novy-MacNeal-Nicole)
PCLVA	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Americana
RIFI-BM	Reação de Imunofluorescência Indireta com <i>kit</i> produzido por Biomanguinhos
RIFI-CH	Reação de Imunofluorescência Indireta com antígeno de <i>L. chagasi</i> produzido no Laboratório de Patologia de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP-
RFC	Reação de fixação de complemento
ROC	Receiver-operator characteristics
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SSTF	Solução salina tamponado com fosfatos
TG-ROC	Two-graph Receiving operator characteristics

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-BM do grupo (A) na diluição 1/20.....	27
Tabela 2: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-BM do grupo (A) na diluição 1/40.....	28
Tabela 3: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-BM do grupo (A) na diluição 1/80.....	28
Tabela 4: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-BM do grupo (A) na diluição 1/160.....	29
Tabela 5: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-CH do grupo (A) na diluição 1/20.....	30
Tabela 6: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-CH do grupo (A) na diluição 1/40.....	30
Tabela 7: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-CH do grupo (A) na diluição 1/80.....	31
Tabela 8: Distribuição das freqüências observadas na leitura da RIFI-CH do grupo (A) na diluição 1/160.....	31
Tabela 9: Valores da leituras realizadas com a técnica RIFI-BM e RIFI-CH em porcentagens, número de amostras, mediana, desvios padrão, valores máximo e mínimo.....	35
Tabela 10: Sumário de resultados da RIFI-BM observados nas diluições 1:20, 1:40, 1:80 e da RIFI-CH na diluição 1:20.....	36
Tabela 11: Resultados do teste ELISA-BM com papel-filtro (DO 0,352) e soro.	38
Tabela 12: Resultados do teste ELISA-BM com papel-filtro (DO 0,214) e ELISA-BM com soro.....	38
Tabela 13: Valores observados no teste ELISA soro e papel-filtro, da média, mediana, desvio padrão e valores máximo e mínimo.....	39
Tabela 14: Freqüência de resultados obtidos com os soros no teste ELISA-BM, segundo diagnóstico clínico.....	39
Tabela 15: Freqüência de resultados obtidos com papel-filtro (DO 0,352), segundo diagnóstico clínico.....	40

Tabela 16: Frequência da variável Diagsoro comparada com exame parasitológico.....	43
Tabela 17: Frequência da variável Diagfil ₃₅₂ comparada com exame parasitológico.....	43
Tabela 18: Frequência entre RIFI-BM papel-filtro com ponto de corte 50% comparada com o exame parasitológico.....	44
Tabela 19: Resultados de inquéritos sorológicos realizados nos municípios: Luiziânia, Rubiácea e Piacatú utilizando o teste ELISA em amostras de sangue em papel-filtro.	45

LISTA DE FIGURAS

- Figuras 1A - 1E:** Leitura da RIFI em microscópio de imunofluorescência das amostras de soro e sangue em papel-filtro, utilizando o critério de cruces em porcentagem (0%-amostra negativa a 100% amostra reagente 4+) **21 a 23**
- Figura 2:** Análise pela curva TG-ROC (sensibilidades e especificidade) na diluição 1:20.....**32**
- Figura 3:** Análise pela curva TG-ROC (sensibilidades e especificidade) na diluição 1:40.....**33**
- Figura 4:** Análise pela curva TG-ROC (sensibilidades e especificidade) na diluição 1:80.....**33**
- Figura 5:** Análise pela curva TG-ROC (sensibilidades e especificidade) para RIFI-papel-filtro em comparação com a RIFI-soro – 30%**34**
- Figura 6:** Análise pela curva TG-ROC (sensibilidades e especificidade) para RIFI-papel-filtro em comparação com a RIFI-soro – 45%**34**
- Figura 7:** Representação da curva ROC em comparação de resultados obtidos soro x papel-filtro.....**37**
- Figura 8A:** Representação da curva ROC para os dois testes RIFIsoro e ELISAsoro.....**41**
- Figura 8B:** Representação da curva ROC para os dois testes RIFIsoro e ELISA-papel-filtro.....**42**

RESUMO

O presente estudo avaliou 2002 amostras de sangue de cães provenientes de áreas endêmicas (região oeste do Estado de São Paulo) e de áreas não endêmicas (município de São Paulo) para leishmaniose visceral americana (LVA), com o objetivo de otimizar os testes sorológicos preconizados pelo Programa de Controle de LVA em inquéritos sorológicos caninos, e produzidos por Biomanguinhos (Reação de Imunofluorescência Indireta / RIFI-BM e Ensaio Imunoenzimático ELISA / ELISA-BM. Para tal, as amostras de sangue foram agrupadas em três bancos de dados: Banco (A) constituído por 97 amostras de sangue assim caracterizadas: 51 amostras com exames parasitológico e sorológico positivo sintomatologia definida como assintomática (2); oligossintomática (18) e sintomática (31); além destas, 46 amostras de sangue sorologicamente negativas das quais 26 tinham exames parasitológico e sorológico negativos e 20 somente com exame sorológico negativo; Banco (B) composto por 174 amostras pareadas de soro e sangue colhidas em papel-filtro das quais 167 com diagnóstico clínico, sorológico e parasitológico positivos; Banco (C) constituído de 1831 amostras de sangue colhidas em papel-filtro, provenientes de 3 inquéritos sorológicos caninos realizados nos municípios de Rubiácea, Piacatú e Luiziana. A RIFI foi realizada quantitativamente nas diluições 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160 e a leitura foi expressa por critério de cruces sendo atribuído porcentagens para cada leitura assim definidas: A) zero (0%), B) + (25%), C) ++ (50%), D) +++ (75%) e E) ++++ (100%). Os resultados dos dois testes RIFI-BM e ELISA-BM foram comparados com os resultados obtidos nos mesmos testes mas utilizando antígeno específico de *Leishmania chagasi* e permitiram concluir que a RIFI com antígeno específico (RIFI-CH) foi capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos verdadeiros positivos. Foi possível ainda observar que a eficiência da RIFI-BM variou de 60% a 76%. Quando se compararam os resultados da RIFI-BM com soro e com papel-filtro, na diluição 1/40, como preconiza o PCLVA, observou-se que para a RIFI com papel-filtro o melhor ponto de corte ficou definido como 30%, ou seja, acima de 1+ (25%) e para o soro o ponto de corte ficou estabelecido em 45%. Portanto o novo parâmetro para o ponto de corte da RIFI-BM deve ser a diluição

1/40 com leituras de 2+ (50%), ou então 1/80 o que seguramente diminuiria o número de falsos positivos. Da comparação de resultados da RIFI-BM com os do ELISA-BM observou-se uma discordância de 23% entre os dois testes, ou seja o ELISA-BM deixou de diagnosticar 23% dos resultados positivos em relação aos observados com a RIFI-BM. O ELISA BioManguinhos forneceu mais resultados falsos positivos com o ponto de corte estabelecido pelo Kit, quando comparado com o novo ponto de corte proposto neste estudo, que foi calculado a partir de controles negativos de eluatos. Quando o ELISA foi avaliado com o novo ponto de corte nas 3 populações caninas dos inquéritos sorológicos (Rubiácea, Piacatú e Luizânia) a soroprevalência diminuiu em quase 50% quando comparado com o mesmo teste com ponto de corte preconizado por Biomanguinhos. Os resultados do estudo demonstraram a urgência de se implementar iniciativas para o aprimoramento de novos testes sorológicos com antígenos específicos que sejam capazes de identificar e separar as diferentes fases da doença.

ABSTRACT

In this study we analyzed 2002 blood samples of dogs living in endemic and non endemic areas for visceral leishmaniasis (VL). The purpose of the study was to optimize the serologic tests produced by the Biomanguinhos (Immunofluorescence test / IFT-BM and enzyme-linked immunosorbent assay / ELISA-BM) and used by the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP). The blood samples were grouped in three different sets: set (A) with 97 blood samples: 51 with clinical sign and symptoms from which 2 were asymptomatic, 18 oligosymptomatic and 31 symptomatic (serology and parasitological also examined); 46 negative serological from which 26 were also examined by parasitological methods.; set (B) with 174 samples comprising serum and blood collected on filter paper with clinical, serological and parasitological diagnostic; set (C) with 1831 samples of blood collected in filter paper from dog serological survey carried out in Rubiácea, Piacatú and Luiziana. The quantitative analyze of the RIFI were made by the dilution 1/20, 1/40, 1/80 and 1/160 and the results expressed by crosses giving the percentage to each class such as: 0% = 0; 25% = +; 50% = ++; 75% = +++; 100% = ++++. The results were compared with those obtained by the same tests using the *L.chagasi* specific antigen and showed that such (RIFI-CH) differentiated the true negative from the true positive. It was also showed the RIFI-BM efficiency varied from 60% to 76%. Comparing the RIFI-BM results under the dilution of 1/40, as indicated by the VLCP, with the samples of the serum and the filter paper the best cut off for the last is 30% or over 1+ (25%) and for the serum 2+ (50%) or 1/80 that for sure will down the false positive number. Comparing the results of the RIFI-BM and ELISA-BM there is discordance around 23% between the two tests that means the ELISA-BM does not diagnostic 23% of the positive results observed by the RIFI. The ELISA Biomanguinhos resulted in more false positive tests with the cut off suggested by the Kit when compared with the cut off obtained in the present study that was estimated from of negative controls of eluted samples. When the ELISA was estimated with the new cut off in the survey of dogs (Rubiácea, Piacatú and Luiziana) the seroprevalence down almost 50%. The results of the study show the urgency in make the tests more efficient to identify and to differentiate the clinical stages.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose visceral é uma das sete endemias mundiais afetando de um a dois milhões de pessoas a cada ano. Estima-se que aproximadamente 360 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo. Ocorre em 47 países e tem como agente etiológico três espécies de *Leishmania* pertencentes à família *Trypanosomatidae*: *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia, *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, nas Américas. Nesta última área a doença recebe a denominação de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou Calazar neo-tropical.

A LVA ocorre em 11 países das Américas do Sul e Central, sendo que no Brasil as principais áreas atingidas são o Nordeste e o Centro Oeste, embora existam focos importantes nas Regiões Norte e Sudeste, principalmente em áreas onde ocorreu perda da cobertura vegetal **(PESSOA, 1982; LAINSON e SHAW, 1987; VIEIRA e COELHO, 1998; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003)**.

No Brasil, a doença vem apresentando caráter endêmico-epidêmico, com média anual de 3 a 4 mil casos novos distribuídos desde Roraima até o Paraná **(CABRERA, 1999)**. Considerada doença predominantemente rural, nas últimas décadas vem sofrendo processo de urbanização, onde cidades de médio ou grande porte têm sido acometidas por verdadeiras epidemias, como é o caso de Santarém (PA), São Luiz (MA), Teresina (PI),

Natal (RN), Aracajú (SE), Montes Claros (MG), Belo Horizonte (MG) e Corumbá (MS) (**VIEIRA e COELHO, 1998**).

Esta mudança no padrão de transmissão da doença se deve principalmente à urbanização do vetor, à participação do cão como reservatório doméstico da *L. chagasi* e à degradação ambiental, juntamente com o processo migratório da população para os grandes centros urbanos (**COSTA et al. 1990; EVANS et al., 1992; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994**).

No Estado de São Paulo, o primeiro relato de suspeita de autoctonia da doença humana foi registrado na Grande São Paulo, em 1978, por IVERSSON (1979) sem confirmação de suspeita. Em 1998, no Município de Araçatuba, foi detectada a presença de *Leishmania sp* em exame parasitológico direto de cães com suspeita clínica de LVA, sendo posteriormente identificada como *L. chagasi*. Estes fatos, aliados à presença do inseto transmissor, *Lutzomyia longipalpis*, notificada em 1997, confirmaram a autoctonia de LVA em cães na área urbana de Araçatuba. Em 1999, no mesmo município, foi relatado o primeiro caso humano autóctone no Estado (**CAMARGO-NEVES e KATZ, 1999**).

Dados recentes da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo têm demonstrado que a endemia encontra-se em franca expansão nos municípios onde o vetor vem se adaptando juntamente com o aumento do fluxo migratório de cães infectados. Desta forma, hoje, em 41 municípios da região oeste do Estado de São Paulo, o vetor *Lu. longipalpis* está presente; 23 deles apresentam transmissão de LVA canina (prevalência de 2,2 a

10,1%) e 13 possuem casos humanos autóctones (**SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo *Lu. longipalpis* a principal espécie nas Américas (**REY, 2001**) e considerada, durante muito tempo, como a única transmissora da doença. Entretanto, **SANTOS et al. (1998)** demonstraram a participação de *Lu. cruzi*, como vetor no Mato Grosso do Sul, e **MARZOCHI et al. (1994)** a de *Lu. Intermedia*, no litoral do município do Rio de Janeiro.

A transmissão da *L. chagasi* ocorre através da picada da fêmea de *Lu. longipalpis*, que ingere com o sangue células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), macrófagos e leucócitos parasitados pelas formas amastigotas, presentes no local da picada. No tubo digestivo do flebotomíneo, estas formas transformam-se em promastigotas, que se multiplicam e são inoculadas em novo repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado (homem ou outro reservatório). No vertebrado, transformam-se rapidamente em amastigotas, fechando assim o ciclo de transmissão (**GENARO, 2000; PESSOA, 1982**).

O ciclo biológico do vetor se dá no ambiente terrestre, passando por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, sendo de aproximadamente 30 dias o período necessário para que o ovo se transforme em fase adulta.

Os principais reservatórios são os canídeos, sendo a raposa, no ciclo silvestre e rural, e o cão doméstico, nas áreas urbanas e periurbanas, os

mais importantes. No Brasil, os principais reservatórios são o cão (*Canis familiaris*) e a raposa (*Dusicyon vetulus*) que mantêm o ciclo da doença no ambiente domiciliar e peridomiciliar; na região amazônica, a raposa *Cerdocyon thous* destaca-se como um canídeo importante. Os gambás também já foram apontados como reservatórios, sendo que as espécies *Didelphis albiventris*, da Bahia, e *Didelphis marsupialis*, da Colômbia (TRAVI, 1994) foram identificadas como portadoras do parasito (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003).

Alguns autores acreditam que a transmissão da LVA, entre cães, possa se dar em decorrência da ingestão de carrapatos infectados, mordedura e cópula; entretanto, a importância epidemiológica destes mecanismos não foi ainda confirmada. Do mesmo modo, a transmissão direta de animal para animal, de animal para pessoa ou de pessoa para pessoa também não foi comprovada até o presente momento (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A leishmaniose visceral humana é caracterizada pela infecção do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), provocada por *L. chagasi*, podendo ser expressa por episódios febris associados a hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, com manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos (**MARZOCHI et al., 1981**).

As respostas do organismo à infecção por LVA podem se dar das seguintes formas: (a) reação local com destruição do parasito fagocitado; (b) fagocitose por histiócitos e interação parasito-hospedeiro, com persistência do parasito no organismo, de forma latente, por tempo indeterminado e (c) fagocitose e multiplicação dos parasitos dentro dos macrófagos com disseminação para o Sistema Retículo Endotelial determinando, na dependência de fatores de risco, um espectro da doença que varia desde formas assintomáticas até o calazar clássico (**SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

Na infecção assintomática não há evidência clínica da doença. Os indivíduos são provenientes de áreas endêmicas e são identificados geralmente através de inquéritos sorológicos populacionais. Estes indivíduos são quase sempre sorologicamente positivos ou reagentes no teste intradérmico. Os títulos de anticorpos geralmente são baixos e podem permanecer positivos por tempo indeterminado (**BADARÓ, 1986 a, b; 1996; BERRAHAL et al. 1996; CASTRO, 1996; GENARO 2000; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

As infecções subclínicas ou oligossintomáticas caracterizam-se por sintomatologia inespecífica como: febre baixa ou ausente, tosse seca, diarreia, sudorese e prostração. Nesta forma da doença, o fígado apresenta-se ligeiramente aumentado. As alterações bioquímicas são pouco expressivas, estando as proteínas totais e frações dentro dos limites da normalidade. Nestes casos, a sorologia para detecção de anticorpos específicos anti-leishmânia é positiva e fundamental para o diagnóstico. A intradermorreação é geralmente negativa e quando positiva indica bom prognóstico. Os sintomas podem persistir, por até seis meses, com resolução espontânea sem terapêutica específica (cura espontânea) ou evoluir para o calazar clássico, no período de 2 a 15 meses. O hemograma geralmente está dentro dos limites normais e a velocidade de hemossedimentação (VHS) é elevada. A pesquisa do parasita no creme leucocitário e no aspirado de medula óssea é de baixa positividade, tanto no exame direto quanto na cultura em meio específico; todavia, o resultado da biópsia hepática pode ser positivo (**BADARÓ, 1986 a, b; 1996; CASTRO, 1996; BADARÓ e DUARTE, 1997; GENARO, 2000; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

A infecção aguda caracteriza-se por um quadro febril, que pode persistir por mais de duas semanas com história de tosse e diarreia. Nesta forma, a hepatoesplenomegalia é moderada e as proteínas totais e frações estão discretamente aumentadas. A anemia é pouco expressiva e a hemoglobina apresenta-se aumentada; o número de leucócitos geralmente está normal com predominância de células linfomonocitárias. A sorologia

para detecção de anticorpos anti-leishmânia é positiva, com títulos acima de 256, e a intradermorreação é negativa. A pesquisa do parasito em material de aspirado esplênico ou de medula óssea pode ser positiva, tanto em esfregaço como em cultura em meio específico (**BADARÓ, 1986 a, b; 1996; CASTRO, 1996; BADARÓ e DUARTE, 1997; GENARO, 2000; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

Na forma sintomática ou calazar clássico os sintomas são bastante acentuados: a doença tem evolução prolongada com febre irregular, anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e proeminente hepatoesplenomegalia; porém, o aumento do fígado não assume as proporções do crescimento do baço. Os exames laboratoriais complementares estão todos alterados, havendo inversão da relação albumina/globulina; as aminotransferases e bilirrubinas estão aumentadas. A sorologia para detecção de anticorpos anti-leishmânia também é fortemente positiva com títulos acima de 4000 e a intradermorreação é negativa. A pesquisa do parasito é positiva tanto em esfregaços de baço e de medula óssea como em cultura (**BADARÓ, 1986 a, b; 1996; CASTRO, 1996; BADARÓ e DUARTE, 1997; GENARO, 2000; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

A sintomatologia da infecção canina apresenta o mesmo espectro de variação que a humana e, de acordo com **GENARO (2000)**, os cães soropositivos são classificados clinicamente como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Na forma assintomática os animais não apresentam sintomas da infecção por LVA, mas representam quase 60% da

soropositividade em áreas endêmicas. Em geral, possuem baixos títulos de anticorpos e normalmente a infecção encontra-se em fase inicial. Por outro lado o exame parasitológico de pele revela que aproximadamente 67% destes animais são positivos demonstrando sua importância na cadeia de transmissão da doença. Na forma oligossintomática, cerca de 17% dos cães são soropositivos; os animais apresentam os primeiros sinais clínicos da doença, sorologia positiva e parasitismo cutâneo em torno de 71%. Os animais sintomáticos constituem 25% dos soropositivos, de uma área endêmica, e o parasitismo cutâneo é neles em torno de 81%. Demonstram os sinais característicos da doença como: emagrecimento, alopecia, dermatite furfurácea, lesões crostosas, onicogribose e outros, progredindo para a caquexia e óbito.

