

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Núcleo de Medicina Tropical**

**MAURO MACIEL DE ARRUDA**

ACURÁCIA E REPRODUTIBILIDADE DE TESTES  
IMUNOENZIMÁTICOS COM ANTÍGENOS DE  
*Leishmania major* E *Leishmania infantum* PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA NO BRASIL

Brasília

2014

**Núcleo de Medicina Tropical**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

MAURO MACIEL DE ARRUDA

ACURÁCIA E REPRODUTIBILIDADE DE TESTES  
IMUNOENZIMÁTICOS COM ANTÍGENOS DE *Leishmania major*  
E *Leishmania infantum* PARA O DIAGNÓSTICO DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Tropical como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical  
com Área de Concentração em Epidemiologia e  
Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Orientador:** Gustavo Adolfo Sierra Romero

Co-orientadores: Elza Ferreira Noronha e Fabiano Borges Figueiredo

Brasília

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1015695.

Arruda, Mauro Maciel de.  
A778a Acurácia e reprodutibilidade de testes imunoenzimáticos com antígenos de *Leishmania major* e *Leishmania infantum* para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina no Brasil / Mauro Maciel de Arruda. -- 2014.  
123 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.  
Inclui bibliografia.  
Orientação: Gustavo Adolfo Sierra Romero.

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

CDU 616.993.161

MAURO MACIEL DE ARRUDA

ACURÁCIA E REPRODUTIBILIDADE DE TESTES  
IMUNOENZIMÁTICOS COM ANTÍGENOS DE  
*Leishmania major* E *Leishmania infantum* PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA NO BRASIL

**Banca examinadora**

Prof. Gustavo Adolfo Sierra Romero - UnB

Prof. Alexandre Barbosa Reis - UFOP

Prof. Jaime Martins Santana - UnB

Prof. Pedro Luiz Tauil - UnB

Prof. Wildo Navegantes de Araújo - UnB

Maria Imaculada Barboza Muniz-Junqueira – UnB (Suplente)

## **Dedicatória**

Dedico essa Tese aos maiores exemplos de vida, meus pais, Manoel Batista de Arruda e Wilma Maciel de Arruda.

A minha esposa Denise pelo amor incondicional e aos meus queridos filhos Barbara e Lucas, amo vocês.

## **Agradecimentos**

Antes de tudo, agradeço a DEUS por tudo que me tem proporcionado, por todas as provações e desafios a mim impostos e pelo meus sucessos alcançados, pelas pessoas que ELE tem colocado em meu caminho que tanto me ajudam a seguir em frente e superar os obstáculos. Muito obrigado meu DEUS.

Aos meus orientadores Gustavo Romero, Fabiano Borges Figueiredo e Elza Noronha, além de me conduzirem pelos caminhos da pesquisa foram mais que mestres, foram amigos e nunca deixaram as minhas demandas sem respostas ou solução.

A querida amiga e grande mentora Eliane Furtado que com toda a sua generosidade me ensinou os primeiros passos na compreensão uma doença tão complexa e diversa.

Aos amigos pesquisadores e técnicos da FIOCRUZ- RJ tanto do Instituto de Pesquisa Carlos Chagas como do Instituto Oswaldo Cruz que não mediram esforços para identificar e classificar cada uma das amostras caninas que posteriormente seria o nosso padrão de referência utilizado.

Fernanda, Adriana, Regina, Ronaldo e aos demais técnicos do Laboratório de Referência Nacional de Leishmanioses (FUNED-MG), obrigado pelos anos de convivência e pelo trabalho incansável no diagnóstico das leishmanioses no Brasil e pela contribuição nas análises dos soros utilizados para a validação dos testes.

Em nome do Roberto Hiamamoto e Kátia do Laboratório de Referência Estadual em Leishmanioses de São Paulo (Instituto Adolfo Lutz) agradeço a todos os técnicos que se envolveram nas análises sorológicas das amostras do painel a nível estadual.

Julia Brazuna, você e sua equipe do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande desempenharam um excelente trabalho nas análises sorológicas das amostras e contribuíram muito para minha pesquisa, meu muito obrigado.

Aos jovens e dedicados profissionais da medicina veterinária Edvar e Carlos sem vocês a segurança e confiança na coleta das amostras a campo não seria a mesma, bem como a alegria e descontração em um trabalho tão sério.

Não posso deixar de agradecer a BIOMANGUINHOS pelo empenho em desenvolver e disponibilizar um teste de ELISA com antígenos específicos de *L. infantum* para que pudéssemos realizar esse trabalho. Muito obrigado a toda equipe de desenvolvimento, controle de qualidade e comercialização por acreditar e apoiar nossa iniciativa.

Pessoalmente não gosto de fazer agradecimentos dessa forma, pois certamente podemos, sem intenção, omitir pessoas que foram importantes e que estiveram diretamente envolvidas com o trabalho ou que nos deram algum suporte técnico e emocional. Assim quero agradecer de forma geral aos ex-colegas de trabalho da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB/SVS/MS), do PNCVLV (DEVEP/SVS/MS) e da Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da UnB.

## Lista de Figuras

- FIGURA-1.** SÉRIE HISTÓRICA DO NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA NOTIFICADOS NO BRASIL DE 1980 A 2012..... **15**
- FIGURA-2.** EVOLUÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA NO BRASIL DE 1983 A 2012.....**15**
- FIGURA-3.** TAXA DE LETALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL, de 2003 a 2012 .....**16**
- FIGURA-4.** EXPANSÃO TERRITORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL NO ANO DE 2010 SEGUINDO PADRÃO DE DIFUSÃO PELAS ROTAS MIGRATÓRIAS.....**23**
- FIGURA-5.** ALGORITMO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DAS AMOSTRAS DE SORO PARA A VALIDAÇÃO DOS TESTES DE ELISA COM ANTÍGENO DE *L. major* E ELISA COM ANTÍGENOS DE *L. infantum* E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM ANTÍGENOS DE *L. major*.....**38**



## Abreviações

CCI	Coeficiente de correlação intraclasse
CCZ-CG	Centro de Controle de Zoonoses - Campo Grande
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
DAT	Direct agglutination test
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imuno enzimático
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG, IgE,...	Imunoglobulinas G, Imunoglobulinas E,....
IPEC	Instituto de Pesquisa Osvaldo Cruz
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVCLV Visceral	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>

## **Financiamento**

Esse trabalho é um dos produtos do projeto de construção de um painel nacional de soros caninos para a validação dos testes diagnósticos utilizados no serviço público, encomendado e financiado pelo Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde-SVS.

O doutorando foi subsidiado com bolsa de estudos do CNPq.

# Índice

Dedicatória.....	4
Agradecimentos.....	5
Lista de figuras.....	7
Abreviações.....	8
Financiamento.....	9
Índice.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 As leishmanioses.....	16
1.2. O agente da leishmaniose visceral.....	19
1.3. O vetor.....	20
1.4. Epidemiologia.....	21
1.5. Reservatórios.....	22
1.6. A doença no cão.....	24
1.7. O controle.....	25
1.8. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1. Delineamento do estudo.....	37
4.2. O padrão de referência.....	38
4.3. Testes avaliados.....	39
4.4. Descrição da metodologia analítica.....	39
4.4.1 Teste Imunoenzimático - ELISA.....	40
4.4.2 Teste de imunofluorescência indireta.....	41
4.5. Análise estatística.....	41

4.6. Aspectos éticos.....	42
5. RESULTADOS .....	42
5.1. Artigo I: publicado na revista PLoS One: De Arruda MM, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JC, de Oliveira MR, et al. (2013) Validity and reliability of enzyme immunoassays using <i>Leishmania major</i> or <i>L. infantum</i> antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS One ;8: e69988. ....	44
INTRODUÇÃO .....	47
MÉTODO.....	49
RESULTADOS .....	51
DISCUSSÃO .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
5.2. Artigo II.....	64
INTRODUÇÃO .....	66
MATERIAIS E MÉTODOS .....	67
RESULTADOS .....	69
DISCUSSÃO .....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
9. ANEXOS .....	98
9.1 – Certificado de licença da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Osvaldo Cruz.....	98
9.2 Protocolo da técnica imunoenzimática.....	99
9.3 Protocolo da técnica de imunofluorescencia.....	108
9.4 Checklist pelo método STARD.....	116
10. APÊNDICES .....	117
10.1 Artigo original publicado na revista PLOS. ....	117

## Resumo

### Introdução

A leishmaniose visceral é uma enfermidade parasitária, provocada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*). A limitada acurácia dos testes empregados para o diagnóstico dos cães pode contribuir com o baixo impacto de uma das medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde brasileiro, a eutanásia de cães sororreagentes para leishmaniose. Os objetivos deste trabalho buscam estimar a acurácia e a confiabilidade de dois testes imunoenzimáticos que utilizam antígenos de *L.(L.) major* ou de *L.(L.) infantum* em laboratórios de diferentes níveis de complexidade e estimar a acurácia dos testes de ELISA e IFI aplicados em combinação sequencial ou de forma paralela, analisando os valores preditivos positivos e negativos destas abordagens em prevalências variáveis de infecção canina.

### Método e principais resultados

Foi utilizado um painel de 1.425 amostras de soros caninos, coletados em estudo multicêntrico. As amostras foram analisadas por meio de técnicas de visualização direta de parasitos, por estudo histopatológico corado com hematoxilina-eosina, pela técnica de imunohistoquímica e pelo isolamento do parasito em cultura. Estas técnicas constituíram o padrão de referência, sendo um caso positivo para a infecção por *L. infantum* o animal que apresentasse positividade em pelo menos um dos testes. Os resultados da acurácia do teste de ELISA com antígenos de *L. major* e *L. infantum* realizados em condições ideais no Laboratório de Referência Nacional foi de 91,84% (IC95% 86,3 - 97,3) e 89,80% (IC95% 83,8 - 95,7) para sensibilidade e de 83,57% (IC95% 81,7 - 85,7) e 82,69% (IC95% 80,6 - 84,7) para especificidade, respectivamente. A AUC (área abaixo da curva ROC) foi de 0,920 para antígeno de *L. major* e de 0,898 para *L. infantum*. Os coeficientes de correlação intraclassa médios dos testes com antígenos de *L. major*, variaram entre 0,890 (0,876-0,902 IC95%) e 0,948 (0,942-0,953 IC95%) e com os antígenos de *L. infantum* entre 0,818 (0,792-0,841 IC95%) e 0,879 (0,865-0,8910 IC95%). A sensibilidade e a especificidade do teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi 90,8% (IC95% 84,2 - 97,5) e 53,4% (IC95% 51,6 - 55,1), respectivamente.

Utilizados de forma combinada o teste de ELISA com antígeno de *L. major* e o teste de IFI mostraram que em paralelo o desempenho da sensibilidade global subiu para 99,2%, porém a especificidade diminuiu para 44,8%. Na utilização dos testes em série (ELISA seguido de IFI) observou-se uma diminuição na sensibilidade (83,3%) e melhora na especificidade (92,5%).

### **Conclusões**

A acurácia dos dois testes avaliados é semelhante, com um desempenho discretamente melhor do antígeno de *L. major*. A reprodutibilidade dos testes foi quase que perfeita ( $>0,81$ ) com desempenho pouco melhor para o antígeno de *L. major*. Conclui-se, portanto, que não se justifica a mudança do antígeno no teste de ELISA atualmente constituído por *L. major* para diagnóstico de leishmaniose visceral canina no Brasil. Finalmente, a combinação dos testes de ELISA com antígeno de *L. major* seguido do teste de IFI melhorou a especificidade da abordagem diagnóstica, sem perda substancial da sensibilidade. A combinação em série destes testes pode satisfazer os anseios, tanto da saúde pública como dos proprietários de cães residentes em áreas endêmicas, por uma abordagem diagnóstica mais acurada da leishmaniose visceral canina.

## Abstract

### Background

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Leishmania (Leishmania) chagasi*). The limited accuracy of diagnostic tests for canine leishmaniasis may contribute to the lack of impact of the control measures recommended by the Brazilian Ministry of Health, i.e., euthanasia of seroreactive dogs. The objective of this study was to estimate the accuracy and reliability of two ELISA tests employing *L. (L.) major* or *L.(L.) infantum* antigen used by laboratories of different levels of complexity and estimate the accuracy of the ELISA tests and IFI applied in sequential or parallel combination, analyzing the positive and negative predictive values of these variables approaches prevalence of canine infection.

### Methods and principal findings

A series of 1,425 serum samples collected from dogs in a multicenter study was used. The samples were analyzed by direct visualization of the parasite in hematoxylin/eosin-stained sections, immunohistochemistry, and isolation of the parasite in culture. These techniques represented the reference standard and an animal that was positive in at least one of the tests was defined as infected with *L. infantum*. The results of the accuracy of the ELISA test with antigens of *L. major* and *L. infantum* played in ideal conditions at the National Reference Laboratory was 91.84% (CI 95% CI 86.3 - 97.3) and 89.80% (CI95% 83.8 - 95.7) for sensitivity and 83.57% (CI95% 81.7 - 85.7) and 82.59 (CI95% 80.6 - 84.7) specificity%, respectively. The AUC (area under the ROC curve) was 0.920 for the *L. major* and *L. infantum* 0.898 to. The mean intraclass correlation coefficients of the tests ranged from 0.890 (CI95% 0.876-0.902) to 0.948 (CI95% 0.942-0.953) when *L. major* was used as antigen, and from 0.818 (CI95% 0.792-0.841) to 0.879 (CI95% 0.865-0.8910) when *L. infantum* was used.

The sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence assay (IFA) was 90.8% (95% CI 84.2 to 97.5) and 53.4% (95% CI 51.6 to 55.1), respectively. Used in combination with the ELISA antigen of *L. major* and the IFA test showed that parallel the performance of the overall sensitivity increased to 99.2%, but the specificity decreased to 44.8%. The use of serial testing (ELISA followed by IFI) observed a

decrease in sensitivity ( 83.3 % ) and improved specificity ( 92.5 % ).

### **Conclusions**

The accuracy of the two assays was similar with a slightly better performance of the *L. major*. Reliability of the test was almost perfect ( $> 0.81$ ) with slightly better performance for the *L. major*. These results do not support a change in the antigen composition of ELISA tests (*L. major*) currently used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Finally, the combination of ELISA tests with *L. major* antigen followed by the IFA test improved the specificity of the diagnostic approach without substantial loss of sensitivity. Serial combination of these tests can satisfy the desires of both the public health and dog owners living in endemic areas for a more accurate diagnostic approach of canine visceral leishmaniasis.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 As leishmanioses

As leishmanioses representam um conjunto de enfermidades parasitárias de distribuição mundial, que podem apresentar patogenicidade e alterações clínicas bem distintas entre si. No continente americano, basicamente existem duas formas de acometimento: o de pele e mucosas denominado de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e o acometimento das vísceras que caracteriza a síndrome de Leishmaniose Visceral (LV).

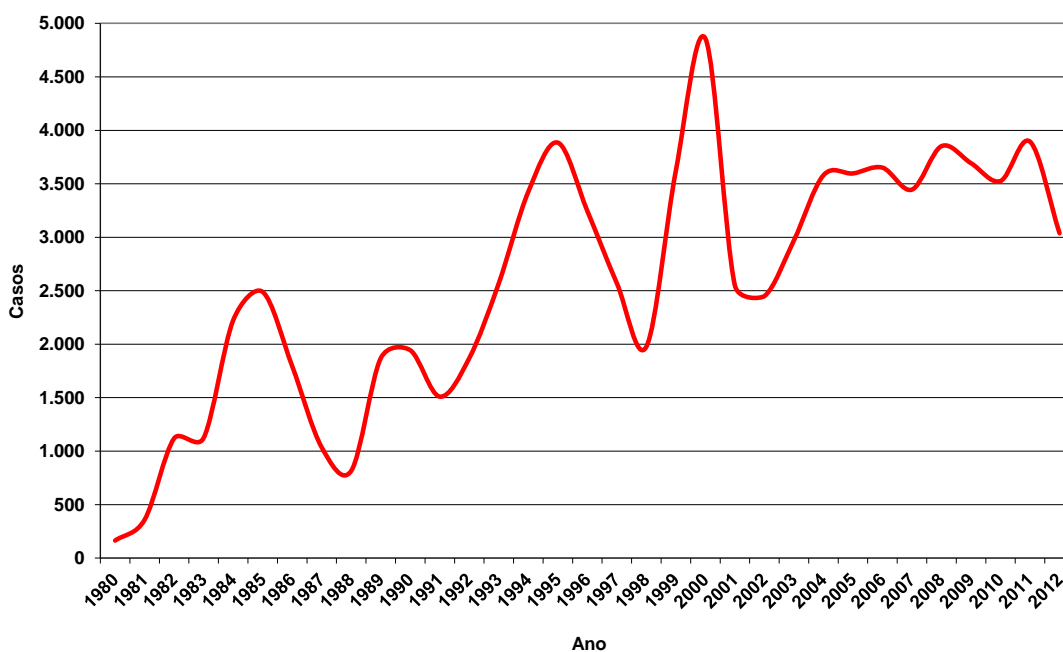
Essas enfermidades são produzidas por diferentes espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*, parasitos com ciclo de vida heteroxênico, que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos, responsáveis pela transmissão dos parasitos entre mamíferos (Deane e Deane 1962; Marzochi e Marzochi 1994; TRD/WHO 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), inclui as leishmanioses entre as doenças tropicais da categoria 1, definidas como doenças em expansão e para as quais não se dispõe de instrumentos de controle adequados (WHO<sup>a</sup> 2010; WHO<sup>b</sup> 2010).

Estima-se que 350 milhões de pessoas de 98 países, distribuídos por quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) estão expostos à transmissão de pelo menos uma das trinta espécies de *Leishmania*. A incidência anual é estimada em 1,5 milhão de casos para LTA e de 220 a 400 mil para LV humana e de 700 mil a 1,2 milhões para leishmaniose visceral canina (LVC), sendo 90% dos casos de LV humana estão localizados em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil

e Etiópia. (WHO 1990; Desjeux 2004; WHO<sup>b</sup> 2010; Alvar et al. 2012).

No Brasil a LV, também conhecida como calazar, constitui um grave problema de saúde pública, devido à ampla distribuição no país e à dispersão para regiões consideradas indenes, bem como, pela gravidade das suas formas clínicas que podem levar o indivíduo à morte se não tiver tratamento adequado e oportuno. Há registros de casos humanos em 21 das 27 unidades da federação, com média anual de 3.156 casos nos últimos dez anos e incidência aproximada de 2 casos por 100.000 habitantes (Fig. 1 e 2). (BRASIL 2006; BRASIL 2012).



Fonte: SVS/MS

Figura-1. Série histórica do número de casos de leishmaniose visceral humana notificados no Brasil de 1980 a 2012.

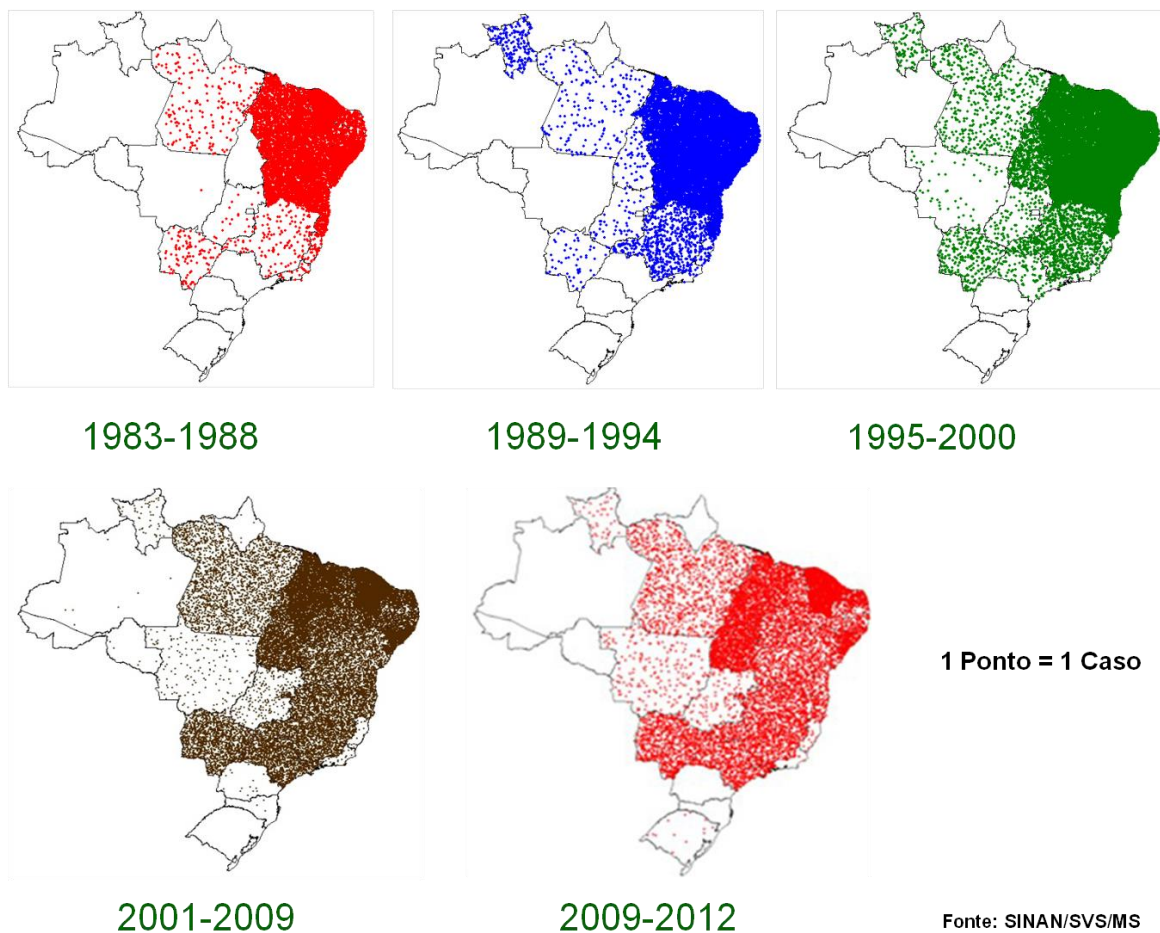
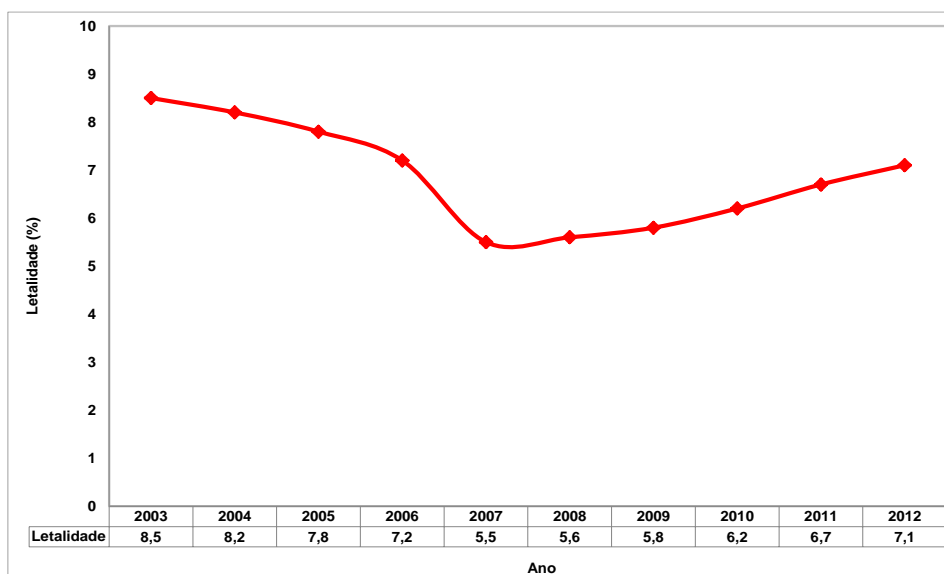


Figura-2. Evolução da distribuição dos casos de leishmaniose visceral por município de residência no Brasil de 1983 a 2012.

Conforme dados do Ministério da Saúde do Brasil (MS) a letalidade média entre os anos de 2003 a 2012 no país foi 6.86%. É interessante destacar que desde 2007 a letalidade apresenta-se de forma crescente (Fig. 3).



Fonte: SVS/MS

Figura-3. Taxa de letalidade por LV, Brasil, 2003 a 2012.

