

UNIVERSIDADE FEDERAL JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPTº PARASITO, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA.

Lily Paola Martínez Abad

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA PROTEÍNA rKLO8 NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Juiz de Fora
2016

LILY PAOLA MARTÍNEZ ABAD

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA PROTEÍNA rKLO8 NO DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

**Juiz de Fora
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de
geração automática da Biblioteca Universitária da
UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Martínez Abad, Lily Paola.

Avaliação da Acurácia da Proteína rKLO8 no Diagnóstico da
Leishmaniose Visceral Canina / Lily Paola Martínez Abad. -- 2016.
102 f. : il.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Imunologia e Genética, 2016.

1. Leishmaniose visceral canina.. 2. Diagnóstico sorológico. 3. rKLO8.
4. rK26. 5. Teste rápido DPP® LVC. I. Couto Teixeira, Henrique, orient. II.
Título.

LILY PAOLA MARTINEZ ABAD

Avaliação da acurácia da proteína rKLO8 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30 / 09 / 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira


Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Elaine Soares Coimbra

Universidade Federal de Juiz de Fora



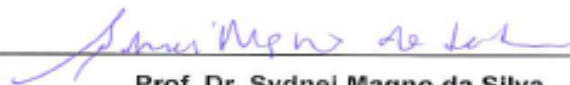
Prof.ª Dr.ª Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida de Souza

Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Universidade Federal de Uberlândia

*Dedico este trabalho à minha mãe María Onis, minha
inspiração, e motor do dia- a- dia;*

*À memória de meu pai Esteban, meu anjo maior; Meu
avô José Isabel, a luz da família e o maior exemplo de
perseverança e amor; Meus irmãos Sair, José Luís, pela
paciência e apoio incondicional; Meu marido Francisco,
presente da vida e parceiro incansável;*

*À minha família, que me incentivaram nesta caminhada
e todos que contribuíram para sua realização.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, força diária, coragem, oportunidades, por sempre me confortar nos momentos de incerteza e angústia, por ensinar-me que o transitório não é permanente, que o permanente é minha Fé e que não existe nada impossível para Ele, por abençoar minha vida com pessoas e oportunidades maravilhosas e permitir mais esta conquista.

À minha família, meus guerreiros e minha maior benção. Obrigada pelo apoio e amor incondicional em todo momento que me impulsiona cada dia a seguir na luta por meus sonhos e por ensinar-me a viver sabiamente e dar sempre o melhor de mim.

A Francisco, meu marido, meu amigo e amor. Obrigada por seu amor, apoio incondicional, compreensão em todos os momentos vividos, por fazer estes anos mais rápidos e mais felizes. Obrigada por identificar-te com meus logros e derrotas e por lembrar-me que tudo é possível quando decidimos que seja assim.

À Organização de Estados Americanos (OEA) e à Universidade Federal Juiz de Fora, por ter aberto suas portas para mim, e me oferecer o maior presente: O conhecimento.

Ao Professor e Doutor Henrique Couto Teixeira, obrigada por ter acreditado em mim, mesmo sem conhecer-me. Obrigada pela oportunidade, ensinamentos, paciência, confiança, dedicação, amizade, por entender a mudança de vida que passei e por abrir meus olhos a uma perspectiva diferente da vida, ficam a minha admiração e gratidão. Foi um prazer tê-lo como orientador!

À Caroline Almeida e Ana Marcia Mattos, vocês são as melhores! Minhas companheiras de luta, minhas irmãs brasileiras. Obrigada pela ajuda infinita e pela amizade, que se fizeram presentes no meu dia-a-dia, vocês são uma inspiração para mim. À Juciane Andrade de Castro, Bárbara Bruna, obrigada pelo carinho, ajuda infinita e pela amizade, e pela paciência dia-a-dia, minhas tradutoras do espanhol ao

português. De igual maneira a Karina Castellanos por suas palavras de forças no momento preciso. Deus escolheu vocês para serem anjos no meu caminho, obrigada por tudo. Amo vocês.

À Carolina Mendonça, Isabela, Carolina van Keulen, companheiras de luta, obrigada pelo carinho e pela paciência em cada dia de bancada.

Ao Dr. Ulrich Steinhoff, do “Institute for Medical Microbiology and Hygiene”, University of Marburg (Germany) Alemanha, pelo fornecimento do antígeno rKLO8 e pelas boas sugestões dadas ao projeto; ao Dr. Renato Porrozi do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses da FIOCRUZ-RJ, pelo fornecimento do antígeno rK26 e pela cessão dos Kits para diagnóstico DPP; à Dra. Aimara C. Pinheiro da Gerência de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG, pelo fornecimento dos soros de cães e colaboração no trabalho.

À Dra. Maria Aparecida de Souza, obrigada pelo carinho, amizade, pela disposição sempre de colaborar, orientar e as boas sugestões dadas ao projeto.

Ao Profº Márcio J. M. Alves, pela boa vontade em colaborar, especialmente na realização dos cálculos estatísticos.

Aos Professores e membros do laboratório de imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, pessoas queridas e maravilhosas, que tenho tanto carinho, me ajudaram em momentos de dificuldade com uma palavra amiga, com apoio, momentos em que estive longe da família, com tantas responsabilidades e muitas vezes sem saber a quem recorrer, quando eu estava com medo e insegura no trabalho e na nova cidade e País. Vocês foram um porto seguro, estiveram ao meu lado para me mostrar o lado bom de tudo! Uma nova família que não importa onde eu estiver vou levar comigo!

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e OEA, pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A todos, minha enorme gratidão!!

Obrigada Brasil, seu lindo!