LANOTTE et al. (1979), trabalhando com cães infectados por *L. infantum*, identificaram quatro formas clínicas da doença: a) aguda, com sintomas de emagrecimento progressivo; b) subaguda, cujos principais sintomas são anemia, emagrecimento, poliadenopatia, onicogribose e ulcerações cutâneas; c) crônica, com longo período de latência e finalmente d) latente, cujos sinais clínicos são pouco intensos, com evolução para resolução espontânea da doença. Estes mesmos autores, através de estudos imunoclínicos com cães de uma área endêmica para *L. infantum*, na França, observaram que a doença se manifestava de duas formas distintas: uma com sintomatologia víscero-cutânea (patente) e altos níveis de anticorpos e a outra, onde os animais não apresentavam sintomas e os títulos de anticorpos eram sempre baixos, podendo evoluir para cura

espontânea ou desenvolver a doença. Já **MANCIANTI et al. (1988)** trabalhando com cães infectados com *L. infantum*, na Itália, identificaram três estágios da doença: assintomático, oligossintomático (adenopatia linfóide, perda de peso) e sintomático (sinais severos da doença tais como: alterações cutâneas, onicogrifose, ceratoconjuntivite etc.).

Determinados autores discutem a relação entre a sintomatologia da LVA canina com o potencial de transmissão da doença, abordando a relação entre a forma clínica da LVA canina e infectividade do flebotomíneo (**EVANS et al. 1990; TESH 1995; ARIAS et al. 1996; VIEIRA et al. 1998 e ASHFORD et al. 1998**). Dessa forma, **DYE (1992) e HASIBEDER et al. (1992)**, através de modelos matemáticos de LVA canino, previram que cães assintomáticos seriam incapazes de infectar os flebotomíneos e **MOLLINA et al. (1994)**, estudando o grau de infectividade de cães naturalmente infectados, observaram diferentes taxas de infecção dos flebotomíneos que se alimentaram nestes animais, independentemente da forma clínica dos mesmos.

Por outro lado, outros trabalhos têm demonstrado que a retirada dos cães pode diminuir a incidência de casos humanos da doença. Citam-se, por exemplo, os levantamentos de **MAGALHÃES et al. (1980); ASHFORD et al. (1998); OLIVEIRA et al. (2001); CALLADO et al. (2001)**.

A eliminação do cão soropositivo nas áreas endêmicas, como medida de controle da LVA, tem sido bastante discutida. **DIETZE et al (1997)**, estudando o impacto da retirada de cães na transmissão da LVA, em três cidades do Espírito Santo, não observaram diferença significativa nas taxas

de soropositividade humanas. Resultados encontrados por **CABRERA (1999)** e **PAULA (2001)** também questionam a efetividade de eliminação dos cães, uma vez que outros reservatórios podem ser os responsáveis pela manutenção da doença em determinadas áreas.

O diagnóstico da LVA é feito com base em critérios epidemiológicos (procedência de área endêmica ou história de viagem para áreas endêmicas, ocorrência dos casos caninos e presença do vetor na residência); clínicos (presença de sinais clínicos) e laboratoriais (demonstração do parasito ou detecção de anticorpos por métodos sorológicos) (**BADARÓ, 1996**).

No caso da leishmaniose visceral canina (LVC), o diagnóstico também se baseia nas características clínicas e epidemiológicas do animal bem como nas características laboratoriais. Nestes casos, o método de escolha é a demonstração do parasito através do exame parasitológico direto de amostras de lesões de pele, de biópsia de linfonodo ou de medula óssea. A demonstração do parasito consiste na detecção das formas amastigotas, em esfregaços corados com Giemsa, de material colhido da medula óssea, fígado, baço e linfonodo, podendo este mesmo material ser cultivado em diferentes meios de cultura para isolamento dos parasitos (**GENARO, 2000; SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**).

A sensibilidade do método parasitológico direto é variável nos diferentes órgãos dos quais o material é retirado. Na medula óssea, a sensibilidade varia de 54% a 86%; o baço apresenta positividade de 90% a

98% e os linfonodos 60% a 64% (**WHO, 1984; SIDDIG et al. 1988 e KAR, 1995**).

Os métodos imunológicos constituem instrumentos auxiliares importantes no diagnóstico da LVA. Porém, quando extratos solúveis de *Leishmania*, ou mesmo o parasita inteiro, são utilizados como antígeno há que se considerar suas limitações com relação à especificidade e reprodutividade. Casos de infecção subclínica ou assintomática geralmente têm baixos títulos de anticorpos e, na maioria das vezes, estão próximos do ponto de corte do teste. Além disto, é a faixa onde a reatividade cruzada é observada (**BADARÓ, 1996b**).

Os diferentes métodos disponíveis para a detecção de anticorpos no soro ou no sangue como a reação de fixação de complementos (RFC), o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos ELISA, Fast-ELISA e Dot-ELISA, já foram aplicados ao diagnóstico de LVA, tanto canina como humana e suas potencialidades diagnósticas foram demonstradas por diferentes autores.

A RFC foi bastante utilizada no passado devido à possibilidade de sua aplicação para o caso de amostras de sangue colhidas em papel-filtro (**PELLEGRINO e BRENER, 1958**), fato que a torna prática em estudos populacionais. Durante muito tempo, ela foi adotada pelo Ministério da Saúde em inquéritos sorológicos de LVA e, posteriormente, substituída pela RIFI (**COSTA et al, 1991**). **ALLAIN & KAGAN (1975)** utilizaram o DAT em amostras de soro de indivíduos sadios e em pacientes com leishmaniose

visceral (LV) e cutânea (LC), empregando, como antígeno, promastigotas de três espécies de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. tropica*. Seus resultados revelaram, para pacientes com LV, uma positividade entre 61% a 96% com os três antígenos e para os portadores de LC uma positividade de 81% com o antígeno de *L. braziliensis* e de 54% a 55% com os outros dois. Os soros normais foram reativos nos títulos ≤ 16 , com os antígenos de *L. donovani* e *L. braziliensis*, e no título de 128 para o antígeno de *L. tropica*. Isso demonstra que a sensibilidade do DAT foi satisfatória na detecção de anticorpos, no caso de pacientes com as duas formas da doença. Entretanto, o teste se mostrou pouco específico uma vez que foi observada reação cruzada com o antígeno de *T. cruzi*. Como conclusão, os autores sugerem que o teste poderia ser utilizado rotineiramente em laboratório para diagnóstico das leishmanioses. Já **HARITH et al., (1986)** utilizaram o DAT modificado em amostras de soro de duas populações: uma formada por indivíduos portadores de leishmaniose visceral, confirmada parasitologicamente, previamente tratada e outra representada por indivíduos infectados por outros parasitas (esquistossomose, doença de Chagas, hanseníase, tuberculose, giardíase e toxoplasmose). O grupo-controle foi constituído por amostras de sangue de indivíduos provenientes de regiões livres da doença. Como antígeno, empregaram promastigotas de *L. donovani* tratadas com tripsina, fixadas com formalina e coradas com azul brilhante de Coomassie e os resultados demonstraram índices de sensibilidade de 100% e de especificidade variando entre 99,3% a 100%.

Nessa mesma pesquisa, os autores indicam a utilização do DAT em áreas endêmicas de LV, para o diagnóstico individual e populacional.

No caso de LVA canina, **NEOGY et al. (1992)** avaliaram o DAT em cães de uma área endêmica de Córsega, no Mediterrâneo, demonstrando uma sensibilidade de 95,4%, em amostras com títulos iguais ou superiores a 160, e uma especificidade de 100% para amostras onde os cães eram portadores de outras doenças. **SEMIÃO-SANTOS et al.(1996)**, utilizaram o DAT em estudo de diagnose de LV em reservatórios domésticos e silvestres, em duas áreas endêmicas de Portugal. Comparando esta técnica com a RIFI e com os resultados clínicos e parasitológicos, os autores encontraram uma concordância de 81,25% entre as duas técnicas sorológicas.

Atualmente, os métodos diagnósticos mais utilizados nos Programas de Controle de LVA são a RIFI e o ELISA. A RIFI ainda é o método escolhido para inquéritos soropidemiológicos, pelos seus bons níveis de sensibilidade, que variam entre 90% a 100%, e de especificidade, ao redor de 80% (**ALVES e BEVILÁQUA 2004**). Também os métodos imunoenzimáticos vem sendo utilizados no diagnóstico das leishmanioses, desde 1971, para detecção de anticorpos específicos, tanto na infecção humana como na canina, sendo a escolha do antígeno de extrema importância para a boa especificidade do teste (**BADARÓ e REED, 1996**).

EDRISSIAN & DARABIAN (1979), num estudo comparativo entre o ELISA e a RIFI, utilizaram antígeno de *L. donovani* em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e com leishmaniose visceral (LV). Seus resultados indicaram maior sensibilidade do ELISA em relação à RIFI, porém

com menor especificidade. Observaram, também, para os dois testes, a ocorrência de reação cruzada com outras doenças infecciosas, como malária, tifo e síndrome da larva migrans. Entretanto, esse fato não prejudica a utilização dos dois testes para o diagnóstico de LVA, uma vez que os pacientes sempre apresentavam títulos maiores do que os portadores daquelas doenças infecciosas. **BADARÓ et al (1983)** avaliaram os parâmetros de sensibilidade e especificidade da RIFI, em pacientes humanos com LVA e com a doença de Chagas, utilizando como antígeno as formas amastigotas e promastigotas de *L.mexicana* e *L. chagasi*. Os autores observaram que, com o antígeno de promastigotas de *L. chagasi*, a sensibilidade do teste no título de 128 foi de 100% e a especificidade no título de 32 de 98%. Neste caso, foi observada reação cruzada em pacientes portadores de Chagas. Utilizando antígeno de amastigota de *L. chagasi*, nestes mesmos títulos, verificaram que a sensibilidade foi próxima de 100% e a especificidade foi de 91%, já com o antígeno de *L. mexicana* a especificidade foi de 80%. Segundo os autores, a RIFI com promastigotas de *L. chagasi* pode ser o método de escolha para o diagnóstico de LVA em áreas onde a doença de Chagas também seja endêmica. **SAVANI et al., (2003)**, em inquérito sorológico com cães do Município de São José do Rio Preto, utilizaram a RIFI com antígeno de promastigotas de *L. chagasi* e observaram um maior número de reações cruzadas em títulos iguais ou inferiores a 40. **MARCONDES et al. (2003)**, estudando uma área não endêmica para LVA (Santa Maria e municípios vizinhos, RS), empregaram a RIFI confirmando a ausência de transmissão canina da doença LVA.

A aplicabilidade e os parâmetros de sensibilidade e especificidade da RIFI com papel-filtro, metodologia preconizada pelo Ministério da Saúde desde 1971, tem sido analisada por diferentes autores. **EVANS et al. (1991); BRAGA et al. (1998); ALVES e BEVILÁQUA (2004).**

3. JUSTIFICATIVA

Desde a década de 1960, o Ministério da Saúde vem desenvolvendo o controle da infecção canina em diversos estados da Federação, através da redução populacional do vetor e da identificação e eliminação de cães infectados. Foram propostos determinados métodos diagnósticos, para a identificação de cães infectados, sendo utilizado, no início, o exame parasitológico de pele ou vísceras, bem como a reação de fixação de complemento para detecção de anticorpos. A partir de 1982, a técnica de imunofluorescência tem sido preconizada para o sangue colhido em papel-filtro sendo os testes mais utilizados, nos programas oficiais de controle da LVA, a reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático ELISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Em geral, os programas de controle de LVA preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos visando conhecer a situação epidemiológica da doença, nas áreas com transmissão ativa ou em potencial, e ao mesmo tempo identificar os cães sorologicamente positivos para posterior eliminação. Entretanto, **BRAGA, et al. (1998)** enfatizam a importância dos parâmetros sensibilidade e especificidade, dos testes, quando avaliam o impacto da eliminação do cão frente à metodologia sorológica empregada. **ALVES e BEVILÁQUA (2004)**, numa análise crítica da metodologia diagnóstica utilizada nos inquéritos epidemiológicos realizados em Belo Horizonte – MG, sugerem que a utilização da RIFI poderia comprometer a efetividade do Programa de Controle da LVA por não estar detectando animais infectados, os falsos negativos, e ao mesmo

tempo, identificando cães não infectados (falsos positivos) com consequente recomendação de sua eliminação, de acordo com o Programa de Controle da Doença.

CABRERA (1999), estudando a epidemiologia da LVA em Guaratiba (RJ), destaca que determinados marsupiais, que freqüentam o ambiente peridoméstico, poderiam representar reservatórios de *L. chagasi* indicando que a eliminação de cães soropositivos, como medida de controle da doença nessa área, é discutível.

A correlação entre o estado clínico do cão e sua infectividade para o flebotomídeo também deve ser considerada nas discussões para a adoção de medidas de controle da LVA canina, uma vez que **PINELLI et al. (1994)** observaram que animais assintomáticos e aqueles com manifestações clínicas na forma grave apresentavam respostas celulares e humorais bastante distintas.

No Estado de São Paulo, o Programa de Controle adota como método sorológico a Reação de Imunofluorescência Indireta utilizando *kits* padronizados por Biomanguinhos (RIFI-BM). Esta técnica, quando utilizada em eluato de papel-filtro, tem sua sensibilidade reduzida, se comparada com ELISA realizada em soro (**BRAGA et al., 1998; FERREIRA et al. 2000**).

Sendo assim, o presente estudo propôs uma avaliação dos testes sorológicos RIFI e ELISA, padronizados por Biomanguinhos (RIFI-BM e ELISA-BM) e preconizados pelo Programa Estadual de Controle de LVA,

com o objetivo de identificar novos pontos de cortes para discriminar os binômios: infecção latente/doença e infecção latente/não doença.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

- Comparar os testes sorológicos RIFI-BM e ELISA-BM na identificação da soroprevalência da infecção por LVA, em amostras de sangue de cães, colhidas em papel-filtro, provenientes de inquéritos soropidemiológicos realizados em três municípios, classificados, na ocasião da coleta, como município silencioso, não receptivo (ausência da doença), município silencioso receptivo (pré-endêmico) e município em investigação (endêmico).

4.2. ESPECÍFICOS

- Comparar os resultados obtidos com a RIFI-BM e o ELISA-BM, com aqueles obtidos utilizando estes mesmos testes, porém, com antígeno específico de *L. chagasi* (RIFI-CH e ELISA-CH).
- Estimar parâmetros de acurácia dos dois testes, RIFI-BM e o ELISA-BM, a fim de utilizá-los como instrumento de medida de soroprevalência.
- Estimar o melhor ponto de corte para os parâmetros de sensibilidade e especificidade, entre os testes RIFI, utilizando o teste RIFI-CH como referência.
- Estimar medidas de eficiência e a capacidade de classificação correta e incorreta da infecção, nos dois testes.

- Reavaliar os inquéritos, relacionados no objetivo geral, com as estimativas dos parâmetros de sensibilidade e especificidade através dos novos valores para os pontos de corte, definidos para os dois testes sorológicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Casuística

Foram selecionadas 2002 amostras de sangue, colhidas em papel filtro, de cães provenientes de municípios com e sem transmissão de LVA canina; essas amostras foram agrupadas em três bancos de dados:

(A): População-referência, constituída por 97 amostras de soro. Dentre elas, 51 pertenciam a cães provenientes de áreas endêmicas para LVA, que haviam sido submetidos a exames clínicos e com parasitológico e sorológico positivos, sendo 31 classificados como sintomáticos, 18 definidos como oligossintomáticos e 2 como assintomáticos. Outras 26 amostras pertenciam a cães sorologicamente negativos e com exames clínico e parasitológico também negativos, cedidos pela Profa. Dra. Márcia D. Laurenti do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. As restantes amostras (20), cedidas pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo, eram de cães provenientes do município de São Paulo, considerada área não endêmica.

(B): representados por 167 amostras pareadas, de soro e sangue colhidas em papel filtro, de cães, com exames clínicos, e com parasitológico e sorológico positivos, provenientes de inquéritos sorológicos realizados em municípios endêmicos do Estado de São Paulo (Araçatuba e Andradina). Com o objetivo de avaliar o ponto de corte que melhor separasse as diferentes formas clínicas da doença dos animais não doentes, foram

acrescentadas sete amostras de sangue colhido em papel filtro sorologicamente negativas, de animais provenientes destes mesmos municípios, compondo assim uma população com distribuição sintomatológica conhecida.

(C): 1831 amostras de sangue colhido em papel-filtro da população canina dos municípios Luiziânia, Rubiácea e Piacatú (região de Araçatuba, noroeste do estado de São Paulo), que foram submetidos a inquéritos sorológicos no ano de 2003.

5.1.1. Descrição dos inquéritos sorológicos

Cada um desses três municípios apresentava uma determinada situação epidemiológica, segundo a classificação de municípios proposta pelo Programa de Controle de LVA (PCLVASP): **Luiziânia**, que contribuiu com 720 amostras, pertencia a categoria de município silencioso não receptivo (sem transmissão canina e sem vetor); **Rubiácea**, de onde foram coletadas 504 amostras, representava um município silencioso receptivo (com vetor e sem cães soropositivos) e **Piacatú**, de onde foram obtidas 607 amostras, foi classificado como município em investigação (vetor presente e ocorrência de cães soropositivos).

Luiziânia apresenta uma área de 168 km² e uma população de 4.274 habitantes; a população canina neste município era de 807 cães. Rubiácea dista 560 km da capital, com comunicação pela Rodovia Marechal Rondon, e apresenta uma área de 257 km² com população estimada em 2.236 habitantes; a população canina era de aproximadamente 749 cães, sendo

650 da zona urbana. Piacatú localizado ao sul da micro região de Araçatuba, possui área de 216 km² situando-se a 550km da capital paulista. Possui aproximadamente 4.785 habitantes (743 na zona rural e 4042 na zona urbana) e uma população canina estimada em 812 cães sendo 700 em zona urbana.