No homem, a LV caracteriza-se principalmente pela tríade clínica: febre, palidez e esplenomegalia, que são os sintomas mais frequentes. A febre apresenta-se de forma irregular e prolongada e o aumento do baço e do fígado é progressivo. Há alterações biológicas como anemia associada com leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal, hipoalbuminemia e a consequente inversão da relação albumina/globulina. Edema periférico ou generalizado e pigmentação da pele podem estar presentes (Badaró 1987; Marty et al. 2009).

## 1.2. O agente da leishmaniose visceral

Os agentes etiológicos responsáveis pela LV pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (*L. (Leishmania) donovani*, *L. (Leishmania) infantum* e *L. (Leishmania) chagasi*). No subcontinente indiano e na África a *L. (L)*

*donovani* apresenta-se predominantemente e *L. (L.) infantum* predomina na bacia do Mediterrâneo no continente Europeu. Nas Américas, existem evidências que sustentam a hipótese de que *L. (L.) chagasi* constitui uma espécie idêntica à *L.(L.) infantum*. (Laison e Shaw 1987). A nomenclatura utilizada para o agente no novo mundo foi proposta por Cunha e Chagas no ano de 1937, devido a variações bioquímicas entre os parasitos encontrados no continente europeu e americano. Porém, com o aprimoramento das técnicas taxonômicas sejam por isoenzimas (Cupolillo et al. 1994; Cupolillo et al. 1995) ou por biologia molecular (Mauricio et al. 1999; Mauricio et al. 2001; Ochsenreither et al. 2006; Kuhls et al. 2011) conclui-se que não há distinção entre as espécies *infantum* e *chagasi*. Estudos de imunogenicidade também corroboram essas conclusões (Marcondes et al. 2011).

### **1.3. O vetor**

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos, o parasito vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Nesse meio, as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro, diferenciam-se em formas promastigotas (flageladas) que são posteriormente inoculadas na pele dos hospedeiros mamíferos durante a picada (Desjeux 1996; Palatnik-de-Sousa et al. 2001).

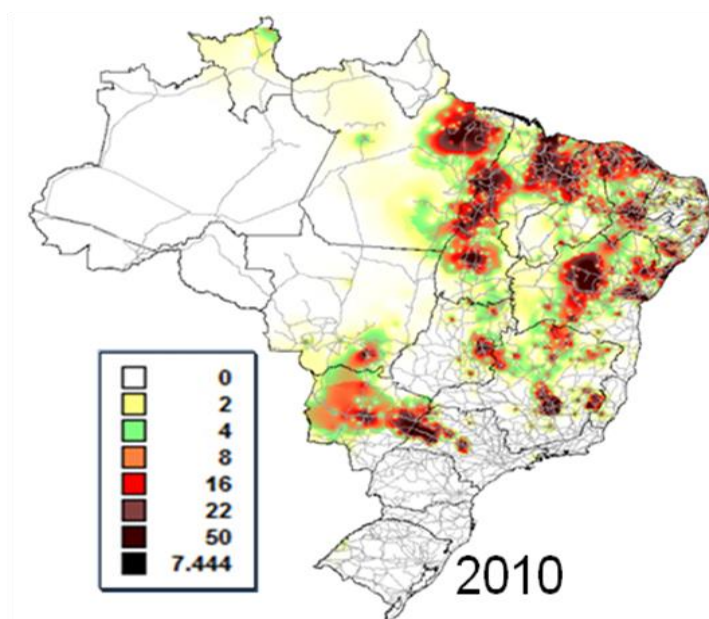
O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas do Canadá à Argentina. No Brasil, *Lu. longipalpis* é incriminada como o principal vetor da LV, entretanto, outras espécies podem contribuir com a transmissão do agente em diferentes regiões, tais como *Lu. cruzi*, descrita no Estado do Mato Grosso do Sul (Santos et al.1998; Missawa et al.

2011). Seu criadouro é em solo úmido e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição. Formas imaturas são encontradas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, e também nas forquilhas das árvores em tocas de animais (Palatnik-de-Sousa et al. 2001; Basano e Camargo 2004; BRASIL 2006).

#### **1.4. Epidemiologia**

Os padrões epidemiológicos de transmissão da LV têm sofrido mudanças nas últimas décadas no Brasil (Fig. 4). Inicialmente, apresentava-se predominantemente em áreas rurais e periurbanas, mas vem se expandindo para as áreas urbanas de cidades de médio e grande porte. Fatores como a urbanização recente e destruição de ecótopos silvestres, a oferta de fontes alimentares humanas e presença de animais domésticos, a arborização abundante em quintais, as más condições sanitárias com o acúmulo de lixo, presença de abrigos de animais silvestres dentro do perímetro urbano possibilitam a domiciliação de *Lu. longipalpis* (Costa et al. 1995; BRASIL 2006; Mestre e Fontes 2007).

A dispersão para regiões consideradas indenes segue padrões de distribuição espacial e de concentração semelhantes aos fluxos migratórios da população, seguindo os corredores de circulação (Fig. 5). A introdução de cães infectados em determinadas áreas pode estar associada à migração, uma vez que estes animais, muitas vezes, são trazidos infectados da região de origem, contribuindo para a infecção dos flebotomíneos presentes em áreas de desmatamento recente e em zonas periurbanas (Paranhos-Silva et al. 1998; Mendes et al. 2002; Mestre e Fontes 2007; Fébre et al. 2006).



Casos por km<sup>2</sup>  
 — Rodovias brasileiras  
 Fonte: Sinan/SVS/MS

Figura 4. Expansão territorial da leishmaniose visceral no Brasil no ano de 2010 seguindo padrão de difusão pelas rotas migratórias.

### 1.5. Reservatórios

A primeira descrição da leishmaniose em cães foi realizada por Nicolle & Compte no Instituto Pasteur de Tunis em 1908 (Bari 2006). Desde então, o parasito tem sido isolado nessa espécie em diversos países. Os cães domésticos ocupam um papel de destaque na cadeia epidemiológica da enfermidade sendo incriminados como os principais reservatórios da *L. infantum* (Ashford 1996; Moreno e Alvar 2002; Desjeux 2004<sup>a</sup>; Desjeux 2004<sup>b</sup>; Gramiccia e Gradoni 2005; Dantas-Torres e Brandão-Filho 2006). Na caracterização dos parasitos por isoenzimas não se observa diferença entre isolado obtidos de humanos e de cães (Pratlong et al. 2004; Alvarenga 2007;

Caballero 2008). Levando em conta a alta prevalência da infecção em cães, pela ocorrência da enzootia canina precedendo os casos humanos e pelo acentuado parasitismo cutâneo, que poderia facilitar a infecção dos vetores, a infecção nos cães é considerada epidemiologicamente mais relevante para a manutenção da zoonose do que a doença humana (OMS 1990; Slappendel e Ferrer 1990; Solano-Gallego et al. 2001). A incidência de casos humanos é aumentada em anos subsequentes à identificação da alta prevalência em cães (Badaró 1987). Nesse sentido, a OMS recomenda que antes de iniciar as atividades de controle deve-se prestar especial atenção ao estudo de distribuição e frequência da enfermidade nos cães, por meio de inquéritos sorológicos (WHO<sup>b</sup> 2010).

Deane e Deane em 1962 (Deane e Deane 1962) apontam que pessoas com infecção ativa de LV possuem a competência de infectar os flebótomos vetores. Costa e colaboradores em 2000 e 2002 (Costa et al. 2000; Costa et al. 2002) indicam que humanos portadores assintomáticos podem ser reservatórios da infecção por *L. infantum* em áreas endêmicas, no entanto, o seu papel na manutenção da transmissão permanece incerto.

No ambiente silvestre, confinados em bosques ou zoológicos, diversos mamíferos podem albergar o parasito, tais como: *Cerdocyon thous* (lobinho) (Silveira et al. 1982; Marzochi e Marzochi 1994), *Speothos venaticus* (cachorro vinagre) (Figueiredo et al. 2008), *Lycalopes vetulus* (Deane e Deane 1962), *Dusicyon vetulus* (raposa grisalha), *Vulpes vulpes* (raposa vermelha) (Mancianti et al. 1994), *Didelphis albiventris* (gamba) (Marzochi e Marzochi 1994), *Chrysoccyon brachyurus* (lobo guará), animais da ordem edentata como tatu e preguiças e ainda primatas (Deane e Deane 1962; Laison et al. 1969; Marzochi e Marzochi 1994; Ashford 1996; Paranhos-Silva et al. 1996; Gramiccia e Gradoni 2005; Dipineto et al. 2007; Figueiredo et al. 2008; Manna et al. 2009).



## 1.6. A doença no cão

As manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) abrangem amplo espectro de características que variam do aparente estado sadio a um grave quadro final relacionado ao tipo de resposta imunológica de cada animal.

Inicialmente, os parasitos encontram-se no lugar da picada infectante. Posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e pele. Após a infecção, alguns cães podem controlar a infecção e não desenvolvem a doença no curto prazo, às vezes por anos ou ao longo da vida, enquanto que outros cães infectados apresentam doença progressiva. Isso pode estar relacionado a diferenças genéticas entre as raças e indivíduos e a ativação de resposta imune específica de cada um (Manna et al 2004; Silva et al. 2005; Rodriguez-Cortes et al. 2007; Sanchez-Robert et al. 2008). A presença de infecção latente em cães, mesmo durante toda a sua vida, é típica e contribui para a manutenção da presença em longo prazo do parasito em regiões endêmicas (Manna et al. 2006).

Dentre os principais sinais clínicos no cão estão as lesões cutâneas, como as dermatites e úlceras, linfadenopatia localizada ou generalizada, perda de peso, anorexia, anemia, afecções oculares, onicogrifose, atrofia muscular, esplenomegalia e falência renal (Solano-Gallego et al. 2001; BRASIL 2006; Manna et al. 2006; Diouani et al. 2008).

De acordo com a sintomatologia, os cães com LV podem ser classificados em três categorias distintas: 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, onicogrifose, perda de peso moderada ou grave, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (Mancianti et al. 1988).

Gradoni et al. (1980) citam que mais de cinquenta por cento de todos os animais infectados não apresentam sinais clínicos, ou seja, são assintomáticos (Gradoni et al. 1980). Baseado nos estudos de Guarga et al. (2000) a pele saudável de cães infectados é mais atrativa para os vetores do que a pele deteriorada de animais sintomáticos, isso aumenta a importância dos assintomáticos no ciclo de transmissão e manutenção da enfermidade em áreas endêmicas (Guarga et al. 2000). Para Rodriguez-Cortes (2007) a importância dos animais assintomáticos como fontes de infecção ainda necessita de maiores estudos. (Rodriguez-Cortes et al. 2007), por outro lado Mosshfe e colaboradores em 2009, demonstraram, em seu estudo, que 43,4% dos cães assintomáticos apresentavam DNA de *L. infantum* no sangue periférico e que atuavam como fonte infectante de *Leishmania* (Mosshfe et al. 2009).

## **1.7. O controle**

Conforme o trabalho de revisão conduzido por Romero e Boelaert em 2010, existe a necessidade de maiores estudos a fim de esclarecer a dinâmica de transmissão da *Leishmania* em cães, humanos e na população de vetores (Romero e Boelaert 2010).

Diversas medidas de controle têm sido elaboradas e aplicadas nos países endêmicos. No Brasil, o programa de controle da LV está centrado em quatro pilares de ação (BRASIL 2006):

- Diagnóstico e tratamento oportuno dos casos humanos, com a distribuição gratuita de medicamentos específicos,

- Redução da população de flebotomíneos, pelo controle químico com inseticidas com efeito residual,

- Controle dos reservatórios caninos por meio de inquéritos sorológico e a eutanásia dos animais soro-reagentes,

#### -Atividades de educação em saúde

Apesar das estratégias bem estabelecidas, a transmissão da enfermidade continua se expandindo para áreas consideradas indenes, indicando que essas estratégias não estão sendo eficazes (Romero e Boelaert 2010).

Das ações preconizadas pelo MS, o controle dos reservatórios caninos com a eutanásia dos animais soro-reagentes é certamente a mais polêmica. Alguns estudos demonstram que há decréscimo na incidência da LV em crianças e cães após as ações de diagnóstico e eutanásia de cães soropositivos (Ashford et al. 1998; Palatnik-de-Sousa et al. 2001) outros concluem que a eliminação de cães não reduz efetivamente a incidência de LV na população humana (Tesh 1995; Dietze et al. 1997; Vieira e Coelho 1998; Moreira et al. 2004; Nunes et al. 2008). Os longos intervalos entre o sorodiagnóstico e a remoção dos animais; a sensibilidade dos testes utilizados, a elevada taxa de reposição dos animais eutanasiados, incluindo animais suscetíveis ou mesmo por outro infectado e o envolvimento de outros reservatórios podem determinar o sucesso ou fracasso dos programas que utilizam o controle da infecção nos reservatórios domésticos (Moreira et al. 2004; Andrade et al. 2007; Miro et al. 2008; Nunes et al. 2008).

A eutanásia de cães também sofre a oposição dos proprietários de cães, das organizações de proteção animal e de médicos veterinários que desejam que outras formas de controle para doença sejam regulamentadas, como o tratamento canino, a utilização de vacinas e coleiras impregnadas com inseticida para proteção dos cães contra o vetor, reduzindo os efeitos sociais e éticos causados pela eutanásia.

O tratamento canino com fármacos de uso humano é oficialmente proibido no Brasil desde 2008, quando os Ministérios da Saúde e da

Agricultura instituíram a Portaria Interministerial No. 1426 julho de 2008 (BRASIL 2008), baseada em recomendações do I Fórum de discussão do tratamento da LVC que reuniu diversos expertos em leishmanioses para aprofundar a discussão e subsidiar o MS na tomada de decisão. Um novo fórum foi realizado no ano de 2009, tratando do mesmo tema, que manteve a recomendação do I Fórum da proibição do tratamento canino com drogas de uso humano (BRASIL 2009). A proibição está baseada nas evidências científicas que os protocolos de tratamentos atualmente preconizados levam à melhora clínica dos animais, mas não promovem a cura parasitológica, possibilitando que animais tratados permaneçam como fonte de infecção para os vetores e o contínuo risco de aparecimento de cepas resistentes aos poucos fármacos disponíveis para o tratamento da enfermidade em humanos. (Oliva et al. 1995; Slappendel e Teske 1997; Cavaliero et al. 1999; Riera et al 1999; Koutinas et al 2001; Croft et al. 2006; Ikeda-Garcia et al. 2007; Ribeiro et al. 2008; Manna<sup>b</sup> et al. 2009).

Existem no Brasil duas vacinas contra LVC registradas no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Em 9 de julho de 2007 os Mistérios da Saúde e da Agricultura, publicaram no Diário Oficial da União a Instrução Normativa N°31 que aprova o Regulamento Técnico para a pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacinas contra leishmaniose visceral. Esse regulamento estabelece um prazo para que os fabricantes apresentem os resultados de estudos controlados, randomizados e mascarados para avaliar a eficácia vacinal (Estudos de fase III) e estudos de vigilância e pesquisas pós-registro (Estudos de fase IV) (BRASIL 2007). Em maio de 2009 o MS publica a Nota Técnica intitulada “Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Anti-leishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA” onde não recomenda o uso das vacinas como medida de controle nos programas de Saúde Pública até a conclusão e avaliação dos estudos propostos na Instrução Normativa 31 (BRASIL 2009).

O controle de vetores por meio do uso de inseticidas de efeito residual em áreas onde a presença dos flebótômíneos foi identificada, e o uso de coleiras para cães impregnadas com inseticidas, são ações aceitas pelas populações afetadas, porém é necessária a realização de estudos para demonstrar a sua efetividade e para melhor conhecer o comportamento e a sazonalidade do vetor que permita intervenções mais precisas, bem como da resistência aos inseticidas atualmente utilizados (Romero e Boelaert 2010).

Estudo realizado em Teresina, capital do estado do Piauí, aponta para um efeito protetor da eliminação de cães infectados em adição à borrifação intradomiciliar com inseticidas, na incidência de infecção por *L. infantum* (Costa et al. 2007).

Políticas públicas orientadas para eliminação da fome e de suporte nutricional, para melhorias habitacionais, da gestão de resíduos ou outras que envolvam a participação da comunidade, poderiam contribuir indiretamente no controle da LV (Romero e Boelaert 2010).

## **1.8. O diagnóstico da leishmaniose visceral canina**

O diagnóstico oportuno dos casos humanos e a correta classificação dos cães infectados ou não são fundamentais para o sucesso do programa de controle da LV. O diagnóstico deve estar baseado nos achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

A suspeita inicial da enfermidade normalmente esta relacionada com o aparecimento de sinais clínicos tanto no homem como no cão. A apresentação de sintomas suspeitos, em conjunto com o diagnóstico epidemiológico baseado nas características ambientais e ecológicas que

propiciem a dispersão dos vetores, reservatórios e do agente em uma determinada área, asseguram um bom indicador da presença da enfermidade. O diagnóstico laboratorial deve ser realizado para auxiliar na conclusão final do diagnóstico. Diversas técnicas laboratoriais são ferramentas utilizadas para o diagnóstico da LV tais como:

- I. Técnicas sorológicas
  - a. -Imunofluorescência indireta – IFI
  - b. -Ensaio imunoenzimático – ELISA
  - c. -Teste de aglutinação direta – DAT
  - d. -Testes imunocromatográficos rápidos
  - e. -*Western Blot*
- II.
- III. Técnicas parasitológicas
  - a. -Pesquisa direta do parasito
    - i. -Preparação de esfregaço de pele
    - ii. -Aspirados de linfonodos, medula óssea, baço ou outros tecidos
  - b. -Histopatologia convencional de tecidos corados com hematoxilina-eosina
  - c. -Imunohistoquímica usando anticorpos anti-*Leishmania*
  - d. -Cultura de parasitos em meios específicos
- IV. Detecção de DNA do parasito
  - a. -PCR (*polymerase chain reaction*) convencional ou quantitativa
  - b. -Hibridação com sondas específicas

Como método diagnóstico da LVC, o programa brasileiro recomendava até 2012 a utilização de duas técnicas sorológicas combinadas, ELISA e IFI, produzidos por Biomanguinhos® (Rio de Janeiro, Brasil). Os conjuntos de diagnóstico são distribuídos para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) após avaliação e aprovação de controle de qualidade no laboratório de referência nacional da Fundação Ezequiel

Dias (FUNED). Os Lacens e laboratórios oficiais credenciados realizam os exames em áreas de transmissão de LV a fim de detectar cães infectados. O Ministério da Saúde recomendava a triagem pelo método de ELISA e a confirmação pela IFI. Isto se deve ao fato de que o ELISA constitui uma técnica automatizada e mais sensível, sendo indicada para triagem e a IFI, por ser mais específica, para confirmar animais infectados, reduzindo assim a probabilidade da manutenção de animais com resultados falso-negativos na localidade bem como de eutanasiar animais com resultados falso-positivos (BRASIL 2006). O protocolo atual brasileiro utiliza um teste imunocromatográfico rápido (DPP- Plataforma de duplo percurso) como teste de triagem e o ELISA como confirmatório.

O diagnóstico parasitológico é método de certeza e baseia-se na demonstração do parasito. Apesar de simples, alguns desses exames são invasivos e podem levar riscos para os animais. Os testes parasitológicos podem apresentar uma especificidade de quase 100%, mas a sensibilidade é afetada pelo grau de parasitismo. Nos cães sintomáticos, os métodos parasitológicos podem apresentar 80% de sensibilidade. No entanto, nos cães oligossintomáticos e principalmente nos assintomáticos, a sensibilidade desses métodos diminui (BRASIL 2006; Baneth e Aroch 2008). Devido ao número de animais testados no programa brasileiro, os testes parasitológicos são impraticáveis na rotina de saúde pública.

Métodos moleculares como a detecção de DNA por meio da PCR podem se aproximar melhor ao “padrão de referência” para determinar a presença e identidade das infecções por *Leishmania* tanto em vertebrados como nos vetores (Manna et al. 2006). Estudos utilizando a técnica de PCR têm demonstrado que a prevalência da infecção em cães é maior que aquelas indicadas pelos estudos sorológicos (Berrahal et al. 1996; Solano-Gallego et al 2001). Porém, essa ferramenta diagnóstica não está disponível na rotina de vigilância epidemiológica do programa de controle brasileiro, ficando restrita aos centros de pesquisa. Essa técnica carece de estudos de

validação para identificar qual ensaio seria o mais adequado para uso na rotina da rede de Lacens.

Os métodos sorológicos baseados na detecção de anticorpos são os mais utilizados no diagnóstico da LVC e indicam a exposição do animal à infecção. A soro-conversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania* e em menor grau de imunoglobulina M (IgM) (Marcondes et al. 2011).

Os métodos de IFI, ELISA, DAT e mais recentemente a imunocromatografia rápida são técnicas amplamente desenvolvidas para melhorar o monitoramento e controle da LVC. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, falham na detecção de cães infectados no período pré-patente da doença e não discriminam entre doença e infecção assintomática além de poder apresentar reações cruzadas com outras enfermidades (Vexenat et al. 1996; Sarkari 2005; Pinheiro et al. 2009).

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

A soroprevalência para LV na população canina na bacia do Mediterrâneo varia de região para região. Por exemplo, na Itália, a região da Apúlia possui a prevalência de 14,5% e a Toscana 24%, nos Alpes Marítimos na França, apresenta prevalências entre 3% a 17%, na Espanha, Madrid tem 5% e a região do Priorato tem 18%, em Portugal na área circundante de Lisboa, a prevalência é de 8,5% (Moreno e Alvar 2002). Em Israel, nas vilas de Nataf e Nili têm soroprevalencia de 10% e 12.9%, respectivamente, e nas vilas vizinhas a prevalência de 1% (Baneth et al.



1998).

No Brasil, a situação não difere dos dados apresentados nos países de velho mundo, a prevalência de cães infectados vivendo em áreas endêmicas varia de 1% a 67% (Coutinho et al. 1985; Paranhos-Silva et al 1996; Bernadina et al. 1997; Ashford et al. 1998; Moura et al. 1999; Franca-Silva et al. 2003; Silva et al. 2005; Mestre e Fontes 2007; Queiroz et al. 2009).

Além dos fatores ecológicos, a prevalência canina pode variar devido ao tipo de utilização e comportamento dos cães. Em estudos desenvolvidos na Argélia cães de rua apresentam maior prevalência (11,7%) que cães de fazenda (9,7%) e cães da guarda florestal (5,9%) (Adela et al. 2010).

Estudos relacionando a carga parasitária, sinais clínicos e avaliação sorológica e molecular são discutidos por diversos autores (Mettler et al. 2005; Silva et al. 2005; Rodriguez-Cortes et al. 2007; Candido et al. 2008; Pinheiro et al. 2009). Manna e colaboradores em 2006 concluem que existe uma correlação positiva entre carga parasitária e sintomatologia clínica (Manna et al 2006). Outros autores apresentam correlação positiva entre altas concentrações de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2), a carga parasitária em tecidos e os escores de manifestações clínicas (Rodriguez-Cortes 2007). Rodriguez-Cortez e colaboradores no ano de 2007 também sugerem que quando a doença clínica se manifesta o número de parasitos aumenta nos órgãos-alvo e na circulação sanguínea, sendo o maior achado desses autores a existência de correlação negativa entre a carga parasitária e a imunidade celular específica (Rodriguez-Cortes 2007). O estudo conduzido por da Costa-Val e colaboradores em 2007 demonstra que animais com acentuada sintomatologia clínica apresentam altos níveis de IgG e são hábeis para infectar um grande número de flebotomíneos (Costa-Val et al. 2007).

O aparecimento de sintomatologia clínica em animais soropositivos

pode variar conforme a região e metodologia utilizada pelos autores: 20% (Ait-Oudhia et al. 2009), 28% (Baneth et al. 1998) 41,2% (Tomaz-Soccol et al. 2009), 50% (Madeira et al 2004). Da mesma forma o desempenho dos testes sorológicos depende de fatores como o status da infecção (Mettler 2005; Candido et al. 2008), do tipo de antígeno utilizado (Porrozzi et al. 2007) ou da amostra testada, soro ou eluato obtido de amostras sanguíneas conservadas em papel de filtro (Rosario 2005).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A ampla distribuição da LV em quatro continentes em 98 países expondo ao risco de adoecer quase 350 milhões de pessoas. A mudança dos padrões epidemiológicos, com acentuada urbanização e expansão para áreas consideradas indenes, e as taxas de letalidade preocupantes, fazem da LV uma das principais enfermidades de interesse da saúde pública da atualidade.