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) representa um grave problema de saúde pública. No Brasil, a prevalência da infecção nos cães é bastante variável, podendo atingir níveis superiores a 60% em alguns surtos. O teste rápido Dual Path Platform (TR-DPP®-Bio-Manguinhos), como teste de triagem, seguido por ELISA (EIE-Bio-Manguinhos), como teste confirmatório, tornaram-se parte do protocolo de diagnóstico da LVC, credenciado no Brasil desde 2011. No entanto, o diagnóstico da LVC ainda precisa ser melhorado para alcançar uma taxa de detecção mais precisa. Recentemente, rKLO8, uma nova proteína antigênica de *L. donovani* do Sudão foi clonada e purificada, e mostrou alta reatividade para diagnosticar leishmaniose visceral em humanos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a reatividade de soros de cães frente ao antígeno rKLO8 e o antígeno de referência rK26, comparando ambas as proteínas, utilizadas como antígenos em testes de ELISA, com os testes DPP® e EIE, usados como testes de diagnóstico da LVC. Amostras de soros de cães de Governador Valadares, uma área endêmica para leishmaniose em Minas Gerais, Brasil, foram agrupadas da seguinte forma: (I) DPP®/EIE negativo (n = 100), (II) DPP® positivo / EIE negativo e (III) DPP® / EIE positivo (n = 100). Níveis séricos elevados de IgM e IgG para ambos os antígenos, rKLO8 e rK26, foram encontrados no grupo III (p <0,0001). Interessantemente, foram detectados níveis elevados de IgG2 e baixos níveis de IgG1 contra ambos os antígenos no grupo de cães DPP®/EIE positivo, sugerindo a ocorrência de um fenótipo predominantemente do tipo Th1 associado com infecção subclínica. O ELISA-rKLO8 (IgG) e o ELISA-rK26 (IgG) mostraram uma sensibilidade de 68% e 77%, e especificidade de 92% e 91%, respectivamente, determinado através da análise da curva ROC. Além disso, o coeficiente Kappa indicou boa concordância (0,739) entre o ELISA-rKLO8 versus o ELISA-rK26. Ainda, a combinação de antígenos rKLO8 e rK26 (rKLO8+rK26) em um mesmo teste exibiu maior sensibilidade (85%) e especificidade (93%). A análise kappa mostrou que o ELISA-rKLO8 + rK26 (IgG) teve melhor concordância com ambos os testes, DPP® e EIE, com valores de kappa igual a 0,700. Estes dados indicaram que a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 gera uma melhor acurácia no diagnóstico da LVC que os antígenos rKLO8 e rK26 usados em separado na detecção de IgG. Estes resultados demonstraram, pela primeira vez, a utilidade do antígeno rKLO8 no diagnóstico da LVC, e que ELISA-rKLO8, pode representar uma potencial ferramenta adicional para o diagnóstico de LVC.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose visceral canina. Diagnóstico sorológico. rKLO8. rK26. Teste rápido DPP® LVC.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) represents a serious public health issue. In Brazil, the prevalence of infection in dogs is quite variable and may reach levels above 60% in some outbreaks. The dual Path Platform (DPP®-Bio-Manguinhos) as quick screening test followed by ELISA (EIE-Bio-Manguinhos) as a confirmatory test became part of the diagnostic protocol of CVL, nationally accredited in Brazil since 2011. However, CVL diagnosis still needs to be improved to achieve a more accurate detection rate. Recently, rKLO8, a new antigenic protein of Sudanese *L. donovani*, was cloned and purified and had high reactivity to diagnose human VL. The present study aimed to evaluate serum reactivity to rKLO8 and to the reference antigen rK26, and to compare both diagnostic proteins used in ELISA with the combined DPP® and EIE as diagnostic tests of CVL. Dog sera samples from Governador Valadares, an area endemic for leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil, were grouped in the following way: (I) DPP®/EIE negative (n = 100), (II) DPP® positive/EIE negative and (III) DPP®/EIE positive dog sera (n = 100). Enhanced serum levels of IgM and IgG to both rKLO8 and rK26 were found in group III ($p < 0.0001$). Interestingly, high IgG2 and low IgG1 levels against both antigens were detected in DPP®/EIE positive dogs, suggesting the occurrence of a predominant Th1 phenotype associated with subclinical infection. The rKLO8-ELISA (IgG) and the rK26-ELISA (IgG) showed a sensitivity of 68% and 77% and specificity of 92% and 91%, respectively, determined by ROC curve analysis. In addition, Kappa coefficient indicated good agreement (0.739) between rKLO8-ELISA and rK26-ELISA. Moreover, the combination of rKLO8 and rK26 antigens (rKLO8+rK26) exhibited higher sensitivity (85%) and specificity (93%). Kappa analysis established that rKLO8+rK26-ELISA (IgG) had better agreement with both DPP® and EIE, with kappa values of 0.700. These data indicate that the combination of rKLO8 and rK26 antigens has better accuracy in the diagnosis of CVL than rKLO8 and rK26 used separately at detecting IgG. These results showed for the first time the usefulness of rKLO8 antigen in the diagnosis of CVL, and that rKLO8-ELISA may represent a potential additional tool for the diagnosis of CVL.