5.2. Coleta e processamento das amostras sangue colhidas em papel-filtro.

As amostras para os inquéritos foram obtidas conforme preconizado pelo PCLVA do Estado de São Paulo (**SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003**): colhidas em papel-filtro Whatman nº 1, secas em temperatura ambiente e armazenadas a 4°C até o momento do uso. Tanto para a RIFI como para o ELISA, utilizaram-se *kits* padronizados por Biomanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz, com antígeno de *L. major*.

5.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada segundo recomendação do *Kit* (**Anexo 1**). Para cada papel-filtro, contendo amostras de sangue, foram confeccionados dois discos de 6mm de diâmetro submetidos a uma eluição em SSTF (solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7.2), resultando numa diluição de aproximadamente 1/40 do soro (**FERREIRA e CARVALHO, 1982**). As lâminas, impregnadas com antígeno, foram secas em temperatura ambiente por 24 horas, para melhor fixação dos parasitos. Os conjugados foram diluídos segundo máxima reatividade e os controles positivos / negativos

utilizados como nas amostras testes, na diluição 1/40. As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência, com objetiva de 40x, sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram fluorescência na membrana dos parasitos e não reagentes as que não apresentavam fluorescência.

5.2.2. Ensaio Imunoenzimático ELISA

O teste ELISA foi realizado segundo protocolo do *Kit (Anexo 2)*. Seguindo o mesmo procedimento da RIFI, dois discos do papel-filtro foram eluidos no diluente específico do *kit* (1 hora sob agitação) de maneira a obter uma diluição correspondente a aproximadamente 1/100 do soro. Foram utilizadas, como controle, duas amostras de soros positivos e duas de soros negativos na diluição 1/100. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com filtro de 450nm. O ponto de corte do teste foi determinado conforme recomendação do *kit*: média das densidades óticas dos soros controles negativos multiplicada por três. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram densidade ótica igual ou superior ao ponto de corte e não reagentes as que apresentaram densidade ótica inferior a ele.

O ELISA também foi avaliado, nas amostras de sangue pertencentes ao banco B, tanto para os eluatos como para as amostras de soro. O mesmo procedimento, preconizado no *kit (Anexo 2)*, foi adotado para este grupo de animais utilizando, entretanto, o antígeno específico de *L. chagasi*. O ponto de corte também foi calculado, segundo metodologia definida no *kit (Anexo*

2), usando a média das leituras das densidades óticas (DOs) dos dois soros controles negativos multiplicado por 3. O ponto de corte foi ainda recalculado com base na média das DOs de sangue colhido em papel-filtro pertencente a 9 cães de área não endêmica.

5.2.3. Preparo das amostras de sangue colhidas em papel filtro para a análise da RIFI semi-quantitativa realizada com o *Kit Biomanguinhos* e com antígeno de *L. chagasi*

Para esta análise, foram avaliadas pela RIFI semi-quantitativa as amostras da população referência (banco A), nas diluições 1/20; 1/40; 1/80 e 1/160. Os testes foram realizados em duplicatas e as amostras foram renumeradas, de modo que as leituras foram feitas na forma de um teste cego. Para a RIFI-BM foram seguidas as recomendações descritas no **Anexo 1** e, para a RIFI com antígeno de *L. chagasi*, (RIFI-CH) foi adotada a metodologia de **Moreira (2003)** descrita no **Anexo 3** usando, porém, os mesmos reagentes do *Kit Biomanguinhos* (**Anexo 2**) para a revelação da reação.

5.2.4. Critérios para a leitura dos Resultados da RIFI semi-quantitativa

As leituras da RIFI, em microscópio de fluorescência com aumento de 400 vezes, foram realizadas de acordo com critério sugerido por **NOGUEIRA (2004)**, em que a gradação da quantificação é dada em número de cruzes e o equivalente em porcentagens: A) zero (0%); B) + (25%); C) ++ (50%); D) +++ (75%) e E) ++++ (100%). As porcentagens referem-se à quantidade de

parasitos fluorescentes, observados no campo visual do microscópio. Como regra geral, o campo visual do microscópio foi dividido em quatro quadrantes e para cada um, preenchido com focos fluorescentes, atribuiu-se 25% de fluorescência. As figuras de 1A - 1E ilustram cada uma das situações.

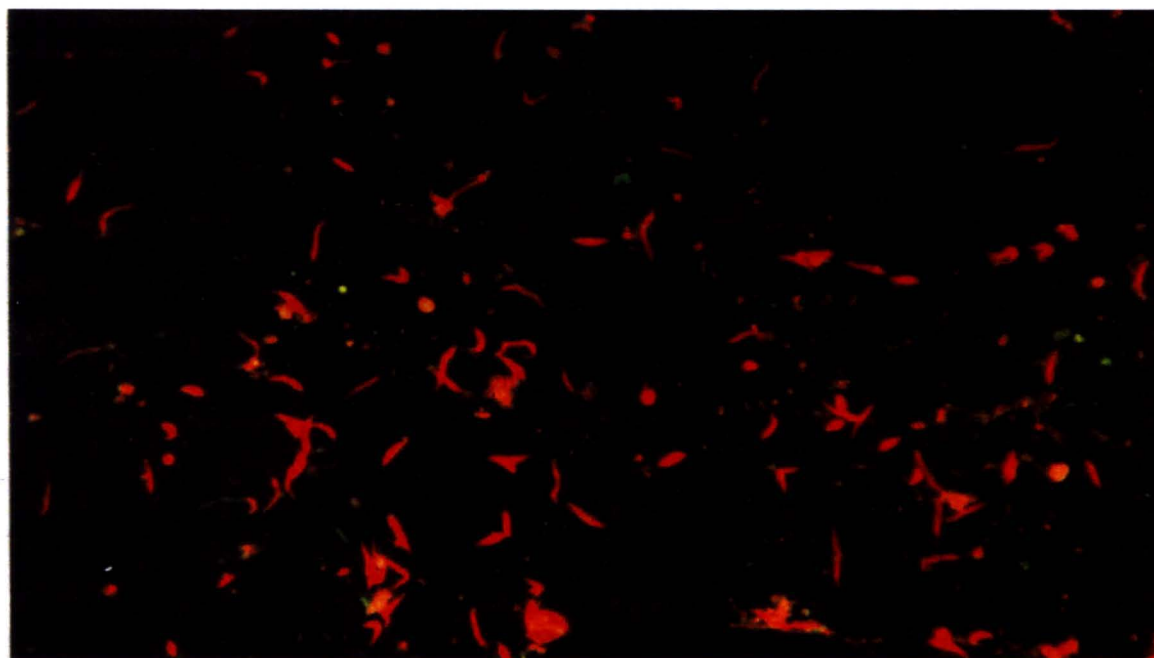


Figura 1A. Leitura da RIFI-CH, realizada em microscópio de fluorescência.
Amostra não reagente: 0 (0%).



Figura 1B. Leitura da RIFI-CH, realizada em microscópio de fluorescência.
Amostra reagente: 1+(25%).

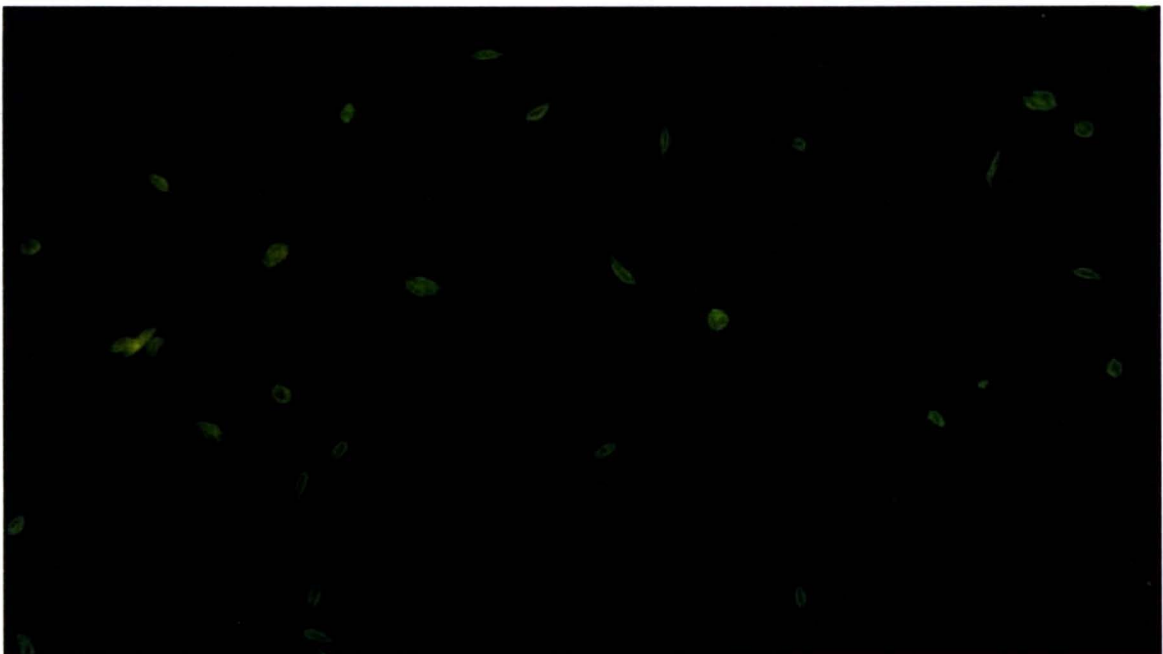


Figura 1C. Leitura da RIFI-CH, realizada em microscópio de fluorescência.
Amostra reagente: 2+(50%).

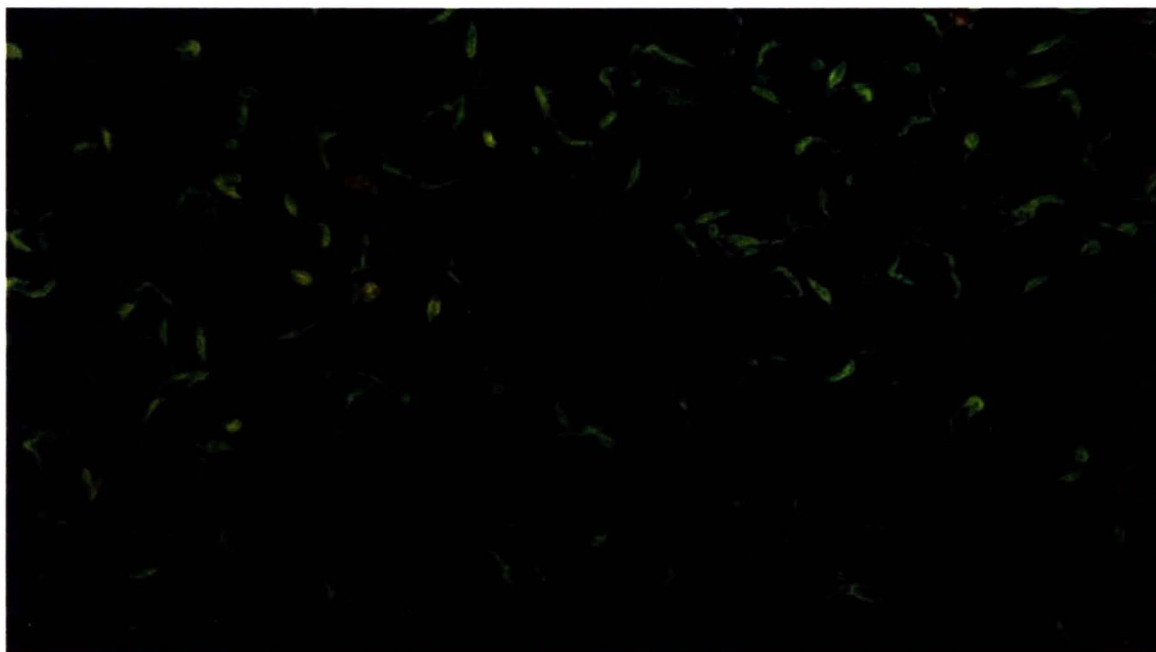


Figura 1D. Leitura da RIFI-CH, realizada em microscópio de fluorescência.
Amostra reagente: 3+(75%).

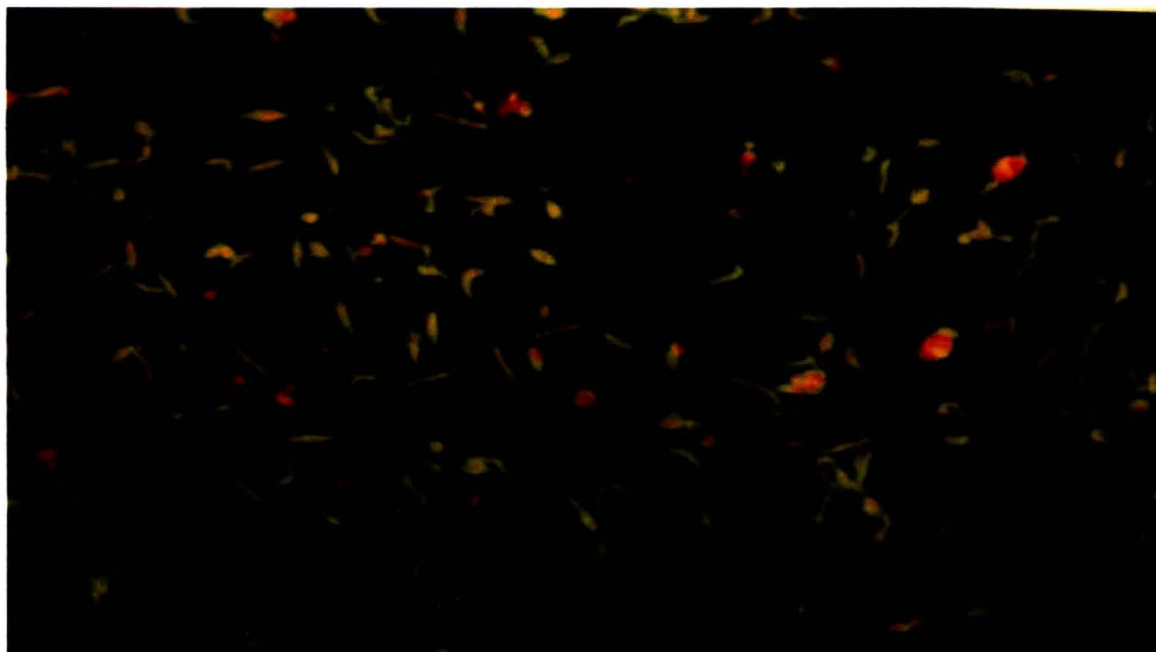


Figura 1E. Leitura da RIFI-CH, realizada em microscópio de fluorescência.
Amostra reagente: 4+ (100%).

5.3. Obtenção dos antígenos de *L. chagasi*.

Os antígenos de *L.chagasi* foram produzidos, segundo metodologia de **MOREIRA et al. (2003)**, no Laboratório de Patologia de Doenças Infecciosas (LIM-50) do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina da USP e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Márcia D. Laurenti.

5.3.1. Procedimentos

Hamsters, infectados cronicamente com *L. chagasi*, foram sacrificados; a região abdominal desses animais foi aberta assepticamente e seus baços removidos. Fragmentos desse órgão foram colocados em tubos contendo meio de cultura NNN-fase sólida (Nicolle McNeal &Novy), acrescidos de RPMI-fase líquida (**TRAGER & JENSEN, 1976**). Após 5 - 7 dias de cultivo essas culturas foram repicadas, com o objetivo de obter massa de antígeno suficiente. Uma semana após o repique, os parasitos foram lavados três vezes com PBS (3000 rpm /10 minutos), centrifugados e re-suspensos em formalina 2%; essa solução foi mantida em temperatura ambiente ou em geladeira. Em seguida, uma alíquota foi lavada com PBS por três vezes, centrifugada a 3000 rpm /10 minutos e novamente re-suspensa em PBS para a contagem dos parasitos, cuja concentração ótima estava em 1×10^6 parasitos/ml. As lâminas foram impregnadas com 15 μ l da suspensão de parasitos/orifício, secas em estufa ou temperatura ambiente e armazenadas à -20 °C até o momento de uso. O procedimento da reação foi o mesmo do item 4.2.1., porém as amostras de soro ou papel-filtro foram processados em diluições seriadas (1/20, 1/40, 1/80 e 1/160).

No caso do ELISA, também foi utilizado o centrifugado do cultivo de baço de hamsters infectados cronicamente com *L. chagasi*. Esse cultivo foi lavado 3 vezes em PBS (3000 rpm / 10 minutos) e após três ciclos de congelamento / descongelamento do centrifugado de parasitos, foram adicionados à suspensão três inibidores de protease PMSF - 5 µg/ml de antipain e leupeptin 1 µg/ml cada um). Essa mesma preparação foi sonicada por três ciclos de 30 segundos, na intensidade de 40 KHz e a concentração proteica do antígeno, 20,8 µg/ml, foi obtida pelo método de **LOWRY et al. (1951)**, utilizando 100 µl para sensibilização de cada orifício da placa. O procedimento da reação foi o mesmo descrito no item 4.2.2.

