

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Núcleo de Medicina Tropical

Validação da técnica de imunocromatografia rápida de  
duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral  
canina em amostras de sangue total e soro

**Edvar Yuri Pacheco Schubach**

Matrícula 09/0156986

**Orientadores:** Gustavo Adolfo Sierra Romero e

Fabiano Borges Figueiredo

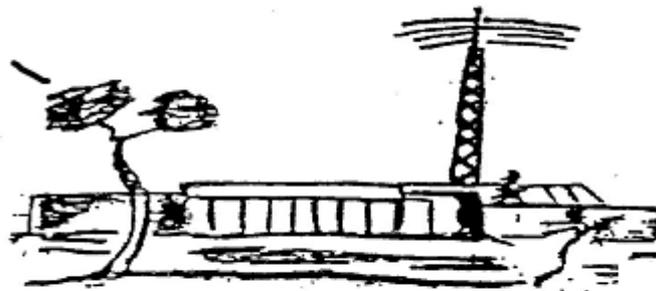
BRASÍLIA

2011

**Edvar Yuri Pacheco Schubach**

Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical como requisito parcial para obter o título de mestre em Medicina Tropical – Área de concentração em epidemiologia e controle das doenças infecciosas e parasitárias.



## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 996987.

Schubach, Edvar Yuri Pacheco.

S383v           Validação da técnica de imunocromatografia rápida  
de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose  
visceral canina em amostras de sangue total e soro  
/ Edvar Yuri Pacheco Schubach. - - 2011.  
                  xiii, 58 f. :il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,  
Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical,  
2011.

Inclui bibliografia.

Orientação: Gustavo Adolfo Sierra Romero.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmaniose visceral  
- Diagnóstico. 3. Cão - Doenças. I. Romero, Gustavo  
Adolfo Sierra. II. Título.

CDU 616.993.161

## **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Edvar Yuri Pacheco Schubach

**Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso  
para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de  
sangue total e soro**

**Universidade de Brasília**

Medicina tropical: Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Data da defesa da dissertação**

12 de agosto de 2011

**Banca examinadora**

**(Em ordem alfabética)**

Cor Jesus Fernandes Fontes – UFMT (Membro titular)

Universidade Federal do Mato Grosso

Elza Ferreira Noronha – UnB (Membro suplente)

Universidade de Brasília

Gustavo Adolfo Sierra Romero – (Presidente)

Universidade de Brasília

Maria Regina Fernandes de Oliveira – UnB (Membro titular)

Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

Não posso começar diferente, tenho antes de tudo que agradecer a Deus por estar sempre iluminando meu caminho, abrindo portas e colocando pessoas especiais em minha vida. Para não ser injusto começarei por etapas e sua ordem não condiz com prioridades de agradecimentos, pois assim estaria sendo injusto. Todos são importantes naquele momento. Quando estava perdido, sem rumo na profissão e querendo tentar a área acadêmica, fui orientado por minha mãe para procurar o Fabiano Figueiredo na tentativa de realizar capacitação no IPEC/FIOCRUZ-RJ. Fui aceito e por ele treinado por quase um ano antes de me ser confiada a missão junto ao meu amigo Carlos Barbosa, de realizarmos coletas biológicas de cães para "Construção de um painel de soros canino para o Ministério da Saúde utilizar na validação de kits de diagnóstico para leishmaniose visceral" o qual Mauro Arruda coordenava junto ao Fabiano. Viajamos Brasil a fora por quase um ano, trabalhando em Bauru-SP, Brasília-DF, Palmas-TO e por fim Fortaleza-CE. Em cada cidade encontramos pessoas especiais, o qual nos deram apoio para trabalhar e nos ajudaram com muito suor e boa vontade. Sou grato a cada um, principalmente aos dois assistentes, Júnior e Edilson, do centro de zoonoses de Fortaleza o qual compunham nossas equipes e nos ajudaram com grande comprometimento a realizar este estudo. Agradeço enormemente ao meu orientador Gustavo Romero por ter me acolhido em 2008 quando em uma conversa despretensiosa de minha parte, disse que me orientaria caso entrasse na pós do Núcleo de Medicina Tropical em curso que seria aberto em meados de 2009, do qual faço parte da primeira turma e tenho a honra de ser o primeiro aluno a defender a dissertação. Agradeço mais uma vez ao Fabiano Figueiredo por ter aceito meu convite de co-orientador e ter me dado os primeiros passos para chegar hoje aqui. Ele cobrou bastante, mas, com o grande poder de esquiva que possuo, consegui correr. Brincadeiras a parte, sempre fui dedicado e sempre lhe falei que poderia contar comigo por mais que estivesse atrasado, no final daria tudo certo, pois se não der é porque não chegou o final. Pois bem, estamos aqui. Agradeço a cada aluno, funcionário e professor do Núcleo de Medicina Tropical que me aturou. Quando falo aturou, quem me conhece sabe o quanto sou chato. Fiz muitos amigos durante o

curso, dentre eles destaco o Mauro Arruda, companheiro de trabalho e estudo que me deu muitas orientações durante esses dois anos e o meu amigo Leandro Nascimento, funcionário da instituição, que quebrou muitos galhos e se tornou amigo particular. Agradeço a família Starling por ter me acolhido em Brasília e ter me dado todo o afeto que precisava estando longe de minhas origens, agradecendo principalmente a Camila e João Pedro Starling por fazerem parte de mim, colaborando para construir parte de quem hoje sou. Agradeço aos meus amigos de infância os quais sempre estiveram ao meu lado e espero para sempre assim contar. Agradeço aos meus pais Armando e Tânia por além de me educarem, orientar até hoje meus caminhos, me dando a mão nos momentos necessários. Não posso esquecer de minhas irmãs Aline e Taline e de minha avó materna Bela, além de todos os outros tios, tias, primos e primas queridos do meu coração. Peço desculpas por não citar todos os nomes, mas saibam que todos que conheci, para mim são e serão sempre importantes.

Obrigado.

## Lista de abreviaturas

**ADN** - ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

**CEUA** - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**DAT** - TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA

**DPP** - DUAL PATH PLATAFORM

**ELISA** - ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

**HE** - HEMATOXILINA-EOSINA

**FIOCRUZ** - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**IC<sub>95%</sub>** - INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%

**IHQ** - IMUNOHISTOQUÍMICA

**IPEC** - INSTITUTO DE PESQUISAS CLÍNICAS

**K** - ÍNDICE KAPPA

**LV** - LEISHMANIOSE VISCERAL

**LVA** - LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

**LVC** - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

**LF** - LATERAL FLOW

**LTA** - LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

**MLEE** - ELETROFORESE DE ENZIMAS

**N** - NÚMERO

**NNN** - NOVY, McNEAL E NICOLLE

**PBS** - SALINA TAMPONADA COM FOSFATO

**PCR** - REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

**RIFI** - REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

**S1** - PRIMEIRA TIRA DO TR DPP QUE CONDUZ A AMOSTRA, SENDO COMPOSTA POR LEITO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA E MEMBRANA E CARTÃO LAMINADO

**S2** - SEGUNDA TIRADO TR DPP QUE DETECTA ANTICORPOS DA AMOSTRA, SENDO COMPOSTA POR LEITO COM CONJUGADO, MEMBRANA DE ABSORÇÃO RESIDUAL E CARTÃO LAMINADO

**SPSS** - STATICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES

**SER** - SECRETARIAS EXECUTIVAS REGIONAIS

**SRD** - SEM RAÇA DEFINIDA

**TR DPP** - TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE DUPLO PERCURSO

**VigiLEISH** - LABORATÓRIO DE VIGILÂNCIA EM LABORATÓRIOS

**VIH** - VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

**VPN** - VALOR PREDITIVO NEGATIVO

**VPP** - VALOR PREDITIVO POSITIVO

## Resumo

A leishmaniose visceral representa um importante problema em saúde pública para o Brasil, sendo o cão doméstico a principal fonte de infecção para o vetor. O objetivo deste estudo foi validar a técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro de cães. A amostra foi composta por 428 cães domiciliados selecionados por conveniência em dois bairros de uma região endêmica na cidade de Fortaleza, Ceará. De cada cão examinado, foram coletados 5µL de sangue periférico da ponta de orelha para realização do teste rápido em sangue total, 5 mL de sangue da veia jugular para obtenção do soro utilizado na realização do teste em condições de laboratório, além de três fragmentos de pele íntegra da região escapular utilizados para exames parasitológicos. Destes, dois foram acondicionados em solução salina estéril com antibiótico e antifúngico para isolamento de *Leishmania* em cultura e um em formol 10% tamponado para realização do exame histopatológico e de imunohistoquímica. Os animais positivos em pelo menos um desses três exames foram considerados casos e os negativos nos três exames foram considerados controles ou não-casos. Na avaliação do teste rápido no sangue com leitura visual, no soro com leitura eletrônica e no soro com leitura visual, foram estimadas, respectivamente, sensibilidade de 87,5% (IC<sub>95%</sub> 66,5 a 96,7), 88% (IC<sub>95%</sub> 67,5 a 96,8) e 88% (IC<sub>95%</sub> 67,5 a 96,8) e especificidade de 73,3% (IC<sub>95%</sub> 67,7 a 78,4), 69,2% (IC<sub>95%</sub> 63,7 a 74,3) e 68,2% (IC<sub>95%</sub> 62,2 a 74,3). A concordância entre a leitura visual e eletrônica no soro foi classificada como quase perfeita, índice Kappa = 0,88 (IC<sub>95%</sub> 0,83 a 0,93). O valor preditivo

positivo para 7.9% de prevalência observada na amostra do estudo foi 21.9%. A análise de sensibilidade revelou que o valor preditivo positivo permaneceu abaixo de 50% em cenários com prevalência de 20%. O bom desempenho do teste rápido no sangue com leitura visual sugere que o mesmo possa ser indicado como exame de triagem para uso na rotina de campo e que ferramentas para leitura eletrônica não sejam necessárias para confirmação do resultado, porém seu uso associado a outros testes, utilizando estratégias de testagem sequencial ou paralela em algoritmos específicos deve ser avaliado, assim como a sua comparação formal com os testes atualmente disponíveis na rotina, para aproveitar da melhor maneira possível as facilidades da sua aplicação em condições de campo.

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose visceral canina 2. Diagnóstico sorológico 3. Sensibilidade 4. Especificidade 5. Validação de testes 6. *Leishmania chagasi*.

## Abstract

Visceral leishmaniasis is a major public health problem in Brazil where the domestic dog is the main source of infection for the vector. The objective of this study was to validate a dual path platform rapid chromatographic immunoassay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in whole blood and serum samples. The study sample consisted of 428 resident dogs selected by convenience from two districts of an endemic region of the city of Fortaleza, Ceará. Five micro liters of peripheral blood were collected from the tip of the ear to perform the rapid test in whole blood; 5 mL of blood from the jugular vein were collected to obtain serum for testing under laboratory conditions, and three fragments of intact skin from the scapular region were obtained for parasitological examination. Two skin fragments were stored in sterile saline with antibiotics and antifungal agents for isolation of *Leishmania* in culture and one fragment was stored in 10% buffered formalin for performing the histopathology and immunohistochemistry procedures. Positive animals in at least one of those three parasitological tests were classified as cases and negative animals in all the three tests were considered non-cases. Rapid test sensitivities were 87.5% (CI<sub>95%</sub> 66,5 to 96,7), 88% (CI<sub>95%</sub> 67,5 to 96,8%) and 88% (CI<sub>95%</sub> 67,5 to 96,8); and specificities were 73.3% (CI<sub>95%</sub> 67,7 to 78,4), 69,2% (CI<sub>95%</sub> 63,7 to 74,3) and 68,2% (CI<sub>95%</sub> 62,2 to 74,3) in whole blood submitted to visual reading; serum submitted to electronic reading and serum submitted to visual reading; respectively. The agreement between visual and electronic reading of serum samples was classified as almost perfect, Kappa index = 0.88 (CI<sub>95%</sub> 0.83 to 0.93). Positive predictive value for a 7.9% prevalence observed in the study sample was 21.9%. Sensitivity analysis revealed that positive predicted value remained below 50% in scenarios of prevalence as high as 20%. The performance of the rapid test in whole blood samples submitted to visual reading suggests that it could be indicated as the screening test for routine use in the field and that tools for electronic reading would be unnecessary to confirm the final result. However, its use in conjunction with other serological assays, using sequential or parallel testing strategies in specific algorithms should be evaluated, as well as its formal

comparison with the currently available tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis.

**Palavras-chave:** 1. Canine visceral leishmaniasis 2. Serology 3. Sensitivity 4. Specificity 5. Test validation 6. *Leishmania chagasi*.