KEY-WORDS: Canine Visceral Leishmaniasis. Serodiagnosis. rKLO8. rK26. DPP® CVL rapid test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo, 2013.....	18
Figura 2. Morfologia da <i>Leishmania</i> spp..	21
Figura 3. <i>Lutzomyia</i> sp. vetor da leishmaniose.	22
Figura 4. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 5. Reservatórios de <i>Leishmania</i> spp.	25
Figura 6. Sinais clínicos da leishmaniose visceral canina.	28
Figura 7. Detecção de anticorpos IgG específicos para o antígeno rKLO8.....	57
Figura 8. Detecção de anticorpos IgG específicos para o antígeno rK26.	58
Figura 9. Níveis séricos de anticorpos IgM específicos para os antígenos rKLO8 e rK26.	60
Figura 10. Níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos para os antígenos rKLO8 e rK26.	60
Figura 11. Comparação dos antígenos rKLO8 e rK26, através da curva ROC (receiver operator characteristic).....	62
Figura 12. Detecção de anticorpos IgG anti-rKLO8+rK26.	66
Figura 13. Níveis de anticorpos IgG2 específicos para os antígenos rKLO8, rK26 e rKLO8+rK26.	66
Figura 14. Comparação da combinação dos antígenos rKLO8 e rK26, através da curva ROC.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras positivas e negativas dos grupos de soros de cães avaliados obtidas mediante ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26.	59
Tabela 2 - Parâmetros estatísticos avaliados para os antígenos rKLO8 e rK26 no sorodiagnóstico da LVC.	62
Tabela 3 - Número de amostras positivas e negativas obtidas mediante os seguintes teste (DPP, EIE, ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26).....	63
Tabela 4 - Concordância entre os testes de ELISA (ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26) e ensaios padrão (DPP e EIE-Bio-Manguinhos) usados para o diagnóstico da LVC.....	64
Tabela 5 - Parâmetros estatísticos avaliados para a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 no sorodiagnóstico da LVC.....	68
Tabela 6 - Acordo entre o teste ELISA-rKLO8+rK26 e ensaios de referências (DPP e EIE-Bio-Manguinhos) usados para o diagnóstico da LVC.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCLIVEPA	Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais
ASC	Área Sob a Curva
CK2	Caseína quinase 2
DP	Desvio padrão
D.O	Densidade Óptica
DAT	<i>Direct agglutination test</i> (Teste de aglutinação direta)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
ELISA	<i>Enzyme linked immunorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
FML	<i>Fucose-mannose-ligand</i> (ligante de fucose manose)
IFI	Imunofluorescência indireta
rK39	Antígeno recombinante rK39
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-1 β	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina- 8
LEISH-TEC®	Vacina contra leishmaniose visceral canina - Laboratório Hertape Callier
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
MS	Mato Grosso do Sul
NK	<i>Natural killer</i>

NO	Nitric oxide (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PKC	Proteína quinase C
QS21	Adjuvante saponina
RJ	Rio de Janeiro
rK26	Antígeno recombinante rK26
rKLO8	Antígeno recombinante rKLO8
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic curve</i>
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TGF- β	<i>Tumoral grow factor-β</i> (Fator de crescimento tumoral- β)
TMB	Cromógeno tetrametilbenzidina
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> (fator de necrose tumoral- α)
TO	Tocantins
TR DPP	Teste Imunocromatográfico Rápido “Dual Path Platform”
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia das leishmanioses	17
1.2 Agentes etiológicos.....	20
1.3 Vetores	21
1.4 Ciclo de vida das espécies do gênero <i>Leishmania</i>	23
1.5 Reservatório	24
1.6 Leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina	26
1.7 Imunologia da leishmaniose visceral canina.....	29
1.8 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	32
1.8.1 Métodos parasitológicos.....	32
1.8.2 Métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	34
1.8.3 Métodos moleculares para detecção de DNA parasitário	39
1.9 Tratamento e prevenção da leishmaniose visceral canina	41
1.10 Diagnóstico atual da LVC no Brasil.....	44
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo geral.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Antígenos.....	47
3.2 Soros de cães.....	48
3.3 Detecção de anticorpos IgM, IgG, e subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) específicos para os antígenos rKLO8 e rK26 utilizando o método de ELISA.	50
3.4 Ponto de corte	51
3.5 Sensibilidade e especificidade do ELISA-rKLO8 em relação a ELISA-rK26 no diagnóstico da LVC.....	53
3.6 Avaliação da utilidade diagnóstica do ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26, com DPP e EIE-Bio-Manguinhos.....	53
3.7 Detecção de anticorpos IgG e IgG2 específicos para a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 usando o ELISA e avaliação da acurácia diagnóstica do ELISA com a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26	54
3.8 Análise estatística	55
4 RESULTADOS.....	56

4.1 Ensaio imunoenzimático utilizando os antígenos rKLO8 e rK26 para a detecção de anticorpos IgG anti-rKLO8 e anti-rK26.....	56
4.2 Avaliação das subclasses de IgG para os antígenos rKLO8 e rK26.....	60
4.3 Estudo das curvas ROC dos testes de ELISA para os antígenos rKLO8 e rK26.	61
4.4 Sensibilidade e especificidade.....	62
4.5 Avaliação da utilidade diagnóstica do ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26, em relação aos testes DPP e EIE Bio-Manguinhos.....	63
4.6 Acurácia diagnóstica da combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 na LVC	65
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	78
7 REFERÊNCIAS.....	79
8 ANEXOS	98
8.1 Anexo 1: Manual de instruções da aplicação do teste rápido TR DPP leishmaniose visceral canina – Bio- Manguinhos	98
8.2 Anexo 2: Manual de instruções da aplicação do teste rápido EIE leishmaniose visceral canina – Bio- Manguinhos	100
8.3 Anexo 3: Comitê de Ética	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, responsáveis por um grande problema de saúde pública mundial. Considerada uma das dez principais doenças tropicais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2010), as leishmanioses são causadas por diferentes espécies de protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. Têm sido reportadas mais de 20 espécies de *Leishmania* que capazes de causar infecções em humanos.

O parasito é transmitido ao hospedeiro vertebrado por insetos vetores da subfamília *Phlebotominae* dos gêneros *Lutzomyia*, em países do Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Grimaldi e Tesh, 1993; WHO, 2010; 2015; De A. Marzochi e F. Marzochi, 1994).

As enfermidades causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania* distribuem-se por 98 países nos cinco continentes, atualmente, existem 14 milhões de indivíduos infectados, sendo que 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Estima-se que 1,3 - 2 milhões de novos casos, dos quais 500 mil apresentam leishmaniose visceral (LV) e 1,5 milhões leishmaniose cutânea (LC), e 20.000 a 30.000 óbitos ocorram anualmente no mundo por leishmanioses (WHO, 2015).

Essas doenças são caracterizadas por um amplo espectro de manifestações clínicas que dependem da espécie do parasito, da patogenicidade e da resposta imunológica mediada por células do hospedeiro (Deane e Grimaldi, 1985; Grimaldi e Tesh, 1993; Ashford e Bates, 1998). No homem, a doença manifesta-se em formas clássicas descritas como: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea mucosa, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose dérmica pós-calazar e leishmaniose visceral, sendo esta última considerada a mais grave (Santos *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2009).

A leishmaniose visceral, é uma doença infecciosa grave, sistêmica e fatal se não é tratada. Atualmente 70 países são endêmicos para LV e mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul, Figura 1 (WHO, 2015).