5.4. Variáveis de estudo

Foram consideradas variáveis de estudos os seguintes parâmetros:

- **leitura da RIFI:** variável ordinal baseada em cruces e transformada em porcentagens: 0 (0%); 1+(25%); 2+(50%);3+(75%) e 4+(100%)
- **variável clínica:** variável nominal que define o estado clínico dos cães: sintomático, assintomático, oligossintomático e sadio.
- **variável soro:** variável ordinal representada por diluições seriadas: 1/20, 1/40/, 1/80 e 1/160
- **variável diagnóstico RIFIsoro:** variável tipo categórica (+ e -); resultado da RIFI (+) na diluição 1/40
- **variável diagnóstico RIFI 50%:** variável tipo categórica; resultado (+) para a RIFI na diluição 1/40 acima de 2+ ou 50% e resultado (-) abaixo de 2+ incluindo como negativo todos os resultados 1+ (25%)

- **variável diagnóstico DOsoro:** variável tipo categórica; são os resultados obtidos no teste ELISA, em D.O. com ponto de corte calculado conforme *Kit Biomanguinhos (Anexo 2)*, utilizando como controle negativo amostras de soro; resultado (+) D.O. $\geq 0,214$ e resultado (-) $< 0,214$
- **variável diagfiltro₃₅₂:** variável tipo categórica; são os resultados obtidos no teste ELISA, em D.O. com ponto de corte calculado utilizando como controle negativo amostras de sangues colhidas em papel-filtro; resultado (+) D.O. $\geq 0,352$ e resultado (-) $< 0,352$
- **variável exame parasitológico:** variável tipo categórica; resultado (1) = exame parasitológico negativo, (2) = exame parasitológico positivo e 1 (s) = exame parasitológico negativo, porém apresentando estruturas muito semelhantes às formas amastigotas
- **variáveis populacionais:** resultados do teste ELISA dos inquéritos sorológicos com ponto de corte calculado utilizando soro e com ponto de corte de calculado com sangue em papel-filtro; resultados Luiziana (0,203) / Luiziana (0,352), Rubiácea (0,213) / Rubiácea (0,352) e Piacatú (0,238) / Piacatú (0,352)

5. 5. Análise estatística

Foi feita a partir de análises exploratórias de gráficos dos valores obtidos em cada teste sorológico RIFI e ELISA. Para tanto, foram observados os resultados de leituras da RIFI-BM e RIFI-CH, em amostras de soro e de sangue em papel-filtro, e das densidades óticas obtidas pelos testes ELISA-BM e ELISA-CH nas amostras de soro e de sangue em papel-

filtro. Foram avaliados, também, as distribuições nas tabelas de frequências, as médias, as medianas e os desvios-padrão dos resultados no banco (A). As estimativas dos pontos de corte e dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, eficiência, curva ROC (Receiver Operator Characteristics) e TG-ROC (Two-graph Receiving Operator Characterisitcs) foram realizadas com os pacotes estatísticos Medcalc (**SCHOOJANS,1998**) e CMDT (**BRIESOFSKY, 2004**) .

6. RESULTADOS

As tabelas 1 a 4 mostram as freqüências observadas nas leituras das reações de imunofluorescência das quatro diluições seriadas do teste RIFI-BM para a população referência, em relação a sintomatologia clínica desta população.

Tabela 1: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:20 com o teste RIFI-BM, segundo a variável clínica.

*Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/20								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	16	19	6	1	1	0	1	44
Sintomático	0	1	9	6	9	2	3	30
Oligossintomático	0	0	4	3	6	2	3	18
Assintomático	0	0	0	0	1	0	1	2
Total =94	16	20	19	10	17	4	8	94

$p < 0,0001$

Qui quadrado=71,9

Coefficiente de contingência = 0,654

Tabela 2: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:40 com o teste RIFI-BM, segundo a variável clínica.

* Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/40								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	22	16	5	0	1	0	0	44
Sintomático	0	1	10	7	7	1	4	30
Oligossintomático	0	1	4	4	6	1	2	18
Assintomático	0	0	0	2	0	0	0	2
Total = 94	22	18	19	13	14	2	6	94

$p < 0,0001$

Qui quadrado=80,8

Coefficiente de contingência = 0,680

Tabela 3: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:80 com o teste RIFI-BM, segundo a variável clínica.

* Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/80)								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	25	10	5	1	2	0	1	44
Sintomático	1	3	12	4	7	1	2	30
Oligossintomático	0	4	6	2	5	1	0	18
Assintomático	0	0	0	2	0	0	0	2
Total = 94	26	17	23	9	14	2	3	94

$p < 0,0001$

Qui quadrado = 65,7

Coefficiente de contingência = 0,641

Tabela 4: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação da imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:160 com o teste RIFI-BM, segundo a variável clínica.

Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/160								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	23	14	2	2	0	0	0	41
Sintomático	0	5	12	2	7	1	3	30
Oligossintomático	0	2	6	4	4	1	1	18
Assintomático	0	0	1	1	0	0	0	2
Total = 91	23	21	21	9	11	2	4	91

$p < 0,0001$

Qui quadrado = 66,8

Coefficiente de contingência = 0,651

Conforme observam-se nas tabelas acima, a diluição de 1:40 apresentou o maior valor do coeficiente de contingência (0,680) e a maior força de associação entre as duas variáveis analisadas, medida pelo qui quadrado de 80,8 (tabela 2). As diluições 1/40 e 1/160 (tabelas 2 e 4), não apresentaram resultados falsos positivos, embora em todas as diluições observaram-se resultados falsos negativos.

A população-referência, pertencente ao banco A foi também submetida à RIFI, porém, utilizando antígeno específico, *L. chagasi*, RIFI-CH e seus resultados estão expressos nas tabelas de números 5 a 8.

Tabela 5: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:20 com o teste RIFI-CH, segundo a variável clínica.

*Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/20								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	42	1	0	0	1	0	0	44
Sintomático	0	3	9	3	12	2	1	30
Oligossintomático	0	3	4	2	8	1	0	18
Assintomático	0	0	0	0	0	2	0	2
Total = 94	42	7	13	5	21	5	1	94

< 0,0001

Qui quadrado = 124,3

Coefficiente de contingência = 0,755

Tabela 6: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:40 com o teste RIFI-CH, segundo a variável clínica.

* Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/40								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	42	1	0	1	0	0	0	44
Sintomático	0	5	9	3	12	0	1	30
Oligossintomático	1	4	2	4	6	1	0	18
Assintomático	0	0	0	0	1	1	0	2
Total = 94	43	10	11	8	19	2	1	94

p < 0,0001

Qui quadrado = 114,7

Coefficiente de contingência = 0,741

Tabela 7: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:80 com o teste RIFI-CH, segundo a variável clínica.

*Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/80								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	42	1	1	0	0	0	0	44
Sintomático	2	8	7	5	5	0	2	29
Oligossintomático	2	6	4	2	3	1	0	18
Assintomático	0	0	0	0	2	0	0	2
Total = 93	46	15	12	7	10	1	2	93

p < 00001

Qui quadrado = 92,4

Coeficiente de contingência = 0,706

Tabela 8: Distribuição das freqüências observadas na leitura da reação de imunofluorescência indireta realizada com soros de cães pertencentes ao banco de dados (A) na diluição 1:160 com o teste RIFI-CH, segundo a variável clínica.

*Leitura da RIFI do grupo (A) na diluição 1/160)								
Diagnóstico clínico	0%	<25%	25%	37%	50%	62%	75%	Total
Sadio	40	2	2	0	0	0	0	44
Sintomático	4	13	2	4	6	1	0	30
Oligossintomático	5	2	6	3	2	0	0	18
Assintomático	0	0	1	0	1	0	0	2
Total = 94	49	17	11	7	9	1	0	94

p < 0,0001

Qui quadrado = 72,7

Coeficiente de contingência = 0,660

De acordo com os resultados expressos nas tabelas acima, observamos que a diluição 1:20 apresentou o melhor coeficiente de contingência (0,755) e a maior força de associação entre as variáveis analisadas (qui quadrado = 124,3), além disto, nenhum resultado falso positivo foi observado e apenas um falso negativo ocorreu sendo menor que 25%, fracamente reagente, não sendo considerada uma leitura positiva.

As próximas figuras (2-6) mostram os resultados obtidos com a aplicação das curvas TG-ROC, que foram aplicadas por se tratar de variável ordinal, distribuição não paramétrica, não se aplicando portanto a análise da curva ROC.

Nessas figuras, foi possível obter os parâmetros de sensibilidade, especificidade e o melhor ponto de diluição de corte para o teste diagnóstico. Nesta análise, cada diluição foi comparada com a diluição 1/20 da RIFI com antígeno de *L.chagasi*, por fornecer os resultados mais representativos, sendo por isto considerados como valores de referência.

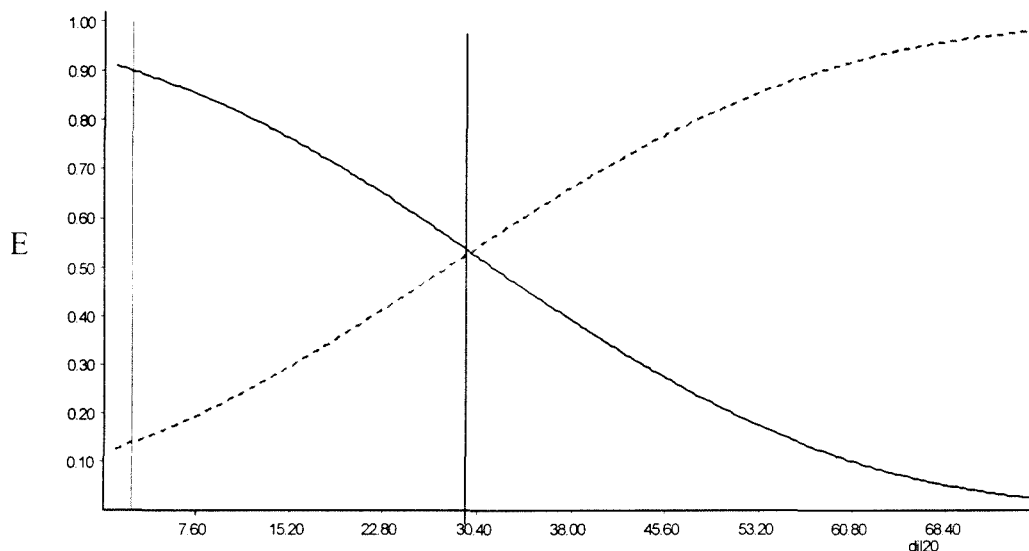


Figura 2: Análise pela curva TG-ROC. Curvas de Sensibilidades(____) e Especificidade(----); os valores de S e E = 90% otimizados e ajustados para a diluição 1:20 do *kit* BM, em comparação com o teste de referência RIFI-CH na diluição 1:20 definindo o ponto de corte $\geq 32\%$.

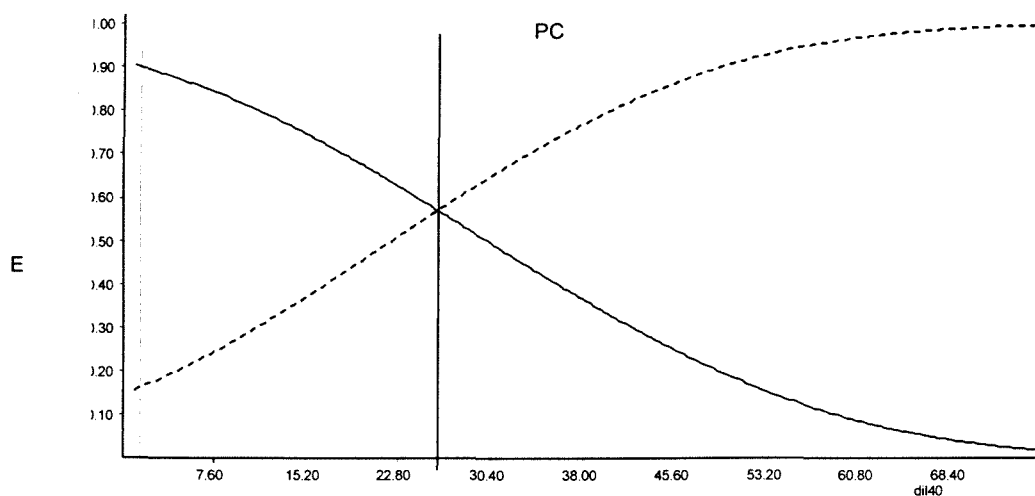


Figura 3: Análise pela curva TG-ROC. Curvas de Sensibilidades(____) e Especificidade (----); os valores de S e E= 90% otimizados e ajustados para a diluição 1:40 do *kit* BM em comparação com o teste de referência RIFI-CH na diluição 1:20 definindo o ponto de corte $\geq 27\%$.

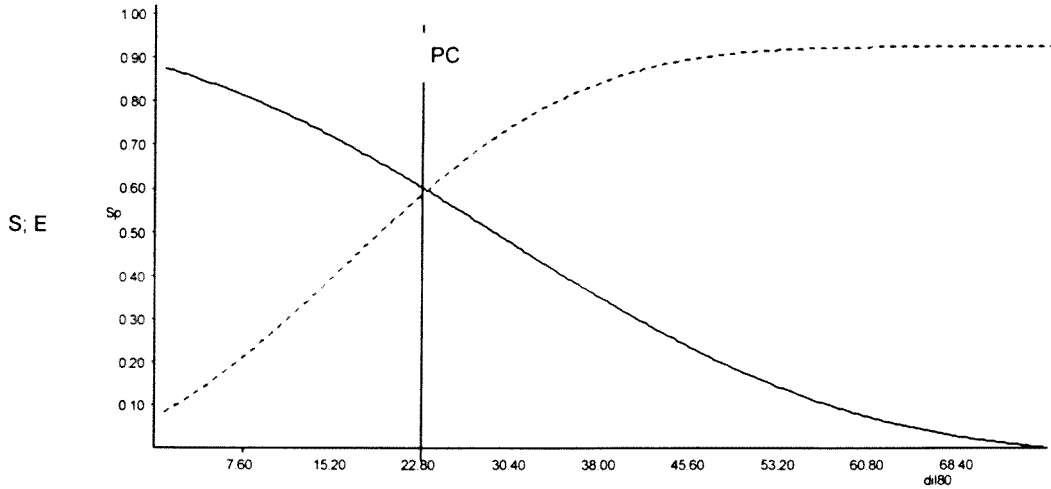


Figura 4: Análise pela curva TG-ROC. Curvas de Sensibilidades(—) e Especificidade(---); os valores de S e E= 90% otimizados e ajustados para a diluição 1:80 do *kit* Biomanguinhos em comparação com o teste de referência RIFI-CH na diluição 1:20 definindo o ponto de corte $\geq 18\%$.

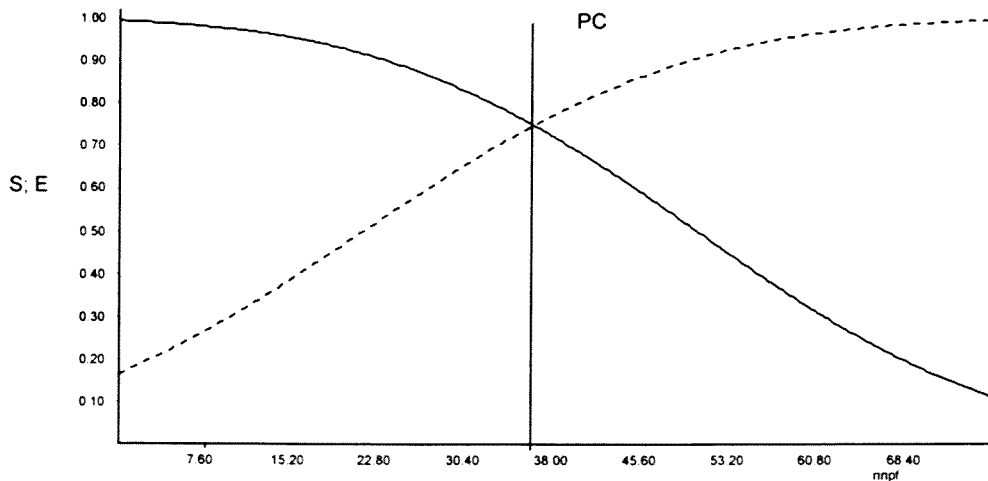


Figura 5: Análise pela curva TG-ROC. Curvas de Sensibilidades(—) e Especificidade(---), os valores de S e E = 90% otimizados e ajustados para RIFI- papel-filtro em comparação com a RIFI soro; valor do ponto de corte $\geq 30\%$ segundo critério diagnóstico do papel-filtro.

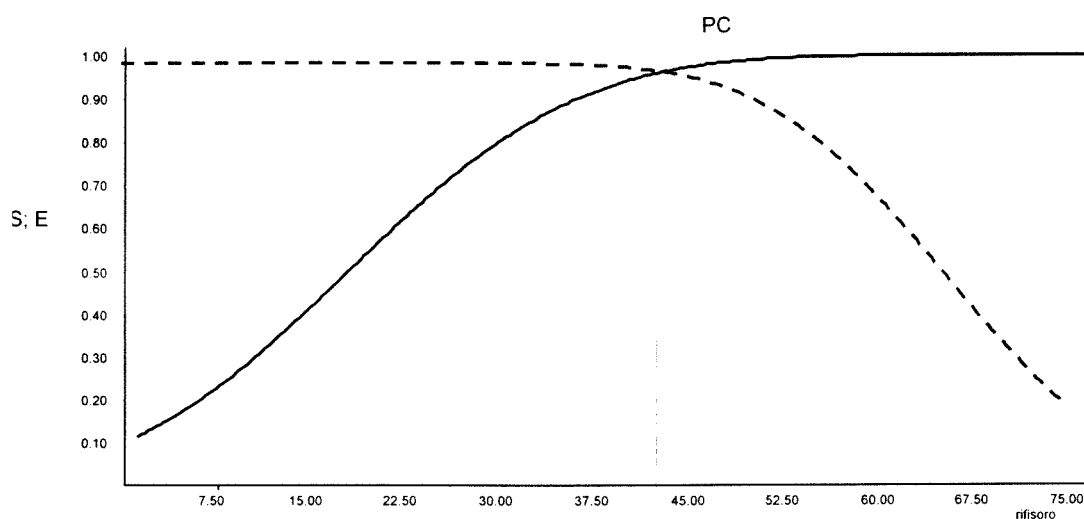


Figura 6: Análise pela curva TG-ROC. Curvas de Sensibilidades(—) e Especificidade(---); os valores de S e E = 90% otimizados e ajustados para RIFI-soro em comparação com a RIFI-papel-filtro; valor do ponto de corte \geq 45% segundo critério diagnóstico do soro.

A tabela 9 mostra os valores máximos, médios e mínimos das leituras realizadas com as três diluições 1:20, 1:40 e 1:80, com o teste RIFI-BM comparadas com a diluição 1:20 do teste RIFI-CH considerada amostra de referência.

Tabela 9: Valores das leituras realizadas com a técnica RIFI-BM e RIFI-CH em porcentagens, números de amostras, mediana, desvios padrão, valores máximos e mínimos.

RIFI N=97	Média Aritmética	Mediana	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
CH 1:20	21,00	10,00	23,05	76,00	1,00
BM 1:20	29,96	26,00	23,46	76,00	1,00
BM 1:40	25,54	26,00	22,61	76,00	1,00
BM 1:80	23,45	26,00	20,80	76,00	1,00

As figuras 2, 3 e 4 mostram a análise TG-ROC definindo pelo melhor ajuste, os parâmetros de sensibilidade e especificidade e o ponto de corte, que no caso da diluição 1:20 foi de 32%, enquanto que para a diluição 1:40 foi 27% e na diluição 1:80 o ponto de corte foi acima de 15%.