## Sumário

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	1
1.3. CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) .....	3
1.4. DIAGNÓSTICO.....	3
1.5. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE .....	5
1.6. IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CANINO COMO FERRAMENTA PARA O CONTROLE DA LVC.....	6
1.7. DESEMPENHO DOS TESTES UTILIZADOS PARA O PADRÃO .....	8
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>11</b>
4.1. ÁREA DE ESTUDO.....	11
4.2. DESENHO DO ESTUDO .....	12
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO .....	13
4.4.1. Critérios de inclusão .....	13
4.4.2. Critérios de exclusão .....	13
4.5. DEFINIÇÃO DE “CASO” E DE “NÃO-CASO” .....	13
4.6. DEFINIÇÃO DE CÃO ASSINTOMÁTICO, OLIGOSSINTOMÁTICO E SINTOMÁTICO....	13
4.7. AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	14
4.8. MÉTODOS ESPECÍFICOS .....	14
4.8.1. Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico .....	14
a) Sangue.....	14
b) Amostras teciduais.....	15
4.8.2. Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação etiológica ..	15
4.8.2.1. Isolamento parasitário em meio de cultura .....	15
4.8.2.2. Eletroforese de enzimas (MLEE) .....	16
4.8.2.3. Técnica de imunohistoquímica (IHQ).....	17
4.8.2.4. Técnica de hematoxilina-eosina (HE) .....	17
4.8.2.5. Teste imunocromatográfico rápido em estudo – TR DPP ( <i>Dual Path Platform</i> ).....	18
4.9. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE .....	19
4.10. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	20

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO CLÍNICO DOS CÃES POSITIVOS NO TR DPP.....	30
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7.CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>9. ANEXO I - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>10. ANEXO II – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>11.ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO .....</b>	<b>56</b>
<b>12. APÊNDICE 1. LEITURA DOS RESULTADOS DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE DUPLO PERCURSO – TR DPP..</b>	<b>58</b>

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Comparação das características gerais dos casos e não casos para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009..... **30**
- Tabela 2.** Comparação da distribuição de casos e não casos por raça para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009..... **30**
- Tabela 3.** Comparação da frequência e proporção dos sinais clínicos apresentados pelos casos e não casos para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.. ..... **31**
- Tabela 4.** Comparação de casos e não casos de segundo a classificação de Mancianti modificada para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de soro para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.. ..... **32**
- Tabela 5.** Tabela 5. Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de sangue total e soro submetidos à leitura visual ou eletrônica para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009..... **33**
- Tabela 6.** Comparação da sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de sangue total e soro submetidos à leitura visual ou eletrônica para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009 ..... **34**
- Tabela 7.** Frequências e porcentagens válidas de resultado falso-positivo entre os não casos segundo sintomatologia de acordo com a classificação de Mancianti modificada..... **37**
- Tabela 8.** Frequências e porcentagens válidas dos resultados positivos do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em soro de 419 cães segundo sintomatologia de acordo com a classificação de Mancianti modificada..... **38**

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa político da cidade de Fortaleza dividido em Secretarias Executivas Regionais .....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Fluxo dos animais utilizados para avaliação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso com amostra de sangue total desde a seleção até a definição de casos e não casos .....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Fluxo dos animais utilizados para avaliação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso com amostra de soro desde a seleção até a definição de casos e não casos .....	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Análise de sensibilidade das estimativas pontuais e intervalares (IC 95%) do valor preditivo positivo do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em sangue total em cenários com prevalências de leishmaniose visceral canina oscilando entre 1% e 20% .....	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> Caso sintomático apresentando alopecia generalizada .....	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b> Caso sintomático apresentando descamação furfurácea.....	<b>36</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Agente etiológico

As leishmanioses são zoonoses que acometem seres humanos e outras espécies de mamíferos domésticos e silvestres sob a forma de doença infecciosa crônica. A Leishmaniose Visceral (LV) humana, também conhecida como Calazar, é considerada a mais importante devido à sua magnitude e elevada letalidade. O agente etiológico da LV nas Américas é *Leishmania (Leishmania) infantum*, considerada como sinônimo de *L. (L.) chagasi* (Mauricio et al., 2000; Dantas-Torres, 2006), entretanto alguns autores as consideram como subespécies diferentes (Lainson ; Rangel, 2005).

## 1.2. Epidemiologia da leishmaniose visceral

As leishmanioses têm ampla distribuição nos cinco continentes e são consideradas endêmicas em 88 países, entretanto a notificação é obrigatória somente em 32 países (W.H.O., 2010). Nas Américas são observadas as duas formas: tegumentar (LTA) e visceral (LVA) (Ministério da Saúde, 2006; 2010).

Durante anos, o impacto das leishmanioses na saúde pública foi subestimado. Atualmente, no mundo há 350 milhões de pessoas em risco e uma incidência de 2 milhões de casos por ano (1,5 milhões da forma tegumentar e 500 mil da forma visceral), com uma estimativa de 14 milhões de pessoas infectadas (W.H.O., 2010). Na ausência de tratamento, a LVA é uma doença potencialmente fatal, podendo alcançar letalidade de 98% (Desjeux, 2004; Ministério da Saúde, 2006).

A epidemiologia da LVA no Brasil apresentava caráter eminentemente rural, mas, atualmente, a doença vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte como Araçatuba (SP), Corumbá (MT), Campo Grande (MS), Palmas (TO) Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG) e mais recentemente, foi identificado um caso autóctone na região Sul, na cidade de São Borja (RS) próximo a fronteira com a Argentina, única região brasileira até então indene (Ministério da Saúde, 2010). *Leishmania (Leishmania) chagasi* é o

agente etiológico responsável pela infecção e o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* incriminado como o principal vetor na sua transmissão. Recentemente *Lu. cruzi* foi descrita no Estado do Mato Grosso do Sul exercendo esse papel (Genaro et al., 1990; Santa Rosa ; Oliveira, 1997; Palatnik-de-Sousa et al., 2001; Ministério da Saúde, 2006).

No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Linnaeus, 1986), além de cachorros-do-mato, asnos, roedores e outros marsupiais (Courtenay et al., 1994; Courtenay et al., 1996; Zerpa et al., 2002; Cerqueira et al., 2003; Moheballi et al., 2005). Nas regiões rurais, peri-urbanas e urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é um importante reservatório da infecção para o ser humano (Ramiro et al., 2003; Molano et al., 2003). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção nestes tem sido mais prevalente que nos humanos (Deane ; Deane, 1955a; b; Barbosa-Santos et al., 1994; Marzochi ; Marzochi, 1994; Paranhos-Silva et al., 1996; Galimberti et al., 1999; Palatnik-de-Sousa et al., 2001). A manutenção da LVA na população humana acontece por meio da interação entre reservatório, inseto vetor e ser humano (Deane ; Deane, 1962; Quinnell et al., 1997).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, quando as formas promastigotas presentes no tubo digestivo deste são inoculadas na pele. Uma vez no tecido, estes parasitos são internalizados por fagócitos, e dentro do vacúolo parasitóforo se transformam em formas amastigotas. A multiplicação do parasito no interior de macrófagos, associada à resposta imune estimulada pela presença do antígeno parasitário, produz uma reação inflamatória com predominância celular. Com a continuidade do binômio replicação parasitária/processo inflamatório surgem lesões teciduais na pele e órgãos internos, principalmente baço e fígado (Rey, 1991).

### **1.3. Clínica da leishmaniose visceral canina (LVC)**

A LVC é uma doença sistêmica grave, de evolução lenta e início insidioso. Os sinais clínicos variam de animal para animal, dependendo do tipo de resposta imunológica. Podem ser observadas lesões cutâneas, principalmente, descamação furfurácea, eczema, úlcera hiperqueratose; onicogribose; esplenomegalia; hepatomegalia; adenites; alopecia; ceratoconjuntivite; caquexia; inanição entre outros, podendo levar a morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer assintomáticos por longo período de tempo. Devido à variedade de sintomas, podemos classificar esses animais em três grupos: assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos, com presença de adenite, perda de peso leve e pêlo opaco; e sintomáticos, com todos ou alguns sinais mais comuns da doença, como alterações cutâneas, onicogribose, perda de peso moderada ou grave, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (Ministério da Saúde, 2006).

### **1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico da LVC compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais podem ser dirigidos para evidenciar o parasita ou para detectar componentes da resposta imune tais como a produção de anticorpos específicos ou reações de tipo celular. Os espécimes clínicos, coletados para o diagnóstico parasitológico de cães, podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado ou de linfonodos e, em alguns casos, de biópsias de pele íntegra, de lesões cutâneas ou de outras vísceras. No exame parasitológico direto é realizada a pesquisa de formas amastigotas, em lâminas de vidro, por aposição ou dispersão do material coletado na punção, corado pela técnica de Giemsa ou de Leishman. O exame parasitológico indireto tem por objetivo o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, por exemplo, NNN (iniciais dos nomes de seus idealizadores Novy, McNeal e Nicolle) acrescido de meio Schneider e enriquecido com soro fetal bovino (Deane et al., 1955; Arora et al., 2006; Ministério da Saúde, 2006). A análise histopatológica dos fragmentos teciduais

também é importante no diagnóstico da LVC, pois, permite identificar as formas parasitárias e ao mesmo tempo contribuir para o diagnóstico diferencial com outras doenças (Slappendel, 1988; Lima et al., 2004).

Outros métodos utilizados são a imunohistoquímica para detectar antígenos parasitários nos tecidos examinados e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasito (Degrave et al., 1994; Kenner et al., 1999; Schubach et al., 2001; Marcondes et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

Tafuri et al. (Tafuri et al., 2004) descreveram um método alternativo, preciso e de menor custo, utilizando soro canino hiperimune como anticorpo primário, para ser aplicado na técnica de imunohistoquímica. Com este método, os autores observaram facilmente formas amastigotas de *Leishmania* em diferentes órgãos.

Andrade e colaboradores (Andrade et al., 2002) investigando a transmissão vertical da LVC, testaram a sensibilidade da técnica de PCR em comparação com microscopia direta. Os resultados obtidos revelaram 100% de sensibilidade nas amostras de medula óssea, 71,4% no baço e 66,6% no fígado.

Entre os métodos diretos e indiretos, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) são as mais utilizadas em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LV, devido à possibilidade de utilizar de amostras de sangue em papel, algo que facilita a coleta e baixa o custo (Nunes et al., 2001; Almeida et al., 2005). Um dos problemas desses métodos refere-se à baixa sensibilidade, acarretando taxas de infecções subestimadas e consequentemente permitindo a manutenção de animais infectados em área endêmica (de Paula et al., 2003; Porrozzi et al., 2007).

Diversos antígenos recombinantes de *L. chagasi* (K9, K26 e k39) têm sido testados e avaliados quanto ao desempenho no diagnóstico da leishmaniose visceral humana (el Hassan et al., 1998) e canina (Ozensoy et al., 1998; Rosati et al., 2003). O desempenho da sensibilidade e especificidade destes testes no diagnóstico tem se mostrado elevado comparado aos testes sorológicos convencionais. O desempenho dessas moléculas em ensaios sorológicos

clássicos tem influenciado a sua utilização na construção de testes diagnósticos de última geração, empregando diferentes antígenos recombinantes associados num único ensaio, o que poderá aumentar a sensibilidade do diagnóstico da LV humana e canina. Baseado nesse conceito, o Instituto de Biotecnológicos da Fiocruz (Biomanguinhos) vem desenvolvendo testes imunocromatográficos voltados para o diagnóstico da LVC. Inicialmente, foi desenvolvido o teste denominado “lateral flow” (LF) cuja tecnologia tem sido substituída pela técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso. Trata-se de um teste rápido qualitativo que emprega os antígenos recombinantes rK26 e rK39 de *L. (L.) chagasi* cujos resultados preliminares têm demonstrado excelente desempenho, apresentando vantagens em relação aos métodos utilizados atualmente, como a maior precisão, interpretação simplificada dos dados, uso de volumes mínimos de amostra e sensibilidade cerca de 10 a 50 vezes maior do que o “lateral flow” (LF), além da compatibilidade com diferentes tipos de fluídos corporais como sangue, soro, saliva, plasma, urina etc. É um sistema baseado nos testes rápidos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Ng et al., 2003) também desenvolvidos pela Fiocruz e que abrem uma alternativa para o diagnóstico da LVC.