Leishmaniose visceral no mundo, 2013.

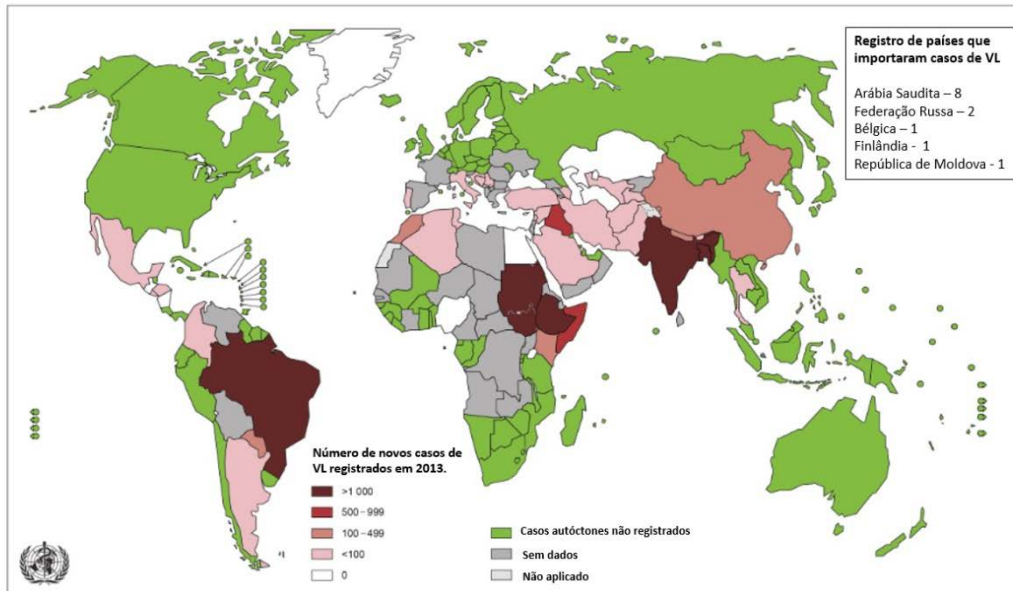


Figura 1. Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo, 2013.

Fonte: <http://gamapserver.WHO.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis2013VL.png>

No Brasil, a LV é uma doença endêmica e representa um grave problema de saúde pública, considerada uma zoonose de transmissão vetorial.

Tendo como agente etiológico o protozoário *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) cuja transmissão ocorre através do repasto sanguíneo da fêmea de *L. longipalpis* infectada (Ministério da Saúde, 2014). Inicialmente, a ocorrência da LV estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas encontra-se em franca expansão para grandes centros. Na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos de LV se concentravam na região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões, essa situação vem se modificando e, em 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos do país (Ministério da Saúde, 2014).

No Brasil, os dados dos últimos anos revelam, um processo de expansão e urbanização da LV com aumento no número de casos humanos e cães soropositivos

em cidades de médio e grande porte, como Palmas (TO), Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG) e Rio de Janeiro (RJ). No período de 2003 a 2012, a média anual de casos de LV foi de 3.565 casos e a incidência de 1,9 casos/100.000 habitantes (Gontijo, 2004; De Carvalho *et al.*, 2010; Ministério da Saúde, 2014).

Em Minas Gerais, a ocorrência de casos humanos de LV foi inicialmente registrada na década de 1940, na região Norte do Estado, e na década de 1960, na região do Vale do Rio Doce, localizada na região leste do Estado. Esta região foi considerada área endêmica, porém controlada após a implantação do programa de controle da LV na década de 1960, que se baseou na integração de três medidas de saúde pública: a distribuição gratuita do tratamento específico, o controle de reservatórios domésticos e o controle de vetores (Gomes e Costa, 2001). No início dos anos 2000 os municípios de Resplendor, Tumiritinga e Governador Valadares, registraram novamente casos de LV (Aversi-Ferreira *et al.*, 2008; Barata *et al.*, 2013).

A cidade de Governador Valadares, MG está localizada na região leste do Estado Minas Gerais, ao longo da bacia do Rio Doce, região sudeste do Brasil, com 260.396 habitantes, distribuídos dentro de 100 distritos urbanos e dez rurais. O clima local semi-úmido, tropical é caracterizado por uma temperatura média de 24,5°C, com apenas pequenos desvios durante o ano (Miranda *et al.*, 2011).

O primeiro registro de casos de LV em Governador Valadares foi nos anos 60 (Coelho e Falcão, 1966). Uma vez adotado o programa de controle da LV, o município foi considerado como pertencente a uma área "endêmica controlada". No entanto, no início dos anos 90, o programa foi interrompido e desde então a vigilância epidemiológica não tem sido realizado regularmente na região. Desta forma, depois de certo tempo de aplicação de tentativas de controle da LV no município de Governador Valadares, desde 2008 começaram a ser registrados novamente caso de LV em humanos e cães, assim em um estudo realizado com informações dos anos 2008 a 2011, foram reportados 86 casos autóctones de LV e 4,992 (30,2%) de cães soropositivos para LV dos 16,529 avaliados, em 35 distritos de Governador Valadares (Barata *et al.*, 2013). Em 2013 foram realizados 7.116 exames em cães, sendo 2.247 positivos para LV, e em humanos foram notificados 12 casos, com um óbito (Prefeitura Governador Valadares-Mg, 2014). Essa reaparição de casos de leishmaniose visceral

em humanos e cães pode ser explicado pelos diferentes fatores que contribuem com o ciclo de transmissão da doença como: grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores e por mais de uma centena de espécies de animais que podem se reservatórios. Também, deve se considerar que as circunstâncias da transmissão das leishmanioses são continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e comportamento humano (Gramiccia e Gradoni, 2005).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Os parasitos causadores das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania*, e apresentam em seu citoplasma uma organela característica da ordem Kinetoplastida, a qual é caracterizada por uma estrutura mitocondrial que contém DNA extranuclear, denominada cinetoplasto, formado por um maxicírculo e um minicírculo (Lainson e Shaw, 2005; Bates e Ashford, 2006).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, de acordo com o sitio de desenvolvimento do parasito no intestino do vetor: *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)* (Lainson *et al.*, 1977). As espécies do subgênero *L. (Leishmania)* se desenvolvem no intestino médio e anterior do vetor (região suprapilárica). Já as espécies do subgênero *L. (Viannia)* tem seu desenvolvimento no intestino posterior (região peripilarica) do vetor (Lainson *et al.*, 1987).