As figuras 5 e 6 mostram a análise TG-ROC entre os resultados obtidos com a RIFI realizada em soro contra os resultados obtidos com papel-filtro, dos mesmos cães. Para os mesmos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos cenários acima o melhor ponto de corte para o teste com papel-filtro foi de 30%, enquanto que para o soro o ponto de corte definido foi de 50%.

Tabela 10: Sumário dos resultados observados com a RIFI-BM, na população do grupo A, para as diluições 1:20, 1:40 e 1:80 x a diluição 1:20 do teste RIFI-CH e os resultados dos parâmetros observados entre o diagnóstico realizado com soro e o diagnóstico com papel-filtro. Ambos com o *kit* BM.

Teste sorológico	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo +	Valor preditivo –	Índice de Youden	Classificação incorreta
Diag. 1:20 x hdiag 1:20	77,78 (66,6-88,8)	97,22 (91,8-100,0)	97,67 (93,7-100,0)	74,46 (62,0-86,9)	0,75 (0,62-0,87)	0,14
Diag. 1:40 x hdiag 1:20	95,35 (89,0-100,0)	81,25 (70,2-92,0)	82,00 (71,3-92,6)	95,12 (85,5-100,0)	0,76 (0,63-0,79)	0,12
Diag 1:80 x hdiag 1:20	86,05 (75,6-96,4)	74,47 (62,0-86,9)	75,51 (63,4-87,5)	85,36 (74,5-96,1)	0,60 (0,44-0,76)	0,20
Diagnógrafisoro x diagnógrafipf 1:40	97,84 (95,4-100,0)	87,50 (71,2-100,0)	98,55 (96,5-100,0)	82,35 (64,2-100,0)	0,85 (0,68-1,0)	0,02

O teste diagnóstico ELISA, cuja leitura é realizada por meio de densidade óptica (DO) em um comprimento de onda = 450nm, tem seu ponto de corte baseado nos resultados dos controles negativos, portanto, para os soros, o ponto de corte apresenta um valor de DO mais baixa que o ponto de corte para o papel- filtro devido a hemólise do sangue no papel-filtro.

As mesmas amostras utilizadas para a RIFI foram submetidas ao teste ELISA, onde as variáveis diagnósticos soro e papel-filtro são do tipo contínua e por isto, a análise paramétrica foi realizada com a curva ROC convencional como se observa na figura 7. Neste caso, a área relativa aos resultados obtidos com os soros é 85,3% em relação à área no teste com o papel-filtro se utilizar os critérios dos resultados obtidos com o papel-filtro.

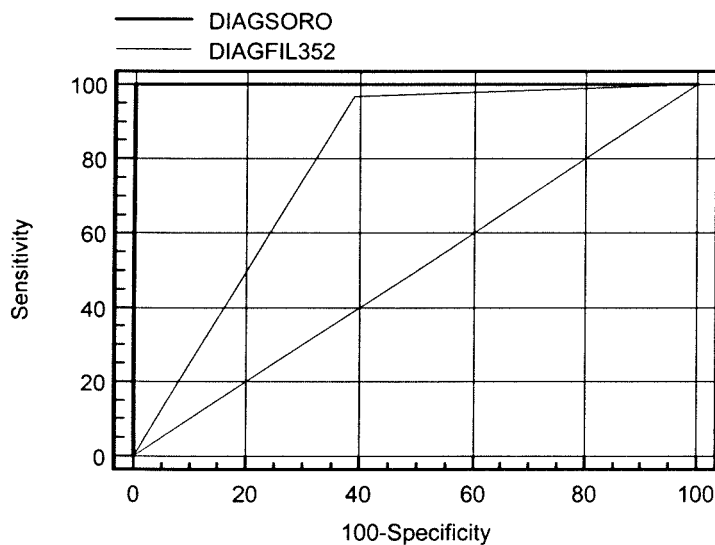


Figura 7: Representação da curva ROC (*Receiver operator characteristics*) dos dois testes de ELISA comparando os resultados obtidos com os soros versus papel-filtro.

Comparação das curvas ROC

Variável 1 = DIAGSORO

Variável 2 = DIAGFIL352

DIAGSORO=1= Positivo

N = 95

DIAGSORO=0= Negativo

N = 69

Curva ROC para DIAGSORO

Área da curva ROC = 1

Erro Padrão = 0

Intervalo de confiança de 95% = 1

Curva ROC para DIAGFIL352

Área da curva ROC = 0,789

Erro Padrão = 0,035

Intervalo de confiança de 95% = 0,718 para 0,848

Diferença entre as áreas = 0,211

Erro Padrão = 0,035

Intervalo de confiança de 95% = 0,143 para 0,279

Nível de significância P = 0,001

A tabela 11 mostra a distribuição entre as variáveis diagsoro (diagnóstico com os soros) cujo o valor do ponto de corte foi $D0=0,214$ e diagpf (diagnóstico com o papel-filtro), valor da DO do ponto de corte foi igual a 0,352.

Tabela 11: Distribuição dos resultados do teste ELISA papel-filtro (DO 0,352) e o teste de ELISA –BM (soro).

DIAG _{FIL352}	DIAG _{soro}		TOTAL
	1	0	
1	92	27	119
0	3	42	45
TOTAL=164	95	69	164

QUI QUADRADO=63,99

Grau de liberdade =1

P<0,0001

Coefficiente de contingência = 0,530

Tabela 12: Distribuição dos resultados o teste ELISA papel-filtro (DO 0, 214) e o teste de ELISA –BM (soro).

DIAG _{FIL352}	DIAG _{soro}		TOTAL
	1	0	
1	95	48	143
0	0	21	21
TOTAL=164	95	69	164

QUI QUADRADO = 30,489

Grau de liberdade =1

P<0,0005

Coefficiente de contingência = 0,396

Tabela 13: Estimativa dos valores da média, mediana, desvio padrão e valores máximo e mínimo para do teste de ELISA para as amostras de soros e papel-filtro.

ELISA N=176	MÉDIA (I.C. 95%)	MEDIANA (I.C. 95%)	DESVIO PADRÃO	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO
DO _{SORO}	0,535 (0,480-0,590)	0,513 (0,393-0,619)	0,366 -	1,513 -	0,000 -
DO _{PF}	0,788 (0,716-0,860)	0,799 (0,694-0,908)	0,482 -	2,319 -	0,053 -

A seguir são mostradas as tabelas de contingência entre a variável diagsoro x a variável clínica (tabela 14) e a variável diagpf_0,352 x variável clínica (tabela 15).

Tabela 14: Frequência entre os resultados obtidos com os soros no teste ELISA-BM, segundo diagnóstico clínico.

Diagnóstico Clínico	<u>DIAG_{SORO}</u>		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Sadio	0	9	9
Sintomático	70	37	107
Oligossintomático	20	11	31
Assintomático	5	12	17
TOTAL= 164	95	69	164

QUI QUADRADO=21,081
 Grau de liberdade =3
 P<0,0005
 Coeficiente de contingência=0,337

Tabela 15: Frequência entre os resultados obtidos no teste ELISA com papel- filtro (DO 0,352), segundo diagnóstico clínico.

Diagnóstico Clínico	<u>ELISA (papel-filtro)</u>		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Sadio	0	9	9
Sintomático	95	20	115
Oligossintomático	26	9	35
Assintomático	10	7	17
TOTAL= 176	131	45	176

QUI QUADRADO=32,417
 Grau de liberdade=3
 P<0,0005
 Coeficiente de contingência=0,394

As figuras 8A e 8B mostram a comparação entre os testes diagnósticos RIFI e ELISA. A) testes com as amostras de soro e B) testes com amostras de sangue colhidas em papel-filtro com ponto de corte 50 % (2+) na diluição 1:40 (RIFI) e ponto de corte DO=0,352 para o teste ELISA.

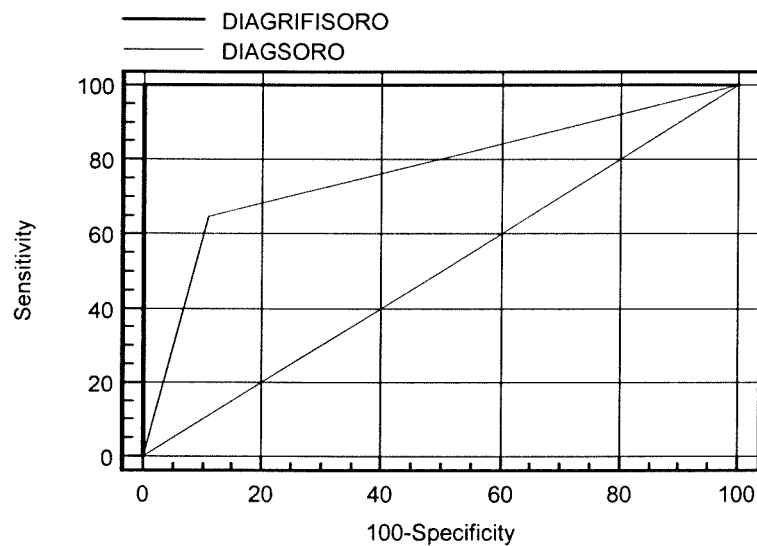


Figura 8A: Representação da curva ROC para os dois testes de diagnósticos, RIFIsoro e ELISAsoro.

Comparação das curvas ROC

Variável 1= DIAGRIFISORO

Variável 2 = DIAGSORO

DIAGRIFISORO=1= Positivo

N = 142

DIAGRIFISORO=0= Negativo

N = 18

Curva ROC para **DIAGRIFISORO**

Área da curva ROC = 1

Erro padrão = 0

Intervalo de confiança de 95% = 1

Curva ROC para **DIAGSORO**

Área da curva ROC = 0,768

Erro padrão = 0,049

Intervalo de confiança de 95%= 0,695 to 0,831

Diferença entre as áreas = 0,232

Erro padrão = 0,049

Intervalo de confiança de 95% = 0,135 to 0,328

Nível de significância P = 0,001

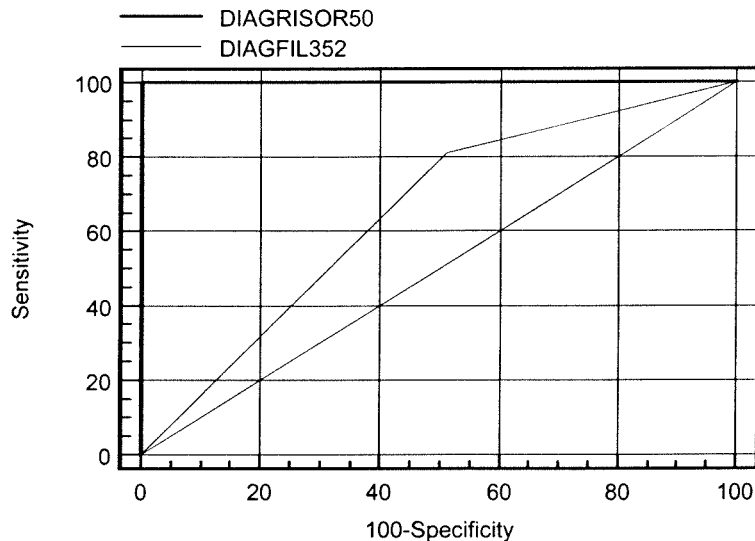


Figura 8 B: Representação da curva ROC para os dois testes de diagnósticos entre RIFIsoro diluição 1:40 e ponto de corte= 2+ (50%) e ELISA papel-filtro com ponto de corte DO=0,352

Comparação das curvas ROC

Variável 1 = DIAGRISOR50

Variável 2 = DIAGFIL352

DIAGRISOR50=1= Positivo

N = 123

DIAGRISOR50=0= Negativo

N = 41

Curva ROC para DIAGRISOR50

Área da curva ROC = 1

Erro padrão = 0

Intervalo de confiança de 95% = 1

Curva ROC para DIAGFIL352

Área da curva ROC = 0,650

Erro padrão = 0,047

Intervalo de confiança de 95% = 0,572 para 0,723

Diferença entre as áreas = 0,350

Erro padrão = 0,047

Intervalo de confiança de 95% = 0,258 para 0,441

Nível de significância $P = 0,001$

As tabelas 16, 17 e 18 representam a freqüência entre as variáveis diagsoro, diagpf_0,352 e diagrifpf_50% (diagnóstico realizado com a técnica de imunofluorescência com o ponto de corte 50%, na diluição 1:40). Os resultados referentes a 1(S) são diagnósticos parasitológico suspeitos, (2) equivale ao diagnóstico parasitológico positivo e (1) significa diagnóstico parasitológico negativo.

Tabela 16: Freqüência entre ELISA-BM(1, positivo; 0, negativo) versus exame Parasitológico, sendo 1(S), suspeito; 2, positivo e 1, negativo.

Parasitológico	<u>DIAGsoro</u>		TOTAL
	1	0	
1(S)	12	20	32
2	77	30	107
1	3	7	10
TOTAL 149	92	57	149

QUI QUADRADO=16,959

Grau de liberdade =2

$P < 0,0005$

Coefficiente de contingência = 0,320

Tabela 17: Frequência entre ELISA-BM papel-filtro(1, positivo; 0, negativo) versus exame parasitológico, sendo 1(S), suspeito; 2, positivo e 1 negativo.

Parasitológico	<u>DIAGfil₃₅₂</u>		
	1	0	TOTAL
1(S)	19	14	33
2	100	18	118
1	7	3	10
TOTAL 161	126	35	161

QUI QUADRADO=11,617

Grau de liberdade =2

P<0,005

Coeficiente de contingência = 0,259

Tabela 18: Frequência entre RIFI-BM papel-filtro corte 50% versus exame parasitológico.

Parasitológico	<u>DIAGfil₃₅₂</u>		
	1	0	TOTAL
1(S)	24	3	27
2	107	2	109
1	6	3	9
TOTAL 145	137	8	145

QUI QUADRADO= 17,815

Grau de liberdade= 2

P<0,0005

Coeficiente de contingência= 0,331

A tabela 19 mostra a análise retrospectiva realizada em três municípios considerados, de acordo com a classificação do PCLVA de São Paulo, como município silencioso não receptivo (ausência da doença),

município silencioso receptivo (pré-epidêmico ou pré-endêmico) e município em investigação (endêmico).

As estimativas foram feitas com o teste ELISA em papel-filtro utilizando os pontos de cortes originais, realizados na primeira fase, comparando com o novo ponto de corte em papel-filtro.

Tabela 19: Resultados dos inquéritos sorológicos realizados nos municípios de Luiziana, Rubiácea e Piacatú, utilizando o teste ELISA em sangue colhidos em papel-filtro, com o ponto de corte original e com o novo (0,352), calculado a partir de controles negativos de papel-filtro.

Município	N	Cut off	SOROPOSITIVOS (%)	
Luiziana	716	0,203	328	(45,49)
	721	0,352	163	(22,60)
Rubiácea	503	0,213	290	(57,65)
	503	0,352	166	(33,01)
Piacatú	597	0,238	315	(52,76)
	597	0,352	193	(32,32)

7. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral assume um caráter espectral, que determina diversas formas clínicas, variando de uma forma silenciosa assintomática, passando por formas subclínicas ou oligossintomáticas até as formas mais graves da doença, o calazar clássico (**BADARÓ, 1996**). Da mesma forma, no cão, a doença apresenta um amplo espectro de características clínicas que variam de um estado aparentemente sadio até um estado com manifestações severas, a doença manifesta. (**SANCHIS et al. 1976; LANOTTE et al. 1979**).

O principal objetivo de um teste de diagnóstico é separar os casos de doença dos não doentes (**PEREIRA, 1995**). Todavia, na prática, não existem testes de diagnósticos perfeitos que apresentem 100% de Sensibilidade e Especificidade levando-se em conta a prevalência correta.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é um método sorológico, que permite avaliar a soroprevalência para determinados antígenos em estudos populacionais. Os programas de controle e de vigilância epidemiológica lançam mão deste tipo de inquérito sorológico para saber se determinado agente está circulando no ambiente ou não e para tomar as medidas de controle sobre as doenças. Dessa forma a RIFI tem sido utilizada em inquéritos soroepidemiológicos nos programas de controle da Leishmaniose visceral canina em vários estados brasileiros (**COUTINHO et al. 1991; BRAGA et al. 1998; MARCONDES et al. 2003; OLIVEIRA & ARAÚJO, 2003; GUERRA et al. 2004**). O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PCLVA) do Estado de São Paulo também

adotou esta metodologia utilizando o *kit* de Biomanguinhos (RIFI-BM), para avaliar e tomar decisões quanto a eliminação de cães sorologicamente positivos.

Para (GREINER & GARDNER, 2000) os erros sistemáticos nos estudos de prevalência são atribuídos as possíveis confusões nas estimativas de sensibilidade e de especificidade, justamente os fatores que influenciam os resultados considerados falsos positivos ou falsos negativos, que por sua vez, são influenciados pelas medidas ou avaliações de resultados do método empregado.

Para melhor avaliar os resultados observados no PCLVA do Estado de São Paulo, com o teste de diagnóstico RIFI-BM, foi criado um sistema de comparação construindo-se um banco de dados, denominado de A, onde aproximadamente 100 cães foram selecionados incluindo casos de cães conhecidamente positivos, cães sintomáticos, assintomáticos e oligossintomáticos e também cães sadios, ou seja, que fossem conhecidamente verdadeiros negativos.

O comportamento da variável diagnóstico clínico (CLÍNICA) e suas diversas categorias (sadios, sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos) distribuídas de acordo com a leitura da RIFI-BM, foi analisado nas tabelas de 1 a 4, para verificar, qual das quatro diferentes diluições separava os verdadeiros negativos (sadios) dos verdadeiros positivos (doentes) e se possível verificar se havia alguma correlação com o resultado quantitativo da RIFI, expresso em número de cruces, e o estágio da doença.

Nas leituras da RIFI-BM, as diluições que separaram os verdadeiros negativos corresponderam as diluições 1:40 e 1:160, cujos resultados apresentaram leituras = 0 e <1+ (<25%). Esta classificação de leitura foi adotada quando na leitura do teste se observava uma leve reação de fundo (background), considerada fracamente reativa, mas não como um resultado positivo verdadeiro. No caso da diluição 1:40, 22 casos foram considerados verdadeiros negativos e 16 fracamente reagentes; os 6 restantes representaram resultados falsos negativos. Já na diluição 1:160, 23 casos apresentaram leitura = 0; 14 casos classificaram-se como fracamente positivos e 4 como falsos negativos. Para os outros estágios da doença não se observou correlação específica para cada grau de leitura, pois todos se distribuíram em todas as faixas de leituras, variando de fracamente positivo a 3+ (75%).