### **1.5. Sensibilidade e especificidade**

De acordo com uma revisão de Romero e Boelaert (Romero ; Boelaert, 2010), na América Latina, os diferentes métodos diagnósticos apresentam sensibilidade e especificidade variáveis dependendo de como é definido o caso e o controle durante o processo de validação. A sensibilidade da RIFI variou de 72% a 100% e a especificidade de 52% a 100% (Andrade et al., 1989; Paranhos-Silva et al., 1996; da Silva et al., 2006; Afonso-Cardoso et al., 2007). Em trabalho realizado por Figueiredo et al. (Figueiredo, 2010), com definições de caso (nove cães) e de controle (296 animais) semelhantes às utilizadas no presente estudo, os resultados foram diferentes dependendo do ponto de corte para considerar a reação positiva. Quando 1:40 a sensibilidade foi de 100% e

especificidade 65% e quando 1:80 a sensibilidade foi 100% e especificidade 83,4%.

A sensibilidade do ELISA variou de 30% a 100% e a especificidade entre 64% e 100% (Andrade et al., 1989; Paranhos-Silva et al., 1996; Garcez et al., 1996; Rosario et al., 2005; Afonso-Cardoso et al., 2007; Porrozzi et al., 2007; Lemos et al., 2008; Camargo et al., 2010) . Figueiredo et al. (Figueiredo, 2010) obteve 100% e 96,6% de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Em estudo que avaliou 74 cães positivos para ELISA ou PCR (casos) e utilizou como controles 101 cães de áreas endêmicas negativos para ambos, um teste imunocromatográfico rápido com uma proteína recombinante (rK39) obteve sensibilidade de 72% e especificidade de 61% (Reithinger et al., 2002). Lemos et al. (Lemos et al., 2008) avaliaram a performance do Kalazar Detect<sup>®</sup> (teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno rK39) em cães infectados assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, utilizando como casos animais com presença de amastigotas no aspirado de medula óssea e como controles animais de área não-endêmica negativos para teste parasitológico e ELISA. Estes autores encontraram sensibilidade e especificidade de 83% e 100%, respectivamente. Porém ao ser testado em 25 cães negativos para LVC, portadores de outras doenças parasitárias, houve reação cruzada com erlichiose e doença de chagas, dando uma especificidade de 93% (Lemos et al., 2008). Da Costa (da Costa et al., 2003) padronizou um teste rápido que utilizava dois antígenos recombinantes, o rK39 e o rK26. Obteve sensibilidade de 84%-96% e especificidade de 100% mesmo ao ser testado em quatorze cães negativos para LVC portadores de outras doenças parasitárias que poderiam causar reação cruzada. Os casos foram escolhidos a partir de cães com clínica e RIFI positiva e os controles foram animais de áreas endêmicas negativos na RIFI e sem sintomas ou sinais sugestivos de LVC.

## **1.6. Importância do diagnóstico canino como ferramenta para o controle da LVC**

Nos testes sorológicos alguns autores relatam reações cruzadas com infecções por outros tripanosomatídeos, como outras espécies de *Leishmania* ou

com o agente da doença de Chagas. Essas reações falso positivas geram um problema, pois nesses casos não há indicação de eutanásia (da Costa et al., 1991; Ribeiro et al., 2007).

Devido à complexidade do cenário epidemiológico dessa doença, as ações de controle devem ser adequadas ao contexto epidemiológico da área em questão para que possam ser efetivas. Na LVA, em área urbana, o cão doméstico continua sendo a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado esforços na aplicação de métodos cada vez mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LVC nesses animais. A tecnologia recombinante em conjunto com a caracterização de antígenos específicos imunodominantes têm permitido o desenvolvimento de uma segunda geração de diagnóstico imunoenzimático, a qual poderá auxiliar de forma mais eficaz no controle da LVA. O diagnóstico canino adequado somado a medidas integradas de controle são ferramentas importantes para prevenir e controlar a doença nos humanos. O diagnóstico precoce associado a uma retirada rápida desses animais do campo reduz significativamente a soroprevalência dos demais cães na região, além de reduzir a incidência de casos humanos (Ashford et al., 1998; Braga et al., 1998). Entretanto, os exames diagnósticos disponíveis atualmente possuem limitações que dificultam as ações de controle. Os exames sorológicos de RIFI e ELISA apresentam alta sensibilidade e especificidade quando se compara animais infectados sintomáticos com animais negativos de áreas não endêmicas (Andrade et al., 1989; Paranhos-Silva et al., 1996; Ferreira et al., 2007; Lemos et al., 2008). Porém, essa realidade se altera quando há animais não infectados oligossintomáticos, assintomáticos ou negativos de áreas endêmicas, portadores de doenças passíveis de reação cruzada, alterando a sensibilidade e a especificidade, e comprometendo o diagnóstico (da Silva et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Porrozzini et al., 2007). Um teste com a acurácia diminuída não cumpre o papel proposto para orientar ações de saúde pública, pois não distingue com precisão os cães infectados dos saudáveis, havendo descarte de animais negativos e permanência de positivos.

## 1.7. Desempenho dos testes utilizados para o padrão-ouro

Não existe um teste único para leishmaniose visceral canina que possua todos requisitos necessários para se cumprir o papel de um padrão-ouro. Dessa forma, combinamos três exames para suprir tal deficiência. A cultura, imunohistoquímica e histopatologia apresentam alta sensibilidade porém sua especificidade é desconhecida. Em estudo realizado por Silva et al. (Silva et al., 2011) observaram 80,3% (53/66) de sensibilidade para *Leishmania* sp. somando os resultados de cultura de diversos tecidos enquanto 62,1% (41/66) somente para *L. chagasi* (lesão, pele de escápula ou abdome, linfonodos cervical, poplíteo e mesentérico, baço, fígado e aspirado de MO). Em 2009 o mesmo grupo (Madeira et al., 2009) isolou *L. chagasi* em 310 de 394 amostras (78,7%).

## 2. JUSTIFICATIVA

A LVA representa um grave problema em saúde pública no Brasil, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) um importante elo na cadeia de transmissão. Com base na resposta imune humoral apresentada por cães com LVC, inquéritos soroepidemiológicos são realizados para o rastreamento de cães supostamente infectados, embora para a confirmação diagnóstica sejam fundamentais a detecção e identificação do parasita. Segundo o manual de controle da LVA do Ministério da Saúde, o teste utilizado para os inquéritos deve ser a RIFI (IFI Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos), distribuído à rede pública de saúde e realizado em amostras de soro sanguíneo. Ainda segundo o manual, os cães sororeatores que apresentarem titulações iguais ou superiores a 1:40 deverão ser submetidos à eutanásia visando à interrupção do ciclo no ambiente urbano. Apesar dessas recomendações, a eutanásia desses animais ainda gera polêmica, principalmente nos aspectos relacionados à veracidade dos resultados obtidos nos inquéritos sorológicos (Alves ; Bevilacqua, 2004).

Uma das principais críticas em relação a deficiência do controle está relacionada a demora na retirada dos casos positivos (Braga et al., 1998), por esse motivo o desenvolvimento de um teste rápido com acurácia e confiabilidade elevadas é de fundamental importância.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a acurácia do teste rápido baseado na técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso (*Dual Path Platform* - DPP) para o diagnóstico da leishmaniose visceral em cães de uma região endêmica na cidade de Fortaleza, Ceará.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Estimar e comparar a sensibilidade e a especificidade do teste imunocromatográfico rápido no diagnóstico da LVC em amostras de sangue total e de soro;
- Estimar a concordância dos resultados do teste imunocromatográfico rápido obtidos no soro por meio da leitura visual e por meio de dispositivo eletrônico.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Área de Estudo

O município de Fortaleza, Ceará (figura 1), está localizado a  $3^{\circ}12'23.93''$  de latitude Sul e  $38^{\circ}54'33.94''$  de longitude Oeste, na altitude do nível do mar e possui extensão territorial de 314,93 km<sup>2</sup>, população de 2.447.409 habitantes, e vegetação predominante constituída mangue e restinga. É composto por 117 bairros, incluindo a Vila Manuel Sátiro (figura 2) e a Cidade dos Funcionários (figura 3). Esses dois últimos estão localizados nas Secretarias Executivas Regionais (SER) V e VI, com uma população de 570 mil e 600mil habitantes, respectivamente.

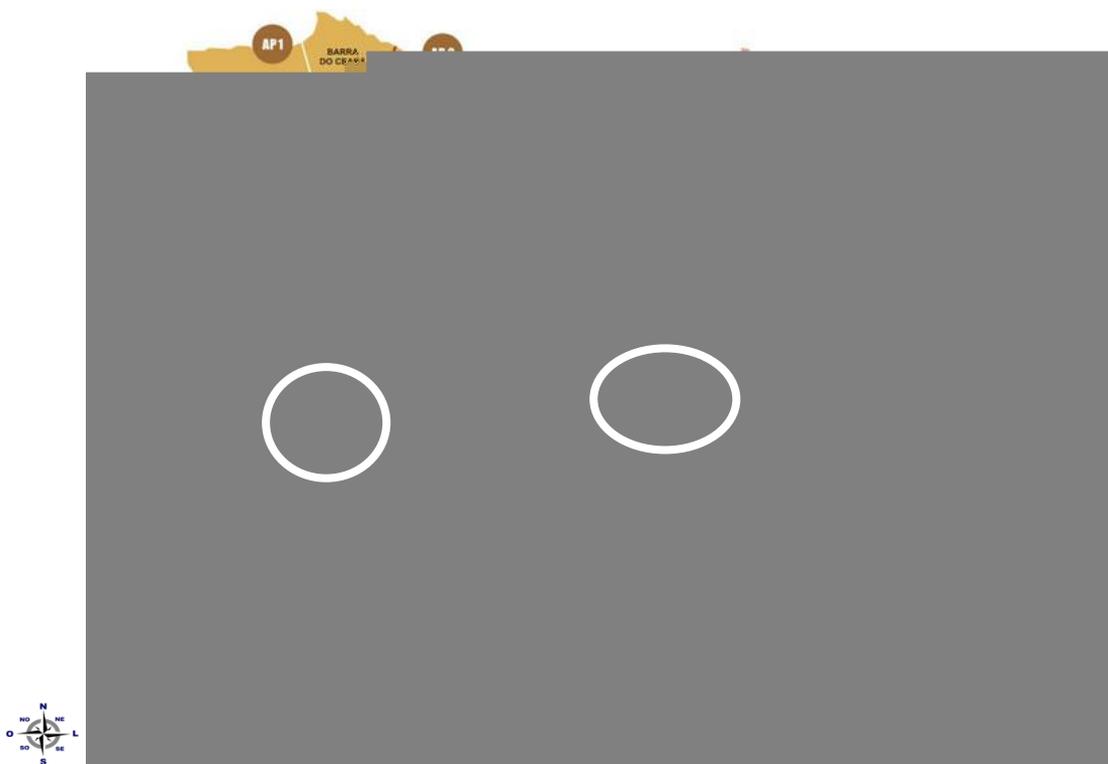


Figura 4. Mapa político da cidade de Fortaleza dividido em Secretarias Executivas Regionais.

## 4.2. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de validação de teste diagnóstico, com amostra de conveniência constituída por cães, selecionados sistematicamente, procedentes de dois bairros da cidade de Fortaleza, Ceará. O estudo foi aninhado dentro do projeto que teve por objetivo a construção de um banco de soros para a validação de testes diagnósticos para leishmaniose visceral canina, com previsão de coleta de soros de 1400 cães de regiões com prevalência de LVC de pelo menos 10%, sendo Fortaleza uma das cidades contempladas. Na cidade de Fortaleza-CE, foram efetivamente coletadas amostras de 428 cães aplicando uma modificação do método utilizado nos inquéritos caninos rotineiros. Os bairros foram selecionados de acordo com inquéritos sorológicos de anos anteriores. As áreas apresentavam estimativa de soroprevalência de infecção canina por *Leishmania* superior a 15% baseada em inquéritos prévios. No entanto, não foi realizado inquérito canino durante o ano anterior à coleta para o presente estudo. A amostra de cães foi obtida da seguinte forma: ao chegar no bairro, era escolhida uma casa em que houvesse pelo menos um cão cujo proprietário autorizasse a coleta. A partir desse ponto a coleta continuou de maneira alternada nas casas localizadas ao lado direito da casa inicial, excluindo os cães da casa vizinha. Nas residências com mais de um cão, foram coletadas amostras de todos os cães elegíveis, conforme os critérios de inclusão e de exclusão.

As coletas foram realizadas entre os dias 04 de março de 2009 e 28 de abril de 2009 nos bairros Cidade dos Funcionários (108 cães) e Vila Manuel Sátiro (320 cães) totalizando uma amostra de 428 animais.

As amostras coletadas para os exames parasitológicos foram processadas no Instituto de Pesquisas Clínicas da Fiocruz-RJ. Os profissionais que realizaram as técnicas não possuíam informações sobre os animais, nem sobre o resultado do teste rápido e vice-versa.