O cão é incriminado como o principal reservatório da LV. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção destes tem sido mais prevalente do que nos humanos. Dentre as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde brasileiro para reduzir os riscos de infecção humana, o controle dos reservatórios caninos por meio de inquéritos sorológicos para a identificação de animais infectados e a posterior eutanásia é a que gera maiores debates na sociedade e no meio científico, principalmente, no que diz respeito à segurança de estar encaminhando para eutanásia aqueles animais verdadeiramente infectados.

Os testes sorológicos tem sido indicados como os métodos de primeira escolha para a identificação de cães infectados por *Leishmania* devido à facilidade de coleta de amostras em condições de campo e baixo

custo, assim como a relativa facilidade na execução das técnicas. Entretanto, atualmente essas metodologias tem sido duramente criticadas por diversos autores pela sua baixa acurácia, principalmente a IFI. Como consequência, animais que apresentam resultados falso-negativos podem permanecer no ambiente, contribuindo para a manutenção e dispersão da enfermidade, ou animais que apresentam resultados falso-positivos serem encaminhados para eutanásia de forma desnecessária.

Testes mais específicos são mais relevantes para a exclusão do diagnóstico frente a casos clínicos suspeitos. Por outro lado, testes sensíveis são fundamentais para programas de vigilância ou para testar cães importados de regiões endêmicas e identificar animais portadores sadios (Mettler 2005).

Um dos fatores determinantes da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos é o tipo de antígeno utilizado e o procedimento para a sua obtenção ou purificação, portanto, metodologia idêntica com antígenos diferentes pode modificar de forma importante os valores de sensibilidade e especificidade do teste (Kar 1995; Boarino et al. 2008).

Uma das principais limitações dos métodos sorológicos ocorre devido a possibilidade de reações cruzadas com infecção causadas por leishmanias dermatóricas tais como *L. (Viannia) braziliensis* e outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (Trocarelli et al. 2009), os quais apresentam uma relação filogenética muito estreita com *L. infantum*, podendo causar resultados falsos positivos (Vexenat et al. 1996). Paralelamente, os achados falsos negativos podem ocorrer, ou por atraso no período pré-patente da infecção ou porque alguns cães nunca soro convertem (Paranhos-Silva 1996).

Apesar da técnica de IFI apresentar moderada sensibilidade e especificidade, algumas desvantagens tais como a não automatização do

procedimento e a avaliação subjetiva do resultado que afeta a sua reprodutibilidade têm sido apontadas como fatores limitadores para sua utilização em larga escala. Por outro lado, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que são automatizados, possuem vantagens nesse aspecto (Rosati et al. 2003).

Considerando as vantagens do método de ELISA e tendo em vista que o teste de ELISA disponível atualmente nos Lacens é produzido com antígeno de *L. major*, que poderia ser inadequado por se tratar de espécie de *Leishmania* diferente da espécie associada com a LVC no Brasil, torna-se necessária a realização de um estudo de validação para comparar a acurácia e a reprodutibilidade da metodologia de ELISA utilizando antígeno homólogo preparado com *L. infantum*. Assim como, um estudo de validação de uma estratégia de combinação de testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil.

Portanto, foi desenvolvido um estudo de validação em amostras de soro obtidas de uma amostra representativa de cães de várias regiões do país, utilizando um padrão de referência de diagnóstico apropriado para definir se existe vantagem na possível mudança da composição antigênica do kit de ELISA produzido com antígeno de *L. major* por um antígeno de *L. infantum*, assim como, validar as estratégias de testagem sorológicas combinadas dos testes diagnósticos utilizados no Brasil até 2012.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a acurácia e a reprodutibilidade de dois testes imunoenzimáticos – ELISA produzidos por Bio-Manguinhos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Avaliar a acurácia da combinação de testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

### 3.2 Objetivos específicos

- i. Estimar a sensibilidade, especificidade, área sob a curva ROC (AUC), valores preditivo positivo e preditivo negativo dos testes imunoenzimáticos preparados com antígenos de *Leishmania major* ou *Leishmania infantum*;
- ii. Comparar a acurácia dos testes imunoenzimáticos com a acurácia da reação de imunofluorescência indireta com antígeno de *Leishmania major*, em um laboratório de referência;
- iii. Avaliar a confiabilidade/reprodutibilidade dos resultados dos testes em laboratórios com distintos níveis de complexidade;
- iv. Estimar a acurácia dos testes de ELISA e IFI aplicados em combinação sequencial ou de forma paralela;
- v. Avaliar o desempenho do uso combinado para cenários hipotéticos de prevalências variáveis de infecção canina observadas no cenário brasileiro.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de validação de testes diagnósticos com três componentes:

- i. Validação da acurácia das técnicas de ELISA com antígenos de *L. major* e *L. infantum* para o diagnóstico de LVC, tendo como padrão de referência uma combinação de testes parasitológicos;
- ii. Avaliação da confiabilidade entre laboratórios, por meio da estimativa de coeficientes de correlação intraclasse.
- iii. Validação de uma estratégia combinada de testagem sorológica utilizando-se um teste de ELISA e a Imunofluorescência Indireta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil.

Para esse trabalho foram utilizados 1600 soros caninos coletados em um estudo multicêntrico realizado entre os anos de 2008 e 2010 em quatro cidades endêmicas para leishmaniose visceral: Bauru, no Estado de São Paulo, Brasília no Distrito Federal, Palmas, no Estado do Tocantins e Fortaleza, no Estado do Ceará, das Regiões Sudeste, Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil respectivamente. De cada município trabalhado foram escolhidos três bairros com prevalências da LVC igual ou superior a 10%. Os animais foram selecionados sem avaliação clínica ou diagnóstico laboratorial prévio. A inclusão dos cães foi por meio de amostragem sistemática das casas onde residiam por rua trabalhada em cada um dos bairros selecionados. A partir da primeira casa os domicílios foram selecionados alternadamente até completar a amostra de 400 cães em cada uma das quatro cidades.

A validação da acurácia dos testes individuais e de forma combinada foi realizada nos meses de março e abril de 2010, no Laboratório de

Referência Nacional, pertencente a Fundação Ezequiel Dias localizado na cidade de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais.

Para a avaliação da confiabilidade dos testes, realizada no mesmo período, além do Laboratório de Referência Nacional, foram incluídos, um Laboratório de Referência Estadual, representado pelo Instituto Adolfo Lutz da cidade de São Paulo –SP (IAL-SP) e um Laboratório de Referência Municipal, representado pelo laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Campo Grande no estado de Mato Grosso do Sul (CCZ-CG).

A avaliação em cada um dos laboratórios participantes foi realizada de maneira mascarada, sendo que os avaliadores ignoravam o resultado dos exames que constituíram o padrão de referência e os resultados dos exames realizados nos outros laboratórios.

#### **4.2. O padrão de referência**

De cada animal selecionado foram coletadas amostras de soro, pele íntegra e de lesão cutânea quando presente. Nas amostras cutâneas foi realizada pesquisa parasitológica pelas técnicas de visualização direta de parasitos em cortes histopatológicos corados com hematoxilina-eosina e teste imunohistoquímico segundo Figueiredo et al. (2010). Também foi realizada a cultura celular para o isolamento do parasito em meio de cultura segundo Madeira et al. (2009). As amostras foram enviadas e processadas no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ-RJ) referência nacional no diagnóstico parasitológico das Leishmanioses.

As técnicas citadas constituíram o padrão de referência, sendo considerado um caso positivo para a infecção por *L. infantum* o animal que apresentasse positividade em pelo menos um dos testes descritos acima e um caso negativo quando todas as técnicas apresentaram resultado

negativo.

### **4.3. Testes avaliados**

Foram validados dois testes de ELISA e um teste de IFI como parâmetro de comparação:

- ELISA com antígeno bruto de promastigota de *Leishmania major*-like produto registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária e utilizado atualmente nos serviços de diagnóstico oficial.
- ELISA com antígeno bruto de promastigota de *Leishmania infantum*, produto piloto, produzido para essa avaliação e não disponível no mercado.
- Teste de imunofluorescência indireta com o kit utilizado na rotina do diagnóstico de LVC com antígeno *L. major*-like.

Todos os conjuntos diagnósticos foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório Bio-Manguinhos /FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

### **4.4. Descrição da metodologia analítica.**

Os soros criopreservados no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ-RJ) foram enviados em gelo seco ao Laboratório de Referência Nacional (FUNED-MG) com identificação codificada. As amostras foram posteriormente descongeladas e separadas em alíquotas de 100µL em tubos tipo *ependorf* que foram então enviadas sob refrigeração em gelo reciclável ao IAL-SP e para o CCZ-CG para a execução dos ensaios.

Os protocolos para a realização das técnicas de ELISA e IFI utilizados nos três laboratórios foram idênticos e se basearam nas recomendações do



fabricante do conjunto diagnóstico (BIO-MANGUINHOS®, Rio de Janeiro, Brasil) (ANEXO 9.2 e 9.3).

A leitura dos testes de ELISA foi realizada com os equipamentos de uso rotineiro dos laboratórios participantes: espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). A IFI foi lida em microscópio de imunofluorescência em câmara escura.

#### **4.4.1 Teste Imunoenzimático - ELISA**

Cinco  $\mu\text{L}$  dos controles fornecidos pelo fabricante e das amostras de soros foram diluídos em 500  $\mu\text{L}$  do diluente de amostra/conjugado (1:100). 100  $\mu\text{L}$  distribuídos em placas e incubados a 37°C por 30 minutos, seguido de 6 lavagens com solução tampão. 100  $\mu\text{L}$  do conjugado diluído e homogeneizado foram adicionados em cada poço e incubados. 100  $\mu\text{L}$  do substrato foram rapidamente distribuídos em todos os orifícios e incubado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. A reação foi bloqueada adicionando 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. A leitura e estabelecimento das densidades óticas de cada soro testado foi realizada em espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). A densidade ótica de cada soro foi utilizada para a construção da curva ROC (*receiver operating characteristic*).

O *cut-off* foi de duas vezes a média da densidade ótica dos controles negativos presentes na placa, conforme recomendação do fabricante (ANEXO 9.2). Amostras que apresentaram densidade ótica com valores entre o valor obtido do *cut-off* e um valor correspondente 1,2 vezes o *cut-off* foram consideradas indeterminadas e retestadas. Aquelas que mantiveram o *status* “indeterminado” foram incluídas entre os soros negativos, já que para animais nessa condição não se recomenda a eutanásia e uma nova amostra

de soro deve ser coletada 30 dias após o primeiro resultado.

Para padronização das densidades óticas (DO) das amostras, dividiram-se as densidades óticas (DO) obtidas pela amostra pelo seu respectivo *cut-off*. O produto dessa divisão foi denominado de índice da densidade ótica (IDO), que foi utilizado para a avaliação de confiabilidade entre laboratórios.

#### **4.4.2 Teste de imunofluorescência indireta**

O teste de imunofluorescência indireta foi realizado seguindo as indicações do fabricante conforme descrito no manual de utilização do teste (ANEXO 9.3), considerando como positivos as amostras com titulação igual ou maior que 1:40, conforme é preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) no Brasil.

#### **4.5. Análise estatística**

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram organizados em planilhas Excel e analisados no programa SPSS 16 para Windows. Foram estimadas as seguintes medidas: sensibilidade, especificidade, curva ROC, valores preditivos positivo e negativo e coeficientes de correlação intraclasse como medida de confiabilidade. Os coeficientes de correlação intraclasse (CCI) foram calculados a partir do modelo *Two-way Random* para concordância perfeita. Foram estimados os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Foi realizada a análise de sensibilidade para a estimativa de valores preditivos segundo diferentes estimativas de prevalência tendo como referência a prevalência estimada em outros estudos (Coutinho et al. 1985; Paranhos-Silva et al. 1996; Bernadina et al. 1997; Ashford et al. 1998; Moura et al. 1999; Franca-Silva et al. 2003; Silva et al. 2005; Mestre e Fontes 2007;

Queiroz et al. 2009). Assim como a análise do uso dos testes de forma combinada, tanto em paralelo como em série estimando o comportamento em diferentes prevalências.

#### **4.6. Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA / FIOCRUZ sob o protocolo L-38/08, para a construção do painel nacional e validação de testes de diagnóstico para LVC (ANEXO 9.1).

### **5. RESULTADOS**

Das 1600 amostras de soro enviados aos laboratórios participantes, 150 foram excluídos das análises, pois apresentavam resultados parasitológicos inconclusivos. Também foram excluídas 25 amostras cujo material foi insuficiente para a realização de todos os testes em todos os laboratórios (Figura 6).

Foram incluídos na validação 1425 amostras de soro, dos quais, 98 (6,9%) foram classificados como positivos pelo padrão de referência, e 1327 (93,1%) amostras de soro de animais que foram considerados negativos pelo padrão de referência.

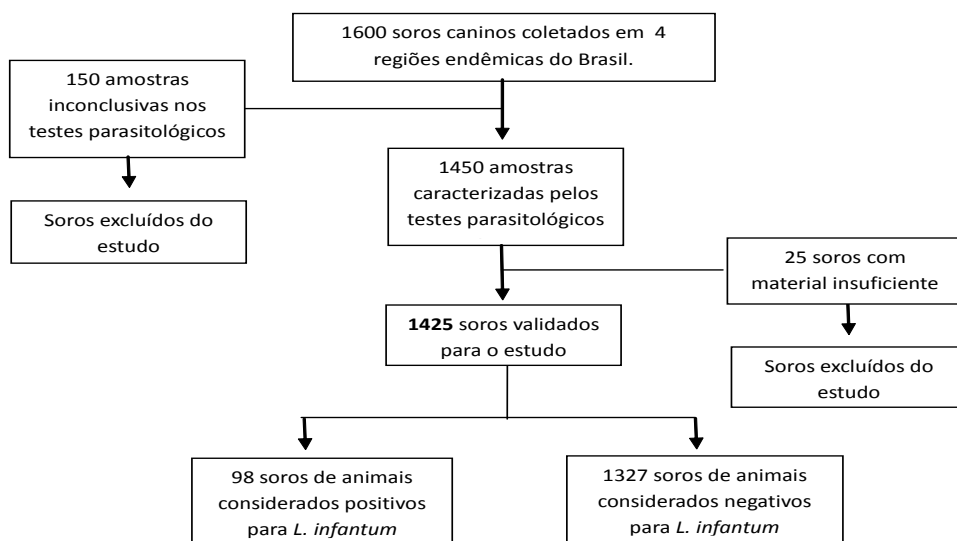


Figura 5 – Algoritmo de inclusão e exclusão das amostras de soro canino para a validação dos testes de ELISA com antígeno de *Leishmania major*, ELISA com antígenos de *Leishmania infantum* e *Imunofluorescência Indireta* com antígenos de *L. major*.

Conforme a metodologia escolhida pelo autor segue a apresentação dos resultados no formato de publicação.

**5.1. Artigo I: publicado na revista PLoS One: De Arruda MM, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JC, de Oliveira MR, et al. (2013) Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS One; 8: e69988.**

**VALIDADE E CONFIABILIDADE DOS TESTES IMUNOENZIMÁTICOS COM ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA MAJOR* E *LEISHMANIA INFANTUM* PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL**

Mauro Maciel de Arruda<sup>1</sup>, Fabiano Borges Figueiredo<sup>2</sup>, Fernanda Alvarenga Cardoso<sup>3</sup>, Roberto Mitsuyoshi Hiamamoto<sup>4</sup>, Júlia Cristina Macksoud Brazuna<sup>5</sup>, Maria Regina Fernandes de Oliveira<sup>1</sup>, Gustavo Adolfo Sierra Romero<sup>1</sup>, Elza Ferreira Noronha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília-DF; <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ <sup>3</sup> Fundação Ezequiel Dias-FUNED, Belo Horizonte-MG <sup>4</sup> Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP <sup>5</sup> Centro de Controle de Zoonoses do Município

de Campo Grande, Campo Grande-MS.

**CORRESPONDÊNCIA:** M. Arruda [mauroarruda1@hotmail.com]- Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Caixa Postal 04517, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal., CEP 70904-970. Tel: +55 61 31071843

## Resumo

### Antecedentes

A leishmaniose visceral é uma enfermidade parasitária, provocada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*). A limitada acurácia dos testes empregados para o diagnóstico dos cães pode contribuir com a falta de impacto de uma das medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde brasileiro, a eutanásia de cães sororreagentes para leishmaniose. O objetivo deste trabalho é estimar a acurácia e a confiabilidade de dois testes de ELISA que utilizam antígenos de *L.(L.) major* ou de *L.(L.) infantum* em laboratórios de diferentes níveis de complexidade.

### Método

Foi utilizado um painel de 1.425 amostras de soros caninos, coletados em estudo multicêntrico. As amostras foram analisadas por meio de técnicas de visualização direta de parasitos, por estudo histopatológico corado com hematoxilina-eosina, pela técnica de imunohistoquímica e pelo isolamento do parasito em cultura. Estas técnicas constituíram o padrão-ouro, sendo um caso positivo para a infecção por *L. infantum* o animal que apresentasse positividade em pelo menos um dos testes.

### Resultados

A sensibilidade do exame com o antígeno de *L. major* foi de 90,8% (84,1 – 97,5% IC95%) nos três laboratórios e com antígeno de *L. infantum* de 80,6% (73,0 – 88,2% IC95%) a 89,8% (84,0 – 95,7% IC95%); a especificidade variou de 78,4% (76,7 – 80,2% IC95%) a 84,8% (83,0 – 85,5% IC95%) com *L. major* e de 82,9% (81,1 – 85,0% IC95%) a 87,3 (85,5 – 99,0% IC95%), com *L. infantum*. Os coeficientes de correlação intraclasse médios dos testes com antígenos de *L. major*, variaram entre 0,890 (0,876-0,902 IC95%) e 0,948 (0,942-0,953 IC95%) e com os antígenos de *L. infantum* entre 0,818 (0,792-0,841 IC95%) e 0,879 (0,865-0,8910 IC95%).

### Interpretação

Concluiu-se que a acurácia e a confiabilidade dos dois testes avaliados são semelhantes e portanto, não se justifica a mudança do antígeno no teste de ELISA atualmente constituído

por *L. major* para diagnóstico de leishmaniose visceral canina no Brasil.

*Palavras-chave: Sensibilidade; Especificidade; Confiabilidade; Leishmaniose visceral; Leishmania infantum; Leishmania major; Sorologia*

## Resumo do Autor

A leishmaniose visceral é uma enfermidade parasitária, provocada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*) e tem o cão doméstico como seu principal reservatório urbano. No Brasil a eutanásia dos cães sorreagentes é uma das principais medidas de controle utilizada pelo Ministério da Saúde, porém, o impacto dessa medida não tem demonstrado eficiência. A limitada acurácia dos testes empregados para o diagnóstico dos cães é apontado como uma das principais causas baixa efetividade dessa ação. A utilização de antígenos espécie específica poderia melhorar o desempenho dos testes e consequentemente evitar a permanência de cães falsos negativos no ambiente, assim como, a realização da eutanásia de cães falsos positivos. O objetivo deste trabalho é estimar a acurácia e a confiabilidade de dois testes de ELISA que utilizam antígenos de *L.(L.) major* ou de *L.(L.) infantum* em laboratórios de diferentes níveis de complexidade, e assim contribuir com indicativos concretos, da necessidade de alteração dos antígenos atualmente empregados no Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral do Brasil. Concluiu-se que a acurácia e a confiabilidade dos dois testes avaliados são semelhantes e portanto, não se justifica a mudança do antígeno no teste de ELISA atualmente constituído por *L. major* para diagnóstico de leishmaniose visceral canina no Brasil.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade parasitária grave que atinge o sistema mononuclear fagocitário do homem e dos animais. O agente responsável pela infecção no Brasil é *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*) (1,2). O parasito é transmitido principalmente pela picada de fêmeas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (2,3,4). No Brasil, a LV é endêmica e apresenta um processo de urbanização desde 1980, com focos em diversas cidades nas cinco regiões político-administrativas do país (6). A prevalência de cães infectados vivendo em áreas endêmicas no país varia de 1% a 67% (3,6)

Uma das medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde brasileiro é a eutanásia de cães sorreagentes para leishmaniose tendo como



objetivo a interrupção do ciclo de transmissão (7). Apesar de ser empregada desde a década de 1950, essa medida ainda é polêmica e controversa, principalmente por não ter demonstrado, até o momento, efetividade consistente na redução da incidência da doença (8,9). Um dos fatores que poderia estar relacionado com a falta de impacto dessa medida de controle seria a limitada acurácia dos testes empregados para o diagnóstico dos cães (10). Como método diagnóstico para LV canina o programa brasileiro utiliza duas técnicas sorológicas: ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assays* - ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI). Os kits de diagnóstico são distribuídos para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN), em todo o país e para os laboratórios credenciados que realizam os exames em áreas de transmissão de LV. O Ministério da Saúde recomenda a triagem pelo método de ELISA e a confirmação pela IFI (7).

Uma das desvantagens dos testes sorológicos é a possibilidade de resultados falsos positivos, devido às reações cruzadas provocadas pela infecções causadas por outros membros da família Trypanosomatidae tais com *Trypanosoma cruzi* e *T. caninum* visto que existem epítomos comuns que têm impacto na especificidade dos ensaios (11,12,13). Testes específicos são mais importantes para descartar o diagnóstico em casos clínicos suspeitos, por outro lado, testes sensíveis são fundamentais para programas de vigilância ou para testar cães importados de regiões endêmicas e identificar animais portadores sadios (14).

Conforme Kar (1995) e Boarino (2008), a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnósticos sorológicos dependem do tipo e da purificação do antígeno utilizado (15,16). Os testes atualmente disponibilizados à rede pública de laboratórios no Brasil são produzidos pelo laboratório Biomanguinhos® da Fundação Oswaldo Cruz, do Ministério da Saúde e utilizam como antígeno a *L. major*. Entretanto, há uma crescente discussão técnica e acadêmica sobre a possibilidade de melhorar a acurácia do teste por meio da utilização de antígeno espécie-específico de *L. infantum*, o que poderia resultar em maior eficiência na remoção de cães sororreagentes e conseqüentemente no impacto do programa de controle.

Assim, o objetivo deste trabalho é estimar a validade e a confiabilidade (entre

laboratórios) de dois testes de ELISA que utilizam antígenos de *L. major* ou de *L. infantum*.

## **MÉTODOS**

Foi realizado um estudo de validação de técnicas de ELISA com antígenos de *L. major* e *L. infantum* para o diagnóstico de LVC, tendo como padrão-ouro os testes parasitológicos; e um estudo de confiabilidade entre laboratórios, por meio da estimativa de coeficientes de correlação intraclasse (CCI).

Foram utilizadas amostras de soro canino e amostras de pele ou lesão previamente coletadas de 1.600 cães, entre os anos de 2008 e 2010, em um estudo multicêntrico realizado em quatro cidades endêmicas para leishmaniose visceral canina (LVC): Bauru, no Estado de São Paulo, Brasília no Distrito Federal, Palmas, no Estado do Tocantins e Fortaleza, no Estado do Ceará, das Regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, respectivamente. De cada município trabalhado foram escolhidos três bairros com prevalências da LVC igual ou superior a 10%. Os animais foram selecionados sem avaliação clínica ou diagnóstico laboratorial prévio. A inclusão dos cães foi por meio de aleatorização sistemática das casas por rua trabalhada em cada um dos bairros selecionados. A partir da primeira casa os domicílios foram selecionados alternadamente até completar a amostra de 400 cães em cada uma das quatro cidades.

As amostras cutâneas foram utilizadas para pesquisa parasitológica pelas técnicas de visualização direta de parasitos em cortes histopatológicos corados com hematoxilina-eosina, para teste imunohistoquímico segundo Figueiredo e al. (17), e para o isolamento do parasito em meio de cultura segundo Madeira et al. (18). As amostras foram processadas no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ-RJ) referência nacional no diagnóstico parasitológico das Leishmanioses. As técnicas citadas constituíram o padrão-ouro, sendo considerado um caso positivo para a infecção por *L. infantum* o animal que apresentasse positividade em pelo menos um dos testes descritos acima.

Foram validados dois testes de ELISA produzidos por Bio-Manguinhos: ELISA com antígenos brutos de *Leishmania major*, produto registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA e utilizado atualmente nos serviços de diagnóstico oficial e o ELISA com antígeno brutos de *Leishmania infantum*, produto piloto, produzido pelo mesmo fabricante para essa avaliação e não disponível no mercado.