O agente etiológico responsável por causar a LV pertence ao subgênero *Leishmania*, apresentando dois espécies principais: *L. donovani*, e *L. infantum* (Melo, 2004). Nas Américas e Brasil a LV é causada pela *L. infantum*, espécie considerada sinonímia de *L. chagasi* (Mauricio *et al.*, 2001; Ministério da Saúde, 2014).

Leishmania spp. apresenta duas formas de desenvolvimento: promastigotas e amastigotas. A forma promastigota têm aparência fusiforme com a extremidade posterior mais delgada que a anterior (Figura 2A). Medem cerca de 10 a 30 µm de largura e de 3 a 5 µm de comprimento. Apresentam núcleo arredondado ou oval na região central do parasito, cinetoplasto subterminal localizado na região anterior do

parasito e flagelo longo localizado na parte posterior, de tamanho similar ao do corpo. As promastigotas estão presentes no trato digestivo do vetor (De Gopugui e Ruiz, 2003). As formas amastigotas apresentam um formato arredondado, com medidas de 3 - 5 μm de largura e 1.5 – 2.5 μm de comprimento, não apresenta flagelo livre (Figura 2B). Apresentam núcleo volumoso e esférico, geralmente excêntrico, e um cinetoplasto próximo ao núcleo de forma bacilar, onde é encontrado o DNA mitocondrial. A forma amastigota se multiplica preferencialmente dentro das células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) dos mamíferos (Connor *et al.*, 1997).

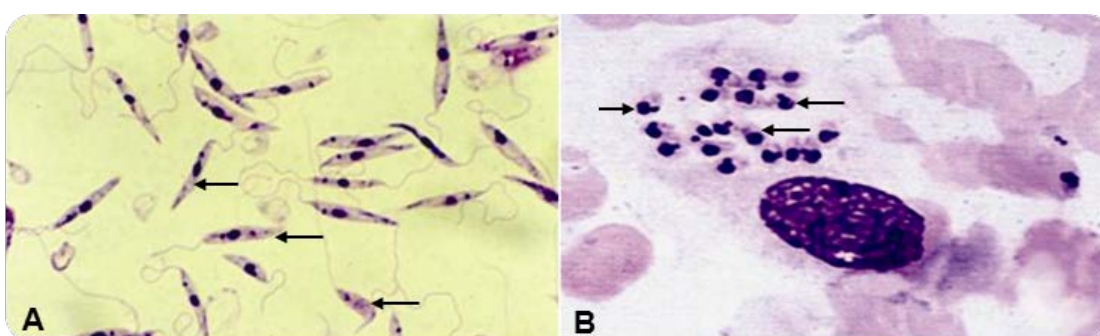


Figura 2. Morfologia da *Leishmania* spp..

A: promastigotas (setas) observados por microscopia com coloração Giemsa; B: amastigotas (setas) observados ao microscópio com coloração Giemsa.

Fonte: A: www.5equipo3d.blogspot.com; e B: www.sante.univ-nantes.fr.

1.3 VETORES

Os flebotomíneos transmissores de *Leishmania* são insetos hematófagos de 2 até 3 mm de comprimento, com asas eretas em forma de “V” e o corpo coberto de cerdas e são de coloração clara (castanho-claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voarem em pequenos saltos e pousarem com as asas entreabertas. Estes insetos, principalmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais, apresentam costumes noturnos e seu ciclo biológico é dado por uma fase de ovo, quatro estágios larvários, um de pupa e a forma adulta (Sandoval e Ferro, 1998; Ordeñana-Pilotos, 2005).

Os vetores de *Leishmania* pertencem a família *Psychodidae*, que inclui seis subfamílias (Young, 1979), das quais apenas duas são hematófagas (*Phlebotominae* e *Sycoracinae*). A subfamília *Phlebotominae* está dividida em seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo. *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os vetores comprovados da leishmaniose no Velho e Novo mundo, respectivamente (Wijeyaratne *et al.*, 1994) Figura 3.



Figura 3. *Lutzomyia* sp. vetor da leishmaniose.

Fonte: www.vectorbase.org/image-gallery/Lutzomyialongipalpis.

No Brasil os vetores responsáveis pela transmissão da LV são insetos, cujos nomes populares: “mosquito palha, tatuquira e birigui” dentre outras, variam de acordo com a região. A principal espécie responsável pela transmissão da LV no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis*, apresentando uma ampla distribuição geográfica e parece estar em expansão. Essa espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: norte, nordeste, sudeste e centro-oeste. Além dessa espécie, o *Lutzomyia cruzi*, também é conhecido como vetor em áreas específicas dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2014).

1.4 CICLO DE VIDA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético alternando entre um hospedeiro mamífero e insetos vetores (Dostálová e Volf, 2012). Durante a evolução de seu ciclo de vida, a *Leishmania* foi se adaptando a ambientes variados e heterogêneos em relação ao inseto vetor e hospedeiros vertebrados, que diferem no pH, temperatura e outros parâmetros (Volf *et al.*, 2008).

O ciclo de vida inicia no vector quando é infectado pela ingestão das formas amastigotas do parasito, no interior dos macrófagos e presentes na pele do hospedeiro infectado, após o repasto sanguíneo, realizado apenas pelas fêmeas dos flebotomíneos. No trato digestivo anterior do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação das formas amastigotas. Os amastigotas e diferenciam-se até o estado infectante de promastigotas metacíclicas e reproduzem-se por processos sucessivos de divisão binária.