Na literatura alguns autores consideram que melhor diluição de corte para o teste RIFI, é 1:80 (**MANCIANTI, 1985; PINELLI, 1994; CABRERA, 1999**). **NEOGY, et al. (1992)**, observaram que a diluição 1:160 é a que apresentou 100% de especificidade, o que significa que todos os verdadeiros negativos são separados nesta diluição, impedindo dessa forma, que animais sadios fossem eliminados. No caso do Kit-BM, o laboratório produtor recomenda a diluição 1:40.

ALVES & BEVILACQUA, (2004), analisaram a qualidade do diagnóstico laboratorial utilizado nos inquéritos epidemiológicos, tendo como base a avaliação das medidas adotadas no programa de controle de LVA em Belo Horizonte (MG), desde 1993. Neste estudo os autores discutem os

questionamentos levantados pelos clínicos veterinários quanto à validade do teste diagnóstico preconizado pelo programa, a RIFI. Segundo estes profissionais o referido teste estaria identificando um grande número de animais falsos positivos, colocando em dúvida a indicação desta metodologia para a identificação de animais a serem sacrificados. O Programa de Controle de LVA em Belo Horizonte, durante o período de 1993 a 1997, examinou através da RIFI, um total de 415.683 cães, tendo sido identificados como positivos 15.117. Considerando a prevalência neste período de 3,64%, os valores preditivos positivos e negativos do teste foram respectivamente 14,5% e 99,5%; verificou-se então que, dos 400.566 animais diagnosticados como negativos, 2003 seriam, na verdade falsos negativos e dentre os 15.117 positivos, 12.925 seriam falsos positivos. Os autores concluem que diante destes resultados, é urgente a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas para identificação e eliminação dos reservatórios animais, principalmente com relação à especificidade do teste.

Nas tabelas de 5 a 8, observam-se os resultados da RIFI com antígeno específico, *L.chagasi*, RIFI-CH, considerado teste referência por separar todos os verdadeiros negativos. As mesmas diluições utilizadas para o teste do kit-BM foram utilizadas com a mesma população referência (Banco A). Neste caso observou-se que dos 43 casos negativos, 42 foram classificados como verdadeiros negativos e 1 como fracamente reagente, que de acordo com o programa seria considerado negativo, o outro caso classificou-se como 2+. Este resultado pode ser explicado baseando-se no fato que, de 2 casos negativos provenientes de região não endêmica

(município de São Paulo) pode ser realmente positivos. Este caso reforça a especificidade do antígeno (*L.chagasi*), e ausência de reação cruzada, conforme citam alguns autores sobre esta possibilidade (**COSTA et al., 1991**). Estes mesmos autores, em estudos de avaliação deste teste utilizando como antígenos, as formas promastigotas de *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* demonstraram não haver diferença significativa com relação à sensibilidade da reação entre os 3 antígenos, porém os resultados revelaram altas taxas de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas. Os autores ressaltaram a preocupação de se atribuir estes resultados como indicadores de prevalência de calazar canino. Tais resultados poderiam refletir a taxa de infecção por tripanossomatídeos e não de infecção leishmaniótica visceral específica.

No caso da RIFI-CH, a utilização do antígeno *L. chagasi* foi muito importante, pois diminuiu a possibilidade de uma classificação incorreta dos resultados, como ocorreu com a RIFI-BM, ressaltando a importância da escolha do antígeno na melhoria da especificidade do teste.

Nas tabelas de 5 a 8 se repetiram as distribuições dos resultados de leituras para os outros estágios da doença, não havendo nenhuma forte correlação entre o número de cruces na leitura da RIFI o estágio da doença.

Os métodos sorológicos tem sido utilizados também em inquéritos epidemiológicos com o objetivo de se conhecer a prevalência da doença em áreas endêmicas ou com potencial de transmissão da LVA, sendo de extrema importância, portanto, o conhecimento dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos das técnicas sorológicas

empregadas para este fim, para não ocorrer interpretações errôneas com relação à ocorrência da doença nas áreas a serem estudadas. Isto está de acordo com os resultados avaliados por alguns autores, que analisam a complexidade da resposta imune envolvida na leishmaniose (**IKEDA et al.,2003; PINELLI et al., 1994**).

A LVA canina é considerada uma doença imunomediada pela capacidade do parasito modificar o sistema imunológico do hospedeiro (**FERRER et al., 1995; LOPES et al.,1996; SLAPPENDEL & FERRER, 1990; IKEDA et al., 2003**). Estudos realizados em modelos murinos e humanos demonstraram que na modulação da resposta imune, o macrófago apresenta antígenos de *leishmania* aos linfócitos T-CD4+, que são subdivididos em pelo menos 2 sub populações (TH1 e TH2). Atualmente sabe-se que existe correlação entre resposta TH1 e proteção e resposta TH2 e processo progressivo de doença. Com relação à resposta celular verifica-se que indivíduos assintomáticos ou pós-tratamento geralmente respondem bem ao teste de Montenegro, enquanto que os indivíduos sintomáticos não respondem a este teste. Contudo, após a terapêutica específica, os níveis de anticorpos caem e os indivíduos tornam-se Montenegro positivos, indicando que após o tratamento da LVA instala-se uma resposta imune efetiva e duradoura devido à inexistência de relatos de reinfecções (**GENARO, 2000**).

Devido a complexidade da resposta imune envolvida na leishmaniose torna-se cada vez mais urgente a necessidade de se padronizar ou aprimorara testes de diagnósticos para triagem sorológica populacional, que

separe os possíveis casos verdadeiramente negativos e reduzam ao máximo os resultados falsos positivos, sendo estes requisitos fundamentais para inquéritos populacionais.

Nos programas de controle em que se adota como medida a eliminação dos reservatórios caninos, os parâmetros de sensibilidade e especificidade são de extrema importância para que esta medida seja efetiva na diminuição da transmissão humana da doença. O aumento do número de casos de LVA e a transmissão de *L.chagasi* em áreas metropolitanas apontam para a existência de fatores que poderiam estar contribuindo para a ineficiência dos programas de controle e tem sido motivo de questionamentos da adoção desta medida (**CABRERA, 1999; DIETZE , et al., 1995**).

Nas figuras 2 a 5 foram projetados os resultados da RIFI-BM com os soros do Banco A comparando-se as diluições 1:20; 1:40 e 1:80 do com a diluição 1:20 do teste RIFI-CH, escolhido como referência por ter apresentado a maior força de associação entre a variável clínica. A análise realizada com a técnica TG-ROC permitiu escolher as condições otimizadas de sensibilidade e especificidade, além de outros parâmetros, tais como valores preditivos positivo e negativo, eficiência (**YOU DEN, 1950**) e também definir o melhor ponto de corte para cada uma das diluições acima citadas.

Observou-se que a diluição 1:20 do teste RIFI-BM apresentou um ponto de corte em 32% (entre 1+ e 2+), portanto os valores com 1+(25%) devem ser considerados como resultados negativos. Na diluição 1:40 o ponto de corte foi 27%, da mesma forma eliminou-se a leitura 1+(25%) dos

resultados positivos. Já na diluição 1:80 todos resultados acima de 15 % (<25%) foram considerados positivos, pois nestes casos os resultados que apresentaram uma reação de fundo (*background*), já não aparecia mais, pois este *background* foi diminuído nesta diluição. Esta técnica, que é uma projeção teórica, é instrumento de grande valor para ser utilizado na escolha dos métodos a serem preconizados em inquéritos sorológicos.

No estudo, ora apresentado comparou-se ainda os resultados da RIFI em soro com os da RIFI em papel-filtro, sendo realizada uma projeção com a análise TG-ROC, utilizando a diluição 1:40 dos soros versus o sangue colhido em papel filtro e ajustado para a diluição 1:40 também, conforme preconiza o programa. Os resultados observados nas figuras 5 e 6 demonstram que os pontos de cortes obtidos para cada caso corroboram com os resultados mencionados acima. Para o teste realizado com o papel filtro, o melhor ponto de corte ficou definido como 30%, portanto acima de 1+ (25%) e para os soros o ponto de corte ficou estabelecido em 45%, equivale dizer a 50% (2+), portanto o novo parâmetro para o ponto de corte deve ser a diluição 1:40 com leituras de 2+ (50%) ou então passar para diluição seguinte 1:80, com o que seguramente se obterá menor número de casos falsos positivos, conseqüentemente maior número de cães soronegativos seriam protegidos da eutanásia do sacrifício. Esta análise pode ser melhor vista na tabela 10, onde estão mostrados as estimativas dos parâmetros de sensibilidade (97%), especificidade (87%), valores preditivos positivo(98,55%) e negativo (82,35%), eficiência (85 %) e classificação incorreta apenas 2%.

Todavia análises com novos pontos de cortes para a técnica RIFI e a utilização de antígeno específico como a *L.chagasi* ainda devem ser avaliados como proposta a ser utilizada em programas de controle.

Apesar da variedade de testes sorológicos disponíveis e já utilizados para o diagnóstico da LVA canina, a reação de imunofluorescência indireta ainda tem sido o teste de escolha para a maioria dos programas de controle. Embora considerados adequados os índices de sensibilidade e especificidade quando comparados com os de outras técnicas diagnósticas, demonstrados na literatura (**ALVES e BEVILACQUA, 2004**) e a possibilidade da sua utilização em sangue colhidos em papel filtro em papel-filtro tornando-a mais prática para estudos populacionais, tem sido detectados alguns problemas com relação ao seu emprego como método de identificação e de eliminação de cães soropositivos. **BRAGA et al. (1998)**, compararam os resultados do emprego da RIFI e do ELISA, utilizando amostras de sangue em papel-filtro e constataram superioridade nos índices de sensibilidade obtidos pelo ELISA. Os autores analisaram a rapidez de liberação dos resultados de cada um dos testes e o impacto da eliminação do cão, tardia ou precoce, sobre a prevalência da infecção nas áreas de estudo.

Vários métodos imunoenzimáticos já foram utilizados no diagnóstico da LVA tanto utilizando antígeno bruto como frações antigênicas (**BADARÓ, 1996**). Os mais utilizados em estudos populacionais tem sido os que empregam antígeno bruto. A utilização de antígenos purificados torna o teste mais sensível e específico. **BADARÓ et al.,(1986)** avaliaram uma

preparação do extrato antigênico utilizando um gradiente de centrifugação que permitiu a eliminação de partículas de membrana do parasito e conseqüentemente diminuição da reatividade cruzada com soro de pacientes infectados por *T. cruzi*.

O antígeno recombinante rK39 tem demonstrado ser bastante adequado para o teste ELISA e já foi utilizado em diferentes áreas no Brasil onde a LVA é endêmica (**BADARÓ, 1996**).

Estudos realizados em diferentes áreas endêmicas para LVA tem demonstrado superioridade do ELISA com relação aos índices de sensibilidade tanto para a doença humana como para a canina. **EVANS et al (1990)**, em estudos realizados no Ceará, em 405 cães, demonstraram maior sensibilidade para o teste ELISA, quando comparado com a RIFI, utilizando soro e eluato. **RACHAMIM et al. (1991)**, em Portugal, num estudo comparativo entre RIFI, ELISA competitivo e um ELISA direto e constatou boa correlação entre as 3 técnicas sorológicas (95,5%). No presente estudo o teste ELISA foi avaliado na mesma população-referência, com a qual avaliamos a RIFI, com o mesmo propósito, de testar novo ponto de corte para melhorar a eficiência diagnóstica do teste.

Os soros da população referência foram submetidos ao teste ELISA-BM, como preconizado no Programa de Controle e o ELISA com antígeno específico de *L. chagasi*, ELISA-CH.

Para a interpretação dos resultados da comparação entre os dois testes ELISA-BM e ELISA-CH com amostras pareadas de soro e de sangue colhido em papel filtro, utilizamos as curvas ROC, que segundo **FLETCHER**

(1996), são valiosas para comparar testes alternativos para determinado método de diagnóstico. Outros autores (ZWEIG e CAMPBELL, 1993) introduziram essa técnica para melhor estabelecer o ponto de corte para doenças em exames laboratoriais.

Na figura 7 estão representadas as duas curvas dos dois testes de ELISA realizados com amostras pareadas de soro e de sangue colhidas em papel-filtro. Nesta análise avaliou-se a diferença entre as áreas dos dois testes verificando-se que o teste realizado com o sangue em papel-filtro correspondeu em 80% da área coberta com o teste realizado com o soro, portanto 20% das amostras não apresentaram concordância.

A tabela 11 está representando a mesma informação na forma de uma tabela 2X2. Quando se comparam os resultados da tabela 11 (ELISA soro versus sangue papel filtro e ponto de corte 0,214) com a tabela 12 com o novo ponto de corte, 0,352, observa-se um aumento do número de resultados falso positivos, de 27 para 48, que representa um viés muito grande na interpretação dos resultados dos inquéritos sorológicos caninos que utilizam esta metodologia. Isto traz como consequência uma interpretação errônea da soroprevalência das áreas endêmicas e na eliminação dos animais soropositivos.

Na tabela 13 encontram-se os valores das médias, medianas, desvios-padrão e valores máximo e mínimo das densidades ópticas das amostras de soro e de papel-filtro para o teste ELISA. Observa-se que os valores encontrados com as amostras de sangue em papel-filtro foram sempre maiores do que aqueles encontrados com o soro.

Na tabela 14 ao comparar os resultados obtidos com os soros e a variável clínica observou-se que os nove casos que eram verdadeiros negativos foram separados pelo ponto de corte. A tabela 15 mostra o mesmo resultado, porém utilizando o sangue em papel filtro com ponto de corte do papel filtro. Todavia o papel filtro apresentou número maior de casos sintomáticos em relação ao soro.

Em seguida se apresentam as análises entre os testes de diagnósticos RIFI e ELISA. A figura 8 representou os dois testes realizados com os soros dos cães e observou-se o teste ELISA apresentou uma diferença de 23% menor que a área representada pelo teste RIFI. Este resultado mostra que o teste ELISA não deve substituir a RIFI, embora de acordo com informação de técnicos da FUNASA, alguns municípios já vinham utilizando este ELISA como método único (comunicação verbal).

A correlação entre a condição clínica do reservatório canino e sua infectividade foi bastante estudada. **DEANE e DEANE (1955)**, demonstraram que somente 8% dos cães assintomáticos tinham as formas amastigotas na pele. Alguns estudos de modelagem matemática de leishmaniose canina tem apontado a incapacidade de cães assintomáticos infectarem os flebotomíneos (**DYE, (1992) e HASIBEDER et al., 1992**). Por outro lado, **MOLINA et al., (1994)**, demonstraram que a infectividade de cães com leishmaniose visceral não está necessariamente ligada ao estado clínico destes animais, entretanto se somente os cães sintomáticos são considerados, a força da infecção é subestimada.

Apesar do teste ELISA apresentar maior sensibilidade em reconhecer casos positivos que podem corresponder a uma parcela de resultados com interpretação errônea, conforme verificou-se nas tabelas 16, 17 e 18 que mostram um número constante de 33 casos de casos com parasitológicos suspeitos, que apresentavam sintomas, mas não foram isolados parasitas *Leishmania*. Esta situação também foi observada por (**MOREIRA, 2003**), que realizou diversos tipos diferentes de testes para analisar cães provenientes da região de Araçatuba, a mesma região da onde eram provenientes estes cães do Banco B.

Finalmente a tabela 19 mostra o quanto é possível errar ao interpretar que cães sorologicamente positivos devem ser eliminados. Em nosso estudo, se apenas um teste diagnóstico, como o ELISA em papel-filtro, com o ponto de corte utilizado para os soros negativos $DO = 0,214$, no inquérito populacional dos três municípios, todos eles mostraram que 50% do inquérito apresentaram cães sorologicamente positivos. Quando este ponto de corte foi realizado com a DO do sangue em papel-filtro ($DO = 0,352$) diminuiu pela metade o número de cães sorologicamente positivo.

Outro ponto de suma importância é fornecido por (**GENARO, 2000**), que aponta que num inquérito soroepidemiológico, a soroprevalência representa o contacto com o agente; este agente está circulando e apenas 10% da soroprevalência representa o número de animais infectados; destes 60% evoluem para cura espontânea e o restante apenas correspondem a real prevalência, que pode variar entre 2 a 4%. Conforme pode ser observado, a tabela 19 mostra o número de animais que poderiam ser

poupados. Por isso há muitas controvérsias em relação a medida de se eliminar cães sorollogicamente positivos.

Os resultados obtidos nos testes apresentam seus limites e seus vieses que precisam ser considerados na sua aplicação como medida de controle.

Análises mais acuradas devem ser feitas quando se pretende utilizar testes diagnósticos. A leishmaniose deve ser melhor estudada no reservatório canino. É preciso conhecer bem mais sobre a história natural da doença em cães. Modelos matemáticos têm sido testados para se saber sobre a taxa de infecção e a sua relação com carga parasitária **(DYE, 1993)**. Sendo assim, os riscos devem ser melhor avaliados.

8. CONCLUSÕES

O estudo em questão permitiu concluir que:

- A eficiência do teste de diagnóstico para RIFI-BM variou de 60% a 76%, quando comparada com o teste de referência RIFI-CH, realizado com antígeno de *L.chagasi* (tabela 10)
- A RIFI com antígeno *L.chagasi* separou todos os verdadeiros negativos.
- A eficiência dos testes RIFI-BM soro e papel filtro melhorou para 85% com a otimização do ponto de corte fornecido pela análise TG-ROC melhorando os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos (tabela 10).
- As duas técnicas de diagnósticos ELISA-BM e RIFI-BM apresentaram uma diferença de 23%. O ELISA deixou de diagnosticar 23% dos resultados positivos em relação aos mesmos resultados observados com a RIFI, portanto não deve ser substituída
- O ELISA-BM forneceu mais resultados falsos positivos utilizando o ponto de corte estabelecido pelo *kit* quando comparado com o novo ponto de corte, calculado a partir de controles negativos de eluatos (papel-filtro).
- A soroprevalência do teste ELISA diminuiu em quase 50%, quando analisado com o novo ponto de corte, nas 3 populações caninas dos inquéritos sorológicos (Rubiácea, Piacatú e Luiziana).

- Deve-se tentar implementar iniciativas para buscar novos testes com antígenos específicos e com marcadores moleculares que possam identificar cada fase da doença ou sintomatologia, é urgente.