A validação da acurácia dos testes foi realizada nos meses de março e abril de 2010, pelo Laboratório de Referência Nacional pertencente a Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. No mesmo período, foi realizada a avaliação da confiabilidade dos testes, em três laboratórios de complexidades distintas que executam a rotina do diagnóstico da LVC: a) Laboratório de Referência Nacional(FUNED-MG), b) Laboratório de Referência Estadual no Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP) e c) Laboratório de Referência Municipal no Centro de Controle de Zoonoses do município de Campo Grande - MS (CCZ-CG). A validação da acurácia e avaliação da confiabilidade foram realizadas de maneira mascarada, sendo que os avaliadores ignoravam o resultado dos exames que constituíram o padrão-ouro. Os soros foram criopreservados no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ-RJ) e enviados em gelo seco ao Laboratório de Referência Nacional (FUNED-MG) com identificação codificada. As amostras foram posteriormente descongeladas e separadas em alíquotas de 100µL em tubos tipo *ependorf* que foram então enviadas sob refrigeração em gelo reciclável ao IAL-SP e para o CCZ-CG para a execução dos ensaios.

Os protocolos para a realização das técnicas de ELISA utilizados nos três laboratórios foram idênticos e se basearam nas recomendações do fabricante do conjunto diagnóstico (BIO-MANGUINHOS<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil). A leitura e estabelecimento das densidades óticas foi realizada com os equipamentos de uso rotineiro dos laboratórios participantes: espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). O cálculo do *cut-off* foi de duas vezes a média da densidade ótica dos controles negativos presentes na placa, conforme recomendação do fabricante. Amostras que apresentaram densidade ótica com valores entre o valor obtido do

*cut-off* e um valor correspondente 1,2 vezes o valor do *cut-off* foram consideradas indeterminadas e retestadas. Aquelas que mantiveram o *status* “indeterminado” foram incluídas entre os soros negativos. Para padronização das densidades óticas (DO) das amostras, dividiu-se as densidades óticas (DO) obtidas pela amostra pelo seu respectivo *cut-off*. O produto dessa divisão foi denominado de índice da densidade ótica (IDO), que foi utilizado para a avaliação de confiabilidade entre laboratórios, por meio do cálculo dos coeficientes de correlação intraclasse (CCI).

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram organizados em planilhas Excel e analisados no programa SPSS 16 para Windows. Foram estimadas as seguintes medidas: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo, valores preditivos negativos, área abaixo da curva ROC (AUC) e coeficientes de correlação intraclasse como medida de confiabilidade. Os coeficientes de correlação intraclasse foram calculados a partir do modelo *Two-way Random* para absoluta concordância. Foram estimados os respectivos intervalos de 95% de confiança. Foi ainda realizada análise de sensibilidade para a estimativa de valores preditivos segundo diferentes estimativas de prevalência tendo como referência a prevalência estimada em outros estudos (19,20,21,22,23,24,25).

## **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto foi desenvolvido após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (CEUA – FIOCRUZ), sob a licença L-38/08. Todos os proprietários de cães que participaram da do experimento deram permissão para a inclusão e assinaram o termo de livre consentimento.

## **RESULTADOS**

Das 1.600 amostras de soro enviadas aos laboratórios participantes, 150 foram excluídas das análises, pois apresentavam resultados parasitológicos inconclusivos pelas técnicas utilizadas como padrão-ouro no IPEC/FIOCRUZ e 25 amostras foram excluídas pela insuficiência de material para a realização de todos

os testes sorológicos em todos os laboratórios. Assim, foram incluídos no estudo as amostras de soro de 1.425 cães, dos quais, 98 (6,9%) foram classificados como positivos e 1.327 (93,1%) como negativos, pelo padrão-ouro.

Os resultados da acurácia do teste de ELISA com antígenos de *L. major* e *L. infantum* em cada laboratório estão demonstrados na Tabela 1. A sensibilidade foi de 91,84% a 97,589,80 IC95%) a 91,7% (85,1 a 98,4 IC95%) entre os três laboratórios e com antígeno de *L. infantum* variou de 80,6% (73,0 a 88,2 IC95%) a 89,8% (84,0 a 95,7 IC95%); e a especificidade 7 variou de 83,57 a 82,59 para *L. major* e *L. infantum* respectivamente. A figura 1 apresenta os resultados da análise de sensibilidade para o cálculo dos valores preditivos positivos e negativos baseados na variação de soroprevalência entre 1 a 65%.

A área sob a curva ROC foi de 0,920 e 0,898 para *L. major* e *L. infantum* respectivamente (Figura 2).

Os coeficientes de correlação intraclasses médios dos testes com antígenos de *L. major*, variaram entre 0,890 e 0,948 e com os antígenos de *L. infantum* entre 0,818 e 0,879 (Tabela 2).

## **DISCUSSÃO**

A relação entre os casos humanos de LV e a prevalência da enzootia canina tem levado a múltiplos esforços para reduzir os riscos de transmissão. Um importante pilar do Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (PNCLV) do Ministério da Saúde do Brasil é a vigilância de reservatórios por meio da identificação e eutanásia dos cães infectados. A busca por testes diagnósticos acurados que possam satisfazer os anseios, tanto da saúde pública como dos proprietários de cães residentes em áreas endêmicas, quanto à confiança em um diagnóstico válido, é o grande desafio dos pesquisadores.

A avaliação da soroprevalência canina em áreas endêmicas pode gerar muitas dúvidas dependendo da sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados, que tem sido variáveis entre diversos estudos de validação Estas

variações poderiam estar relacionadas principalmente às diferenças entre a população de referência e as estratégias de amostragem que têm sido utilizadas para o processo de validação, assim como, pelas características técnicas do teste, competência do laboratório, o padrão-ouro escolhido e o ponto de corte para a interpretação (26). Entretanto, fatores biológicos podem afetar a acurácia dos testes sorológicos. A sensibilidade pode variar com o estágio da infecção ou o estado imunológico do hospedeiro, assim como menor especificidade pode ser explicada por reações cruzadas com outros agentes ou quando esta propriedade é estimada em cães que realmente estão infectados porém não são adequadamente detectados pelo padrão-ouro (26). Testes diagnósticos baseados em antígenos recombinantes mais específicos estão sendo desenvolvidos, porém a baixa sensibilidade dificultam o seu uso como ferramenta de primeira escolha para inquéritos epidemiológicos e programas de controle.

A partir desses princípios, o presente estudo avaliou a acurácia e a reprodutibilidade do ELISA BIO-MANGUINHOS® com antígenos de *L. major* e antígeno de *L. infantum* frente a um painel de amostras de soros caninos que abrangeu o largo espectro da infecção por *Leishmania*, desde animais assintomáticos para aqueles seriamente enfermos, que pela sua composição representa a realidade da LV canina no Brasil. Destaca-se que o método aleatório na seleção dos cães contribuiu para a redução do viés de seleção que costuma afetar os estudos de validação onde há uma representação desequilibrada a favor dos cães sintomáticos. Destaca-se, ainda, neste estudo, o rigor técnico e a abrangência dos métodos que compuseram o padrão-ouro. Entretanto, nosso padrão de referência pode falhar na detecção de cães assintomáticos que apresentam poucos parasitas nos tecidos, produzindo erros de classificação e subestimando os reais valores da especificidade dos testes avaliados.

Na comparando da sensibilidade entre os dois antígenos o desempenho foi semelhante. Barbosa-De-Deus et al.(27) obtiveram melhores resultados da sensibilidade (98%) e especificidade (95%), com um teste de ELISA utilizando antígeno obtido de promastigotas de *L. major*-like em amostras de 1741 animais (1582 negativas e 159 positivas). Similar resultados com sensibilidade de 97% e especificidade de 98% foi descrito por Scalone et al. (28) para amostras de 415

animais (157 positivos e 258 negativas) utilizando antígeno recombinante rK39. Carvalho et al. (29) observou 100% de sensibilidade e especificidade utilizando um ELISA *in house* com antígenos de *L. infantum* em amostras de 125 animais (110 positivas e 15 negativas). O fato da utilização de outro teste sorológico como padrão de referência pode ser uma desvantagem já que os testes avaliados estariam detectando o mesmo fenômeno de elevação de anticorpos detectado pelo padrão-ouro e, portanto, teriam maior probabilidade de concordância, superestimando os valores de sensibilidade e especificidade.

Achados de Oliveira et al.(30) testando técnica de ELISA com antígeno de *L. infantum/chagasi* foram de 90% e 100% para a sensibilidade e especificidade, respectivamente. Foram testadas 101 amostras, das quais, 30 de cães com diagnóstico parasitológico comprovado e 71 negativas (41). Para o cálculo da sensibilidade os pesquisadores utilizaram somente o soro de cães com diagnóstico parasitológico confirmado e para a especificidade somente os soros considerados negativos, o que melhora artificialmente a acurácia dos testes. Rosário et al (31) compararam os testes de ELISA com antígenos brutos de *L. amazonensis* e *L. chagasi/infantum* e antígenos recombinantes rK39 e rK26. Seus resultados em soro foram de: sensibilidade de 100% (95,6 a 100 IC95%) para *L. amazonensis*, 98% (92,7 a 99,7 IC95%) para *L. chagasi/infantum*, 98,1% (92,7 a 99,7 IC95%) para o antígeno rK39, e 99,1% (94,1 a 100 IC95%) para o antígeno rk26. A especificidade foi 100% (83,4 a 100 IC95%) para *L. amazonensis*, 100% (83,4 a 99,7 IC95%) para *L. chagasi/infantum*, 100% (83,4 a 100 IC95%) para o antígeno rK39 e 96% (77,7 a 99,8%) para o antígeno rk26. O número de amostras testadas foi de 131 (106 positivas e 25 negativas). Lira & Cavalcanti (32) trabalharam com o teste de ELISA com antígeno *L. major-like* (Bio-Manguinhos®) utilizado na rotina do programa brasileiro em uma amostra de 41 animais (25 positivos e 16 negativos) e obtiveram resultados de 72% (50,4-87,1) de sensibilidade e 87,5% (60,4-97,8%) de especificidade (40). Além da imprecisão das estimativas neste estudo, os autores utilizaram como controles negativos animais de áreas indenes e isso pode ter influenciado favoravelmente os resultados da especificidade. Pinheiro et al. (32) compararam os testes de ELISA utilizando o antígeno recombinante cisteína proteinase (rLdccys1) e os antígenos com lisados de amastigotas e de promastigotas de *L. chagasi*, os resultados obtidos para a sensibilidade foram de 98% (rLdccys1), 89% (amastigotas) e 86% (promastigotas) e de 96%, 69% e 68%

para a especificidade, respectivamente. Da mesma forma que Oliveira et al. (30) os pesquisadores utilizaram para calcular a sensibilidade somente em soros de cães com diagnóstico parasitológico confirmado (209 animais) e para a especificidade somente os soros de 68 animais considerados negativos, incluindo entre eles 46 soros de cães com outras enfermidades. No entanto, as amostras de cães foram amostras de conveniência sujeitas a viés de seleção.

Em relação aos valores preditivos apresentados na Tabela 1, observamos que o valor preditivo negativo apresenta-se elevado, (99,28 e 99,09), indicando a ótima sensibilidade dos testes. Por outro lado, o valor preditivo positivo com antígeno de *L. major* foi de 29,61% e com antígenos *chagasi* de 27,85% o que representa uma grande preocupação, pois em cenários de prevalência de infecção semelhantes à da amostra estudada de 6,9% seriam eliminados pelo menos 3 cães com resultado falso positivo por cada cão realmente infectado. Neste sentido, vale lembrar que o padrão-ouro utilizado, embora composto, na tentativa de aprimorar a capacidade de detecção da infecção, provavelmente continua sendo imperfeito, deixando de identificar alguns animais verdadeiramente infectados, o que causa impacto sobre o desempenho da especificidade e do VPP.

Como observamos na Figura 1 o valor preditivo dos testes está estreitamente vinculado a prevalência da enfermidade. Como já mencionamos anteriormente a prevalência da LV canina é muito variável e as decisões tomadas pelos profissionais de saúde devem levar em conta os valores preditivos esperados usando os testes sorológico para o controle. Sobre esse respeito testes sensíveis são fundamentais para os programas de vigilância e controle da leishmaniose, desde que eles possibilitem que o maior número de animais verdadeiramente infectados sejam retirados do ambiente. Por outro lado, testes específicos são mais importantes para confirmação de casos clínicos suspeitos, sendo mais importantes para médicos veterinários dedicados ao cuidado individual (14). Barbosa-De-Deus et al. (27) estudaram uma amostra de conveniência importante de cães com LV, e com uma prevalência de 9,13% (159/1741) obtiveram bons resultados nos valores preditivos (100% no VPN e 66% no VPP), porém, o padrão-ouro empregado foi outro teste sorológico (IFI) deve ser levado em consideração para esses resultados, incorrendo no viés de seleção anteriormente mencionado.



Em nosso estudo os índices de concordância intraclasses indicam que os testes possuem uma concordância quase que perfeitas (>0,81) entre laboratórios de diferentes níveis de complexidade. Esse resultado é muito relevante, pois a reprodutibilidade adequada é essencial para evitar a eutanásia desnecessária de cães e otimizam os custos laboratoriais. Considerando que a acurácia dos testes utilizando antígenos de *L. infantum* ou *L. major* não apresentam diferenças significativas não foram encontradas evidências que sustentem a necessidade de mudar a composição antigênica do ensaio imunoenzimático disponível no Brasil para o diagnóstico da LV canina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schonian G, Mauricio I, Cupillillo E (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitology. 26:466-469.
2. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Aug;101(5):577-9.
- 3, Deane MP (1962) Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 4: 198-212.
4. Rangel EF, ML V (2008). *Lutzomyia longipalpes* (Diptera, Pychodidae, Phebotominae) and urbanization of visceral leishmaniosis in Brasil. Cadernos de Saúde Pública. 24:2948-2952.
5. Cerbino NJ, Werneck GL, Costa CH. (2009). Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: na ecological study in Tresina, Piauí state, Brasil. Cadernos de Saúde Pública. 25:1543-1551.
6. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, CH C (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends in Parasitology 27: 403-409.
7. Ministério da Saúde (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília.
8. Romero, GA, and Boelaert M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Neglected Tropical Diseases 4(1): e584.
9. Costa CH. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral

leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44:232-242.

10. Silva AV, Paula AA, Cabrera MA, Carreira JC (2005) Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cadernos de Saúde Pública* 21: 324-328.

11. . Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H (2009) *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 164: 118-123.

12. Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA (2009) Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27 29: 150-152

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

14. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5515-5519.

15.. . Kar K (1995) Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology* 21: 123-152.

16 . Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, et al. (2008) Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31: 527-38 536.

17. . Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, et al. (2010) Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal* 186: 123-124.

18. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, et al. (2009) Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? . *Research in Veterinary Science* 87: 260-262.

19. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MC, Tramontano N (1985) A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 17-22.

20. Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, et al. (1996) A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania*

*chagasi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55: 39-44. .

21. Bernadina WE, De Luna R, Oliva G, Ciaramella P (1997) An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology 73: 207-213.

22. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, et al. (1998) Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 59: 53-57.

23. . Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Rodrigues e Silva R (1999) Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil / Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban area of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 36: 101-102.

24. Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, et al. (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Veterinary Parasitology 111: 161-173.

25. Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, et al. (2009) Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. Research in Veterinary Science 86: 267-273

26. Greiner M, Gardner IA (2000) Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Preventive Veterinary Medicine 45: 3-22.

27. Barbosa-De-Deus R, Dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, et al. (2002) *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology 9: 1361-1366.

28.. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, et al. (2002) Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary Parasitology 104: 275-285.

29. Carvalho D, Oliveira TMFS, Baldani CD, Machado RZ (2009) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. Pesquisa Veterinária Brasileira 29: 120-124.

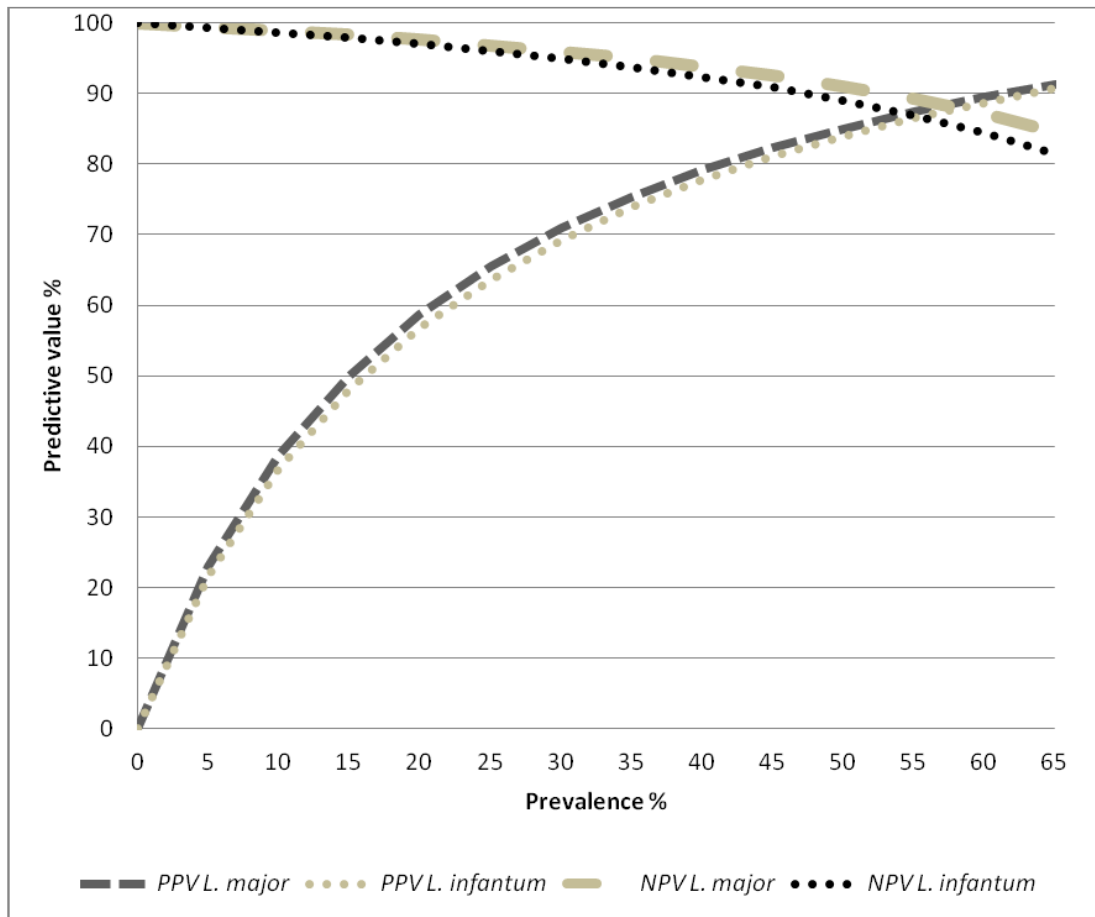
30. Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, et al. (2005) A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ciência Animal Brasileira 6: 16 41-47.

31 Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, et al. (2006) Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-

Manguinhos and the IFI- leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology* 137: 11-16.

32 Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JH, Costa FA, Katz S, et al. (2009) A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 162: 32-39.

**Figura 1.**



**Figura 1.** Análise de sensibilidade dos valores preditivos positivo e negativo dos testes de ELISA com antígenos de *Leishmania major* ou *Leishmania infantum* Bio-Manguinhos® segundo as variações da prevalência de leishmaniose visceral canina tendo como referência os valores de sensibilidade e especificidade obtidos no laboratório de referência nacional FUNED-MG, Brasil, 2011.

**Tabela 1** – Resultados da validação da acurácia dos testes de ELISA com antígenos de *Leishmania major* ou *Leishmania infantum* (Bio-Manguinhos®) em amostras de soros de cães de regiões endêmicas para leishmaniose visceral no Brasil, realizadas pelo Laboratório de Referência Nacional – Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais (FUNED – MG), 2011.

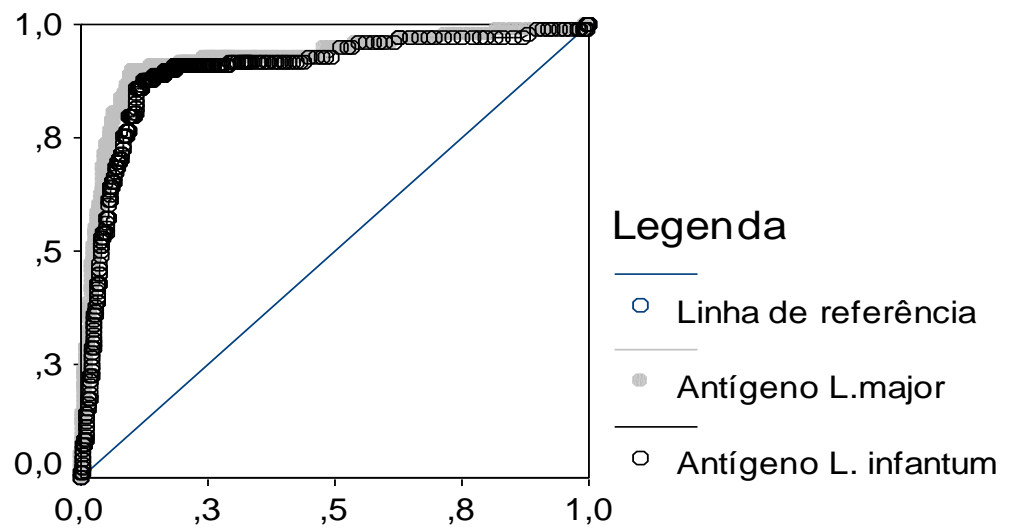
<b>Medidas</b>	<b>ELISA (<i>Leishmania major</i>)</b>	<b>ELISA (<i>Leishmania infantum</i>)</b>
<b>Sensibilidade %</b>	<b>91,84</b>	<b>89,80</b>
IC95%	(86,42 – 97,26)	(83,80 - 95,79)
<b>Especificidade %</b>	<b>83,75</b>	<b>82,69</b>
IC95%	(81,76 - 85,74)	(80,64 - 84,73)
<b>VPP<sup>a</sup> %</b>	<b>29,61</b>	<b>27,85</b>
IC95%	(24,47 – 34,74)	(22,91 – 32,79)
<b>VPN<sup>b</sup> %</b>	<b>99,28</b>	<b>99,09</b>
IC95%	(98,78 - 99,78)	(98,53 – 99,65)

<sup>a</sup> Valor preditivo positivo

<sup>b</sup> Valor preditivo negativo

Figura 2.

## ROC Curve



1 - Especificidade

Testes	Área sob a curva			IC95%	
	Área	Erro Padrão	Significância	Limite inferior	Limite superior
<i>L. infantum</i>	0,898	0,019	0,000	0,861	0,936
<i>L. major</i>	0,920	0,018	0,000	0,885	0,954

**Tabela 2** – Coeficientes de correlação intraclasse médios dos testes de ELISA com antígenos de *Leishmania major* ou *Leishmania infantum* Bio-Manguinhos®, entre laboratórios, em amostras de soros de cães de regiões endêmicas para leishmaniose visceral no Brasil, 2011.

Laboratórios	IDO <sup>a</sup> - <i>L. major</i>	IDO - <i>L. infantum</i>
	CCI <sup>b</sup>	CCI
<b>CCZ-CG<sup>c</sup> x IAL-SP<sup>d</sup></b>	<b>0,904</b>	<b>0,818</b>
IC95%	0,884 - 0,919	0,791 - 0,841
<b>IAL-SP x FUNED-MG<sup>e</sup></b>	<b>0,948</b>	<b>0,879</b>
IC95%	0,942 - 0,953	0,865 - 0,891
<b>CCZ-CG x FUNED-MG</b>	<b>0,890</b>	<b>0,875</b>
IC95%	0,876 - 0,902	0,834 - 0,903

<sup>a</sup> IDO – Índice de densidade ótica

<sup>b</sup> CCI – Coeficiente de correlação intraclasse

<sup>c</sup> CCZ-CG - Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande

<sup>d</sup> IAL-SP - Instituto Adolfo Lutz

<sup>e</sup> FUNED-MG - Fundação Ezequiel Dias



## 5.2. Artigo II.

### VALIDAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA COMBINADA DE TESTAGEM SOROLÓGICA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL

Mauro Maciel de Arruda<sup>1</sup>, Fabiano Borges Figueiredo<sup>2</sup>, Andreza Pain Marcelino<sup>3</sup>,  
José Ronaldo Barbosa<sup>3</sup>, Guilherme Loureiro Werneck<sup>4</sup>, Elza Ferreira Noronha<sup>1</sup>,  
Gustavo Adolfo Sierra Romero<sup>1, 5, 6</sup>.