## **4.4. Critérios de inclusão e de exclusão**

### **4.4.1. Critérios de inclusão**

- Cães cujos proprietários residiam na região de estudo pelo menos por seis meses;
- Proprietário maior de idade habilitado para assinar o termo de consentimento;
- Cães com idade igual ou superior a seis meses.
- Cães em condições de serem submetidos à sedação.

### **4.4.2. Critérios de exclusão**

- Fêmeas gestantes;
- Cães agressivos sem condições de manejo pela equipe de campo;
- Cães sem proprietário identificado e disponível;
- Cães submetidos a qualquer tratamento quimioterápico anti- *Leishmania*.
- Cães vacinados contra leishmaniose

## **4.5. Definição de “caso” e de “não-caso”**

Foi considerado “caso” de infecção por *Leishmania* o cão com pelo menos um resultado positivo em qualquer um dos três testes de diagnóstico parasitológico.

Foi considerado “não-caso” o cão com resultado negativo para os três testes de diagnóstico parasitológico.

## **4.6. Definição de cão assintomático, oligossintomático e sintomático**

Foi utilizada uma modificação da classificação de Mancianti (1988) para caracterização dos cães em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, conforme descrito em seguida:

- Assintomáticos - ausência de qualquer um dos 26 sinais descritos no anexo 1.

- Oligossintomáticos - presença de um a três sinais descritos no anexo 1, incluindo obrigatoriamente pelo menos um dos seguintes sinais: pêlo opaco , alopecia localizada e perda de peso moderada.
- Sintomáticos - presença de quatro ou mais sinais e sintomas descritos no anexo 1, incluindo obrigatoriamente pelo menos um dos três sinais definidores de oligossintomático.

#### **4.7. Avaliação clínica**

Os cães foram amordaçados, contidos mecanicamente e examinados clinicamente por médico veterinário. Foram avaliados: estado geral, condição corporal, coloração de mucosas, grau de desidratação, a presença de lesão cutânea, perda de apetite, emagrecimento, caquexia, apatia, distúrbio urinário, alopecia local, alopecia generalizada, descamação furfurácea, pelo opaco, onicogribose, úlcera crostosa, epistaxe, ceratoconjuntivite, adenite local, adenite generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, dor a palpação renal, artralgia, edema de membros e paresia de membros posteriores. Os dados foram registrados em ficha específica (Anexo I). A idade dos cães foi estimada pela dentição e por entrevista com os proprietários (Reithinger et al., 2002).

#### **4.8. Métodos específicos**

##### **4.8.1. Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico**

###### **a) Sangue**

Para coleta de sangue periférico, a orelha do animal foi posicionada formando uma dobra na extremidade. Após esse procedimento, foi realizada punção com lanceta estéril descartável. Após a perfuração, a orelha foi desdobrada e posicionada para que o sangue não escorresse, formando assim uma gota sanguínea. A coleta do sangue foi realizada com o auxílio da alça coletora descartável, posicionada levemente acima da gota sanguínea para preenchimento do círculo na extremidade da alça, sem que a amostra coletada

apresentasse bolhas ou assumisse formação côncava ou convexa captando, assim, 5 µl de sangue.

Para a realização dos testes sorológicos, foram coletados 5 mL de sangue, sem anticoagulante, por punção da veia cefálica ou jugular, utilizando Vacutainer®. Esta ferramenta contém um canhão, onde é acoplada agulha descartável própria, a qual possui duas pontas: uma recoberta por proteção de borracha que se retrai ao perfurar a tampa do tubo de coleta sanguínea e a outra que fica exposta, utilizada para punção. As amostras foram transportadas sob refrigeração entre 4°C e 8°C. O soro foi separado por centrifugação e conservado a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos no laboratório.

### **b) Amostras teciduais**

Após a coleta de sangue, os animais foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado a acepromazina (0,2 mg/kg) por via intramuscular, para coletar os fragmentos de pele íntegra e lesões cutâneas, quando presentes. Após a sedação, os animais foram colocados sobre uma mesa de aço inoxidável onde foi realizada tricotomia com lâmina de aço inoxidável descartável; assepsia com água e sabão, álcool iodado e álcool 70% e anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Foram coletados três fragmentos de pele íntegra da região escapular, utilizando “punch” de 3mm, dois para cultura e um utilizada tanto para exame histopatológico como para imunohistoquímico. Das lesões tegumentares, quando presentes, foram coletados dois fragmentos para cultura.

## **4.8.2. Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação etiológica**

### **4.8.2.1. Isolamento parasitário em meio de cultura**

Os dois fragmentos teciduais de pele íntegra e, caso houvesse, os dois fragmentos de lesão, logo após a biópsia, foram imersos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 acrescido de antibióticos (1000 UI de penicilina e 200µg de estreptomicina) e antifúngico (100 µg de 5'fluorocitocina) e

conservados a temperatura de 4°C por 24 horas. Após tal período, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicole) contendo como fase líquida o meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas a fresco semanalmente durante 30 dias por exames buscando evidenciar formas flageladas.

#### **4.8.2.2. Eletroforese de enzimas (MLEE)**

Todos os isolados obtidos em meio de cultura durante o estudo, independente do sítio anatômico, foram armazenados no Banco de Amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/IPEC/Fiocruz) e analisados por eletroforese de isoenzimas. Inicialmente, foi obtida a expansão da massa parasitária para obtenção de cerca de  $10^9$  parasitas que posteriormente foi submetida a lavagens em tampão próprio, sob centrifugação até a obtenção de um "pellet" que foi depositado em botijões de nitrogênio líquido ( $N_2$ ) até a realização das corridas eletroforéticas. Foram empregados cinco sistemas enzimáticos: 6PGDH; GPI; NH; G6PDH e PGM, cuja metodologia foi baseada em protocolos já definidos (Cupolillo et al., 1994). Amostras de referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas. Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1% (Tipo V) em tampão de acordo com o sistema enzimático utilizado, que depois de dissolvida e fundida foi colocada sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida eletroforética foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho maria com circulação para manter a refrigeração em torno de 4°C. A revelação da atividade enzimática das amostras foi feita colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima, baseados em protocolos já descritos na literatura. A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% e a mobilidade eletroforética dos isolados foi comparada com o padrão das amostras de referência.

#### **4.8.2.3. Técnica de imunohistoquímica (IHQ)**

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do IPEC/FIOCRUZ-RJ para preparo e processamento. A técnica de imunohistoquímica indireta foi realizada para avaliação de antígenos parasitários "in situ" nos fragmentos teciduais de pele íntegra. O método utilizado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase. Os cortes histológicos colhidos em lâminas de vidro previamente preparadas foram desparafinados em xilol e reidratados em etanol e água. A seguir, foram incubados com soro policlonal de coelho anti-Leishmania em câmara úmida, "overnight", a 4°C. Após a incubação os cortes foram lavados para a remoção mecânica do soro anti-Leishmania. A seguir iniciou-se uma série de incubações e lavagens para a obtenção do preparo. Foram aplicados o anticorpo secundário e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO-LSAB+ kit, Dako Corporation – K0690). A revelação (ligação antígeno-anticorpo) foi visualizada com diaminobenzidina, kit DAB+ marca DAKO, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com lamínulas e Entellan para visualização em microscópio óptico. Como controle positivo da reação foi utilizado cortes histológicos de pele de animais positivos para *L. chagasi*. Como controle negativo foram utilizados cortes histológicos de pele de cães saudáveis. Todo o processo foi realizado segundo protocolo estabelecido no Laboratório de Anatomia Patológica do IPEC/FIOCRUZ.

#### **4.8.2.4. Técnica de hematoxilina-eosina (HE)**

Os fragmentos teciduais (pele e lesões), acondicionados em tubo "ependorf" contendo formalina 10%, tamponada com pH neutro e foram processados e emblocados em parafina. Com o auxílio de micrótomo, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura que foram colocados em lâminas de vidro para serem corados pela hematoxilina-eosina (HE). Essa técnica foi realizada de acordo com o protocolo utilizado pelo Laboratório de Anatomia Patológica IPEC/FIOCRUZ-RJ.

#### **4.8.2.5. Teste imunocromatográfico rápido em estudo – TR DPP (Dual Path Platform)**

O ensaio do teste rápido imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP) LVC emprega uma combinação de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes para *Leishmania* K28 (fragmentos K26, K39 e K9). São ligados à fase sólida de uma membrana de nitrocelulose, para detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em sangue total, soro ou plasma. O conjunto diagnóstico é composto por uma plataforma de base plástica com dois poços que dão acesso a uma tira cada. A primeira é a condutora da amostra, sendo composta por leito de aplicação da amostra e membrana e cartão laminado (S1). A segunda tira detecta anticorpos da amostra, sendo composta por leito com conjugado, membrana de absorção residual e cartão laminado (S2). Além disso, possui um frasco de solução tampão, uma alça para coleta da amostra e uma lanceta. A tira S1 serve para conduzir a amostra à tira S2, onde a reação imunocromatográfica acontece. A tira S2 possui uma linha transversal com complexo antígeno-anticorpo que se liga ao conjugado formado pela partículas do ouro coloidal e anticorpos da amostra, produzindo uma coloração rosada, classificando a amostra como reagente. Na ausência dessa, não se observa a coloração. As partículas que não se ligaram continuam o percurso ao longo da membrana e passam por uma área com proteína A, corando a região de controle. Este controle serve para demonstrar que a amostra e os reagentes foram devidamente aplicados e que migraram através do dispositivo. O tampão facilita o fluxo lateral e promove a ligação dos anticorpos aos antígenos.

O TR DPP foi realizado tanto no sangue total, obtido no momento do exame e coleta das amostras, quanto no soro, obtido após centrifugação no laboratório.

Com uma alça apropriada coletou-se 5µL de sangue total a fresco ou soro previamente descongelado e aplicou-se no poço de nº 1, adicionando em seguida duas gotas de tampão. Após cinco minutos, foram aplicadas quatro gotas do mesmo tampão no poço de nº 2 e aguardou-se 15 minutos. A leitura no

campo foi realizada por dois observadores. Cada um leu aproximadamente 214 testes. Isso ocorreu devido o trabalho de campo ter sido realizado por duas equipes, simultaneamente, em lugares distintos. As leituras consideradas no laboratório foram visual e eletrônica. A leitura visual foi aquela observando as linhas do teste e do controle diretamente no cassete e a leitura eletrônica se deu com o auxílio do equipamento fornecido pelo fabricante (leitadora de DPP modelo CE IP21, Chembio Diagnostic System, Inc., Medford - NY, USA). O teste foi considerado positivo quando duas bandas, uma referente ao controle do teste e outra referente a amostra testada, apareceu dentro de 20 minutos. O teste foi considerado negativo, quando apenas a banda referente ao controle apareceu. Quando nenhuma banda foi visualizada, o teste foi considerado inválido e repetido, utilizando um novo kit. (Apêndice 1)

Todos os cães selecionados foram utilizados para comparar o desempenho da leitura visual e leitura eletrônica do teste rápido nas amostras de soro.

Antes da realização do presente estudo houve um treinamento dos indivíduos que executaram os testes rápidos pelo fabricante do kit. Os profissionais que realizam a técnica a campo e no laboratório não possuíam informações sobre os exames parasitológicos.

#### **4.9. Estratégia de análise**

O banco de dados foi criado a partir da transcrição das fichas utilizadas a campo. As fichas continham dados como nome, endereço, sexo e raça, além de informações clínicas como presença de onicogribose, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, entre outros (Anexo 1). Apenas um digitador teve acesso aos dados com entrada única. Os dados relativos aos exames parasitológicos foram digitados por outro digitador, sendo incorporados depois ao banco, seguindo a ordem da numeração das fichas. O digitador dos dados parasitológicos não teve acesso ao restante dos dados durante o processo de digitação. Com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0, foi realizada uma descrição quanto ao estado clínico e aos resultados da acurácia do método estudado por descrição de frequências e proporções e, quando

pertinente, estas proporções foram acompanhadas dos seus respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%) conforme recomendações de Gardner & Altman (Gardner ; Altman, 1989). O teste de chi quadrado e o teste exato de Fisher ou a correção de Yates foram utilizados para testar a significância das diferenças de sensibilidade e especificidade do teste em estudo aplicado em sangue e soro.