O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas, quando o flebotomíneo infectado realiza um repasto sobre um novo hospedeiro suscetível, os promastigotas metacíclicas são inoculados juntamente com a saliva que contém moléculas com propriedades vasodilatadoras e anti-inflamatórias que facilitam o estabelecimento da infecção. Uma vez no hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos e diferenciam-se em amastigotas. Estas multiplicam-se intensamente por divisão binária até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas que são fagocitadas por novos macrófagos, em processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, propagando a doença no hospedeiro vertebrado (Folgueira e Requena, 2007). Na figura 4 pode-se observar o ciclo de vida das espécies de *Leishmania*.

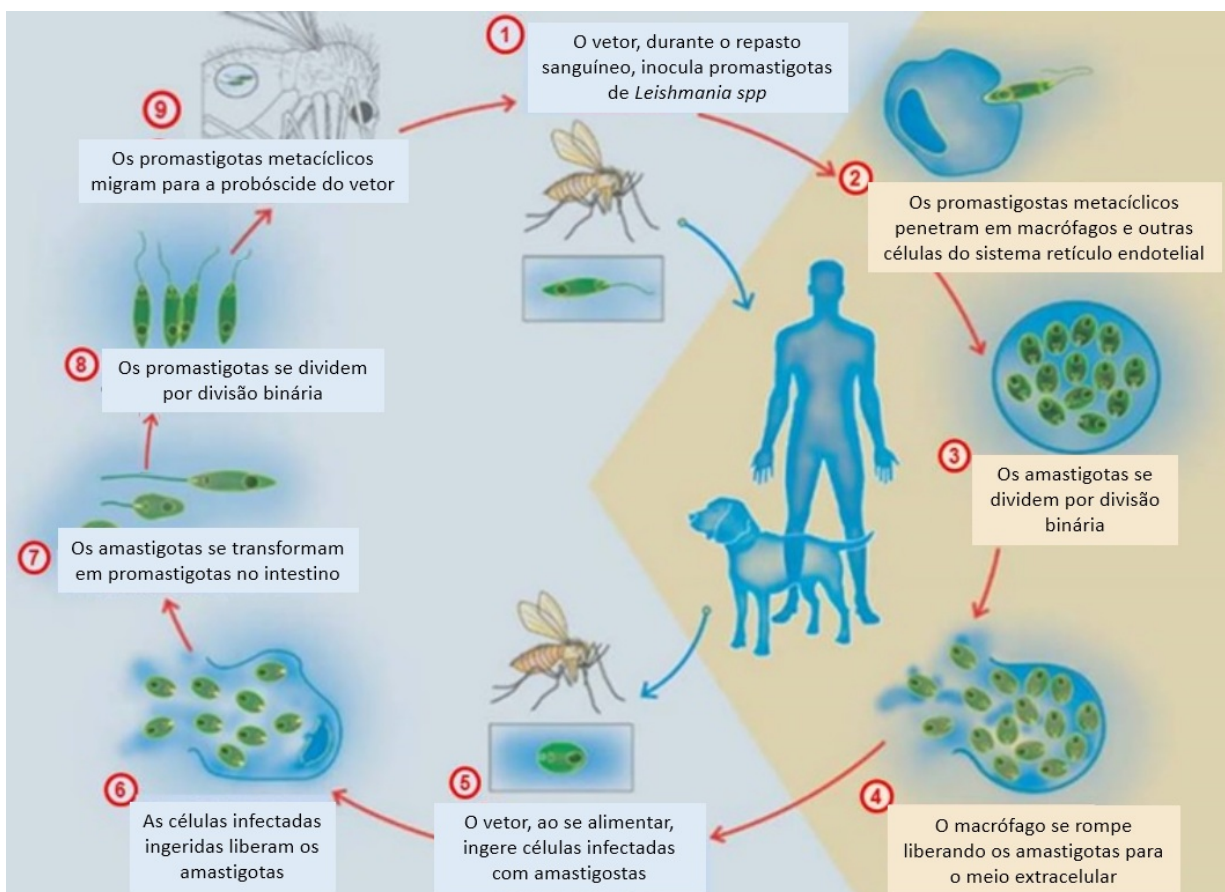


Figura 4. Ciclo de vida da *Leishmania* spp.
 Fonte: Adaptado de Montalvo Álvarez, A. M., (2011).

1.5 RESERVATÓRIO

Um animal considerado reservatório da doença tem seu sistema biológico capaz de garantir a existência do agente etiológico, e facilitar sua posterior transmissão. Além disso, o animal/reservatório deve estar presente em um número suficientemente alto no nicho ecológico da doença, tendo uma média de vida longa para garantir a fonte de alimentação para o inseto vetor. Desse modo, o animal e o vetor ficam intimamente relacionados, e ainda, o processo de infecção deve ser crônico de modo que os parasitos estejam em quantidades e em tempo suficientes para garantir a infecção dos vetores (Ashford, 1996; WHO, 2010).

No ambiente silvestre, os reservatórios de LV são principalmente raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) (Deane e Deane, 1955; Lainson *et al.*, 1990) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupiais*) (Corredor *et al.*, 1989; Sherlock, 1996).

Nas regiões rurais, periurbanas e urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da infecção para o homem (Molano *et al.*, 2003; Ramiro *et al.*, 2003). Evidências epidemiológicas indicam roedores em geral, como possíveis reservatórios peridomésticos de *L. infantum*, constituindo um importante elo entre o ambiente silvestre e o domiciliar (Corredor *et al.*, 1989). Além de roedores, gatos também têm sido encontrados naturalmente infectados (Figueiredo *et al.*, 2009), mas pouco se sabe sobre a importância epidemiológica destes animais como reservatórios da doença.

No Brasil, entre os canídeos que atuam como reservatório de maior importância, destacam-se as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) no ciclo silvestre e rural, e o cão doméstico (*Canis familiaris*) no ciclo urbano (De Camargo-Neves *et al.*, 2006; Ministério Da Saúde, 2006) Figura 5.