*<sup>1</sup>Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília; <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias-FUNED. Minas Gerais, Brazil, <sup>4</sup>Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil <sup>5</sup>National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/CNPq), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. <sup>6</sup>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, Manaus, Amazonas, Brazil*

**CORRESPONDÊNCIA: M. Arruda [mauroarruda1@hotmail.com]- Rua Ernesto Goss 105, apto. 21  
– 88506-160 – Lages – SC. Tel. 49 3222 2862**

## Resumo

Leishmaniose visceral é uma enfermidade parasitária grave causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*). No Brasil, a LV é endêmica e apresenta um processo de urbanização desde 1980, constituindo um grave problema de saúde pública. Os cães domésticos são incriminados como os principais reservatórios da *L. infantum*. Uma das medidas de controle utilizada no Brasil para a interrupção do ciclo de transmissão é a eutanásia de cães sororretores para leishmaniose. Na identificação de cães infectados os testes sorológicos são ferramentas de eleição. Como método diagnóstico para LV canina o programa brasileiro recomendava a utilização da combinação de duas técnicas sorológicas: ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assays* - ELISA) (triagem) e imunofluorescência indireta (IFI)(confirmatório). O objetivo deste trabalho é estimar a acurácia dos testes de ELISA e IFI aplicados em combinação sequencial ou de forma paralela, analisando os valores preditivos positivos destas abordagens em prevalências variáveis de infecção canina. No desempenho individual, observou-se uma boa sensibilidade dos testes, 91,8% para ELISA e 90,8% para a IFI. A especificidade do ELISA foi de 83,4% e da IFI foi de 53,4%. Utilizados de forma combinada em paralelo o desempenho da sensibilidade global subiu para 99,2%, porém a especificidade reduziu para 44,8%. Na utilização dos testes em série (ELISA seguido de IFI) observou-se uma diminuição na sensibilidade (83,3%) e melhora na especificidade (92,5%). A combinação destes testes diagnósticos, particularmente quando utilizados em série, melhorou a especificidade da abordagem diagnóstica, sem perda substancial da sensibilidade. A combinação em série destes testes pode satisfazer os anseios, tanto da saúde pública como dos proprietários de cães residentes em áreas endêmicas, por uma abordagem diagnóstica mais acurada da leishmaniose visceral canina.

*Palavras-chave: Validação de testes; Confiabilidade; Leishmaniose visceral;*

*Leishmania infantum; Sorologia; Cães.*

## **INTRODUÇÃO**

A leishmaniose visceral no continente americano é uma enfermidade parasitária grave causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) (1-3). A Organização Mundial de Saúde (OMS) inclui as leishmanioses entre as principais doenças tropicais negligenciadas, definidas como doenças em expansão e para as quais não se dispõe de instrumentos de controle adequados (4). A transmissão nas Américas se dá principalmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* (5-6), *Lutzomyia cruzi* (7) e *Lutzomyia evansi* (8;9).

No Brasil, a LV é endêmica e apresenta um processo de urbanização desde 1980, constituindo um grave problema de saúde pública, devido a sua ampla distribuição no país e dispersão para regiões consideradas indenes (10-12), bem como pela gravidade das suas formas de apresentação clínica que podem levar o indivíduo à morte na ausência de tratamento adequado e oportuno. Há registros de casos humanos em 21 das 27 Unidades Federativas, com média anual de 3.156 casos nos últimos dez anos e incidência aproximada de 2 casos por 100.000 habitantes (13).

O estreito relacionamento entre humanos e cães domésticos, o acentuado parasitismo cutâneo nos cães, a comprovada capacidade de cães infectados de infectar flebotomíneos e a ocorrência da enzootia canina precedendo os casos humanos, sugerem que o cão doméstico seja o principal reservatório da *L. infantum* em meio urbano (14). Estudos reforçam esta conclusão, ao apontarem associação consistente entre a prevalência de seropositividade canina e o risco de desenvolvimento da doença humana (15). Nesse sentido a OMS recomenda que antes de iniciar as atividades de controle deve-se prestar especial atenção ao estudo de distribuição e frequência da enfermidade nos cães, através inquéritos sorológicos (16).

O Programa de Vigilância e Controle da LV no Brasil tem como principal objetivo a redução do número de casos e de óbitos humanos por meio do diagnóstico e do tratamento oportuno dos casos humanos e do controle vetorial e do reservatório urbano. No Brasil uma das medidas de controle voltada para o reservatório urbano é a eutanásia de cães soropositivos para leishmaniose tendo como objetivo a

redução da transmissão para os humanos. A Organização Mundial de Saúde considera a triagem sorológica e a eutanásia dos cães soropositivos como uma medida para o controle da LV, porém, aponta falhas na efetividade dessa ação, como o período prolongado entre o diagnóstico e a eutanásia, a cobertura parcial das populações caninas nos inquéritos, a imediata reposição dos animais eutanasiados por cães mais jovens e susceptíveis à infecção e problemas com a acurácia dos testes empregados para o diagnóstico sorológico (16). A eutanásia de cães infectados tem sido motivo de ampla polêmica (16), no entanto, há consenso quanto à necessidade de aprimorar os testes sorológicos para conseguir estimar de forma mais acurada a magnitude da infecção na população canina e a sua evolução ao longo do tempo, principalmente quando essa população é alvo de intervenções para o controle da transmissão (18).

Como método diagnóstico para LV canina o programa brasileiro recomendou até 2012 a utilização da combinação de duas técnicas sorológicas: ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assays* - ELISA) como método de triagem e imunofluorescência indireta (IFI), como exame confirmatório da infecção. Ambos os testes utilizam antígenos brutos purificados de *L. major* produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz/RJ (19). No entanto, a estratégia do uso combinado de testes para o diagnóstico da LV canina nunca foi submetida a um estudo de validação abrangente, utilizando uma amostra grande de cães oriundos de áreas endêmicas.

O objetivo deste trabalho é estimar a acurácia dos testes de ELISA e IFI aplicados em combinação sequencial ou de forma paralela e avaliar os valores preditivos positivos destas abordagens em situações de prevalências variáveis de infecção canina observadas no cenário brasileiro.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Para este estudo foi utilizado um painel de soros coletado de 1.600 cães, entre os anos de 2008 e 2010, em um estudo multicêntrico realizado em quatro cidades endêmicas com prevalência prévia estimada de ~10% para leishmaniose visceral canina (LVC), como relatado anteriormente (19). Os animais foram selecionados sem avaliação clínica ou diagnóstico laboratorial

prévio. A inclusão dos cães foi por meio de amostragem sistemática das casas por rua trabalhada em cada um dos bairros selecionados. A partir da primeira casa os domicílios foram selecionadas alternadamente até completar a amostra de 400 cães em cada uma das quatro cidades. De todos os animais selecionados foram coletadas amostras de soro, pele íntegra e de lesão, quando presente.

Nas amostras cutâneas foi realizada pesquisa parasitológica pelas técnicas de visualização direta de parasitos em cortes histopatológicos corados com hematoxilina-eosina, para teste imunohistoquímico e para o isolamento do parasito em meio de cultura no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ-RJ). As técnicas citadas constituíram o padrão de referência, sendo considerado um caso positivo para a infecção por *L. infantum* o animal que apresentasse positividade em pelo menos um dos testes descritos acima.

Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório de Referência Nacional para Leishmaniose Visceral da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte – Minas Gerais, nos meses de março e abril de 2010 de maneira mascarada, os avaliadores desconheciam o resultado dos exames que constituíram o padrão de referência.

Os protocolos para a realização das técnicas de ELISA e IFI seguiram as recomendações do fabricante dos conjuntos diagnósticos (BIO-MANGUINHOS®, Rio de Janeiro, Brasil). A leitura foi realizada com os equipamentos de uso rotineiro dos laboratórios participantes: espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm) para os testes de ELISA e de microscópio de imunofluorescência para a IFI. O *cut-off* utilizado para o teste de ELISA foi de duas vezes a média da densidade ótica dos controles negativos presentes na placa, conforme recomendação do fabricante. Amostras que apresentaram densidade ótica com valores entre o valor obtido do *cut-off* e um valor correspondente 1,2 vezes o valor do *cut-off* foram consideradas indeterminadas e retestadas. Aquelas que

mantiveram o *status* “indeterminado” foram incluídas entre os soros negativos, já que para animais nessa condição não se recomenda a eutanásia e uma nova amostra de soro deve ser coletada 30 dias após o primeiro resultado. O ponto de corte da IFI utilizado foi de  $>1:40$ , recomendado pelo fabricante e a leitura foi realizada por dois avaliadores de forma independente.

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram organizados em planilhas Excel e analisados no programa SPSS 16 para Windows. Foram estimadas as medidas de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos testes individualmente e combinados com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

## **RESULTADOS**

Das 1.600 amostras de soro enviadas aos laboratórios participantes, 150 foram excluídas das análises pois apresentavam resultados parasitológicos inconclusivos pelas técnicas utilizadas como padrão de referência e 25 amostras foram excluídas pela insuficiência de material para a realização de todos os testes. Assim, foram incluídas no estudo as amostras de soro de 1.425 cães, dos quais, 98 (6,9%) foram classificados como positivos e 1.327 (93,1%) como negativos, pelo padrão de referência. No desempenho individual, o estudo demonstrou sensibilidade de 91,8% para o ELISA e 90,8% para a IFI. A especificidade do ELISA foi de 83,9% e da IFI foi de 53,4%. Quando utilizados de forma combinada de forma paralela a sensibilidade aumentou para 99,2%, porém, a especificidade diminuiu para 44,8%. Na utilização dos testes em série (ELISA seguido de IFI) observou-se uma diminuição da sensibilidade para 83,3% e aumento na especificidade para 92,5% (Tabela 1).

A análise para os cenários com prevalências menores de 10% revelou que o VPP torna-se crítico nestas situações, podendo-se prever a classificação de um ou mais cães não infectados como sendo soropositivo para cada cão infectado classificado corretamente (Figura 1).

## **DISCUSSÃO**

A prevalência de cães infectados vivendo em áreas endêmicas no Brasil apresenta ampla variação de 1% a 67% (21-25). O controle do reservatório canino por meio de inquéritos sorológicos para a identificação de cães infectados e a sua posterior eutanásia tem sido desenvolvido dentro de um cenário considerado inadequado, dentre outros aspectos, pelas limitações dos métodos de diagnóstico (26). A avaliação da soroprevalência canina em áreas endêmicas pode gerar muitas dúvidas dependendo da sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados, que tem demonstrado acurácia variável entre diversos estudos de validação (27). Estas variações poderiam estar relacionadas principalmente com as características específicas da população de cães alvo da avaliação e as estratégias de amostragem que têm sido utilizadas para o processo de validação. Outras fontes de variação tem origem nas características técnicas do teste, na proficiência do laboratório, no padrão de referência escolhido para a comparação e no ponto de corte utilizado para a interpretação dos resultados. Fatores biológicos também podem afetar a acurácia dos testes sorológicos, sendo que a sensibilidade pode variar de acordo com o estágio da infecção ou o estado imunológico do hospedeiro, assim como a redução da especificidade pode ser explicada por reações cruzadas com outros agentes infecciosos ou quando esta propriedade é estimada em cães que realmente estão infectados, porém, não são adequadamente detectados pelo padrão de referência (28).

A utilização de testes muito sensíveis, que detectem o maior número possível de animais infectados e evitem a manutenção desses no ambiente seria o mais recomendável para as ações de saúde pública que pretendem reduzir a intensidade de transmissão da infecção. Por outro lado, as associações de defesa dos animais, clínicos veterinários e proprietários buscam a segurança de que somente aqueles animais verdadeiramente positivos sejam encaminhados para eutanásia e para isso, testes mais específicos são desejáveis. O grande desafio é satisfazer essa crescente necessidade de testes altamente sensíveis e específicos. Testes diagnósticos utilizados de forma combinada podem melhorar a acurácia do

diagnóstico e poderiam satisfazer as necessidades relativas às intervenções em saúde pública como dos proprietários de cães residentes em áreas endêmicas.

O presente estudo avaliou a acurácia individual e combinada dos testes ELISA e IFI (BIO-MANGUINHOS®, Rio de Janeiro, Brasil) utilizados na rotina laboratorial das ações de vigilância e controle da LV no Brasil. Os resultados aqui apresentados são consistentes com os resultados obtidos por Lira e colaboradores (2006) que apontam uma melhora significativa na sensibilidade dos testes de 72,0% (ELISA) e 68,0% (IFI) para 92,0% com queda do desempenho da especificidade de 87,5% em ambos os testes para 75%, quando utilizados de forma paralela. Ainda no estudo de Lira e colaboradores (2006), na combinação sequencial houve ganho na especificidade (100%) e redução da sensibilidade para 48%. Esses autores recomendam o uso dos testes em paralelo, para áreas de alta prevalência, reduzindo o número de animais infectados que poderiam permanecer no ambiente, por outro lado, para áreas de baixa prevalência a utilização dos testes em série se mostraria mais adequado (29). Nossos resultados, simulados para diversas prevalências reforçam o sentido das recomendações desses autores.

Levando em conta a prevalência real da infecção no painel de amostras utilizadas no presente trabalho, a estratégia de aplicação dos testes em série utilizado no Brasil seria o mais adequado à realidade. O uso combinado, apesar da perda de sensibilidade, permite um aprimoramento do valor preditivo positivo, diminuindo as consequências indesejáveis da eutanásia de cães que realmente não estão infectados.

A recente modelagem matemática desenvolvida por Costa e colaboradores (2013) revela que a sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos aplicados para o controle da LV canina seriam determinantes do sucesso ou insucesso da estratégia de eliminação de cães soropositivos. Nesse modelo, em cenários com força de transmissão baixa e moderada, a eliminação de cães baseada no resultado de um teste com sensibilidade de 90% e



especificidade de 80% aplicado na população canina sintomática e assintomática teria impacto significativo na transmissão no longo prazo. O estudo também sugere que para se manter uma estratégia de triagem e eliminação de unicamente cães sintomáticos com o mesmo impacto no longo prazo, seria necessário que a sensibilidade do teste fosse no mínimo de 90% e que a estratégia isolada de eliminação canina não seria suficiente para ter impacto em cenários com elevada força de transmissão (26). O presente estudo demonstrou que é possível o aprimoramento da acurácia diagnóstica por meio do uso combinado dos testes de forma sequencial, atingindo sensibilidade e especificidade que de acordo com a modelagem matemática descrita acima seriam adequadas para a intervenção de eliminação canina em cenários com força de transmissão baixa e moderada. No entanto, quando é levado em consideração o valor preditivo positivo da combinação de testes no cenário da prevalência real encontrada no estudo, seria diagnosticado e eliminado um cão sem a infecção por cada cão infectado corretamente diagnosticado e eliminado. Sendo assim, os dados aqui apresentados são de extrema relevância para dar suporte as previsões obtidas por meio dos estudos de modelagem matemática com parâmetros válidos de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados. Uma limitação da abordagem baseada nos dois testes estudados é o problema operacional relativo à demora para a retirada dos cães infectados que só os testes rápidos aplicados diretamente no campo seriam capazes de resolver, no entanto, a acurácia demonstrada pelos testes rápidos ainda está aquém do necessário para poder aplicá-los de maneira isolada para o diagnóstico da LV canina (30). Em conclusão, os resultados demonstram que é possível o aprimoramento da acurácia diagnóstica por meio do uso da estratégia de combinação de testes e que no presente cenário de controle da LV canina no Brasil, a acurácia dos dois testes utilizados sequencialmente alcançou sensibilidade e especificidade suficientes para o controle da LV canina em cenários com força de transmissão baixa ou moderada.

## **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.**

O projeto foi desenvolvido após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (CEUA – FIOCRUZ), sob a licença L-38/08.

## **SUPORTE FINANCEIRO.**

O estudo foi financiado parcialmente pelo Ministério da Saúde do Brasil, O Instituto de Pesquisas Evandro Chagas, FIOCRUZ-RJ e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a toda equipe de profissionais do Laboratório de Referência Nacional em Leishmaniose da Fundação Ezequiel Dias pelo auxílio no processamento das amostras.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitol 2010 Oct;26(10):466-9.
2. Leblois R, Kuhls K, Francois O, Schonian G, Wirth T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. Infect Genet Evol 2011 Jul;11(5):1091-5.
3. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Aug;101(5):577-9.
4. WHO (2010a) First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.
5. Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz Dec;100(8): 811-827.
6. Soares RP, Turco SJ (2003) *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. An Acad Bras Cienc 75: 301-330.
7. Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES (2011) [Evidence of

transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 76-78.

8. Travi BL, Velez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, et al. (1990) *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 676-677.

9. Feliciangeli MD, Rodriguez N, De Guglielmo Z, Rodriguez A (1999) The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite* 6: 113-120.

10. Carranza-Tamayo CO, Carvalho Mdo S, Bredt A, Bofil MI, Rodrigues RM, et al. (2010) Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 396-399.

11. Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, et al. (2009) Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 570-580.

12. Tonini MA, Lemos EM, Reis AB, Vital WC, Dias ES, et al. (2012) First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 754-756.

13. BRASIL (2012b) LEISHMANIOSE VISCERAL - SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA. In: SVS, editor: Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561) Acessado em 23/05/2012.

14. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simoes TC, Nascimento BW, et al. (2013) Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2182.

15. WHO (2010b) Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva.

16. Costa CH (2011) How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 232-242.

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

18. BRASIL (2012a) Leishmaniose visceral : recomendações clínicas para redução

da letalidade. In: Saúde Md, editor. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31941](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941)) Acessado em 21/05/2012

19. De Arruda MM, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JC, de Oliveira MR, et al. (2013) Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* ;8: e69988.

20. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MC, Tramontano N (1985) A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 17-22.

21. Nunes MP, Jackson JM, Carvalho RW, Furtado NJ, Coutinho SG (1991) Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in areas at risk for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adopted. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 411-417.

22. Franca-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, et al. (2005) Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 131: 213-220.

23. Monteiro EM, da Silva JC, da Costa RT, Costa DC, Barata RA, et al. (2005) [Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152.

24. Mestre GL, Fontes CJ (2007) [The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998-2005]. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 42-48.

25. Costa DN, Codeco CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(8):e2355.

26. Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, et al. (2007) Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 14: 544-548.

27. Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary

diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000 May 30;45(1-2):3-22.

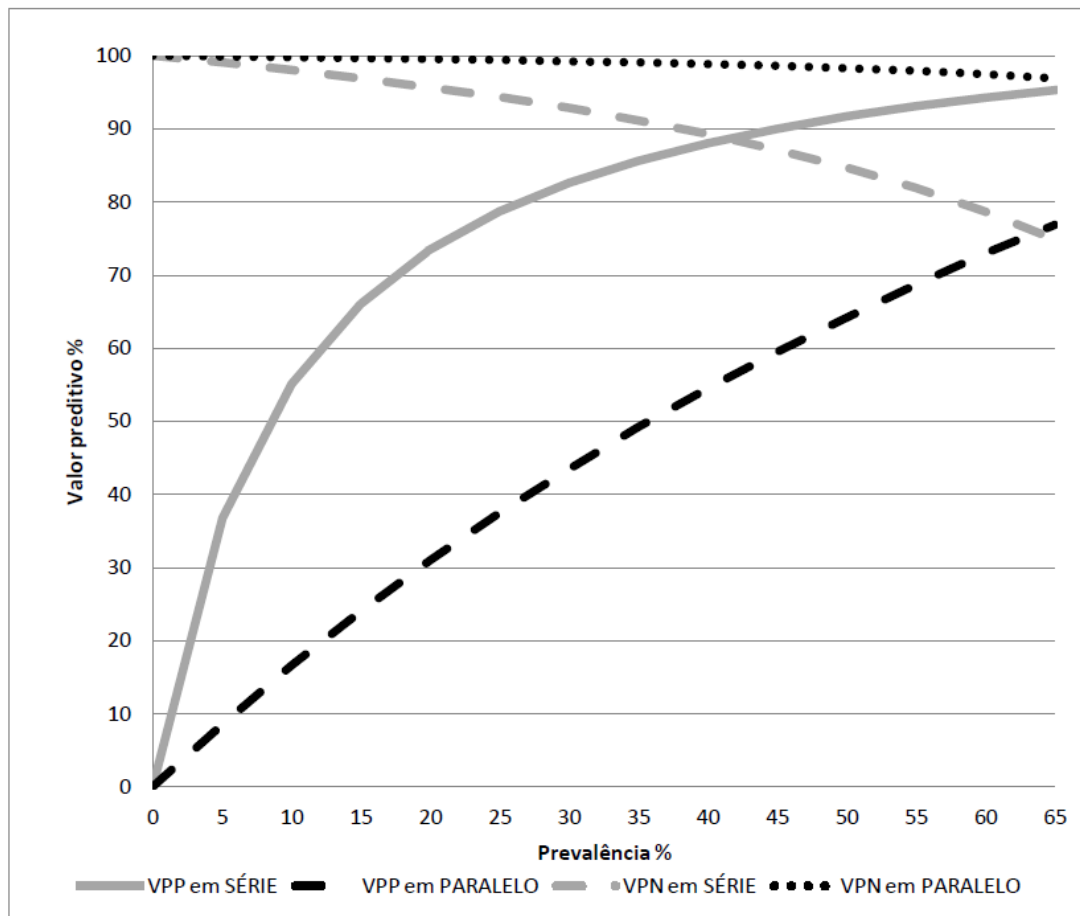
28. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, et al. (2006) Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 137: 11-16.

29. Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012 Jan;106(1):54-9.

**Tabela 1** – Acurácia dos testes de ELISA e IFI de forma individual e combinada seqüencialmente ou em paralelo, em amostras de soros de cães de regiões endêmicas para leishmaniose visceral no Brasil, 2011.

<b>Acurácia</b>	<b>ELISA</b>	<b>IFI</b>	<b>Testes combinados em seqüência (ELISA seguido de IFI)</b>	<b>Testes combinados em paralelo</b>
<b>Sensibilidade - %</b>	<b>91,8</b>	<b>90,8</b>	<b>83,3</b>	<b>99,2</b>
IC95%	(86,3 a 97,3)	(84,2 a 97,5)	(75,6 a 91,0)	(88,8 a 109,6)
<b>Especificidade - %</b>	<b>83,9</b>	<b>53,4</b>	<b>92,5</b>	<b>44,8</b>
IC95%	(81,9 a 85,8)	(51,6 a 55,1)	(87,1 a 97,9)	(43,0 a 46,5)
<b>VPP - %</b>	<b>29,5</b>	<b>12,6</b>	<b>44,9</b>	<b>11,7</b>
IC95%	(24,3 a 34,5)	(7,1 a 18,1)	(34,4 a 55,1)	(5,0 a 18,1)
<b>VPN - %</b>	<b>91,1</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>99,8</b>
IC95%	(98,7 a 99,9)	(98,2 a 99,3)	(96,4 a 100)	(98,9 a 100)

**Figura 1.** Valores preditivos positivo e negativo dos testes de ELISA e IFI (Bio-Manguinhos®) combinados sequencialmente ou em paralelo segundo níveis de prevalência de leishmaniose visceral canina.



## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A importância do reservatório canino no ciclo de transmissão da LV é consenso entre os estudiosos do tema. A ocorrência da infecção nos cães usualmente precede ao aparecimento na população humana, sendo esses animais excelentes sentinelas para a detecção precoce da presença do agente etiológico no meio, possibilitado que ações de vigilância, monitoramento e controle sejam implementadas (Belo et al 2013; Belo et al 2013<sup>a</sup>).