Para avaliar a concordância dos resultados do teste imunocromatográfico obtidos no soro por meio da leitura visual e da leitura eletrônica foi empregado o índice Kappa (k), conforme a classificação de Landis e Koch(Landis ; Koch, 1977): k = 0 quase inexistente; k = 0,01 a 0,20 pequena; k = 0,21 a 0,40 insatisfatória; k = 0,41 a 0,6 satisfatória; k = 0,61 a 0,8 substancial e k = 0,81 a 1,0 quase perfeita. O intervalo de confiança de 95% desta técnica foi calculado conforme Fleiss (Fleiss, 1981).

A cultura parasitológica, o exame histopatológico e imunohistoquímico, em conjunto foram utilizados como padrão de referência para o cálculo da sensibilidade e especificidade. A positividade em qualquer um dos três testes justificou a classificação do cão como verdadeiro positivo e resultados negativos nos três testes justificou a classificação do cão como verdadeiro negativo.

#### **4.10. Considerações éticas**

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pelo CEUA/Fiocruz sob o protocolo L-38/08 (Anexo II). A participação foi aprovada a partir da assinatura do termo de consentimento (Anexo III). Todos os procedimentos foram realizados por médico veterinário capacitado.

Os cães eram sedados com objetivo de diminuir sua excitação, auxiliando numa melhor execução da coleta, diminuindo o risco de ferimento por parte do animal assim como da equipe, além de dar segurança para uma coleta mais precisa, diminuindo os riscos de contaminação devido a uma assepsia inadequada da região de coleta e ao contato do material estéril utilizado com fontes de contaminação por forma mecânica. A dosagem do sedativo foi calculada conforme a idade, peso e estado clínico do animal, buscando minimizar o risco de morte. Para retirada dos fragmentos de pele foi aplicado

anestésico local para insensibilização da área. Os proprietários foram orientados quanto ao modo de fazer curativo após coleta. Os médicos veterinários ficaram a disposição para assistência posterior, cedendo telefones para contato. Caso necessário os animais recebiam nova visita. Os riscos obtidos nesse estudo foram pagos pelo benefício que uma nova técnica diagnóstica pode trazer.

## 5. RESULTADOS

Quatrocentos e vinte e oito cães foram incluídos na pesquisa, sendo 108 provenientes do bairro Cidade dos Funcionários da SER VI e 320 da Vila Manuel Sátiro da SER V. Não houve diferenças clínicas e epidemiológicas entre as duas localidades.

Dos animais avaliados pelo padrão de referência que tiveram amostras de sangue total disponíveis para a validação, 24 (7,9%, n=305) foram considerados positivos em pelo menos um dos testes: cultura parasitológica, exame histológico e imunohistoquímico (Figura 2).

Dos animais avaliados pelo padrão de referência que tiveram amostras de soro disponíveis para validação, 25 (7,5%; n=333) foram considerados positivos em pelo menos um dos testes: cultura parasitológica, exame histológico e imunohistoquímico (Figura 3).

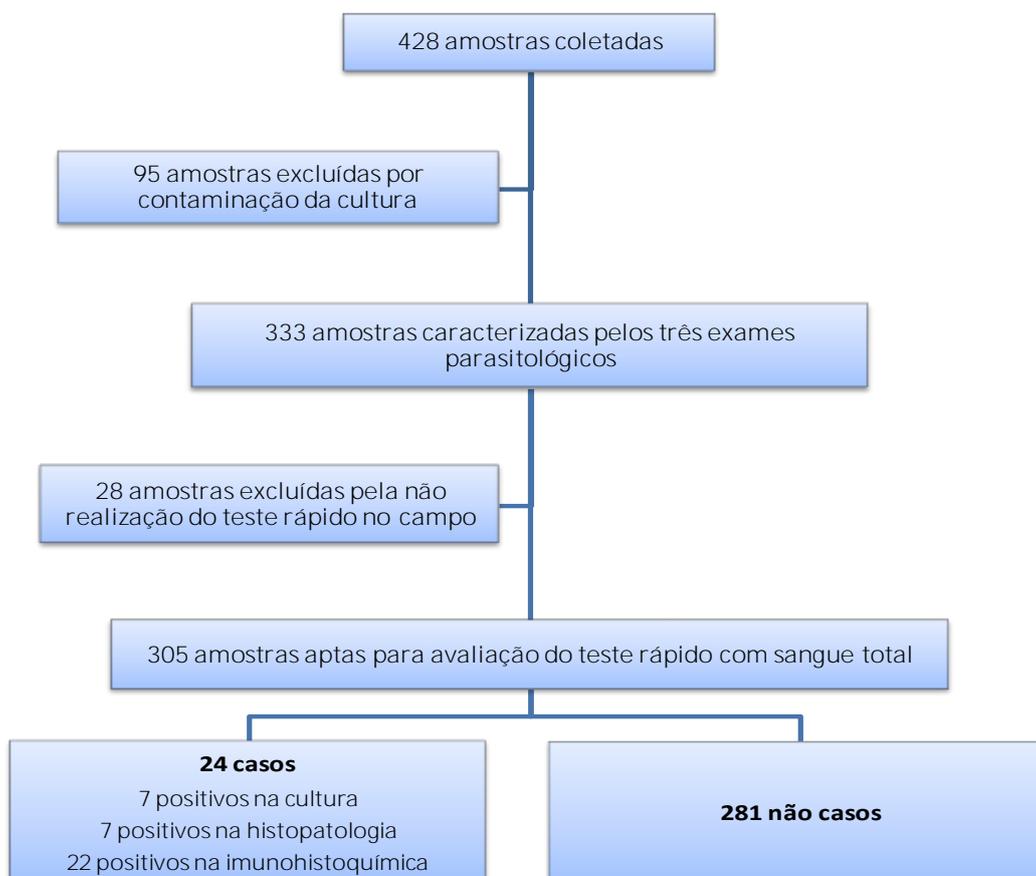
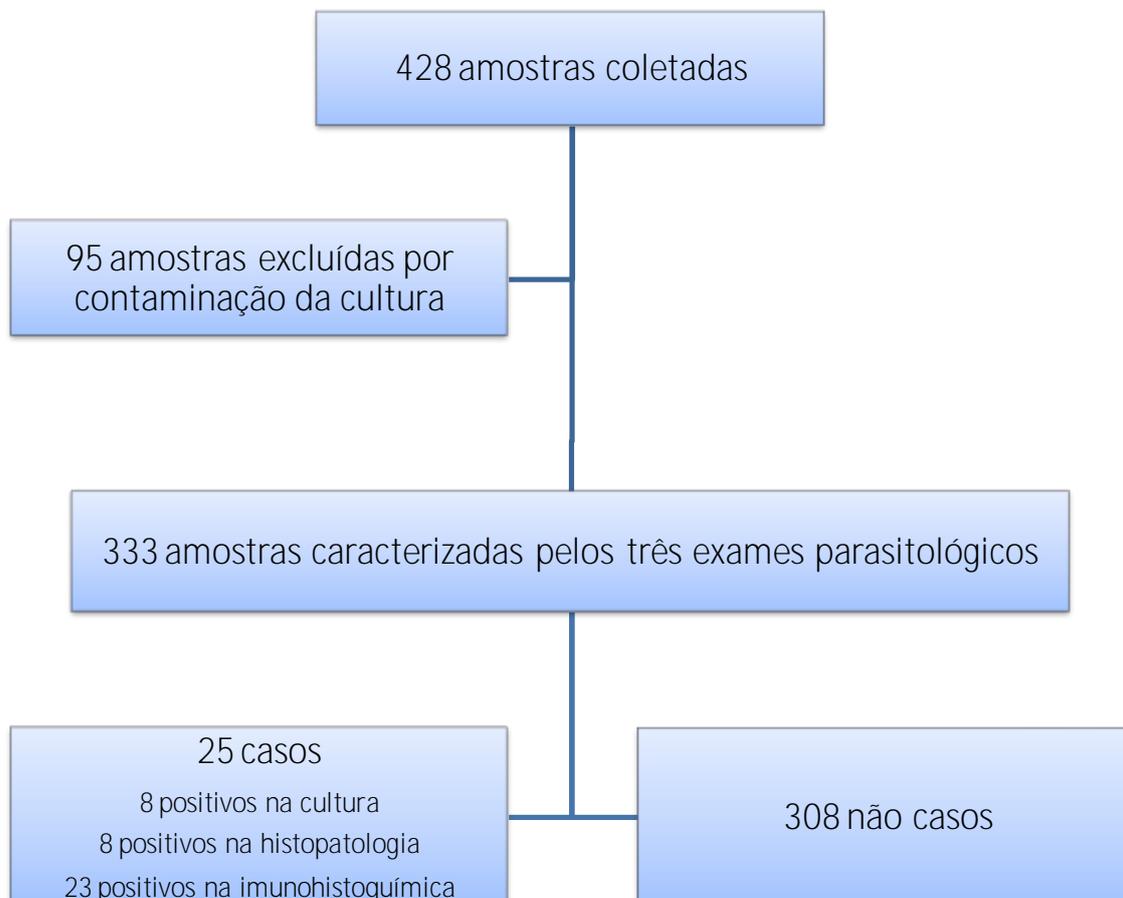


Figura 5. Fluxo dos animais utilizados para avaliação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso com amostra de sangue total desde a seleção até a definição de casos e não casos.



**Figura 6. Fluxo dos animais utilizados para avaliação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso com amostra de soro desde a seleção até a definição de casos e não casos.**

Dos animais selecionados 59,2% (197/333) eram machos, 7,5% (22/291) tinham entre 6 meses e 1 ano, 83,6% (243/291) tinham entre 1 e 7 anos e, 8,9% (26/291) tinham mais de 7 anos. A pelagem foi determinada como curta em 35,3% (106/300) e longa em 64,6% (194/300). O peso foi diverso, variando de 1Kg a 60Kg, sendo que 55,1% (156/283) estavam entre 1Kg a 10Kg, 36,8% estavam entre 11Kg a 20Kg e 8,1% acima de 21 kg. Houve 15 raças distintas (tabelas 1 e 2), havendo 90,9% (271/298) de cães sem raça definida.

Tabela 3. Comparação das características gerais dos casos e não casos para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Características	Casos		Não casos	
	Frequência	%	Frequência	%
<b>Sexo</b>				
Macho	17	68	180	58,4
Fêmea	8	32	128	41,6
<b>Idade</b>				
< 1 ano	0	0	22	8,2
1 ano a 7 anos	18	81,8	225	83,6
> 7 anos	4	18,2	22	8,2
<b>Pelagem</b>				
Curta	4	17,4	102	36,8
Longa	19	82,6	175	63,2
<b>Peso</b>				
< 10Kg	17	70,8	139	53,7
11Kg a 20Kg	5	20,8	98	37,8
> 21Kg	2	8,3	22	8,5
<b>Presença de ectoparasitos</b>				
Sim	11	45,8	151	50,3
Não	13	54,2	149	49,7

Tabela 4. Comparação da distribuição de casos e não casos por raça para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Raça	Casos		Não casos	
	Frequência	%	Frequência	%
Sem raça definida	21	91,4	250	90,8
Cocker Spaniel	1	4,3	1	0,4
Pitbull	1	4,3	2	0,7
Fox Paulistinha	0	0	1	0,4
Doberman	0	0	1	0,4
Fila Brasileiro	0	0	1	0,4
America Starffordshire	0	0	1	0,4
Husky Siberiano	0	0	1	0,4
Poodle	0	0	13	4,6
Dachshund	0	0	1	0,4
Pastor Alemão	0	0	1	0,4
Pinscher	0	0	2	0,7
Total	23	100	275	100

Tabela 3. Comparação da frequência e proporção dos sinais clínicos apresentados pelos casos e não casos para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Sintomas e sinais	Casos (25 cães)		Não casos (308)	
	n/número avaliado	%	n/número avaliado	%
Lesão cutânea	6/24	25,0	18/284	6,3
Perda de apetite	4/24	16,7	19/305	6,2
Emagrecimento	7/24	29,2	14/301	4,7
Caquexia	0/24	0	1/293	0,3
Apatia	2/24	8,3	2/292	0,7
Distúrbio urinário	1/24	4,2	5/288	1,7
Alopecia localizada	2/23	8,7	13/291	4,5
Alopecia generalizada	5/23	21,7	8/295	2,7
Descamação furfurácea	13/25	52,0	17/301	5,6
Pelo opaco	12/24	50,0	42/295	14,2
Onicogribose	6/25	24,0	6/293	2,0
Úlcera crostosa	5/24	20,8	3/297	1,0
Epistaxe	0/25	0	3/301	1,0
Ceratoconjuntivite	11/25	44,0	16/299	5,4
Adenite localizada	6/25	24,0	43/302	14,2
Adenite generalizada	5/24	20,8	10/299	3,3
Esplenomegalia	4/25	16,0	59/301	19,6
Hepatomegalia	1/24	4,2	45/302	14,9
Dor a palpação renal	0/24	0	1/299	0,3
Artralgia	0/25	0	3/301	1,0
Edema de membros	0/24	0	1/300	0,3
Paresia de membros	0/24	0	2/301	0,7

Tabela 4. Comparação de casos e não casos de segundo a classificação de Mancianti modificada para a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de soro para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Clínica	Casos		Não casos	
	Frequência	%	Frequência	%
Assintomáticos	11/24	45,8	243/301	80,7
Oligossintomáticos	4/24	16,7	47/301	15,6
Sintomáticos	9/24	37,5	11/301	3,7

Ao total seriam 25 casos e 308 não casos. Por motivo de não preenchimento adequado das fichas (anexo 1) no campo não foi possível classificar um caso e oito não casos.