9. RECOMENDAÇÕES

- Tanto a RIFI-BM como o ELISA-BM devem ser utilizados como métodos de triagem nos inquéritos sorológicos caninos
- A RIFI deve ser utilizada com antígeno específico *L. chagasi*, pois no presente estudo este teste foi capaz de separar todos os verdadeiros negativos
- A concentração ótima do antígeno para a RIFI deverá ser de aproximadamente 1×10^6 parasitos/ml, sendo que cada orifício da lamina deverá ser impregnado com 15 μ l da suspensão de parasitos
- Para a RIFI-BM, o novo ponto de corte deverá ser a diluição 1/40, com leitura de 2+ ou 1/80 com leituras 1+ ou 25%, para as amostras positivas
- Para o ELISA-BM utilizando amostras de sangue em papel-filtro, o ponto de corte deverá ser calculado com base nas densidades óticas de controles negativos também com sangue em papel-filtro
- Treinamentos para laboratórios que realizam inquéritos sorológicos caninos para incorporação dos novos critérios para a utilização dos *kits* de RIFI e ELISA produzidos por Biomanguinhos

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allain DS, Kagan IG **A direct agglutination test for leishmaniasis.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975; 24: 232-236.

Alves WA, Bevilacqua PD. **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. Saúde Pública*, 2004; 20(1).

Arias JR, Monteiro P, Zicker F **The reemergence of visceral leishmaniasis in Brasil.** *Emerging Infectious Diseases*, 1996; 2: 145-146.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP, Badaró 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: 53-57.

Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. **Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32: 480-484.

Badaró R, Jones TC, Lorencó R, Cerf J, Sampaio D, Carvalho EM, *et al.* **A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil.** *J. Infect. Dis.*, 1986a; 154: 639-649.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, *et al.* **New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis.** *J. Infect. Dis.*, 1986b; 154: 1003-1011.

Badaró RJS. **Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rk39) no diagnóstico**

sorológico da leishmaniose visceral, 1996 [tese doutorado] Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Badaró R e Reed SG. **Leishmanioses.** In: Ferreira AW e Ávila SLM. editor.,

Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1996; 151-156.

Badaró R, Duarte MIS. **Leishmaniose visceral (calazar)** In: Veronezzi R, Focaccia R. (Ed.). **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Atheneu, 1997,p.1234-1259

Berrahal F, Mary C, ROZE M, Berenger A, Escoffier K. **Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55 (3):273-277.

Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu MMLP, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, *et al.* **Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998; 31: 419-424.

Briesofsky J, **Computer Methods for Diagnostic Tests (CMDT).** <URL: <http://www1.vetmed.fu-berlin.de/~mgreiner/CMDT/poster.htm>> 2004 Mar 8.

Cabral M, Grady JO, Alexander J. **Demonstration *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs.** *Parasite Immunology.* 1992; 14: 531–539.

Cabrera MAA. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras.** 1999; 84 p. [Tese de Mestrado] – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública.

Callado ES, Moreno EC, Antunes CM, Wilke VML, Carneiro M. **Correlação entre a infecção humana assintomática por *Leishmania chagasi* e a infecção canina em General Carneiro, Sabará, Minas Gerais.** In: XVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e V Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba-MG. Rev. Soc. Bras. Méd. Trop., Uberaba: FMTM/FUNEP, 2001; p. 67.

Camargo-Neves VLF e Katz G. **Ações controle da leishmaniose visceral americana implementadas na região oeste do Estado de São Paulo.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1999 ; 32: 63.

Castro AG. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar) – Normas Técnicas.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde., 1996;

Callado ES, Moreno EC, Antunes CM, Wilke VML, Carneiro M. **Correlação entre a infecção humana assintomática por *Leishmania chagasi* e a infecção canina em General Carneiro, Sabará, Minas Gerais.** In: XVII reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e V reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, 2001; 67.

Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. **Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India.** Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg., 1990; 84: 363-366.

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. **Epidemia da leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil. Rev. Saúde Pública**, 1990; 25(5): 361-72.

Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick SM, *et al.* **Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1991; 24: 21-25.

Costa CH N, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, *et al.* **Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. J. Infect. Dis.**, 2000; 182: 997-1000.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. **A survey for american and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from áreas in Rio de Janeiro (Brasil) where human disease occur. Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 1985; 80: 17-22

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, *et al.* **Epi Info, version 6: a word processing data base, and statistics program for epidemiology on microcomputer. Center of Disease Control on Prevention, Atlanta, Georgia, USA.**, 1994.

Deane LM & Deane MP. **Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. O Hospital**, 1954; 45:703-707.

Dietze R, Falqueto A, Valli LCP, Rodrigues TP, Boulos M, Corey R. **Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a Dot – Enzyme – linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1995; 53(1): 40-42.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A. **Effect of eliminating seropositives Canines on transmittion of visceral leishmaniasis in Brazil. Clinical Infectious Diseases**, 1997; 25: 1240-1242.

Dye C. **Leishmaniasis epidemiology: the theory catches up.** *Parasitology*, 1992; 104: 7-18.

Dye C, Vidor E & Dereure J. **Serological diagnoses of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease.** *Epidemiology and Infection*, 1993; 103: 647-656.

Edrissian GH & Darabian P. **A comparison of enzyme-linked immuosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran.** *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, 1979; 73: 289-292.

Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAulliffe IT, Lopes UG, *et al.*, **Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil assessment of serodiagnostic method.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 42:118-123.

Evans TG, Teixeira JM, Mc.Auliffe IT, Vasconcelos IAB, Souza AQ, Lima JW, *et al.*, **Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil.** *Journal of diseases*, 1992; 166: 1124-1132.

Ferreira CS & Carvalho ME. **Padronização do uso de papel-filtro como suporte de material para reações sorológicas.** *Rev. Bras. Malariol.*, 1982; 34: 82-86.

Ferreira AGP, Silva ED, Araújo MFL, Silva RM, Taniguchi HH, Larosa R, *et al.*, **Kit EIE / LVA canina Bio-Manguinhos: Adaptação para processamento de sangue colhidos em papel filtro (coletadas em papel-filtro).** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2000; 33: 75

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portús M. **Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.** *Vetinary Record*, 1995; 126(20): 514-516.

Fletcher RH in: Nogueira YL. **Validação de um novo método de isolamento de vírus rábico.SP 2001** [tese de doutorado] Depto. de Práticas de Saúde Pública **Faculdade de Saúde Pública da USP.**

Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VL, Rodas LAC, Casanova C, Costa IP, et al. **Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,**1999; 32: 217-218.

Garcêz 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: 165-180.

Genaro O. **Leishmaniose visceral canina experimental.** 1993 [tese de doutorado] Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Genaro O. **Leishmaniose visceral americana.** In: **Neves, D. P. Parasitologia Humana,** Editora Atheneu, 10ª edição, 2000; 56-72.

Gomes AC. et al. **Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Visceral(Calazar).** Normas Técnicas. Brasília, **Fundação Nacional de Saúde,**1996.

Greiner M, Gardner IA. **Epidemiologic issues in the validation diagnostic tests. Prevent Veterinary Med.,** 2000; 45: 3-22.

Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg JJ. **A simple and economical direct agglutination test for a sero-diagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Med. Hyg.,** 1986; 80: 583-587.

Hasibeder G, Dye C, Carpenter J. **Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. Parasitology,** 1992; 105: 43-53.

Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM, Gonçalves ME, Luvizotto MCR, Lima VMF. **Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos.** *Clinica Veterinária*, 2003; 47: 42-48.

Iversson LB, Camargo ME, Rocha e Silva EO, Chieffi PP, Barros JAC. **Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil.** *Rev. Saúde Pública*. 1979; 13:159-67.

Kar K. **Serodiagnosis of leishmaniasis.** *Crit. Rev. Microbiol.*, 1995; 21: 123-152.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. **Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L). As a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará, State Brazil.** *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 1969; 63: 741-745.

Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardat Y. **Écologie des leishmanioses dans le sud de France. Les formes évolutives de la leishmaniose visceral canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique.** *Annales de Parasitologie*, 1979; 54: 277-295.

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

Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Molleda JM. **Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis.** *Journal of Veterinary Medicine*, 1996; 43: 469-474.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. **Protein measurement with de Folin Phenol Reagent.** *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275

Magalhães PA, Mayrink W, Costa AC, Mello MN, Dias M, Batista SM *et al* 1980, **Calazar na zona do Rio Doce, Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1980; 22(4): 197-202.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. **Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 82: 566-567.

Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ, Smaniotto H, Silva CFB, Schuck Neto VF e Donetto A. **Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul.** 2003; 36(4): 499-501.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. **Leishmaniose Visceral (Calazar).** *Jornal Brasileiro de Medicina*, 1981; 41(5): 61-84.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. **Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro.** *Parasitology Today*, 1994; 10(1): 34-37

Mollina R, Amela C, Nieto J, San Andres M, Gonçalves F, Castillo JA, *et al.* **Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 88: 491-493.

Moreira MAB, **Leishmaniose visceral canina em Araçatuba (SP): diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular e alterações histopatológicas de órgãos linfóides e fígado.** SP 2003 [tese de mestrado] **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.**

Neogy AB, Vouldoukis I, Silva AO, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, *et al.* **Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in**

na endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. Am.J. Trop. Med. Hyg., 1992; 47(6): 772-777.

Nogueira YL, Estimativa de validade de um novo método de isolamento de vírus rábico. Rev. Saúde Pública, 2004; 38(2): 315-322.

Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais. Cadernos de Saúde, 2001; 17(5): 1231-1239.

Paula AA. Aspectos macro e micro-ecológicos da Leishmaniose Visceral Americana canina em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro 2001 [Tese de Mestrado], IOC.

Pellegrino J & Brener Z. Reação de fixação do complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. Ver. Brás. Malariol. Doenças Tropicais, 1958; 10: 39-44.

Pereira NG. Epidemiologia teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1995.

Pessoa SB. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1982;11ª edição

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitember G J. Cellular and humoral Immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infection and Immunity, 1994; 62: 229-235

Rachamim N, Jaffe CL, Abranches P, Silva-Pereira MC, Schnur LF, Jacobson RL. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. Ann Trop Med Parasitol, 1991; 85(5): 503-508.

Rey L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2001

Sanchis R, Vitu C & Giauffret A. **Lês examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. II. Evolution des tests biologiques dans la maladie experimentale. Revue Me Vet., 1976; 127: 1191-1202.**

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Paiva Hoffmann M, Freitas RA, Malacco MA. **Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical Veterinarian Entomology, 1998; 12(3): 315-317.**

Savani ESMM, von Schimon B, Camargo MCGO, D. Auria SRN, **Vigilância de Leishmaniose Visceral Americana em Cães de Área não Endêmica, Brazil. Rev: Saúde Publica, 2003; 37: 260-262.**

Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, Silva ES. **Evaluation of the direct agglutination test and the rk39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Mem.. Inst. Oswaldo Cruz, 2002; 97.**

Schoojans F. **MedCalc statistic for biomedical research. Belgium; 1998.**

Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo. – **II Informe Técnico – Leishmaniose Visceral Americana, 2003.**

Semião-Santos SJ, Abranches P, Silva-Pereira MCD, Santos-Gomes GM, Fernandes JP, Vetter JCM. **Reliability of serological methods for detection of Leishmaniasis in portuguese domestic and wild reservoirs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1996; 91: 747-750.**

Schoone GJ, Hailv A, Kroon CCM, Nieuwenhuys J L, Schallig HDFH, Oskam L. **A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies. Trans. R. Soc. Med. Hyg., 1988; 95: 400-401.**

Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Peters EA. **Visceral leishmaniasis in Sudan: Comparative parasitological methods of diagnosis.** *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.*, 1988; 82: 66.

Slappendel RJ, Ferrer L. **Leishmaniasis** In: Greene CE. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases of the Dog and Cat.** Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1990; 450-458.

Tesh RB. **Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995; 52: 287-292.

Tolezano J, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araujo MFL, Tanigushi HH, Barbosa J A R, Vieira JBF & Coelho GE. **Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998; 31: 85-92.

Trager W & Jensen JB. **Human malaria parasites in continuous culture.** *Science*, 1976; 193: 673-675.

Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Velez ID. ***Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia.** *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 1994;50(5): 557 – 65.

World Health Organization. **The Leishmaniasis, WHO Tech. Rep.Ser.701.**, 1984.

World Health Organization. **Control of leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee Technical report Series, Geneva, Switzerland: World Health Organization;** 1990; 793, 158.

Youden D. **Index for rating diagnostic tests.** *Cancer*, 1950; 3: 32-35.

Zweig MH e Campbell G. **Receiver-operating characteristic (ROC) plots-a fundamental evaluation tool clinical medicine.** *Clin Chem*, 1993; 39: 561-577.

ANEXO I



IFI - LEISHMANIOSE CANINA - BIO-MANGUINHOS
(MATERIAL FORNECIDO PARA 2000 DETERMINAÇÕES)
IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
CANINA

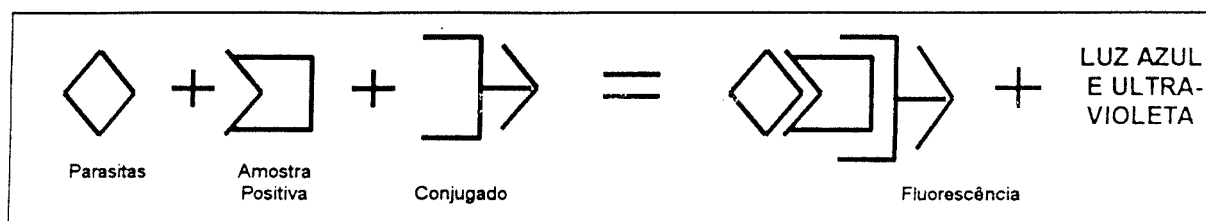


PRINCÍPIO DO TESTE:

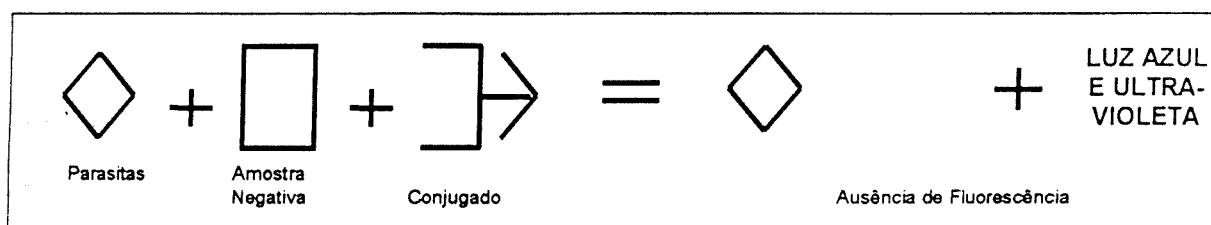
O conjunto apresentado é utilizado na detecção de anticorpos contra **Leishmania** em soros de cão. O ensaio de imunofluorescência indireta consiste na reação de soros com parasitas (**Leishmania**), fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente, para evidenciação 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 reagente os 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:

REAGENTE



NÃO REAGENTE



MATERIAL FORNECIDO:

- 4 Frascos de Antígeno de Leishmania - 5 mL cada
- 1 Frasco de Conjugado Anti-cão - 1 mL
- 1 Frasco de Glicerina Tamponada - 25 mL
- 1 Frasco de Azul de Evans 0,1% - 2,5 mL
- 4 Caixas de Lâminas para IFI, contendo 50 unidades cada

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO:

- Soro controle positivo - 0,5 mL
- Soro controle negativo - 0,5 mL
- PBS (NaCl 0,15 M + Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,01 M pH 7,2)
- Lamínulas
- Microplacas e micropipetas ou tubos e pipetas para diluição
- Câmara úmida e cubas de lavagem
- Microscópio de fluorescência

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL FORNECIDO:

O conjunto deverá ser conservado à 2-8°C (geladeira) e a estabilidade é garantida por 12 meses (vide rótulo).

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Somente para uso diagnóstico "IN VITRO"

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de risco. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções 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, os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado.
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar.
- Usar luvas e jalecos descartáveis durante todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, lâminas usadas etc. em solução de hipoclorito de sódio a 1/20 ou água sanitária a 1/10.
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes.
- Todos os frascos utilizados para diluir os componentes devem ter sido muito bem lavados e enxaguados abundantemente com água destilada.

PREPARO DO TAMPÃO FOSFATO (PBS)

Sais	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) PA 0,15 M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na ₂ HPO ₄) PA - 0,0072 M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH ₂ PO ₄) PA - 0,0028 M	0,34 g
Água destilada qsp (quantidade suficiente para)	1.000 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

Exemplo de correção de peso para preparo de PBS quando se utiliza o fosfato dibásico hidratada com 12 moléculas de água

Cálculo: Na₂HPO₄ Anidro - Peso Molecular = 142 — pesar 1,02 g
Na₂HPO₄.12H₂O - Peso Molecular = 358 — pesar X g

$$\frac{142}{358} \times \frac{1,02}{X} = \frac{1,02 \times 358}{142} = 2,57 \text{ g}$$

Neste exemplo, onde o Fosfato Dibásico é hidratado com 12 moléculas de água, deve-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 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 homogêneo durante o preparo.

3 - Deixe secar de um dia para o outro à temperatura ambiente ou duas horas à 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas.

OBS: Evitar atrito com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitas fixados.

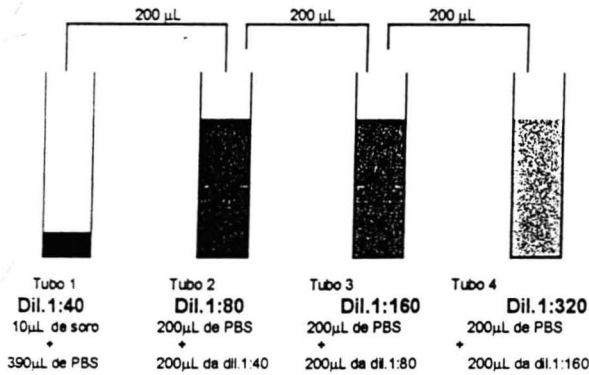
4 - Fazer um protocolo de trabalho, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP) e do Controle Negativo (CN) além dos controles do conjugado (PBS).