Para o controle da enfermidade humana tradicionalmente tem sido aplicadas medidas voltadas para o reservatório canino, notavelmente, a eliminação de cães sororreagentes, embora seja reconhecido o fato de que para se ter impacto na transmissão seria necessária a eliminação de uma parcela significativa dos cães infectados de forma sustentada (Dye 1996; Costa et al 2013). Uma das medidas preconizadas pelo programa brasileiro de controle é a eutanásia de cães soropositivos identificados em inquéritos censitários ou amostrais. Essa medida, em especial, gera muitos conflitos entre os proprietários de cães, os clínicos veterinários e as autoridades sanitárias responsáveis pelo trabalho de prevenção e controle da LV. O desenvolvimento de testes de diagnóstico que propiciem a segurança de encaminhar para a eutanásia apenas os animais realmente infectados certamente minimizaria esses conflitos. Assim, estudos que possam contribuir para o melhoramento da acurácia, reprodutibilidade dos métodos de uso dos testes de diagnóstico tornam-se relevantes para toda a sociedade. Por outro lado, intervenções menos radicais como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas também exigem um diagnóstico acurado da infecção canina, principalmente para poder avaliar adequadamente o impacto da intervenção (Ferroglio et al 2008).



O estabelecimento de um padrão-ouro de referência para o diagnóstico da LV não é uma tarefa simples. A detecção do parasito em amostras teciduais nos exames parasitológicos apresenta especificidade de quase 100%, porém a sensibilidade é afetada pelo grau de parasitismo. Os testes moleculares podem se tornar uma ferramenta importante no estabelecimento de um padrão-ouro de referência, porém carecem de padronização das técnicas, dos alvos de amplificação e dos iniciadores da reação, assim como da melhor definição das amostras de fácil obtenção e manuseio para tornar viável a sua implantação em um programa de controle da abrangência do programa brasileiro. Da mesma forma os métodos imunohistoquímicos carecem de padronizações para serem utilizados em larga escala. A dificuldade no estabelecimento de um padrão-ouro no diagnóstico da LV é sem dúvida o grande desafio das pesquisas de validação de testes de diagnóstico.

Algumas estratégias tem sido desenvolvidas para superar a imperfeição do padrão de referência para a validação de testes diagnósticos. Mais recentemente, a análise de classes latentes tem sido aplicada ao cenário de diagnóstico da leishmaniose visceral humana com resultados que demonstram a utilidade da sua aplicação (Machado de Assis et al 2012) e uma abordagem semelhante poderia ser aplicada no cenário da leishmaniose visceral canina.

Outro ponto a ser destacado é o custo financeiro para a aquisição de equipamentos, insumos e mão de obra especializada que tornam as técnicas parasitológicas, moleculares e imunohistoquímicas inviáveis para uso em larga escala. Assim, os métodos sorológicos baseados na detecção de anticorpos, pela facilidade na obtenção de amostras e na execução das técnicas, tornaram-se os mais utilizados no país,

porém esses testes devem ser interpretados com cautela, uma vez que não apresentam acurácia muito elevada.

Além das dificuldades com os exames de certeza, a validação de testes sorológicos para o diagnóstico da LVC enfrenta os desafios inerentes à implementação dos estudos de validação em condições metodológicas adequadas. Isto exige a testagem consecutiva de um grande número de cães para acumular suficiente número de amostras de indivíduos realmente infectados, principalmente nos cenários onde existe uma baixa prevalência da infecção.

A combinação de testes melhora o desempenho individual destes, porém a escolha do uso em série ou em paralelo deve levar em conta a prevalência da enfermidade na área em estudo e os desafios operacionais para a implantação da estratégia diagnóstica escolhida. O programa brasileiro de controle da LV recomendava a utilização dos testes diagnóstico canino combinados em série, iniciando com o teste de Elisa seguido pelo teste de IFI, até 2013. Nesse ano, a recomendação foi alterada para o uso em série de um teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem ao nível de campo e o teste imunoenzimático no laboratório como teste confirmatório. Estudo recente de Coura-Vital e colaboradores (2014) chama a atenção para o uso sequencial do teste imunoenzimático e do teste imunocromatográfico rápido e demonstra que a inversão da sequência atualmente recomendada traria vantagens na acurácia do uso combinado. Certamente, as considerações a respeito da viabilidade operacional das duas estratégias discutidas acima determinarão finalmente o seu uso na prática. A decisão do uso combinado em série poderia funcionar melhor para as situações de baixa prevalência da infecção, caso da

maioria dos municípios brasileiros, porém em áreas de alta prevalência, onde seria preciso intervir mais intensamente para a retirada do maior número de cães infectados possível, a melhor decisão poderia ser o uso paralelo dos testes, que aumentaria a sensibilidade da estratégia. Portanto, dependendo do objetivo específico da intervenção de retirar cães infectados poderia haver estratégias diferenciadas para áreas estratificadas pela prevalência da infecção. A LVC apresenta-se com grandes variações na prevalência de um local para outro, assim, a análise dos valores preditivos de testes diagnósticos deve ser tomada com cautela, pois esses valores estão diretamente relacionados à prevalência da enfermidade, quanto menor a prevalência menor é o VPP e maior é o VPN, em alta prevalência a situação é inversa.

A indicação de mudanças do antígeno atualmente em uso no teste imunoenzimático utilizado nos laboratórios públicos brasileiros baseava-se na assertiva de que antígenos homólogos deveriam apresentar melhor desempenho do que antígenos heterólogos. Nesse sentido, o presente trabalho demonstrou que nem sempre um antígeno homólogo apresenta vantagens frente a um antígeno heterólogo, principalmente quando se trata de antígenos brutos preparados com espécies do parasito relativamente próximas. O resultado é altamente relevante, considerando que, caso o antígeno homólogo constituído por *L. infantum* tivesse apresentado melhor desempenho, haveria necessidade de implementar a mudança no teste fornecido atualmente à rede de diagnóstico, podendo acarretar descontinuidade no fornecimento de insumos, até a estabilização do novo processo de produção com o antígeno de *L. infantum* para suprir a enorme demanda brasileira. A síntese dos resultados aqui publicada em formato de artigos foi elaborada seguindo as recomendações do STARD cujos critérios aparecem descritos no (ANEXO 9.4) (Bossuyt et. al. 2003).

Finalmente, os resultados apresentados preenchem uma lacuna no conhecimento sobre a validade e a reprodutibilidade de um teste imunoenzimático largamente utilizado no Brasil para o diagnóstico da LVC e oferece informação relevante para os tomadores de decisão em relação a sua aplicação dentro do programa de controle. Espera-se que a qualidade do delineamento metodológico e da análise aplicada aos resultados sirva de modelo para futuras pesquisas, principalmente nos aspectos relativos à estratégia de amostragem e inclusão no estudo que efetivamente evitou a seleção prévia dos cães infectados e não infectados baseada em resultados de outros testes sorológicos. Este aspecto será crucial para garantir o desenvolvimento dos novos testes que superem a acurácia moderada observada nos dois testes estudados.

## 7. CONCLUSÕES

- O ensaio imunoenzimático e o teste de imunofluorescência indireta avaliados apresentam acurácia moderada, que demonstra a necessidade de maior aprimoramento;
- A acurácia dos testes imunoenzimáticos com antígenos de *L. infantum* e *L. major* não apresenta diferenças significativas, portanto, não se recomenda a mudança do antígeno atualmente utilizado de *L. major* por um antígeno homólogo de *L. infantum* nos testes produzidos por Biomanguinhos para o Programa de Controle da Leishmaniose visceral canina no Brasil.
- A reprodutibilidade dos ensaios imunoenzimáticos entre unidades de diferentes níveis de complexidade dentro da rede de laboratórios que realizam o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina no Brasil é elevada.
- A acurácia dos testes utilizados para o diagnóstico da LVC no Brasil pode ser aprimorada pelo uso sequencial do teste de ELISA-*L. major* seguido da Imunofluorescência direta. Porém, a melhoria observada na acurácia ainda está aquém do ideal para o diagnóstico da infecção nos cães, tanto para o manejo individual quanto para a implementação de medidas *de* eliminação com o objetivo de reduzir a transmissão.
- Na utilização dos testes diagnósticos validados no presente estudo, nas condições reais do programa de controle da leishmaniose visceral, é importante levar em consideração o desempenho observado nos valores preditivos em cenários com prevalências variáveis; o que pode auxiliar na melhor decisão de uso, principalmente para a estratégia de utilização combinada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adela, SC, Speybroeck N, Praet N, Victor B, De Deken R, Soukehal A, Berkvens D. (2010). Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Veterinary Parasitology*. **172**(3-4): 204-213.
- Ait-Oudhia, K, Lami, P, Lesceu, S, Harrat, Z, Hamrioui, B, Dedet, JP, Pratlong, F. . (2009). Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **103**(8): 679-692.
- Alvar, J, Vélez, ID, et al. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. . *PLoS ONE* **7**(5): e35671.
- Alvarenga, JSC. (2007). Estudo da variabilidade genética inter e intra-específica de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908). Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: [http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/novembro2011/biologia\\_artigos/9variabilidade\\_genetica.pdf](http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/novembro2011/biologia_artigos/9variabilidade_genetica.pdf). Acessado em 19/06/2012. **Doutorado**.
- Alves, WA, e Bevilacqua PD. (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública* **20**(1): 259-265.
- Andrade, AM, Queiroz, LH, Nunes, GR, Perri, SH, Nunes, CM, (2007). Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **40**(5): 594-595.
- Ashford, DA., David, JR., Freire, M, David, R, Sherlock, I, Eulalio, MC, Sampaio, DP, Badaro, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**(1): 53-57.
- Ashford, RW. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinical Dermatology* **14**(5): 523-532.
- Badaró, R. (1987). Current situation in regard to leishmaniasis in Brazil. *Research on Control Strategies for the Leishmaniasis*, Ottawa, Canada,
- Baneth, G, e Aroch I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal* **175**(1): 14-15.

- Baneth, G, Dank, G, et al. (1998). Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**(5): 722-725.
- Barbosa-De-Deus, R, Dos Mares-Guia, ML, Nunes, AZ, Costa, KM, Junqueira, RG, Mayrink, W, Genaro, O, Tavares, CA. (2002). *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology* **9**(6): 1361-1366.
- Bari, A. U. (2006). Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* **16**: 24-27.
- Basano, S. A. e L. M. A. Camargo (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **7**(3).
- Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, Struchiner CJ. (2013), Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **7**(4):e2182.
- Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RG, da Silva ES (2013a). A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. **195**(1-2):1-13.
- Bernadina, WE, De Luna, R, Oliva, G, Ciaramella, P, (1997). An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* **73**(3-4): 207-213.
- Berrahal, F, Mary, C, Roze, M, Berenger, A, Escoffier, K, Lamouroux, D, Dunan, S. (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**(3): 273-277.
- Boarino, A, Bollo, E, Prunotto, L, Canale, L, Uslenghi, F, Poletti, P, (2008). Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comparative, Immunology, Microbiology, Infectious Diseases* **31**(6): 527-536.
- Bossuyt, PM, Reitsma, JB, et al. (2003). Towards Complete and Accurate Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy: The STARD Initiative. *Clinical Chemistry* **49**(1): 1-6.
- Braga, MD, Coelho, I. C, Pompeu, MM, Evans, TG, MacAullife, IT, Teixeira, MJ, Lima, JW, (1998). 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **31**(5): 419-424.

- BRASIL (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF, Ministério da Saúde.
- BRASIL (2007). INSTRUÇÃO NORMATIVA INTERMINISTERIAL No- 31 DE 9 DE JULHO DE 2007. Diário Oficial da União. M. d. A. P. e. Abastecimento and M. d. Saúde. Brasília - DF, Imprensa Nacional. **131**: 1.
- BRASIL (2008). PORTARIA INTERMINISTERIAL No- 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008 - Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. M. d. Saúde. Brasília - DF, Imprensa Nacional. **Nº 133**, : 37.
- BRASIL (2009). II FORUM DE DISCUSSÃO SOBRE O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) - RELATÓRIO FINAL. SVS. Brasília-DF, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final30\\_7\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final30_7_10.pdf). Acessado em 24/05/2011.
- BRASIL (2012). LEISHMANIOSE VISCERAL - SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA. SVS, Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561) Acessado em 23/05/2012.
- BRASIL<sup>a</sup> (2009). Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina Registradas no MAPA. SVS. Brasília-DF, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral\\_nota\\_esclarecimento27052009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral_nota_esclarecimento27052009.pdf). Acessado em 26/04/2011.
- Caballero, NNG, (2008). Caracterização biológica, bioquímica e molecular de isolados de *Leishmania spp* de diferentes áreas endêmicas do Paraguai. IOC. Rio de Janeiro-RJ, Instituto Oswaldo Cruz, Disponível em: [http://btdt.cict.fiocruz.br/tesdesimplificado/tde\\_arquivos/1/TDE-2009-01-21T100743Z-121/Retido/NORATH%20N%20G%20CABALLERO%20BCM%202008%20IOC%20093.pdf](http://btdt.cict.fiocruz.br/tesdesimplificado/tde_arquivos/1/TDE-2009-01-21T100743Z-121/Retido/NORATH%20N%20G%20CABALLERO%20BCM%202008%20IOC%20093.pdf) . Acessado em: 18/06/2012. . **Mestrado**: 92-122.
- Candido, TC, Perri, SH, Gerzoschkwitz Tde O, Luvizotto, MC, de Lima, VM, (2008). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* **157**(3-4): 175-181.
- Carvalho, D, Oliveira, TMS, Baldani, CD, Machado, RZ, (2009). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. *Pesquisa. Veterinária Brasileira*. **29** (2): 120-124.



- Cavaliero, T, Arnold, P, Mathis, A, Glaus, T, Hofmann-Lehmann, R, Deplazes, P. (1999). Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **13**(4): 330-334.
- Cerbino NJ, Werneck GL, Costa CH. (2009). Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: na ecological study in Tresina, Piauí state, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 25:1543-1551.
- Cerino, DA, Teodoro, U, Silveira, TG. (2009). Sand flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. *Neotropical Entomology* **38**(6): 853-858.
- Costa, CH, Gomes, RB, et al. (2000). Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *Journal of Infectious Diseases* **182**(3): 997-1000.
- Costa, CH, Stewart, JM, et al. (2002). Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **66**(4): 334-337.
- Costa, CH, Tapety, CM, Werneck, GL. (2007). Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **40**(4): 415-419.
- Costa, JM, Viana, GM, Saldanha, AC, Nascimento, MD, Alvim, AC, Burattini, MN, Silva, AR. (1995). Visceral leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: evolution of an epidemic. *Cadernos de Saúde Pública* **11**(2): 321-324.
- Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira Nd, Oliveira LA, de Menezes Machado EM, Morais MH, Corrêa-Oliveira R, Carneiro M, Reis AB. (2014) Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*. **9**(3):e91009.
- Coutinho, SG, Nunes, MP, Marzochi, MC, Tramontano, N. (1985). A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **80**(1): 17-22.
- Croft, SL, Yardley, V, Kendrick, H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* **19**(1): 111-126.
- Cupolillo, E, Grimaldi, GJr, Momen, H. (1995). Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **89**(1): 17-23.
- Cupolillo, E, Grimaldi, GJr, Momen, H. (1994). A general classification of new world

- Leishmania* using numeral zymotaxonomy. American Journal Tropical Medicine Hygiene **50**: 296-311.
- Costa-Val, AP, Cavalcanti, RR, Gontijo, NF, Michalick MSM, Alexander, B, Williams, P, Melo, MN.. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. The Veterinary Journal **174**(3): 636-643.
- Costa DN, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. (2013) Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases. **7**(8):e2355. Dantas-Torres, F. and S. P. Brandao-Filho (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **48**(3): 151-156.
- Costa CH. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **44**:232-242.
- de Paula, AA, da Silva, AV, Fernandes, O, Jansen, M. (2003). The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. Journal of Parasitology **89**(4): 832-836.
- Deane, L. M. e M. P. Deane (1962). Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **4**: 198-212.
- Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clinical Dermatology **14**(5): 417-423.
- Desjeux, P.<sup>a</sup> (2004). Leishmaniasis. Nature Reviews of Microbiology **2**(9): 692.
- Desjeux, P.<sup>b</sup> (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. **27**(5): 305-318.
- Dietze, R, Barros, GB, Teixeira, L, Harris, J, Michelson, K, Falqueto, A, Corey, R.. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clinical Infectious Diseases **25**(5): 1240-1242.
- Diouani, M. F., N. B. A. Bouafif, et al. (2008). Dogs *L. infantum* infection from an endemic region of the north of Tunisia: a prospective study. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis **85**(1-4): 55-61.
- Dipineto, L, Manna, L, Baiano, A, Gala, M, Fioretti, A, Gravino, AE, Menna, LF. (2007). Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. Journal of Wildlife Diseases **43**(3): 518-520.

- Dye, C. (1996) The logic of visceral leishmaniasis control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**(2):125-30.
- Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. (2008) Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*. **55**(3):145-8.
- Févre, EM, Bronsvoort, BMC, Hamilton KA, Cleaveland S. (2006). Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in Microbiology* **14**(3): 125-131.
- Figueiredo, F. B., I. D. Gremiao, et al. (2008). First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**(2): 200-201.
- Figueiredo, FB, Madeira, MF, et al. (2010). Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Veterinary Journal* **186**(1): 123-124.
- Franca-Silva, JC, Costa, RT, et al. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* **111**(2-3): 161-173.
- Garth, A. (2008). *Analysing data using SPSS (A practical guide for those unfortunate enough to have to actually do it.)*, Sheffield Hallam University: 94.
- Gradoni, L, Pozio, E, Bettini, S, Gramiccia, M. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **74**(3): 421-422.
- Gramiccia, M. and L. Gradoni (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology* **35**(11-12): 1169-1180.
- Greiner, M. and I. A. Gardner (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* **45**: 3-22.
- Guarga, JL, Moreno, J, Lucientes, J, Gracia, MJ, Peribanez, MA, Alvar, J, Castillo, JA. (2000). Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science*. **69**(3): 249-253.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*. **27**(9): 403-409.
- Ikeda-Garcia, F. A., R. S. Lopes, et al. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology* **143**(3-4): 254-259.

- Kar, K. (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. **21**(2): 123-152.
- Koutinas, AF, Saridomichelakis, MN, et al. (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* **98**(4): 247-261.
- Kuhls., K, Alam, MZ, et al. (2011). Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**(6): e1155.
- Lainson, R. and J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. W. Peters and R. Killick-Kendrick. London, Academic Press. 1-120.
- Lainson, R, Shaw, JJ, Lins, ZC, (1969). Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **63**(6): 741-745.
- Lira, R. A., M. P. Cavalcanti, et al. (2006). Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology* **137**(1-2): 11-16.
- Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. (2012) Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Tropical Medicine and International Health*. **17**(10):1202-7.
- Madeira, F, Schubach AO, Schubach, TM, Leal, CA, Marzochi, MC.. (2004). Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **8**(6): 440-444.
- Madeira MF, Figueiredo FB, et al. (2009). Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Research in Veterinary Science*. **87**(2): 260-262.
- Madeira, M. F., M. A. Sousa, et al. (2009). *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* **136**(4): 411-423.
- Mancianti, F, Gramiccia, M, Gradoni, L, Pieri, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**(4): 566-567.

- Mancianti, F, Mignone, W, Galastri, F. (1994). Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *The Journal of Wildlife Diseases* 30(3): 454-456.
- Manna, L., S. Reale, et al. (2006). *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 142(3-4): 271-280.
- Manna, L., Reale, S, et al. <sup>a</sup> (2009). Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science* 87(1): 76-78.
- Manna, L., F. Vitale, et al. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 125(3-4): 251-262.
- Manna, L, Vitale, F, Reale, S, Picillo, E, Neglia, G, Vescio, F, Gravino, AE. <sup>b</sup> (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Journal*. 182(3): 441-445.
- Marcondes M, Biondo AW, Gomes AA, Silva AR, Vieira RF, Camacho AA, Quinn J, Chandrashekar R. (2011). Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs *Veterinary Parasitology*.175(1-2):15-9..
- Marty, P., C. Pomares-Estran, et al. (2009). Actualités sur les leishmanioses en France. *Archives de Pédiatrie* 16: S96-S100.
- Marzochi, M. C. and K. B. Marzochi (1994). Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 10 Suppl 2: 359-375.
- Mauricio, IL., Gaunt, MW, Stothard, JR, Miles, MA. (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 122(Pt 4): 393-403.
- Mauricio, IL, Howard, MK, Stothard, JR, Miles, MA. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119 ( Pt 3): 237-246.
- Mendes, WS, Silva, AA, Trovao JR, Silva, AR, Costa, JM. (2002). Space expansion of the American visceral leishmaniasis in Sao Luis, Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(3): 227-231.
- Mestre, G. L. and C. J. Fontes (2007). The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(1): 42-48.
- Mettler, M, Grimm, F, Capelli, G, Camp, H, Deplazes, P. et al. (2005). Evaluation of enzyme-

- linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(11): 5515-5519.
- Miro, G, Cardoso, L, Pennisi, MG, Oliva, G, Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* **24**(8): 371-377.
- Missawa, NA, Veloso, MA, Maciel, GB, Michalsky, EM, Dias, ES.. (2011). Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **44**(1): 76-78.
- Moreira, EDJr, Mendes de Souza, VM, Sreenivasan, M, Nascimento, EG, Pontes de Carvalho, L. (2004). Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary Parasitology* **122**(4): 245-252.
- Moreno, J. and J. Alvar (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* **18**(9): 399-405.
- Moshfe, A, Mohebbali, M, et al. (2009). Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Tropica* **112**(2): 101-105.
- Moura, ST, Fernandes, CGN, Pandolpho, VC, Rodrigues e Silva, R. (1999). Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil / Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban area of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **36**(2): 101-102.
- Nunes, CM, Lima, VM, Paula, HB, Perri, SH, Andrade, AM, Dias, FE, Burattini, MN. (2008). Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology* **153**(1-2): 19-23.
- Ochsenreither, S, Kuhls, K, Schaar, M, Presber, W, Schonian, G. (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(2): 495-503.
- Oliva, G., L. Gradoni, et al. (1995). Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **36**(6): 1013-1019.
- Oliveira, LS, Julião, FS, Sousa VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJAP, Aguiar PHPA Melo SMBM, Franke CRF . (2005). A utilização da imunofluorescência indireta no Diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira* **6**(1): 41-47.

- OMS (1990). Lucha Contra las Leishmaniasis: Informe de um Comité de Expertos de la OMS. Série de Informes Técnicos **793**.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., W. R. dos Santos, et al. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**(5): 510-517.
- Paranhos-Silva, M, Freitas, LA, Santos, WC, Grimaldi, GJr, Pontes-de-Carvalho, LC, Oliveira-dos-Santos, AJ. (1996). A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**(1): 39-44.
- Paranhos-Silva, M, Nascimento, EG, Melro, MC, Oliveira, GG, dos Santos, WL, Pontes-de-Carvalho, LC, Oliveira-dos-Santos, A J. . (1998). Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Tropica* **69**(1): 75-83.
- Pinheiro, PH, Pinheiro, AN, Ferreira, JH, Costa, FA, Katz, S, Barbieri, C. L. (2009). A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* **162**(1-2): 32-39.
- Porrozi, R, Costa, MVS, et al. (2007). 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. *Clinical and Vaccine Immunology*. **14**(5): 544-548.
- Pratlong, F, Rioux, JA, Marty, P, Faraut-Gambarelli, F, Dereure, J, Lanotte, G, Dedet, JP. (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(9): 4077-4082.
- Queiroz, P. V., G. R. Monteiro, et al. (2009). Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science* **86**(2): 267-273.
- Rangel EF, ML V (2008). *Lutzomyia longipalpes* (Diptera, Pychodidae, Phebotominae) and urbanization of visceral leishmaniosis in Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 24:2948-2952.
- Ribeiro, RR, Moura, EP, et al. (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(7): 2564-2572.
- Riera, C., J. E. Valladares, et al. (1999). Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine

- antimoniate. *Veterinary Parasitology* **84**(1-2): 33-47.
- Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, et al. (2007). A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International Journal of Parasitology* **37**(6): 683-693.
- Romero, GA, and Boelaert M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**(1): e584.
- Rosario, EY, Genaro, O, Franca-Silva, JC, da Costa, RT, Mayrink, W, Reis, AB, .Carneiro, M. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**(2): 197-203.
- Rosati, S, Ortoffi, M, Profiti, M, Mannelli, A, Mignone, W, Bollo, E, Gradoni, L. (2003). Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology* **10**(6): 1153-1156.
- Sanchez-Robert, E, Altet, L, Utzet-Sadurni, M, Giger, U, Sanchez, A, Francino, O.. (2008). Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research* **39**(3): 36.
- Santos, SO, Arias, J, Ribeiro, AA, Hoffmann, MP, Freitas, RA, Malacco, MA. (1998). Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical Veterinary Entomology* **12**(3): 315-317.
- Sarkari, BC. (2005). A capture ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis using a monoclonal antibody against a leishmanial urinary antigen. *Iranian Biomedical Journal* **9**: 117-122.
- Scalone, A., R. De Luna, et al. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitol* **104**(4): 275-285.
- Schonian G, Mauricio I, Cupilillo E (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitology*. 26:466-469.
- Silva, AV, Paula, AA, Cabrera, MA, Carreira, JC.. (2005). Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cadernos de Saúde Pública* **21**(1): 324-328.
- Silveira, FT, Lainson, R, Shaw, JJ, Pova, MM. (1982). Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**(6): 830-832.
- Slappendel, RJ and Ferrer L. (1990). Leishmaniasis. *Clinical microbiology and infectious*



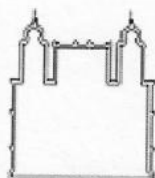
- diseases of the dog and cat. C. E. GREENE. Philadelphia, W.B.Saunders,: 450-458.
- Slappendel, RJ and Teske E. (1997). The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Veterinary Quarterly* **19**(1): 10-13.
- Solano-Gallego, L, Morell, P, Arboix, M, Alberola, J, Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(2): 560-563.
- Souza, AI, Oliveira, TMSF, Machado, RZ, Camacho, AA.. (2009). Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **29**(2): 150-152.
- Sundar, S and Rai M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology* **9**(5): 951-958.
- Tesh, RB. (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**(3): 287-292.
- Tomaz-Soccol, V, Castro, EA, et al. (2009). Allochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Parana, Brazil: epidemiological implications. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **18**(3): 46-51.
- TRD/WHO (2009). TRD - For research on diseases of poverty, TDR RESEARCH PUBLICATION.
- Troncarelli, MZ, Camargo, JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H, (2009). *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* **164**(2-4): 118-123.
- Vexenat, AC, Santana, JM, Teixeira, AR. (1996). Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **38**(3): 177-185.
- Vieira, JB and G. E. Coelho GE. (1998). Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **31 Suppl 2**: 85-92.
- WHO (1990). Control of leishmaniasis. W. H. Organization. Geneva, WHO.
- WHO (2009). TRD - For research on diseases of poverty, TDR RESEARCH PUBLICATION.
- WHO<sup>a</sup> (2010). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/).