Foram observados valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos semelhantes nos três tipos de avaliação conforme descrito nas tabelas 5 e 6. A precisão das estimativas intervalares da sensibilidade ficou prejudicada pelo reduzido número de casos identificado pelo padrão ouro.

Tabela 5. Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de sangue total e soro submetidos à leitura visual ou eletrônica para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Teste	Tipo de Leitura	Número de casos	Sensibilidade (IC <sub>95%</sub> )	Número de controles	Especificidade % (IC <sub>95%</sub> )	Valor preditivo positivo (IC <sub>95%</sub> )	Valor preditivo negativo (IC <sub>95%</sub> )
Teste rápido em sangue total	Visual	24	87,5 (66,5 -96,7)	281	73,3 (67,7 - 78,4)	21,9 (14,3 - 31,7)	98,6 (95,9 - 99,7)
Teste rápido em soro	Visual	25	88,0 (67,5 -96,8)	308	69,2 (63,7 - 74,3)	18,8 (12,2 - 27,1)	98,6 (96,0 - 99,7)
Teste rápido em soro	Eletrônica	25	88,0 (67,5 -96,8)	308	68,2 (62,2 - 74,3)	18,3 (11,9 - 26,4)	98,6 (95,9 - 99,7)

Prevalência real estimada pelo padrão ouro de 7,9%.

Tabela 6. Comparação da sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em amostras de sangue total e soro submetidos à leitura visual ou eletrônica para diagnóstico de leishmaniose visceral em população canina da cidade de Fortaleza, Ceará, 2009.

Comparação da sensibilidade	Diferença de sensibilidade (%)	IC <sub>95%</sub>
Sangue e soro leitura visual	0,5	-13 a 23
Soro leitura visual e eletrônica	0,0	-18 a 18
Comparação da especificidade	Diferença de especificidade (%)	IC <sub>95%</sub>
Sangue e soro leitura visual	4,2	-3,1 a 11,5
Soro leitura visual e eletrônica	1,0	- 6,3 a 8,3

A concordância bruta entre a leitura visual e eletrônica em amostras de soro foi 95% (Kappa= 0,88), considerada como 'quase perfeita' pela classificação de proposta por Landis e Koch (Landis ; Koch, 1977).

Considerando o valor preditivo positivo observado para a prevalência real de 7,9%, foi realizado análise de sensibilidade para esse parâmetro simulando prevalência de infecção crescente de até 20%. Porém, mesmo em cenários de prevalência elevada o valor preditivo positivo permaneceu abaixo de 50%.

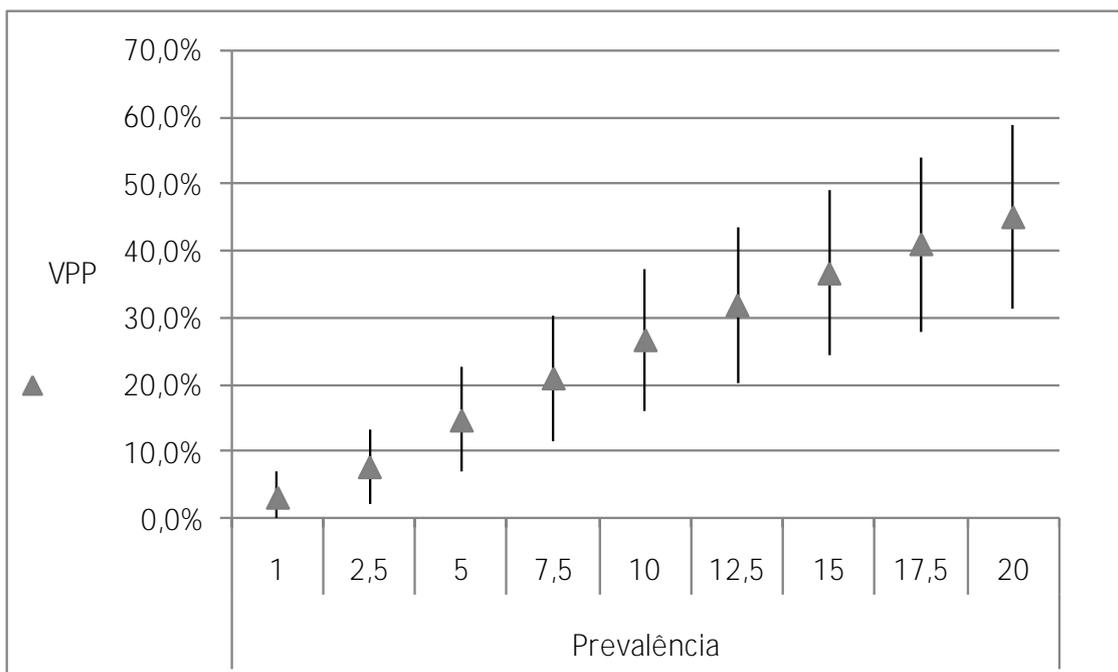


Figura 4. Análise de sensibilidade das estimativas pontuais e intervalares (IC 95%) do valor preditivo positivo do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em sangue total em cenários com prevalências de leishmaniose visceral canina oscilando entre 1% e 20%.

## Descrição do comportamento clínico dos cães positivos no TR

### DPP

Na avaliação do teste rápido em sangue total, soro com leitura visual e soro com leitura eletrônica, 129 (32,5%; n=397), 149 (34,8%; n=428) e 150 (35%; n=428) tiveram resultado positivo, respectivamente.

Dos 25 animais positivos no padrão de referência, 90% (n=23) tinham idade entre 1 e 7 anos e 10% acima de 7 anos; 60,9% (n=25) eram machos; sendo que 56% possuíam pelagem longa. Trinta e seis por cento (n=25) apresentavam-se em bom estado geral, 24% regular e 12% ruim. A condição corpórea (n=25) foi normal em 64% e 8% apresentavam-se magros. As mucosas se apresentaram hipocoradas em 16% ou normocoradas 48% (n=23) dos animais e 4% com leve desidratação (n=23); Ectoparasitas (n=24) foram encontrados em 29,4% dos animais. De todos os positivos 24% tinham lesão cutânea (n=24) e das lesões três (n=6) eram na orelha, uma no focinho, uma na região da crista ilíaca e uma em um dos membros. Em relação a clínica

observada clínica observada foi 45,8% de cães assintomáticos, 16,7% de oligossintomáticos e 37,5% de sintomáticos (Tabela 4 e figuras 5 e 6).



Figura 5. Caso sintomático apresentando alopecia generalizada.



Figura 6. Caso sintomático apresentando descamação furfurácea.

Dos 18 cães clinicamente sintomáticos , 8 foram positivos para cultura. Destes, todos foram detectados pelo teste rápido em ambos os tipos de amostra, exceto em um animal que não foi realizado o DDP<sub>s</sub>, apresentando uma sensibilidade de 100%. Os três casos falso negativos pelo TR DPP corresponderam a três cães assintomáticos.

O comportamento clínico dos não casos com resultado falso positivo pelo TR DPP em amostras de soro por leitura visual aparece descrito na tabela 7, revelando uma diferença significativa na proporção de positividade entre cães sintomáticos. O mesmo comportamento foi observado quando se analisou a positividade do TR DPP em soro, na totalidade da amostra estudada, conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 7. Frequências e porcentagens válidas de resultado falso-positivo entre os não casos segundo sintomatologia de acordo com a classificação de Mancianti modificada.

Clínica	Número de falsos positivos/ número de não casos	%
Assintomáticos	74/243	30,4
Oligossintomáticos	11/47	23,4
Sintomáticos	8/11	72,7*
Total	93/301	30,9

\*Diferença estatisticamente significativa entre sintomáticos e as outras duas categorias (chi-quadrado – Yates = 7,43; p=0.006)

Tabela 8. Frequências e porcentagens válidas dos resultados positivos do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso em soro de 419 cães segundo sintomatologia de acordo com a classificação de Mancianti modificada.

Clínica	Frequência	% válida
Assintomático	106/329	32,2
Oligossintomático	22/66	33,3
Sintomático	18/24	75,0*
Total	146/419	34,8

\*Diferença estatisticamente significativa entre sintomáticos e as outras duas categorias (chi-quadrado = 18,8; p=0,00002).

Dos 428 cães, nove tiveram seus dados clínicos preenchidos de forma incorreta, não podendo ser avaliados.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se o desempenho do TR DPP para o diagnóstico da LVC em cães domiciliados em área endêmica de LV. O padrão-ouro foi composto pela combinação de resultados de várias técnicas por não existir um único teste que isoladamente possua características próximas a um padrão-ouro. Os resultados mostraram que a sensibilidade do TR DPP foi melhor (88%) em amostras de soro avaliadas em condições de laboratório e a especificidade foi maior em amostras de sangue total (73,3%) aplicado em condições de campo. No entanto, a aplicação do teste em amostras de sangue utilizando leitura visual e de soro utilizando leitura visual ou eletrônica, revelou resultados muito semelhantes o que permite afirmar razoavelmente que o teste seja adequado para uso em condições de campo sem ajuda de equipamentos eletrônicos. Esta característica tornaria o TR DPP um teste apropriado para facilitar o trabalho de diagnóstico canino, possibilitando a retirada imediata dos cães infectados.

A maneira o qual os cães foram amostrados, a quantidade de sinais avaliados, seu padrão ouro composto por três exames parasitológicos e a qualificação dos médicos veterinários que coletaram as amostras, tornam o presente estudo único até o momento, podendo explicar algumas diferenças encontradas na literatura.

Ferreira et al. (Ferreira et al., 2007) avaliaram RIFI, ELISA e um teste de aglutinação direta (DAT) de soro em 234 cães de Belo Horizonte. Os casos foram 112/234 cães que tiveram cultura de medula óssea, imprint de biópsia de pele de orelha ou esfregaço de medula óssea positivo e para os controles foram utilizados 20 cães nascidos e criados em canil da Universidade Federal de Minas Gerais, mantido em condições especiais, negativos para todos os testes parasitológicos e sorológicos. Houve também a inclusão de soro de 20 cães com *Trypanosoma cruzi* (07), *Leishmania braziliensis* (05), *Toxoplasma gondii* (05) e *Ehrlichia canis* (03). Para a classificação da clínica não houve a discriminação de quais e quantos sinais clínicos foram avaliados, levando em conta a quantidade de sinais observados no cão. Foram classificados em não infectados, assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. A RIFI, ELISA e

DAT apresentaram 72%, 96% e 93% de sensibilidade respectivamente e 100% de especificidade. Porém ao serem testados para possíveis reações cruzadas, as especificidades observadas foram 45%, 60% e 95% respectivamente.

Lemos et al. (Lemos et al., 2008) avaliaram ELISA com antígeno bruto e um teste imunocromatográfico rápido com rK39 em soro de 76 cães casos de área endêmica e 33 controles de área indene. Os casos foram cães com exame direto de punção de medula óssea positivo e os não casos foram animais com um resultados negativos de um teste imunoenzimático e exame direto de medula óssea. Os casos foram avaliados conforme a clínica (assintomático, oligossintomático e sintomático). O ELISA e o teste rápido obtiveram 95% e 83% de sensibilidade respectivamente e 100% de especificidade. Quando testados com soros de cães com doenças possíveis de apresentarem reação cruzada, as especificidades baixaram para 64% e 84% respectivamente. A metodologia do estudo se assemelha ao nosso, porém os controles foram triados com um exame sorológico, que tem a mesma base dos teste avaliados, podendo alterar a acurácia hiperestimando o desempenho. A classificação clínica teve a mesma base (Mancianti et al., 1988) porém, o número de sinais analisados foi menor que o utilizado no presente estudo.