Os cães são considerados os principais reservatórios do agente etiológico da LV no ambiente doméstico devido à alta suscetibilidade desses animais à infecção e ao intenso parasitismo cutâneo e a sua presença nas residências (Deane e Deane, 1955; Quinnell e Courtenay, 2009), servindo assim como fonte de infecção para os vetores ali presentes, o que contribui para a manutenção e expansão do ciclo de transmissão em contextos domésticos e peridomicílio (Ashford, 1996; Courtenay *et al.*, 2014; Ministério da Saúde, 2014).



Figura 5. Reservatórios de *Leishmania* spp.

A) *D. albiventris*. B) *Proechimys* sp. C) *Canis familiaris*. Fonte: www.nhm.ac.uk/education/online-resources/a-day-in-the-life/post-16/2choose-what-to-study/index.html

1.6 LEISHMANIOSE VISCERAL E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A LV é uma zoonose crônica causada pelo protozoário *L. infantum* cuja transmissão ocorre através do repasto sanguíneo da fêmea do inseto flebotômico infectado (Pearson e De Queiroz, 1996). Além do homem, *L. infantum* também pode infectar canídeos silvestres e domésticos, marsupiais, roedores, felídeos, dentre outros (Dantas-Torres, 2007; Quinnell e Courtenay, 2009). A LV é uma doença de progressão lenta do sistema reticuloendotelial, que uma vez iniciado os sinais clínicos e na ausência do tratamento, pode causar a morte (WHO, 2010).

O ponto de inoculação que inicia a primo-infecção pode ser imperceptível ou pode ser observado uma lesão primária que não ulcera. Após a infecção aparece uma sintomatologia secundária, causada pela infecção de órgãos como baço, fígado, e medula óssea, caracterizado pelo surgimento de febre, leucopenia, hepatoesplenomegalia, diminuição do peso corporal e apetite, anemia com um prognóstico de morte muito comum na população infantil (WHO, 2010).

O período de incubação da LV é bastante variável tanto para o homem como para o cão. No homem, varia entre 10 dias a 24 meses, apresentando média de 2 a 6 meses. No cão, este período é ainda mais variável, sendo considerado a partir de 3 meses a vários anos, apresentando uma média de 3 a 7 meses (Ministério da Saúde, 2006; Baneth e Aroch, 2008). A visceralização da infecção pode iniciar-se em poucos meses ou levar vários anos para ocorrer (Gállego, 2004).

A LVC é uma doença sistêmica grave, de evolução lenta e início insidioso, causada principalmente, pela espécie *L. infantum*. Nas Américas, estima-se também, que milhões de cães estejam infectados, não só por *L. infantum*, mas também, por outras espécies de *Leishmania*, como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Hernández *et al.*, 2006; Dantas-Torres, 2009).

O desenvolvimento da doença nos cães pode variar, sendo marcado pelo pleomorfismo de sinais e certamente influenciado por fatores, tais como a suscetibilidade genética do animal, aspectos nutricionais, resposta imunológica desenvolvida pelo cão e por fatores intrínsecos do parasito e pela carga parasitária

inoculada. Dentre estes fatores também estão a coinfeção de outros parasitos ou imunossupressão (Aresu *et al.*, 2007; Cortese *et al.*, 2011; Palatnik-De-Sousa, 2012).

A LVC é o protótipo de uma disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário pela *Leishmania*, produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas. Os aspectos clínicos podem se apresentar de diversas maneiras, desde quadros subclínicos, com animais aparentemente saudáveis, até um estágio crônico generalizado, que fatalmente, leva à morte do animal, caso não seja tratado adequadamente (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Classicamente, a LVC inicial é acompanhada por febre, descamação e eczema, especialmente, no espelho nasal e na orelha. Muitas vezes apresentam pelos opacos, pequenas úlceras rasas localizadas, frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Com a evolução da doença é comum ocorrer linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose, especialmente na ponta do espelho nasal. Na fase final da infecção ocorre em geral, a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (Ministério Da Saúde, 2006).

Diferentes critérios são utilizados nas classificações clínicas dos animais com LVC. Mancianti *et al.*, (1988) incluem em suas classificações a adenopatia linfóide, diminuição do peso, opacidade dos pelos, alopecia, eczema furfuráceo, úlcera, onicogribose, ceratoconjuntivite, e rigidez dos membros posteriores, graduando os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, com base no exame físico (Mancianti *et al.*, 1988). Quinnell *et al.*, (2003) consideram alopecia, dermatite, úlcera, onicogribose, conjuntivite e linfadenopatia como alterações importantes e classificam os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Solano-Gallego *et al.*, (2009), por sua vez, classificou os animais em: cães com leishmaniose clínica, aqueles que apresentam sinais clínicos compatíveis e/ ou alterações clinicopatológicas e com infecção confirmada. Os cães com leishmaniose subclínica ou infecção subclínica; aqueles que não apresentam sinais clínicos ou alterações clinicopatológicas por testes laboratoriais de rotina (hemograma, perfil

bioquímico e urinálise), porém, que tenham a infecção confirmada. Por outro lado, Solano et al., (2011) classificou os indivíduos assintomáticos como aqueles que possuem ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*, os oligossintomáticos por apresentarem no máximo três sinais clínicos, e os sintomáticos como aqueles com todos ou alguns sinais mais comuns da doença, com base no exame físico (Solano-Gallego et al., 2011).

Os principais sinais clínicos da LVC incluem alterações dermatológicas (alopecia, dermatite furfurácea, úlceras cutâneas e descamações), bem como, nódulos, perda de apetite, perda de peso moderada ou grave e comumente apresenta caquexia, pelos opacos, onicogribose, ceratoconjuntivite, e hepatoesplenomegalia (Solano-Gallego et al., 2011) (Figura 6). Algumas formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem se distribuir em vários outros tecidos dos cães podendo resultar em manifestações clínicas atípicas (Tafari et al., 2004), como desordens neurológicas (Blavier et al., 2001), cardiopatias, pneumopatias (Torrent et al., 2005; Silvestrini et al., 2012), alterações gastrointestinais (Adamama-Moraitou et al., 2007), bem como, lesões no sistema genital (Diniz et al., 2005; Benites et al., 2011).