WHO<sup>b</sup> (2010). Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Technical Report Series WHO. Geneva. **n.949**.

Zanette, M. F. (2006). Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária. Araçatuba Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. **Mestrado**: 92.

## 9. ANEXOS

### 9.1 – Certificado de licença da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Osvaldo Cruz



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 diagnósticos para LV. "*


número P-454/08, proposto por Fabiano Borges Figueiredo, foi licenciado pelo N° L-038/08.

Sua licença de N° L-038/08 autoriza o uso anual de :

*- 1400 Canis familiaris*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de maio de 2012.

Rio de Janeiro, 24/09/2008

  
Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ

## 9.2 Protocolo da técnica imunoenzimática



LEISHMANIOSE  
**EIE - LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA  
Bio-Manguinhos**  
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

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

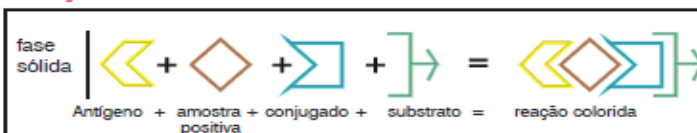
#### **PRINCÍPIO DO TESTE:**

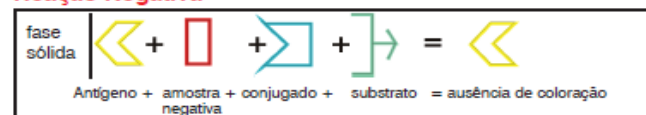
Este ensaio consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura "in vitro", que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras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

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

#### **ESQUEMA DO TESTE:**

##### **Reação Positiva**



**Reação Negativa****MATERIAL FORNECIDO:**

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Diluyente de Amostra/ Conjugado [5X]	2 Fr. 45 mL
R-02	Lecitina de leite	1 saco 10 g
R-03	Tampão de Lavagem [20X]	2 Fr. 60 mL
R-04	Diluyente do Substrato	1 Fr. 60 mL
R-05	Cromógeno (TMB)	1 Fr. 0,7 mL
R-06	Substrato (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1 Fr. 0,2 mL
R-07	Ácido Sulfúrico 2M	1 Fr. 30 mL
R-08	Controle Positivo	1 Fr. 0,25 mL
R-09	Controle Negativo	1 Fr. 0,25 mL
R-10	Conjugado	1 Fr. 0,4 mL
R-11	Molduras c/ 6 strips duplas sensibilizadas Folhas Adesivas Manual de Instruções de Uso	4 molduras 8 folhas

**MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:**

- Água destilada.
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc).
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e pontelras.
- Luvas descartáveis.
- Barquetes.
- Estufa à 37°C.

- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas.
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária.
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm.
- Balança semi-analítica.
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6mm e agitador rotacional

**CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:**

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

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

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

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

**CUIDADOS E PRECAUÇÕES:**

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

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

- as amostras, assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado;
- homogeneizar as amostras e controles antes de usar;

**EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 5**

- utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial em todas as etapas do teste.
- desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas usadas etc. em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- para evitar interferências, nunca tocar com os dedos a parte de cima das strips;
- cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- não usar os reativos após sua data de validade;
- utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação

**PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS DE SORO:**

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

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

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

3 - Distribuir 100 µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o controle positivo, na "C" e "D" o

**6 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos**

controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

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

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

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

5 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

nº strips duplas	nº reações	R-03	H <sub>2</sub> O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº strips duplas	nº placas	R-03	H <sub>2</sub> O dest.
até 3	1/2	20 ml	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

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

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

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

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

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

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

11 - Preparo do substrato:

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

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

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

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

#### LEITURA:

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

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

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

CO = Cut-Off

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

**Obs.:** o operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado

(SS) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

### RESULTADOS

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

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

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

**Obs. 2:** mantendo-se as Amostras na “faixa cinza”, após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como indeterminado.

CO		
AMOSTRAS NAO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

### VALIDAÇÃO DO TESTE:

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

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

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

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

### PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO:

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

n° strips duplas	n° reações	R-01(5X)	R-02 (pesar)	H <sub>2</sub> O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	14mL	1,4g	56mL

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

3 - Adicionar 400  $\mu$ L de diluente de amostra/conjugado por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500  $\mu$ L para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 - Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar os tubos em leve agitação por 1 hora.

5 – Diluir em tubos, 5  $\mu$ L dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500  $\mu$ L do diluente de amostra/conjugado (1:100).

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



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

CP= controle Positivo CN= Controle Negativo SS= Sem Soro

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

8 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

nº strips duplas	nº reações	R-03	H <sub>2</sub> O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº strips duplas	nº placas	R-03	H <sub>2</sub> O dest.
até 3	1/2	20 ml	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

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

Aguarde 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10 - Preparo do conjugado:

nº strips duplas	nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	1 5 µ L
6	até 96	15 mL	15 µL

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

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

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

14 - Preparo do substrato:

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

**EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 13**

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

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

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

**LEITURA:**

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

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

CO = Cut-Off

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

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

**RESULTADOS**

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

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

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

**14 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos**

**Obs.2:** mantendo-se as Amostras na “faixa cinza”, após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como indeterminado.

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

**VALIDAÇÃO DO TESTE:**

Considerar o teste válido quando os valores (densidade ótica) estiverem na faixa descrita abaixo:

Controle Positivo > 0,500 densidade ótica

Controle Negativo > 0,050 < 0,120 densidade ótica

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

**CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO DO TESTE**

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

**DISPONIBILIDADE**

Este produto destina-se prioritariamente para atendimento das demandas dos Programas Públicos de controle da

Leishmaniose Visceral, e ainda para Projetos de Pesquisa realizados por Instituições Públicas do País.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad.S.Pub, RJ*; 2004; 20(1)jan-fev: 259-265.
2. ASFORD, D.A. BADARÓ, R. EULALIO, C. *Et Al.* Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Amer.J.Trop.Med.Hyg.*1993;Jan;48(1):1-8.
3. BADARÓ, R. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2ed. 2002; 1254-79
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.1976; 72.
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Leishmaniose Visceral**. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A. CHAREST, H. TAVARES, C.A.P. *Et Al.* Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovan* A2 antigen. *Diag. Microb. And Infect. Disease*. 2002; 43: 289-295
7. CÚBA, C.A. MARSDEN, P.H.D. BARRETO, A .C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param.*1980; 89: 195-208.
8. MEDRONHO, R.A. *Et Al.* **Epidemiologia**.2003.Cap 18;p 259-270.

9. MONTOYA, A. CASTELL, J.V. **Long Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for use in enzyme Immunoassay**. *J. Immun. Meth.*1978; 99: 13-20.
10. MORENO, J. ALVAR, J. **Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model**. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(9): 399-405.
11. NAKANE, P.K. KAWAVI, A. **Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation**. *J. Histochem Cytochem.*1974; 22(12);1084-1091.
12. PAPPAS, M.G.HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, W.T. **Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis**. *J. Immunol.Method.* 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. **Canine Leishmaniasis: novel strategies for control**. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(7): 289-290.

**EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 17**

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8968/04, em 22/09/2004.  
Resp. Téc. Méd. Vet.: Adenauer Cruz Telxetra | CRMV-RJ nº 1.359

**ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:**

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

Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz  
CNPJ 33.781.055/0015-30  
Departamento de Reativos para Diagnóstico  
Av. Brasil, 4365 - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ  
Tel: (21) 3882.9393 Fax: (21) 2561.0277  
SAC: 0800.210.310  
www.bio.fiocruz.br

edição: setembro de 2008  
BM\_014\_08Bk

**Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Visceral Canina**

**MODELO DE PROTOCOLO**

Lote: \_\_\_\_\_ Validade: \_\_\_\_\_  
EIE Nº: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Disposição das amostras**

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

**Densidade ótica das amostras**

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

Cálculo do Cut-Off: (amostras de soro)

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

CO=

Técnico Responsável: \_\_\_\_\_

Observações:

### 9.3 Protocolo da técnica de imunofluorescencia



**IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos**  
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

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

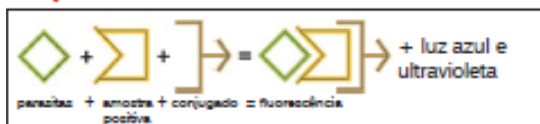
#### PRINCÍPIO DO TESTE:

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

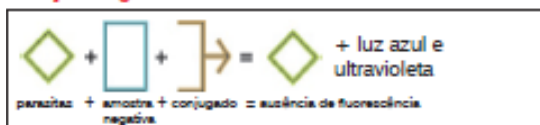
A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultra-violeta, sendo considerado reagente os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

#### ESQUEMA DO TESTE:

##### Reação Positiva



##### Reação Negativa



**MATERIAL FORNECIDO:**

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

**MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:**

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

**CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:**

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

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

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

**CUIDADOS E PRECAUÇÕES:**

Somente para uso "IN VITRO".

## 4 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

Sais	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) PA - 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) PA - 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) PA - 0,0028M	0,34 g
Água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 5

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

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

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

**TITULAÇÃO DO CONJUGADO:**

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

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

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

2- Separar 3 lâminas e pingar 10 µL do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo.

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

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

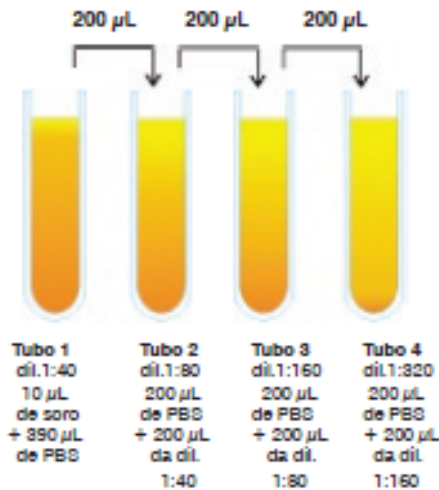
4- Fazer um protocolo de trabalho, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), e do Controle Negativo (CN), além dos controles do conjugado (PBS).

6 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Ex:



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



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

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

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

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

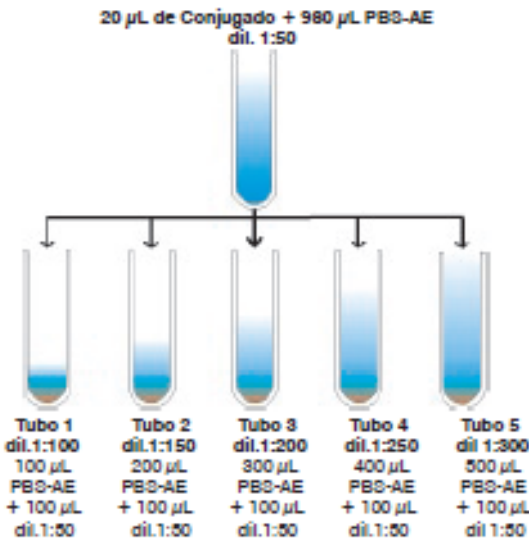
8- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.

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

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

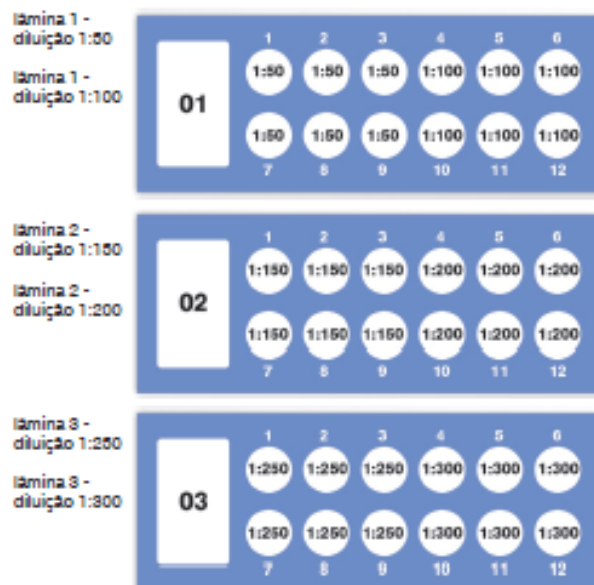
11- Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

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



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





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

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

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

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

#### DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO

Para a leitura, utilizar o microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado será a diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo (vide rótulo do frasco), e ausência de fluorescência nas diluições correspondentes ao controle negativo e ao PBS (controle de conjugado). Os limites aceitáveis da titulação do conjugado para aprovação do teste de Imunofluorescência Indireta estão em torno de 1:100 até 1:640.

#### PROCEDIMENTO DO TESTE:

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

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



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

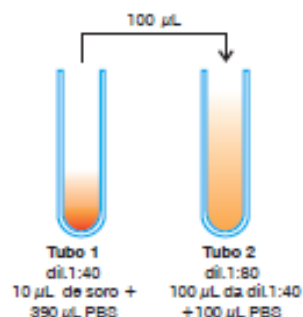
Obs. 2: os controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

## IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 11

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

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

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



5- Adicionar 10  $\mu\text{L}$  das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.

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

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

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

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

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

## 12 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

nº lâminas	Vol. PBS	Vol. Azul de Evans (0,1%)
2	480 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
4	960 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
6	1440 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$

11- Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15  $\mu\text{L}$  da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

**Obs. 1:** diluir somente a quantidade de conjugado necessária para utilização no mesmo dia.

**Obs. 2:** evitar pipetar menos de 5  $\mu\text{L}$  de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição.

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

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

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

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

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

17 - É recomendado que a leitura da reação ocorra no período de até 4 horas após a execução do teste, mantendo-se as lâminas ao abrigo da luz.

### LEITURA E INTERPRETAÇÃO:

1- Para a leitura e interpretação das reações utilizar o microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X. Focalizar a lâmina na posição do controle positivo e observar a fluorescência presente, de acordo com o padrão descrito a seguir.

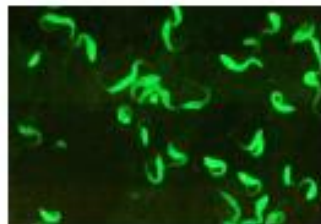
2- Focalizar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo "background".

#### IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 13

3- Proceder a leitura das amostras, considerando os padrões a seguir:

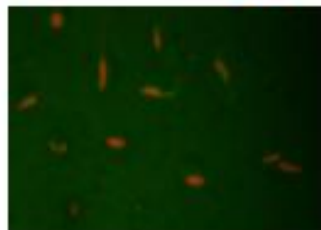
##### **Amostras reagentes**

Aqueles soros que, a partir da diluição 1:40, inclusive, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitas, mais intensa que o *back-ground* observado no orfício do controle negativo.



##### **Amostras não reagentes**

Os soros teste que não apresentarem fluorescência.



#### ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:

Na literatura científica existem diversos trabalhos comparando as performances das metodologias de IFI, ELISA e Aglutinação, entre outros. Nestes trabalhos, o desempenho da IFI oscila em torno de 90% para sensibilidade e 80% para especificidade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- CAMARGO, M.E. REBONATO, C. Cross-reactivity in immunofluorescence for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *A.J.Trop.Med.Hyg.* 1969. 18: 500-505.
- CUBA, C.A. MARSDEN, P.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param.* 1980; 89: 195-208. CUBA,

#### 14 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

CA. MARSDEN, P.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param.* 1980; 89: 195-208.

- GUIMARÃES, M.C.S. CELESTE, B.J. CORRALES, E.M. Antígenos de *Leishmania-major-like* e *L. braziliensis* na reação de imunofluorescência (IgG-IFI) na Leishmaniose Mucosa cutânea. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991; 24 (supl. II): 112.

- *Methods In Immunology - A Laboratory Text for Instruction and Research*, Third Edition, Benjamin Cummings Publishing Company, 1981.

- *Fluorescent Antibody Techniques*, CDC nº 729, USA, 1961.

- *Labelled Antibodies In Bioplogy and Medicine*, Abacus Press and McGraw Hill International Book Company, 1978.

- ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral da leishmaniose canina em inquéritos epidemiológicos :o caso da epidemia de Belo Horizonte Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. *Cad.Saúde Pública*; 20(1) RJ, Jan/Fev. 2004.

#### ATENÇÃO:

Este produto destina-se prioritariamente para atendimento das demandas dos Programas Públicos de controle da Leishmaniose Visceral, e ainda para Projetos de Pesquisa realizados por Instituições Públicas do País.

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8972, em 04/10/2004.

Resp. Téc. Méd. Vet.: Dr. Joel Majerowicz. CRMV-RJ 2342

#### ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a: Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz Departamento de Reativos para Diagnóstico CNPJ 33.781.055/0015-30

Av. Brasil, 4365 - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ

Tel: (21) 3882.9393 - FAX: (21) 2561.0277

SAC: 0800.210.310 [www.bio.fiocruz.br](http://www.bio.fiocruz.br)

edição: dezembro de 2004

BM 008 07Bk

ENSAIO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA  
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA  
MODELO DE PROTOCOLO

IFI nº: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Kit: \_\_\_\_\_ Lote: \_\_\_\_\_  
Validade: \_\_\_\_\_

Lâmina nº: \_\_\_\_\_

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

Lâmina nº: \_\_\_\_\_

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

Técnico responsável: \_\_\_\_\_

Observações:

## 9.4 Checklist pelo método STARD.

Table 1. STARD checklist for the reporting of studies of diagnostic accuracy.

Section and Topic	Item #		On page #
TITLE/ABSTRACT/ KEYWORDS	1	Identify the article as a study of diagnostic accuracy (recommend MeSH heading 'sensitivity and specificity').	OK
INTRODUCTION	2	State the research questions or study aims, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.	OK
METHODS		Describe	
<i>Participants</i>	3	The study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where the data were collected.	OK
	4	Participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?	OK
	5	Participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in items 3 and 4? If not, specify how participants were further selected.	OK
	6	Data collection: Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?	OK
<i>Test methods</i>	7	The reference standard and its rationale.	OK
	8	Technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.	OK
	9	Definition of and rationale for the units, cutoffs and/or categories of the results of the index tests and the reference standard.	OK
	10	The number, training and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.	OK
	11	Whether or not the readers of the index tests and reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any other clinical information available to the readers.	OK
<i>Statistical methods</i>	12	Methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	OK
	13	Methods for calculating test reproducibility, if done.	OK
RESULTS		Report	
<i>Participants</i>	14	When study was done, including beginning and ending dates of recruitment.	OK
	15	Clinical and demographic characteristics of the study population (e.g. age, sex, spectrum of presenting symptoms, comorbidity, current treatments, recruitment centers).	OK
	16	The number of participants satisfying the criteria for inclusion that did or did not undergo the index tests and/or the reference standard; describe why participants failed to receive either test (a flow diagram is strongly recommended).	OK
<i>Test results</i>	17	Time interval from the index tests to the reference standard, and any treatment administered between.	OK
	18	Distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition; other diagnoses in participants without the target condition.	
	19	A cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard; for continuous results, the distribution of the test results by the results of the reference standard.	OK
	20	Any adverse events from performing the index tests or the reference standard.	OK
<i>Estimates</i>	21	Estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	OK
	22	How indeterminate results, missing responses and outliers of the index tests were handled.	OK
	23	Estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centers, if done.	OK
	24	Estimates of test reproducibility, if done.	OK
DISCUSSION	25	Discuss the clinical applicability of the study findings.	OK

## **10. APENDICES**

### **10.1 Artigo original publicado na revista PLOS.**

# Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil

Mauro Maciel de Arruda<sup>1\*</sup>, Fabiano Borges Figueiredo<sup>2</sup>, Fernanda Alvarenga Cardoso<sup>3</sup>, Roberto Mitsuyoshi Hiamamoto<sup>4</sup>, Júlia Cristina Macksoud Brazuna<sup>5</sup>, Maria Regina Fernandes de Oliveira<sup>1,6</sup>, Elza Ferreira Noronha<sup>1</sup>, Gustavo Adolfo Sierra Romero<sup>1,6</sup>

**1** Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **2** Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Fundação Ezequiel Dias-FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, **6** National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/CNPq), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

## Abstract

**Background:** American visceral leishmaniasis is caused by the protozoan *Leishmania infantum*. Dogs are the main reservoirs in the domestic transmission cycle. The limited accuracy of diagnostic tests for canine leishmaniasis may contribute to the lack of impact of control measures recommended by the Brazilian Ministry of Health. The objective of this study was to estimate the accuracy of two enzyme-linked immunosorbent assays employing *L. major* or *L. infantum* antigens and their reliability between three laboratories of different levels of complexity.

**Methods:** A validation study of ELISA techniques using *L. major* or *L. infantum* antigens was conducted. Direct visualization of the parasite in hematoxylin/eosin-stained histopathological sections, immunohistochemistry, and isolation of the parasite in culture were used as gold standard. An animal that was positive in at least one of the tests was defined as infected with *L. infantum*. Serum samples collected from 1,425 dogs were analyzed. Samples were separated in three aliquots and tested in three different laboratories. Sensitivity, specificity and the area under de ROC curve were calculated and the reliability was evaluated between the participant laboratories.

**Results:** The sensitivity was 91.8% and 89.8% for the *L. major* and *L. infantum* assays, respectively. The specificity was 83.75% and 82.7% for the *L. major* and *L. infantum* assays, respectively. The area under de ROC curve was 0.920 and 0.898 for *L. major* and *L. infantum*, respectively. The mean intraclass correlation coefficients between laboratories ranged from 0.890 to 0.948 when *L. major* was used as antigen, and from 0.818 to 0.879 when *L. infantum* was used.

**Interpretation:** ELISA tests using *L. major* or *L. infantum* antigens have similar accuracy and reliability. Our results do not support the substitution of the *L. major* antigen of the ELISA test currently used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil.

**Citation:** de Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JCM, et al. (2013) Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. PLoS ONE 8(7): e69988. doi:10.1371/journal.pone.0069988

**Editor:** Chien-Sheng Chen, National Central University, Taiwan

**Received:** March 26, 2013; **Accepted:** June 13, 2013; **Published:** July 26, 2013

**Copyright:** © 2013 de Arruda et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the Brazilian Ministry of Health, IPEC-FIOCRUZ, and the state funding agency Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Young Scientist and Study of Neglected and Reemerging Diseases programs. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mauroarruda1@hotmail.com

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe parasitic disease that affects the phagocytic mononuclear system of humans and animals. In Brazil, the infection is caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* [1,2]. The parasite is transmitted mainly by the bite of female sandflies (*Lutzomyia longipalpis*) [2,3,4]. VL is endemic in Brazil and urbanization of the disease has been observed since 1980 [5]. Foci of VL are found in different cities of the five political-administrative regions of the country [6]. The prevalence of infected dogs that live in endemic areas ranges from 1% to 67% [3,6].