Da Silva et al. (da Silva et al., 2006) realizaram estudo de avaliação de RIFI e DAT em Belo Horizonte, também área endêmica de LVC. A amostra foi composta por 36 casos e 67 não casos. O padrão-ouro foi uma combinação da presença do parasita em pelo menos um dos seguintes testes: cultura de medula óssea, microscopia direta em esfregaço de medula óssea ou detecção de ADN pela PCR em amostra de sangue periférico em papel filtro. Os resultados de sensibilidade para RIFI e DAT foram de 100% para ambos e especificidade de 66% e 89,5% respectivamente. A semelhança da especificidade da RIFI com a obtida com o TR DPP possa ser explicado pelo fato de todos os não casos serem de área endêmica e terem ao menos um sinal clínico. A sensibilidade foi discordante talvez pelo fato da amostra de da Silva conter apenas cães com sintomas, sem levar em consideração que a dificuldade do teste está em detectar a infecção nos assintomáticos.

Reithinger et al. (Reithinger et al., 2002) avaliaram os seguintes testes teste: imunocromatográfico rápido com rk39, ELISA com antígeno bruto de *L. donovani* e reação em cadeia de polimerase (PCR) de *L. donovani*. Foram utilizados soros de 175 cães. Houveram duas abordagens para avaliação dos casos e controles. Na primeira todos cães negativos na ELISA e na PCR eram os controles (101) e os demais eram considerados casos (74). Na segunda, parte dos soros positivos para o teste rápido e negativos para ELISA e PCR, foram considerados falsos positivos, totalizando 83 controles e 92 casos. A sensibilidade e especificidade variram dependendo da abordagem. O teste rápido com rk39 teve sensibilidades de 72% e 77% e especificidades de 61% e 75% respectivamente as abordagens 1 e 2. A ELISA apresentou sensibilidades de 88% e 71% respectivamente as abordagens 1 e 2 e especificidade de 100% em ambas abordagens. Foram observadas sensibilidades de 64% e 51% respectivamente as abordagens 1 e 2 e especificidade de 100% em ambas as abordagens para o teste de PCR.

Dietze et al. (Dietze et al., 1995) avaliaram o dot-ELISA e clínica como forma de diagnóstico. Foram utilizados 37 casos e 63 controles de área endêmica e, 30 controles de área não endêmica. Os cães de área endêmica foram coletados no campo, indo consecutivamente de casa em casa. Este estudo teve como padrão-ouro o diagnóstico parasitológico direto em esfregaços de medula óssea o que torna o estudo pouco comparável com a presente validação do TR DPP que utilizou três métodos, tendo mais chances de classificar melhor casos e não-casos. Foram observados sensibilidade de 97% e especificidade de 100%. Ambos os estudos classificaram os cães utilizando vários sinais clínicos, porém os sistemas de classificação clínica foi diferente. Dietze classificou os animais com menos de dois sintomas em saudáveis e os com dois ou mais em doentes, enquanto no presente estudo os cães foram classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos dependendo do número e tipo de sinais.

Da Costa et al. (da Costa et al., 2003) avaliaram dois testes imunocromatográficos, um com o antígeno rK26 e outro com o antígeno rK39

em 50 casos e 50 controles, ambos de áreas endêmicas. Os casos foram selecionados a partir da presença de sintomatologia e RIFI  $\geq 1:160$ . Os controles foram cães assintomáticos, com RIFI negativa. O teste rápido com rk26 obteve 94% de sensibilidade e 100% de especificidade. O teste rápido com rk39 obteve 96% e 100% de sensibilidade e especificidade respectivamente. Ambos não apresentaram reação cruzada quando testados em soros caninos experimentalmente infectados com *T. cruzi* e com imunofluorescência positiva para esse. A amostra de da Costa foi direcionada aos extremos da LVC, não abordando, portanto, o espectro completo da doença/infecção. O presente estudo, apesar de ter um componente de conveniência na constituição da amostra, possibilitou testar soros de animais em diversos estádios da infecção, fato confirmado pela distribuição dos cães nas categorias de assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. O estudo de Costa também utilizou um número reduzido de características clínicas que o utilizado para categorizar os cães no presente estudo.

Porrozzi et al. (Porrozzi et al., 2007) avaliaram quatro ensaios imunoenzimáticos com diferentes antígenos: bruto, rK39, rK26 e rKA2. Foram avaliados 50 casos assintomáticos e 50 sintomáticos tendo como padrão ouro a RIFI. Os cães eram classificados por escore em assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (Quinnell 2001). Os controles foram 25 soros de cães de área não endêmica e 14 cães não infectados por *Leishmania* com diagnóstico confirmado de outras doenças que poderiam causar reação cruzada. Nos casos sintomáticos os testes de ELISA com antígenos bruto, rk39, rk26 e rkA2 obtiveram sensibilidade de 88%, 100%, 94% e 70% respectivamente e especificidade de 100% em todos. Mesmo utilizando um padrão ouro diferente da combinação usada na presente validação, o resultado de sensibilidade do ELISA rk39 mesclando os assintomáticos e sintomáticos foi semelhante (83%), porém a especificidade foi maior (100%). A diferença na especificidade poderia ser explicada pelas diferenças na composição da amostra de não-casos. Em ambos os estudos os testes de rk39 tiveram sensibilidades de 100% em cães sintomáticos.

Rosário et al. (Rosario et al., 2005) avaliaram quatro tipos de ELISA com os antígenos: bruto de *L. amazonensis*, bruto de *L. chagasi*, rK39 e rK 26. Avaliaram também os testes os resultados de sensibilidade e especificidade obtidos em amostras de soro e eluato. Cento e quinze cães com resultado positivo na RIFI foram eutanasiados e extraídos fragmentos de pele de orelha e baço para realização de histologia. Em 106 foram encontrados amastigotas e considerados casos. Vinte e cinco soros de cães negativos pela RIFI e histologia de biópsia de pele de orelha foram agregados ao estudo para formarem os não-casos junto com soros de 74 cães com outras doenças que poderiam causar reação cruzada. Os cães foram classificados pela sua clínica segundo Mancianti (1988). A sensibilidade para os antígenos brutos e os recombinantes em soro e eluato foram similares (97%-100%). A especificidade foi maior que 96% em soro e eluato para todas as amostras com exceção para o antígeno *L. chagasi* utilizando eluato (88%). Os resultados encontrados foram superiores aos observados na presente validação do TR DPP. A triagem realizada com RIFI pode ter sido crucial para melhorar a estimativa de sensibilidade e especificidade observadas nesse estudo. Com a amostra do Rosário o VPP de todos os testes ficou elevado ao contrario do nosso. Os antígenos recombinantes no estudo de Rosário, não mostraram reações cruzadas.

Terán-Angel et al. (Teran-Angel et al., 2007) avaliaram DAT em soro de 26 cães com sinais clínicos de LVC e parasitologia positiva e, em soro de 16 cães sadios. A sensibilidade chegou a 100%, sendo equiparada à sensibilidade encontrada nos casos oligossintomáticos e sintomáticos na presente validação do TR DPP. Porém, por se tratar de não-casos bem caracterizados e possivelmente sem ter sido exposto a infecção, a especificidade encontrada por Terán-Angel foi superior(100%).

Garcez et al. (Garcez et al., 1996) avaliaram os testes DAT, ELISA e RIFI. Foram utilizados soros de 21 cães assintomáticos e positivos para cultura ou microscopia direta de medula óssea e 14 cães não infectados de Belém, Pará (método não apresentado). A especificidade foi de 100% para todos e a sensibilidade foi de 71,4% para DAT e ELISA e de 100% para RIFI.

Os testes sorológicos utilizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC apresentam alguns problemas como a subjetividade na interpretação dos resultados da RIFI para a avaliação confirmatória, a falta constante dos kits de ELISA para triagem e a demora para liberação dos resultados. O TR DPP possui a vantagem de sua produção ser realizada em um menor tempo, dar um resultado em 20 minutos, podendo ser utilizado tanto no campo em amostras de sangue total como com soro na bancada. Durante o processo de validação do TR DPP no campo foi evidente a vantagem de não necessitar de outros equipamentos a não ser aqueles que constam no conjunto diagnóstico, portanto, sem necessidade de centrífuga para separar o soro, geladeira para armazenamento das amostras, além da resposta imediata ao proprietário com a retirada imediata dos animais infectados. Outro ponto relevante foi a concordância quase perfeita observada entre a leitura manual e a leitura eletrônica em amostras de soro dispensando a necessidade de mecanismos automatizados de leitura. Dessa forma, a leitura no campo dos testes realizados em amostras de sangue total pode ser feita facilmente por um técnico devidamente capacitado.

A prevalência da infecção no cenário escolhido para a validação do TR DPP, definida pelos resultados do padrão-ouro, foi de 7,9% e nessas condições o valor preditivo negativo (VPN) foi bom, acima de 95%, e o valor preditivo positivo (VPP) demonstrou resultado ruim. A imprecisão da estimativa intervalar para a sensibilidade ficou prejudicada pelo reduzido número de casos definidos por meio do padrão-ouro utilizado. Este ponto merece destaque, pois, é provável que apesar do uso combinado de técnicas para aprimorar a detecção dos verdadeiros positivos, existissem casos de LVC dentre os cães classificados como verdadeiros negativos; fato que por outro lado acabou prejudicando a estimativa pontual da especificidade que mostrou um excesso substancial de resultados falso-positivos. Certamente, pode-se estar frente ao caso em que o novo teste diagnóstico supera a sensibilidade de um padrão-ouro imperfeito.

Foi realizado também uma análise de sensibilidade que demonstrou que o VPP manteria comportamento ruim, mesmo em cenários de prevalências tão elevadas quanto 20%, sem conseguir superar a estimativa pontual de 50%.

A amostragem por conveniência poderia ser uma limitação no presente estudo, porém, os resultados da distribuição dos cães nas categorias de sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos parece representar razoavelmente o comportamento da infecção/doença na população canina, assim como o que já era esperado em relação à maior positividade do TR em cães sintomáticos. A sistematização da coleta a partir da primeira casa que foi escolhida de forma aleatória pode ter contribuído para a composição de uma amostra que apesar de “conveniente” ficou equilibrada.

Outro problema enfrentado no estudo foi a contaminação frequente das culturas o que pode ter prejudicado a correta classificação dos cães como casos e não-casos e ser causa de subestimação da especificidade. Porém, não há como provar com os resultados disponíveis que de fato o teste apresentou reações cruzadas, principalmente na população de cães sintomáticos que foram classificados pelo padrão-ouro como não-casos. O transporte de amostras de cultura do campo em Fortaleza para o laboratório localizado na Fiocruz no Rio de Janeiro revelou-se trabalhoso e com vazamento frequente do material contido nos tubos o que certamente contribuiu para a contaminação observada. O desenho do presente estudo é parte de um projeto maior multicêntrico. A cidade de Fortaleza, Ceará foi a quarta cidade a ser trabalhada. Em nenhuma das cidades anteriores havia acontecido tamanho índice de contaminação. Provavelmente, houve problemas no transporte, pois as amostras ao chegarem no Ipec/Fiocruz-RJ se encontravam reviradas dentro das caixas de transporte.

Os resultados encontrados sugerem que o TR DPP poderia ser utilizado pelo Programa Nacional de Controle das Leishmanioses, pela facilidade de execução, leitura e a possibilidade da utilização em amostras de sangue total em condições de campo. No entanto, a baixa sensibilidade e especificidade observadas, são preocupantes se for levado em consideração o fato de que modelagens matemáticas tem demonstrado que para tornar eficiente a retirada

de cães infectados como estratégia de controle, esta medida deveria produzir um impacto na redução da mortalidade de cães infectados que alcance cifras ao redor de 90% (Dye, 1996). Isto implica que um teste para detectar cães infectados deveria ter uma sensibilidade de 95%. A baixa especificidade, também observada com outros testes para diagnóstico de LVC, causa um ônus importante para o programa de controle e para os proprietários dos cães não infectados submetidos à eutanásia. O uso do TR DPP associado a outros testes, utilizando estratégias de testagem sequencial ou paralela em algoritmos específicos deve ser avaliado para aproveitar da melhor maneira possível as facilidades da sua aplicação em condições de campo. Por outro lado, os resultados das comparações do desempenho do TR DPP rigorosamente testado contra um padrão-ouro viável, em relação aos testes atualmente disponíveis para o diagnóstico da LVC na rotina dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública poderá contextualizar melhor a potencial utilidade do TR DPP nos programas de controle de LVC. A consistência do presente estudo em relação ao problema de baixa acurácia, principalmente na população de cães assintomáticos, revela que há ainda um longo caminho para aprimorar o diagnóstico da LVC.