01	1	2	3	4	5	6
	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160
	7	8	9	10	11	12
	CP 1:320	CN 1:40	PBS	CP 1:320	CN 1:40	PBS

02	1	2	3	4	5	6
	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160
	7	8	9	10	11	12
	CP 1:320	CN 1:40	PBS	CP 1:320	CN 1:40	PBS

03	1	2	3	4	5	6
	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160	CP 1:40	CP 1:80	CP 1:160
	7	8	9	10	11	12
	CP 1:320	CN 1:40	PBS	CP 1:320	CN 1:40	PBS

5. Diluir em PBS, o soro controle positivo 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e diluir o soro controle negativo 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada abaixo:



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

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

7 - Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C.

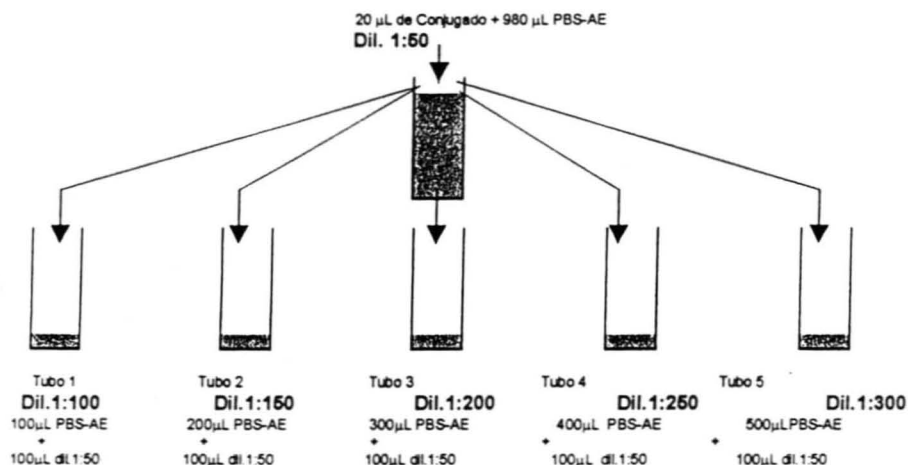
8 - Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

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

10 - Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37 °C para secar. No entanto não exceda 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 marcada com fluoresceína, conforme descrito abaixo:



13. Adicionar 15µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes, conforme esquema abaixo:

lâmina 1 - diluição 1:50

lâmina 1 - diluição 1:100

lâmina 2 - diluição 1:150

lâmina 2 - diluição 1:200

lâmina 3 - diluição 1:250

lâmina 3 - diluição 1:300

01	1	2	3	4	5	6
	1:50	1:50	1:50	1:100	1:100	1:100
	7	8	9	10	11	12
	1:50	1:50	1:50	1:100	1:100	1:100

02	1	2	3	4	5	6
	1:150	1:150	1:150	1:200	1:200	1:200
	7	8	9	10	11	12
	1:150	1:150	1:150	1:200	1:200	1:200

03	1	2	3	4	5	6
	1:250	1:250	1:250	1:300	1:300	1:300
	7	8	9	10	11	12
	1:250	1:250	1:250	1:300	1:300	1:300

14. Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C.

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

16. Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa à 37°C, para secar. No entanto não exceda muito nesta etapa.

17. Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com laminula. Mantenha-as sob abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO

Para a leitura, utilize 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 soro controle positivo (vide rótulo de frasco) e ausência de fluorescência nas diluições correspondentes ao soro negativo e ao PBS (controle de conjugado).

PROCEDIMENTO PARA EXECUÇÃO DO ENSAIO:

1 - Ferver as lâminas e lamínulas 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).

1 CP 1:40	2 CN 1:40	3 A1 1:40	4 A1 1:80	5 A2 1:40	6 A2 1:80
7 A3 1:40	8 A3 1:80	9 A4 1:40	10 A4 1:80	11 A5 1:40	12 A5 1:80

OBSERVAÇÃO:

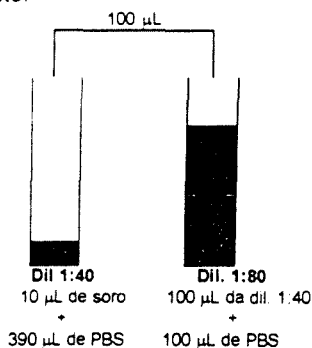
A - Conforme recomendação de especialistas, as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de imunofluorescência, pelo menos, nas diluições 1:40 e 1:80.

B - Os soros controle positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

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 à 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas.

OBS: Evitar atrito com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitas fixados.

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



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 à 37 °C.

7 - Lavar as lâminas 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 exceda muito nesta etapa.

10. Prepare, momentos antes do uso, uma solução PBS - Azul de Evans (PBS-AE), conforme tabela abaixo:

Nº de lâminas	Volume de PBS	Volume de Azul de Evans (AE) 0,1%
2	480 µL	20 µL
4	960 µL	40 µL
6	1440 µL	60 µL

11 - Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15 µL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

OBS1: Diluir somente a quantidade de conjugado necessária para utilização no mesmo dia.

OBS2: Evite pipetar menos de 5 µL de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição.

12 - Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C.

13 - Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

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

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

16 - Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Mantenha-as sob abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

17 - Levar as lâminas ao microscópio de fluorescência e:

- Focalizar o orifício do soro controle positivo e observar a fluorescência.
- Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar o " back-ground" (coloração de fundo) do teste.
- Focalizar os orifícios dos soros teste e considerar REAGENTE aqueles que a partir da diluição 1:40, inclusive, apresentam fluorescência na membrana dos parasitos, mais intensa que o "back-ground" observado no orifício do soro controle negativo. Considerar NÃO REAGENTE os soros que não apresentarem fluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Camargo, M.E. & Rebonato, C., 1969. Cross-reactivity in immunofluorescence for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A.J.Trop.Med.Hyg., **18**: 500-505.
- Cuba, C.A.; Marsden, PH.D; Barreto, A.C.; Rocha, R.; Sampaio, R.R. & Patziuff, L., 1980. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. of Sanit. Param., **89**: 195-208.
- Guimarães, M.C.S.; Celeste, B.J.; Corrales, E.M., 1991. Antígenos de Leishmania-major-like e *L. braziliensis* na reação de imunofluorescência (IgG-IF) na Leishmaniose Muco cutânea. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **24** (supl. I): 112.
- Methods in Immunology - A Laboratory Text for Instruction and Research, Third Edition, Benjamin Cummings Publishing Company, 1981.
- Fluorescent Antibody Techniques, CDC nº729, USA, 1961.
- Labelled Antibodies in Bioplogy and Medicine, Abacus Press and McGraw Hill International Book Company, 1978.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a:

Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos / Divisão de Reativos para Diagnóstico

v. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ

Tel: (0XX) 21 38829343 - FAX: (0XX) 21 260-4727

EDIÇÃO: março de 2002

ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA LEISHMANIOSE CANINA PROTOCOLO

Instituição: _____ IFI nº: _____ Data: ____ / ____ / ____

Kit: _____ Lote: _____ Validade: _____

Lâmina nº: _____

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7	8	9	10	11	12
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1 _____	7 _____
2 _____	8 _____
3 _____	9 _____
4 _____	10 _____
5 _____	11 _____
6 _____	12 _____

Lâmina nº: _____

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7	8	9	10	11	12
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1 _____	7 _____
2 _____	8 _____
3 _____	9 _____
4 _____	10 _____
5 _____	11 _____
6 _____	12 _____

Lâmina nº: _____

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7	8	9	10	11	12
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1 _____	7 _____
2 _____	8 _____
3 _____	9 _____
4 _____	10 _____
5 _____	11 _____
6 _____	12 _____

Lâmina nº: _____

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7	8	9	10	11	12
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1 _____	7 _____
2 _____	8 _____
3 _____	9 _____
4 _____	10 _____
5 _____	11 _____
6 _____	12 _____

Técnico Responsável: _____

Observações: _____

ANEXO II



EIE-LEISHMANIOSE CANINA- BIO-MANGUINHOS

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
CANINA
(MATERIAL FORNECIDO PARA 384 REAÇÕES)



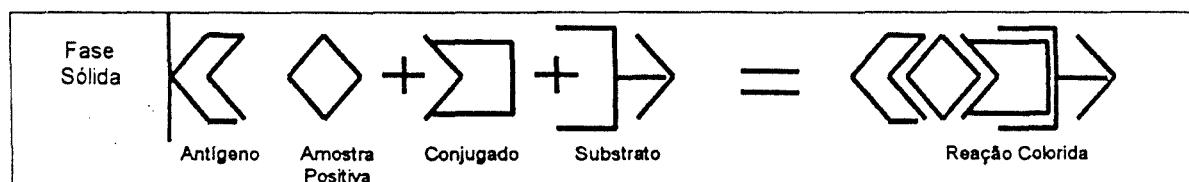
PRINCÍPIO DO TESTE:

Este ensaio consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* (complexo *L. donovani*) obtidos a partir de cultura "in vitro", que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-globulina de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes.

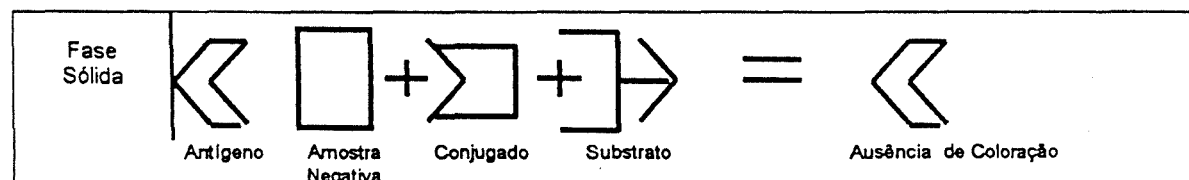
Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

ESQUEMA DO TESTE:

REAGENTE



NÃO REAGENTE



MATERIAL FORNECIDO:

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Diluyente de Amostra/Conjugado [5X]	1 Fr. 90 mL
R-02	Lectina de leite	1 Fr. 10 g
R-03	Tampão de Lavagem [20X]	1 Fr. 120 mL
R-04	Diluyente do Substrato	1 Fr. 60 mL
R-05	Cromógeno (TMB)	1 Fr. 0,70 mL
R-06	Substrato (H ₂ O ₂)	1 Fr. 0,20 mL
R-07	Ácido Sulfúrico 2M	1 Fr. 30 mL
R-08	Controle Positivo	1 Fr. 0,25 mL
R-09	Controle Negativo	1 Fr. 0,25 mL
R-10	Conjugado	1 Fr. 0,40 mL
R-11	Molduras/strips duplas sensibilizadas	04/24
	Folhas Adesivas	08
	Manual de Instruções de Uso	01

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc)
- Água destilada
- Micropipetas mono e multicanais e ponteiras
- Barquetes
- Estufa a 37°C
- Luvas descartáveis
- Hipoclorito de sódio ou água sanitária
- Espectrofotômetro para leitura microplacas, com filtro de 450nm,
- Lavador automático ou sistema de vácuo com pente de lavagem e/ou pipeta pasteur
- Balança semi-analítica
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6mm e agitador rotacional

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

Manter entre 2 e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06, R-07

Manter à - 20°C: R-08, R-09, R-10, R-11

Todos os componentes do teste, devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do conjunto.

OBS.: A temperatura de transporte com bobinas de gelo reciclável, permitem que o conjunto se mantenha em condições adequadas, durante 24-36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

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 necessárias. A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das boas práticas de laboratório, tais como:

- As amostras de soro ou plasma assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado.
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar.
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como: luvas descartáveis, jalecos e protetor facial.
- Desprezar ponteiras, luvas, vidrarias, frascos, strips etc, em solução de hipoclorito de sódio a 1-2% ou água sanitária.
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos a parte de cima das strips
- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez.
- As soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais.
- Não usar os reativos após sua data de validade.
- Utilize frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS DE SORO

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	Até 64	10 mL	1,0 g	40 mL
5	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

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

3 - Distribuir 100 µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o controle positivo, na "C" e "D" o controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100µL das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo CN = Controle Negativo SS = Sem soro

4 - Selar os strips com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

5 - Preparo do tampão de lavagem:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-03 (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	2 mL	38 mL
2	Até 32	3 mL	57 mL
3	Até 48	4 mL	76 mL
4	Até 64	5 mL	95 mL
5	Até 80	7 mL	133 mL
6	Até 96	8 mL	152 mL

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

7 - Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente. Preparo do conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-01 diluído	R-10
1	Até 16	5 mL	5 µL
2	Até 32	5 mL	5 µL
3	Até 48	10 mL	10 µL
4	Até 64	10 mL	10 µL
5	Até 80	15 mL	15 µL
6	Até 96	15 mL	15 µL

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

9 - Selar e incubar os strips conforme descrito no item 4 e aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

11 - Preparo do substrato:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-04	R-05	R-06
1	Até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	Até 32	4,0 mL	40 µL	8 µL
3	Até 48	6,0 mL	60 µL	12 µL
4	Até 64	8,0 mL	80 µL	16 µL
5	Até 80	10,0 mL	100 µL	20 µL
6	Até 96	12,0 mL	120 µL	24 µL

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

13 - Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

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

LEITURA:

Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm 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) e em seguida, iniciar a leitura da microplaca de teste.

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.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X}CN \times 2$

CO = Cut-Off

$\bar{X}CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

OBS: O 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.

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.

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO:

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	Até 64	10 mL	1,0 g	40 mL
5	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	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, nos tubos correspondentes.

3 - Adicionar 400 µL de diluente de amostra/conjugado, por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500 µl 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 os tubos em leve agitação por 1 hora.

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

6 - Distribuir 100 µL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o soro controle positivo, na "C" e "D" o controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras teste já eluídas, nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo CN = Controle Negativo SS = Sem soro

7 - Selar os strips com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

8 - Preparo do tampão de lavagem:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-03 (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	2 mL	38 mL
2	Até 32	3 mL	57 mL
3	Até 48	4 mL	76 mL
4	Até 64	5 mL	95 mL
5	Até 80	7 mL	133 mL
6	Até 96	8 mL	152 mL

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

10 - Preparo do conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-01 (diluído)	R-10
1	Até 16	5 mL	5 µL
2	Até 32	5 mL	5 µL
3	Até 48	10 mL	10 µL
4	Até 64	10 mL	10 µL
5	Até 80	15 mL	15 µL
6	Até 96	15 mL	15 µL

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

12 - Selar e incubar os strips conforme descrito no item 7 e aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

14 - Preparo do substrato:

Nº strips duplas	Nº de reações	R-04	R-05	R-06
1	Até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	Até 32	4,0 mL	40 µL	8 µL
3	Até 48	6,0 mL	60 µL	12 µL
4	Até 64	8,0 mL	80 µL	16 µL
5	Até 80	10,0 mL	100 µL	20 µL
6	Até 96	12,0 mL	120 µL	24 µL

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

16 - Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

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

LEITURA:

- Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm, e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar e iniciar a leitura.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X}CN \times 3$

CO = Cut-Off

$\bar{X}CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

OBS: O 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.

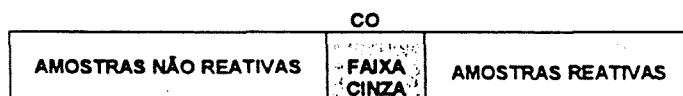
RESULTADOS:

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.

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.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Cuba, C.A.; Marsden, PH.D.; Barreto, *C.; Rocha, R.; Sampaio, R.R. & Patziuff, L., 1980. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. Of sanit. Param., 89: 195-208.
2. Knovall G. Purification of Staphylococcal Protein A using Immunosorbents. Scand. J. immunol. 2 (1973) 31-36.
3. Bradford. M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of Protein-Dye. Biding Analytical Biochemitry, 72: 1976.
4. Lyerla, H.C.; Forrester, T.F. Immunofluorescence Methods in Virology Course. No.8231-c Center for Disease Control.
5. Hudson L.; Hay F.C. Practical Immunology. Oxford London Edinburg Melboune Blackwell Scientific Publications (1976).
6. Lowry, O. H.; Resebrough, N.J.; Farr, A.L.; and Randall, R.J. J. Biol. Chemical 193,265-275.
7. Nakane, P.K.; Kawavi, A. Peroxidase. Labeled Antibody a new Method of Conjugation. J. Histochem Cytochem; 22(12): 1974.
8. Tsang, V.C.N.; Peralta, J.M.; Simons, A.R. Enzyme Kiked Immunoelctrotransfer blot Techniques (EITB) for studying the specificites of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis - Meth. Enzymol., 92: 377-391, 1983.
9. Jolley, M.E. Antigen Detection by Particle Concentration Fluorescence Immunoassay. Pandex (Reseach Report) 3: FEB:
10. Mancini, G.; Carbonara, A.O. ; Heremans, J.F. Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. Immunochemistry, 2: 235-254, 1965.
11. (WHO) Tehe Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Bull. WLd.HLTh. Org., 54: 129-139, 1976.
12. Wisdon, G.B. Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem., 22/8:1243-1255.
13. Tale, F.A.F.; Balado, R.F. Inzimo-Immunoensayo-Acta Bioquim. Clin. Latinoamericana, 4: 191-194, 1977.
14. Angulo, G.P.; Vela, M.C.M. El Metodo ELISA - Tecnicas y Aplicacion Laboratorio, 65 (385): 59-77, 1978.
15. Voller, A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Microbiological Associates Vol 2 no. 1 Feb 1978.
16. Langone, J.J. Applications of Immobilized Protein A in Immunochemical Techniques J. Immunol. Meth., 55: 277-296.

17. Montoya, A.; Castell, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for use in enzyme Immunoassay. J. Immun. Meth., 99: 13-20, 1978.

18. Mac Crindle, C.; Sch Wenzer, K.; Jolley, M.E. Particle Concentration Fluorescence Immunoassay: A new immunoassay technique for quantification of human Immunoglobulins in serun. Clin.Chem. 31(9): 1487-90, 1985.

19. Guimarães, M.C.S. Exames de Laboratório: Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo. Rev. Socied. Bras. Med. Trop. 18(2): 117-120, 1985.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a:
Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos / Departamento de Reativos para Diagnóstico
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro – RJ
CGC: 33.781.055/0015-30
Tel: (0XX21) 3882-9393/9340/94110XX21) 2561-0277
SAC: 0800210310
www.bio.fiocruz.br

Edição: Agosto 2002

Protocolo para Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina

ote: _____ Validade: _____ EIE N^o: _____ Data: _____

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: (Amostras de Soro)

$$CO = \bar{X}CN \times 2$$

CO =

Técnico Responsável: _____

Observações: _____

Protocolo para Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina

Lote: _____ Validade: _____ EIE N^o: _____ Data: _____

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: (Amostras colhidas em Papel Filtro)

$$CO = \bar{X}CN \times 3$$

CO =

Técnico Responsável: _____

Observações: _____