One of the control measures of human VL recommended by the Brazilian Ministry of Health is euthanasia of seroreactive dogs in order to interrupt the transmission cycle [7]. Although employed since the 1950s, this measure continues to be controversial mainly because of its low effectiveness in reducing the incidence of canine and human disease [8,9]. One of the factors that might be related to the lack of impact of this control measure is the limited accuracy of the tests used for the diagnosis of VL in dogs [10]. The Brazilian program uses two serological techniques for the diagnosis of canine VL: the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the indirect immunofluores-

cent antibody test (IFAT). The diagnostic kits are supplied to the Central Public Health Laboratories (LACEN) of the country and to accredited laboratories that perform the tests in areas of VL transmission. The Ministry of Health recommends serological screening of the dogs with the ELISA and confirmatory diagnosis based on the IFAT results [7].

One of the disadvantages of serological tests is the possibility of false-positive results due to cross-reactions with other members of the family Trypanosomatidae, such as *Trypanosoma cruzi*, because of the existence of common epitopes that interfere with the specificity of the assays [11,12,13]. Specific tests are important to rule out VL in suspected clinical cases, whereas sensitive tests are fundamental for surveillance programs or to test dogs imported from endemic regions and to identify infected healthy animals [14].

According to Kar (1995) and Boarino (2008), the sensitivity and specificity of serological diagnostic methods depend on the type and purity of the antigen used [15,16]. The tests currently available within the public health laboratory network in Brazil are produced by Bio-Manguinhos<sup>®</sup>, Fundação Oswaldo Cruz, Ministry of Health, and use *L. major* as antigen. However, there is growing technical and academic discussion about the possibility to improve the accuracy of the test by using *L. infantum* homologous antigen. This approach could increase the efficiency of culling seroreactive dogs and, consequently, the impact of the control program. We conducted the present study to answer whether a homologous crude antigen prepared with *L. infantum* would be able to improve the specificity of a crude antigen ELISA test currently prepared with *L. major*. Therefore, the objective of the present study was the validation and evaluation of reliability between laboratories with different complexity levels of two ELISA tests using *L. major* or *L. infantum* antigens.

## Methods

A validation study of ELISA techniques using *L. major* and *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine VL was conducted. Parasitological tests were used as gold standards. In addition, the reliability between laboratories was tested by estimating intraclass correlation coefficients (ICC).

Serum and intact skin or skin lesion samples were collected from 1,600 dogs between 2008 and 2010 in a multicenter study conducted in four cities endemic for canine VL: Bauru, State of São Paulo; Brasília, Federal District; Palmas, State of Tocantins, and Fortaleza, State of Ceará, located in the southeast, center-west, north, and northeast regions of Brazil, respectively. Three neighborhoods with a historical prevalence of canine VL of 10% or higher were chosen in each city. The animals were selected without prior clinical assessment or laboratory diagnosis. The dogs were included based on systematic random sampling of the dwellings per street in each selected neighborhood. Dwellings were selected alternately from the first residence until a sample of 400 dogs was obtained from each of the four cities.

The skin samples were used for detection of the parasite by direct visualization in hematoxylin/eosin-stained histopathological sections, for immunohistochemistry according to Figuciredo et al. [17], and for isolation of the parasite in culture according to Madeira et al. [18]. The samples were processed at the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance, Evandro Chagas Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro), a National Referral Center for the parasitological diagnosis of leishmaniasis. These techniques represented the gold standard and an animal that was positive in at least one of the tests was defined as infected with *L. infantum*.

Two ELISA tests produced by Bio-Manguinhos<sup>®</sup> were validated: ELISA using crude *L. major* antigen, a registered product of the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA) currently used by official diagnostic laboratories, and ELISA using crude *L. infantum* antigen, a pilot product produced by the same manufacturer which is not commercially available.

The tests were validated simultaneously in March and April 2010 by the National referral laboratory at the Ezequiel Dias Foundation in the State of Minas Gerais (FUNED-MG) and the reliability was evaluated by three referral laboratories of different levels of complexity that perform routine diagnostic tests of canine VL: the National Referral Laboratory at the Ezequiel Dias Foundation in the state of Minas Gerais (FUNED-MG), the State Referral Laboratory at the Adolfo Lutz Institute in the state of São Paulo (IAL-SP), and the Municipal Referral Laboratory at the Zoonosis Control Center in the municipality of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul (CCZ-CG). The tests were performed blindly by each laboratory, with the examiners being unaware of the result of the gold standard. The sera were cryopreserved at IPEC/FIOCRUZ and sent on dry ice to FUNED-MG with coded identification. The samples were then thawed and divided into 100- $\mu$ L aliquots in eppendorf tubes. The tubes were sent under refrigeration in reusable ice to IAL-SP and CCZ-CG for the reliability assays.

The ELISA protocols used by the three laboratories were identical and were based on recommendations of the manufacturer of the diagnostic kit (Bio-Manguinhos<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil). The results of the assays were read with routine equipment of the participating laboratories: a microplate spectrophotometer equipped with a 450-nm filter without the use of a reference filter (620–630 nm). The cut-off value was twice the mean optical density of the negative controls included in the plate according to manufacturer recommendations. Samples that presented an optical density between the cut-off and 1.2 times the cut-off were classified as indeterminate and re-tested. Samples that continued to be indeterminate were classified as negative. For standardization of the optical densities of the samples, the optical density obtained for the sample was divided by the respective cut-off. The product of this division was called the optical density index (ODI) and was used for evaluation of the reliability between laboratories based on the calculation of ICC.

The results were entered into Excel spreadsheets and analyzed using the SPSS 16 for Windows program. The following parameters were estimated: sensitivity, specificity, area under the ROC curve, positive (PPV) and negative predictive values (NPV), and ICC as a measure of reliability. A two-way random model for absolute agreement was used for calculation of the ICC. The respective 95% confidence intervals (95% CI) were estimated. Finally, a sensitivity analysis was performed to estimate the predictive values based on plausible seroprevalence rates previously reported in the literature [19,20,21,22,23,24,25].

## Ethics Statement

The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-CEUA) according to the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), licensed under the number: G-38/08. All animal owners who participated in the experiment agreed to include their dogs in the study and signed an informed consent.



**Results**

Of the 1,600 serum samples, 150 were excluded from the analysis because of inconclusive parasitological results obtained with the gold standards at IPEC/FIOCRUZ and 25 because the material was insufficient to perform all serological tests at the three laboratories. Thus, the final sample consisted of sera from 1,425 dogs. Of these, 98 (6.9%) were classified as positive and 1,327 (93.1%) as negative by the gold standard.

The accuracy of the ELISA tests using *L. major* and *L. infantum* antigens in are shown in Table 1. Briefly, sensitivity was 91.84% and 89.80% and specificity was 83.57% and 82.59% for *L. major* and *L. infantum* antigens, respectively. Figure 1 shows the results of the sensitivity analysis for the calculation of NPV and PPV based on seroprevalence rates ranged from of 1 to 65%.

The area under the ROC curve (AU<sub>ROC</sub>) was 0.920 and 0.898 for *L. major* and *L. infantum* antigens, respectively. Figure 2.

The mean ICC of the tests ranged from 0.890 to 0.948 when *L. major* was used as antigen, and from 0.818 to 0.879 when *L. infantum* was used. Table 2.

**Discussion**

The relationship between human cases of VL and the prevalence of canine zoonotic disease has resulted in multiple efforts to reduce the risk of transmission. An important cornerstone of the national control program of the Brazilian Ministry of

**Table 1.** Accuracy results of ELISA tests using *Leishmania major* or *Leishmania infantum* antigens (Bio-Manguinhos®) for the detection of visceral leishmaniasis in serum samples of dogs from endemic regions in Brazil (2011).

	<i>Leishmania major</i> test	<i>Leishmania infantum</i> test
Sensitivity	91.84% (86.42 to 97.26)	89.80% (83.80 to 95.79)
Specificity	83.75% (81.76 to 85.74)	82.69% (80.64 to 84.73)
AU <sub>ROC</sub> <sup>a</sup>	0.917 (0.881 to 0.953)	0.893 (0.854 to 0.933)
PPV <sup>b</sup>	29.61% (24.47 to 34.74)	27.85% (22.91 to 32.79)
NPV <sup>c</sup>	99.28% (98.78 to 99.78)	99.09% (98.53 to 99.65)

The 95% confidence interval is given in parentheses.

<sup>a</sup>AU<sub>ROC</sub>: area under the ROC curve.

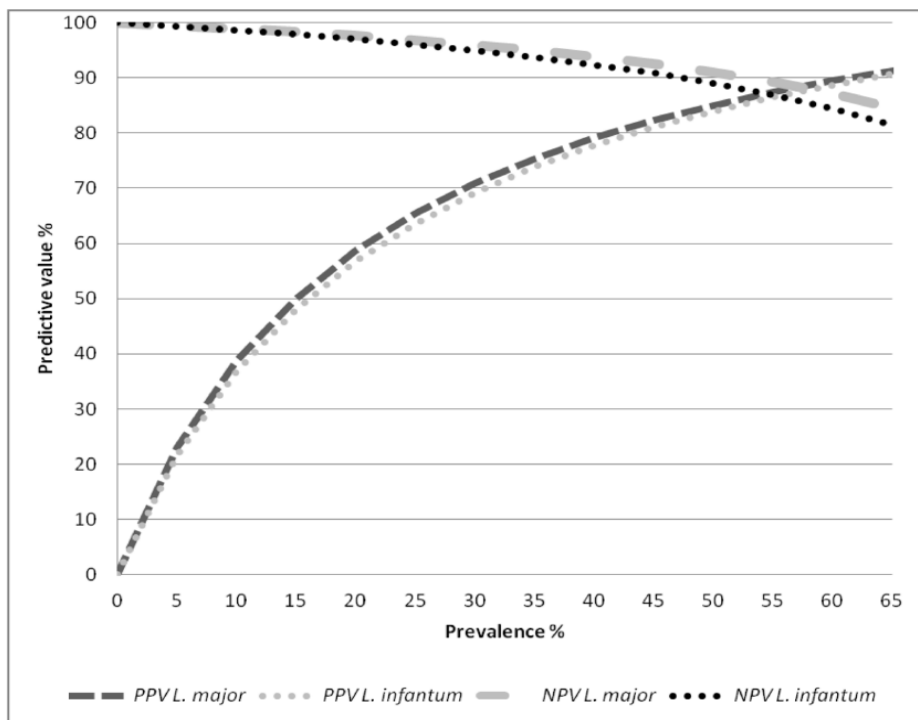
<sup>b</sup>Positive predictive value.

<sup>c</sup>Negative predictive value.

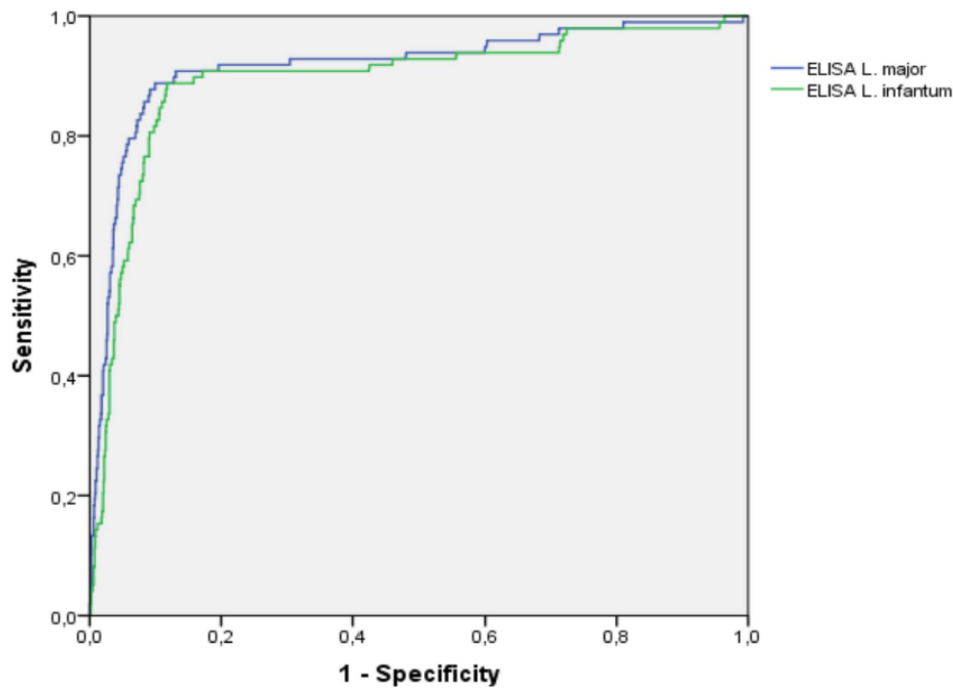
doi:10.1371/journal.pone.0069988.t001

Health is the monitoring of reservoirs based on the identification and euthanasia of infected dogs. The development of accurate diagnostic tests that meet the needs of both public health services and owners of dogs living in endemic areas in terms of the reliability of a valid diagnosis is a major challenge for researchers.

The study of canine seroprevalence in endemic areas can generate much doubt depending on the sensitivity and specificity



**Figure 1.** Sensitivity analysis of positive and negative predictive values of ELISA tests using *Leishmania major* or *Leishmania infantum* antigen (Bio-Manguinhos®) according to variations in the prevalence of canine visceral leishmaniasis. PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value. doi:10.1371/journal.pone.0069988.g001



**Figure 2. Receiver operating curve (ROC) comparing the results of the optic density indexes obtained with ELISA tests using *Leishmania major* or *Leishmania infantum* antigen (Bio-Manguinhos®).**  
doi:10.1371/journal.pone.0069988.g002

of the tests used, which vary between different validation studies. These variations are related mainly to differences in the reference population and sampling strategies used for the validation process, as well as to technical characteristics of the test, competence of the laboratory, choice of the gold standard, and cut-off value used for interpretation [26]. Furthermore, biological factors can affect the accuracy of serological tests. Sensitivity varies according to the state of infection and immune status of the host. In addition, lower

specificity is due to cross-reactions with other agents or when this parameter is estimated in dogs that are truly infected but are not detected adequately by the gold standard [26]. Diagnostic tests based on recombinant more specific antigens have been developed, however the lack of sensitivity precludes their use as the first choice tools for epidemiological surveys or control intervention programs.

In view of these considerations, the present study evaluated the accuracy and reproducibility of Bio-Manguinhos® ELISA tests using *L. major* and *L. infantum* antigens for the detection of VL in serum samples of a random sample of dogs including the whole spectrum of *Leishmania* infection, from asymptomatic to seriously ill animals which represents the reality of canine VL in Brazil. The random sampling of dogs contributed to reduce selection bias, which is commonly seen in validation studies due to an unbalanced representation of symptomatic dogs. Another strong point of this study is the technical rigor and completeness of gold standard methods. However, our gold standard could fail in asymptomatic infected dogs with lower parasite burden producing a classification bias which would underestimate the true specificity value for both tests.

Comparison of the sensitivity between both antigens showed similar performance. Barbosa-De-Deus et al. [27] reported 98% sensitivity and 95% specificity of an ELISA test using antigen prepared from *L. major*-like promastigotes in a sample of 1,741 animals (1,582 negative and 159 positive). Similar results (97% sensitivity and 98% specificity) have been reported by Scalone et al. [28] for a sample of 415 animals (258 negative and 157 positive) using recombinant rK39 antigen. Carvalho et al. [29] observed

**Table 2. Mean intraclass correlation coefficients between laboratories for the optic density indexes of ELISA tests using *Leishmania major* or *Leishmania infantum* antigen (Bio-Manguinhos®) for the detection of visceral leishmaniasis in serum samples of dogs from endemic regions in Brazil (2011).**

Laboratory	<i>Leishmania major</i> test	<i>Leishmania infantum</i> test
	ICC <sup>a</sup>	ICC
CCZ-CG <sup>b</sup> x IAL-SP <sup>c</sup>	0.904 (0.884 to 0.919)	0.818 (0.791 to 0.841)
IAL-SP x FUNED-MG <sup>d</sup>	0.948 (0.942 to 0.953)	0.879 (0.865 to 0.891)
CCZ-CG x FUNED-MG	0.890 (0.876 to 0.902)	0.875 (0.834 to 0.903)

The 95% confidence interval is given in parentheses.

<sup>a</sup>Intraclass correlation coefficient.

<sup>b</sup>Centro de Controle de Zoonoses, Campo Grande.

<sup>c</sup>Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

<sup>d</sup>Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais.

doi:10.1371/journal.pone.0069988.t002

100% sensitivity and specificity of an *in-house* ELISA using *L. infantum* antigen in 125 animals (15 negative and 110 positive). The fact that another serological test was used as the gold standard in those studies might be a disadvantage since the tests evaluated would detect the same phenomenon of antibody elevation identified by the gold standard and the chance of agreement would therefore be higher, overestimating sensitivity and specificity.

Studying ELISA tests that employed *L. infantum/chagasi* antigen, Oliveira et al. [30] reported 90% sensitivity and 100% specificity of the test for a sample of 101 dogs, including 30 animals with a confirmed parasitological diagnosis and 71 negative animals. The authors used exclusively sera from dogs with a confirmed parasitological diagnosis for the calculation of sensitivity and exclusively sera from dogs defined as negative for the calculation of specificity, an approach that improves artificially the accuracy of the tests. Rosário et al. [13] compared ELISA tests employing crude antigens of *L. amazonensis* and *L. chagasi/infantum* and the recombinant antigens rK39 and rK26. A total of 131 samples were tested (25 negative and 106 positive) demonstrating sensitivity of 100% (95% CI: 95.6 to 100) for *L. amazonensis*, 98% (92.7 to 99.7) for *L. chagasi/infantum*, 98.1% (92.7 to 99.7) for antigen rK39, and 99.1% (94.1 to 100) for antigen rK26. Specificity was 100% (83.4 to 100) for *L. amazonensis*, 100% (83.4 to 99.7) for *L. chagasi/infantum*, 100% (83.4 to 100) for antigen rK39, and 96% (77.7 to 99.8%) for antigen rK26. Lira et al. [31] evaluated ELISA with *L. major*-like antigen (Bio-Manguinhos®), which is currently used by the Brazilian visceral leishmaniasis control program, in a sample of 41 animals (25 positive and 16 negative) and observed sensitivity of 72% (50.4 to 87.1) and specificity of 87.5% (60.4 to 97.8%). In addition to the imprecise estimates of that study, the authors used animals from unaffected areas as negative controls, a fact that may have favorably influenced the specificity results. Pinheiro et al. [32] compared ELISA tests using a recombinant cysteine proteinase (rLdcys1) and lysates of *L. chagasi* amastigotes and promastigotes as antigens. In that study, sensitivity was 98% (rLdcys1), 89% (amastigotes) and 86% (promastigotes), and specificity was 96%, 69% and 68%, respectively. Like Oliveira et al. [30], the authors used sera from dogs with a confirmed parasitological diagnosis (209 animals) for the calculation of sensitivity and sera from 68 animals classified as negative for the calculation of specificity, including 46 samples from dogs with other diseases. However, the dog sera were obtained by convenience sampling which is prone to selection bias.

With respect to the predictive values shown in Table 1, the NPV were high (99,28 and 99,09%) indicating excellent sensitivity of the tests. On the other hand, the PPV was 29,61% when the *L. major* antigen was used and 27.85% with the *L. chagasi* antigen. These

results are a matter of concern since in cases in which the prevalence of infection is similar to that of the sample studied (6.9%), at least three dogs with a false-positive result would be eliminated per each truly infected animal. In this respect, although designed to improve the capacity for detection of infection, the gold standard used probably continues to be imperfect and does not identify some truly infected animals, with a consequent impact on specificity and PPV.

As can be seen in Figure 1, the predictive values of the ELISA tests are closely related to the prevalence of the disease. As already mentioned above prevalence of canine visceral leishmaniasis is variable and health decision-makers need to be aware of the expected predictive values using serological tests for control purposes. In this respect, sensitive tests are fundamental for surveillance and control programs of leishmaniasis since they permit the culling of a larger number of truly infected animals, whereas specific tests are more important for the confirmation of suspected clinical cases, being more relevant for veterinarians dedicated to individual animal care [14]. Barbosa-De-Deus et al. [27] studied an important convenience sample of dogs in which the "prevalence" of VL was 9.13% (159/1741), obtained good predictive values (100% NPV and 66% PPV). However, as discussed earlier the selection bias that may occur as a result of the use of another serological test as the gold standard should be taken into account when interpreting these results.

In our study the ICC indicated almost perfect agreement between tests (>0.81) in labs with different levels of complexity. This is a very relevant result because adequate reproducibility is essential to avoid unnecessary dog culling and optimize lab costs. The lack of significant differences in the accuracy and reliability of tests using *L. infantum* or *L. major* antigen indicates that there is no need to change the antigen composition of the enzyme immunoassay currently used in Brazil for the diagnosis of canine VL.

## Acknowledgments

We thank the Municipal and State Secretary Offices of Health that participated in the study for their help and commitment. Professor José Uéleres Braga for critical review of the manuscript and useful suggestions for improving data analysis.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMA BFB FAC RMH JCMB MRFO EFN GASR. Performed the experiments: MMA BFB FAC RMH JCMB. Analyzed the data: MMA BFB MRFO EFN GASR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MMA BFB FAC RMH JCMB. Wrote the paper: MMA BFB FAC RMH JCMB MRFO EFN GASR.

## References

- Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E (2010) Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitol. 26: 466–469.
- Shaw JJ (2006) Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101: 577–579.
- Deane LM, Deane MP (1962) Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4: 198–212.
- Rangel EF, ML V (2008) *Luizomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad. Saude Publica. 24: 2948–2952.
- Cerbino NJ, Werneck GI, Costa CH (2009) Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. Cad. Saude Publica. 25: 1543–1551.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. 27: 403–409.
- Ministério da Saúde (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília: Available: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_viscerale2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscerale2006.pdf) Accessed 25 January 2011.
- Romero GA, Boelaert M (2010) Control of visceral leishmaniasis in latin america—a systematic review. PLoS Negl. Trop. Dis. 4: e584.
- Costa CH (2011) How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44: 232–242.
- Silva AV, Paula AA, Cabrera MA, Carreira JC (2005) Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. Cad. Saude Publica. 21: 324–328.
- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Luchesi SB, Langoni H (2009) *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 164: 118–123.
- Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA (2009) Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. 29: 150–152.
- Rosario EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, et al. (2005) coEvaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and

- recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: 197–203.
14. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J. Clin. Microbiol. 43: 5515–5519.
  15. Kar K (1995) Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit. Rev. Microbiol. 21: 123–152.
  16. Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, et al. (2008) Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 31: 527–536.
  17. Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, et al. (2010) Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. Vet. J. 186: 123–124.
  18. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, et al. (2009) Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? Res. Vet. Sci. 87: 260–262.
  19. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MC, Tramontano N (1985) A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 80: 17–22.
  20. Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, et al. (1996) A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55: 39–44.
  21. Bernadina WE, De Luna R, Oliva G, Ciaramella P (1997) An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. Vet. Parasitol. 73: 207–213.
  22. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, et al. (1998) Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59: 53–57.
  23. Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Rodrigues e Silva R (1999) Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil/Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban area of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 36: 101–102.
  24. Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, et al. (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 111: 161–173.
  25. Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, et al. (2009) Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. Res. Vet. Sci. 86: 267–273.
  26. Greiner M, Gardner IA (2000) Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Prev. Vet. Med. 45: 3–22.
  27. Barbosa-De-Deus R, Dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, et al. (2002) *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 1361–1366.
  28. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, et al. (2002) Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Parasitol. 104: 275–285.
  29. Carvalho D, Oliveira TMFS, Baldani CD, Machado RZ (2009) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. Pesq. Vet. Bras. 29: 120–124.
  30. Oliveira LS, Juliao FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, et al. (2005) A utilização da imunofluorescência indireta no Diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ci.Anim.Bras.6: 41–47.
  31. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, et al. (2006) Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIP-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. Vet. Parasitol. 137: 11–16.
  32. Pinheiro PHdC, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FAL, Katz S, et al. (2009) A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 162: 32–39.