## 7. CONCLUSÕES

O teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP), aplicado em amostras de sangue total ou de soro, submetidas à leitura visual ou; aplicado em amostras de soro, submetidas à leitura eletrônica, demonstrou sensibilidade de 88% e especificidade em torno de 73% para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

A comparação da sensibilidade e da especificidade do TR DPP para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro, não apresentaram diferenças significantes.

A concordância quase perfeita observada nos resultados do TR DPP em amostras de soro obtidos por meio da leitura visual e por meio de dispositivo eletrônico demonstra que o uso de dispositivos eletrônicos de leitura poderia ser dispensado em condições de campo.

A análise de sensibilidade demonstrou que o valor preditivo positivo do teste permanece baixo inclusive em cenários de prevalência simulada de leishmaniose visceral canina de 20%.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso poderia ser utilizado em condições de campo em amostras de sangue total submetidas à leitura visual e que a seu uso associado a outros testes, utilizando estratégias de testagem sequencial ou paralela em algoritmos específicos, deve ser avaliado para aproveitar da melhor maneira possível as facilidades da sua aplicação dentro do programa de controle de leishmaniose visceral.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso-Cardoso SR, Rodrigues FH, Gomes MA, Silva AG, Rocha A, Guimaraes AH, et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Korean J Parasitol*. 2007;45(4):255-66.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*. 2005;127(3-4):227-32.

Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1):259-65.

Andrade CR, Nascimento AE, Moura PM, Andrade PP. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar. *Braz J Med Biol Res*. 1989;22(5):611-5.

Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol*. 2002;103(1-2):71-81.

Arora B, Setia S, Rekhi B. Role of computerized morphometric analysis in diagnosis of effusion specimens. *Diagn Cytopathol*. 2006;34(10):670-5.

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

Barbosa-Santos EG, Marzochi MC, Urtado W, Queiros F, Chicarino J, Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania*

*braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(2):217-20.

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

Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16(3):414-420.

Cerqueira EJ, Sherlock I, Gusmao A, Barbosa Junior Ade A, Nakatani M. [Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(6):695-701.

Courtenay O, Macdonald DW, Lainson R, Shaw JJ, Dye C. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. Parasitology. 1994;109 (Pt 3):273-9.

Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90(5):498-502.

Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994;50(3):296-311.

da Costa CA, Genaro O, de Lana M, Magalhaes PA, Dias M, Michalick MS, et al. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the

serologic method used in epidemiologic studies. Rev Soc Bras Med Trop. 1991;24(1):21-5.

da Costa RT, Franca JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97(6):678-82.

da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. Vet Res Commun. 2006;30(6):637-43.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(1):117-8.

de Paula AA, da Silva AV, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. J Parasitol. 2003;89(4):832-6.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital. 1955a;47(1):75-87.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sôbre a importância comprovativa do homem, do cão e da rapôsa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. O Hospital. 1955b(1).

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1962;4:198-212.

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

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:463-469.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18.

Dietze R, Falqueto A, Valli LC, 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):40-2.

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

el Hassan AM, Khalil EA, el Sheikh EA, Zijlstra EE, Osman A, Ibrahim ME. Post kala-azar ocular leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92(2):177-9.

Ferreira C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol. 2007;146(3-4):235-41.

Figueiredo FBM, M.F.; Nascimento, L.D.; Abrantes, T.R.; Mouta-Confort, E; Passos, S.L.R.; Schubach, T.M.P. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection fo IgG in serum and eluate samples. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(4):193-196.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons Ed. 1981;2nd Edition:321.

Galimbertti MZ, Katz G, V.L.F. C-N, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;1:217.

Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. [Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Para]. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29(2):165-80.

Gardner MJ, Altman DG. Statistics with confidence – confidence intervals and statistical guidelines. Br Med J Ed. London. 1989:140pp.

Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. Rev Soc Bras Med Trop. 1990;23(2):121.

Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. J Cutan Pathol. 1999;26(3):130-136.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(8):811-27.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33(1):159-74.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop. 2008;107(2):205-7.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W, Luiz Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. Acta Trop. 2004;92(1):43-53.

Linnaeus S. Phase-integral calculation of phase shifts for a heavy-ion optical potential. *Phys Rev C Nucl Phys.* 1986;34(4):1274-1277.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 2009;87(2):260-2.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-7.

Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ, et al. A survey of visceral leishmaniasis in dogs from Santa Maria and neighbouring municipalities, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(4):499-501.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 1994;10 Suppl 2:359-75.

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

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2010:62.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília. 2006.

Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.* 2005;129(3-4):243-51.

Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003;92(1-2):1-13.

Ng KP, Saw TL, Baki A, Kamarudin R. Evaluation of three commercial rapid tests for detecting antibodies to human immunodeficiency virus. *Med J Malaysia*. 2003;58(3):454-60.

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E, et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(3):299-300.

Oliveira FS, Brazil RP, Pacheco RS. Response to Silva et al.: Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies. *Trends Parasitol*. 2005;21(12):552-3.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, et al. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(3):363-9.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):510-7.

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

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and

asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(5):544-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology. 1997;115 ( Pt 2):143-56.

Ramiro MJ, Zarate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine. 2003;21(19-20):2474-84.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2352-6.

Rey L. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ª ed: Editora Guanabara Koogan SA: 2ª edição.; 1991.

Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Schubach TM, Madeira Mde F, Marzochi MC. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. Vet Parasitol. 2007;148(3-4):200-6.

Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):e584.

Rosario EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(2):197-203.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(6):1153-6.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. Clinica Veterinária. 1997;2:24-28.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(7):987-96.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Vet Parasitol. 2011;179(1-3):257-61.

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

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Met. 2004;292(1-2):17-23.

Teran-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodriguez V, Ulrich M, Cabrera M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. Biomedica. 2007;27(3):447-53.

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010:793.

Zerpa O, Ulrich M, Benitez M, Avila C, Rodriguez V, Centeno M, et al. Epidemiological and immunological aspects of human visceral

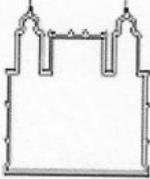
leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(8):1079-83.

## 9. ANEXO I - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO





## 10. ANEXO II – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

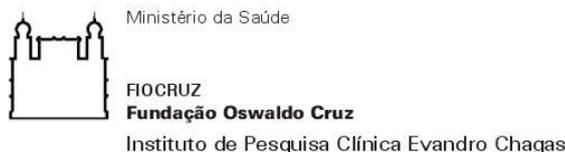
# CERTIFICADO

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

*" Construção de um painel de soros caninos para o Ministério de Saúde utilizar na validação de kits "*

[REDACTED]

## 11. ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO



### Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

#### Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_, portador da carteira de identidade nº \_\_\_\_\_, expedida pelo órgão \_\_\_\_\_, proprietário (a) do animal \_\_\_\_\_, espécie \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, registro \_\_\_\_\_; autorizo a participação do meu cão no projeto de pesquisa “CONSTRUÇÃO DE UM PAINEL DE SOROS CANINOS PARA O MINISTÉRIO DA SAÚDE UTILIZAR NA VALIDAÇÃO DE KITS DE DIAGNÓSTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.”, autorizando que nele sejam aplicadas técnicas anestesiológicas como sedação, anestesia local e ou geral para a realização do exame clínico, coleta de fragmento cutâneo através de biópsia de pele, coleta de 5ml sangue através de punção venosa.

Os medicamentos utilizados para sedação como a acepromazina pode causar hipotensão e bradicardia dose-dependente (diminuição da pressão arterial e dos batimentos cardíacos) e a quetamina poderá causar rigidez muscular, sialorréia (excesso de salivação), mioclonias (contração muscular), taquicardia e hipertensão (aumento dos batimentos cardíacos e aumento da pressão arterial). Associação de ambas mantém estabilidade cardiovascular. Pode haver convulsão que será revertido com diazepam, IV (0,2 - 1,0 mg/kg). Na punção venosa pode ocorrer flebite (inflamação da veia), edema local e extravasamento de sangue, sendo realizada compressão local até interrupção. Aspirado de medula óssea pode ocasionar dor, controlada com anestesia local.

Autorizo também a utilização dos dados e materiais coletados para a pesquisa realizada pelo responsável técnico Fabiano Borges Figueiredo CRMV: 6519, sabendo que a identificação desse animal será mantida em sigilo e a participação nesse estudo não acarretará em qualquer custo financeiro para o proprietário.

O acompanhamento pós-operatório será realizado pela equipe de campo no sétimo dia após a realização da biópsia. Se houver algum problema em relação aos

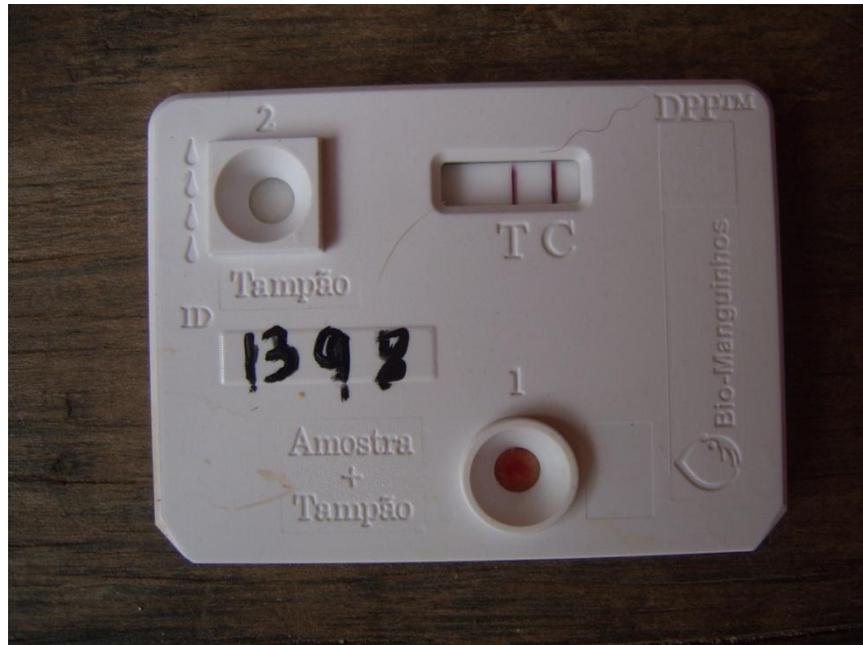
procedimentos realizados nos cães o veterinário responsável poderá ser encontrado pelos telefones (021) 38659536 / 38659553, no horário de 8:00 às 17:00 h.

O presente estudo além de trazer um benefício direto aos proprietários de cães da região de estudo, que terão a possibilidade de diagnosticarem seus animais em relação a uma zoonose grave como a leishmaniose visceral, região que atualmente não é realizado esse diagnóstico pela secretaria municipal de saúde, estarão também contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnósticos para LVC mais sensíveis e específicas.

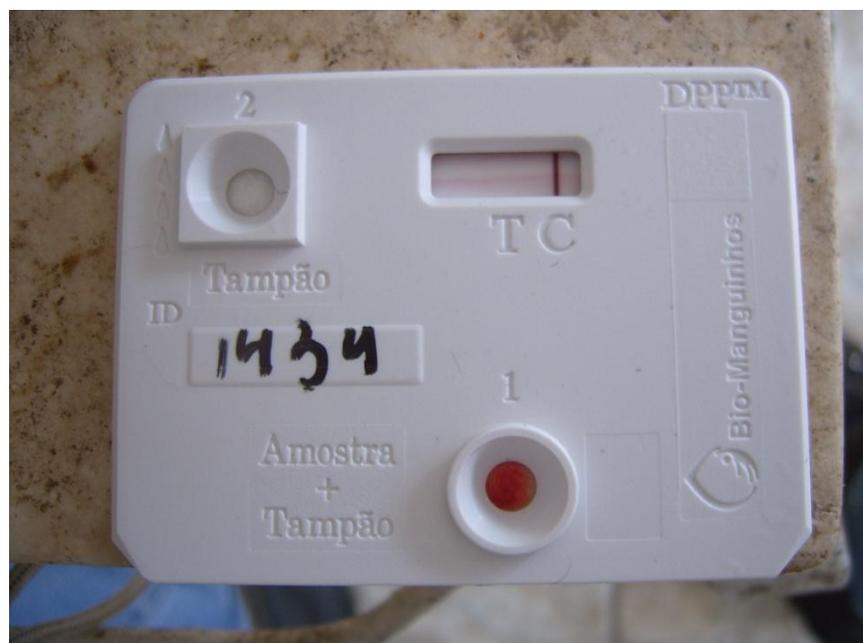
Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

## 12. APÊNDICE 1. LEITURA DOS RESULTADOS DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE DUPLO PERCURSO – TR DPP



Teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso positivo, com as bandas teste e controle em evidência.



Teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso negativo, apenas com a banda controle em evidência.