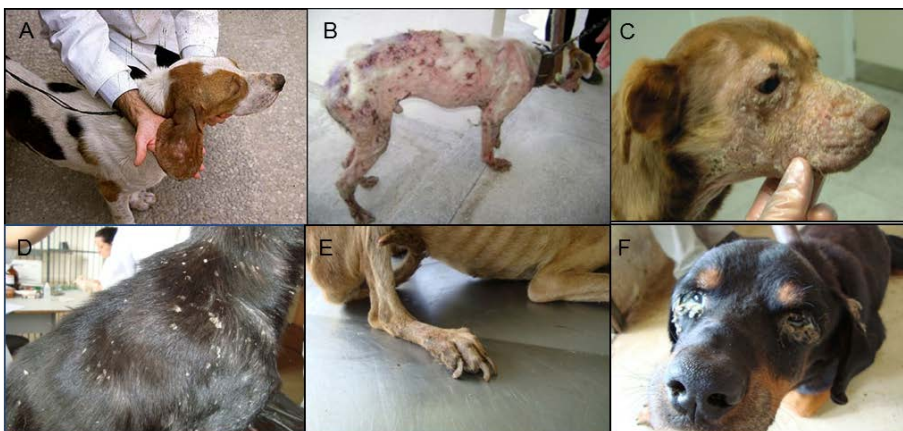


Figura 6. Sinais clínicos da leishmaniose visceral canina.

(A) Lesões ulceradas (orelha e face) e nódulos, (B) emagrecimento acentuado e alopecia, (C) descamações, (D) pelos opacos, (E) onicogribose, (F) ceratoconjuntivite. **Fonte:** Secretaria Municipal de Saúde Departamento de Vigilância em Saúde Centro de Controle de Zoonoses Governador Valadares – MG 2014.

1.7 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A imunidade contra a *Leishmania* é mediada por respostas imunes inata e adaptativa (Kedzierski, 2010). O parasito é capaz de infectar uma variedade de células hospedeiras e manipular vias de sinalização que estão envolvidos na morte de patógenos ou em estimulação de respostas imunes (Shio *et al.*, 2012). Na imunidade inata os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da infecção, também representando as primeiras células infectadas. Eles servem como células hospedeiras intermediárias, ajudando o parasito a entrar silenciosamente nos macrófagos (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Em geral, a *Leishmania* entra nos macrófagos através de um processo clássico mediado por receptores. Este inclui várias moléculas do parasito e receptores de superfície dos macrófagos tais como os receptores para o complemento (CR) 1, CR3 (Mac-1), receptor de fibronectina e o receptor de manose-fucose (MR). Estes receptores reconhecem estruturas específicas sobre a superfície de promastigotas, que incluem lipofosfoglycanos de superfície (GLP), a protease maior de superfície (GP63), e proteofosfoglycanos (PPG) de promastigotas de *L. major* (Liu e Uzonna, 2012).

Os macrófagos e as células dendríticas também desempenham um papel essencial na susceptibilidade ou resistência contra a infecção por *Leishmania* (Liu e Uzonna, 2012; Mccall *et al.*, 2013).

O controle da leishmaniose depende da resposta imune mediada por célula (Murray, 1997), principalmente por células T CD4+ e as células *natural killer*, comumente conhecidas como células NK, produtoras de IFN- γ . As células NK conectam a resposta inata para o desenvolvimento de uma imunidade celular adaptativa eficiente. Quando estimuladas por IL-12 (produzidas pelas células apresentadoras de antígenos), as células NK produzem IFN- γ , que induz maior produção de NO, responsável por parte da atividade microbicida dos macrófagos (Scharton-Kersten *et al.*, 1995; Bogdan *et al.*, 2000; Brandonisio *et al.*, 2002). (TNF- α) e as interleucinas-2 e -12 (IL-2 e IL-12) (Pinelli *et al.*, 1994; Pinelli *et al.*, 1999; Bhattacharya e Ali, 2013). Após a fagocitose dos protozoários, são ativados

mecanismos intrínsecos capazes de promover a resistência à ação de enzimas hidrolíticas e espécies reativas do oxigênio (Paltrinieri *et al.*, 2010; Van Assche *et al.*, 2011).

A sobrevivência do parasito é baseada em mecanismos de evasão, tais como a modulação da atividade leishmanicida dos macrófagos pela produção do fator de crescimento tumoral (TGF- β) com inibição da ação de interferon gama (IFN- γ), redução da expressão das moléculas MHC de classe II e a supressão da produção de óxido nítrico (NO) (Kemp *et al.*, 1993). Além disso, tem sido demonstrado que a IL-10, citocina imunorregulatória produzida por macrófagos e linfócitos, também contribui para a sobrevivência do parasito dentro destas células, sendo considerada um forte fator da patogênese na LV, inibindo a síntese das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), produzidas pelos macrófagos (De Waal Malefyt, Rene *et al.*, 1991). Além disso, a IL-10 é capaz de reduzir a função apresentadora de antígenos de macrófagos por diminuição da expressão de moléculas MHC de classe II (De Waal Malefyt, René *et al.*, 1991).

Similar a leishmaniose visceral humana, o surgimento dos sinais clínicos em cães suscetíveis deve-se a uma resposta imune exacerbada do tipo Th2, com proliferação de linfócitos B e produção das citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), IL-5, IL-6 e IL-10. Este microambiente favorece uma marcada resposta humoral, a qual pode promover a formação de imunocomplexos (Barbieri, 2006). Estes imunocomplexos são responsáveis pela grande variedade de sinais clínicos presentes na LVC, por se depositarem em vários órgãos e tecidos dos cães, levando a respostas inflamatórias intensas (Ciaramella e Corona, 2003).

Desse modo, em cães, a LV está frequentemente associada com uma resposta imunológica humoral. O nível de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* detectadas em cães sintomáticos são maiores que os detectados em cães infectados assintomáticos (Reis *et al.*, 2006). Nos cães, quatro subclasses de IgG foram descritas, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Mazza *et al.*, 1993), sendo as duas primeiras as mais estudadas. Uma resposta imune com predominância de células Th1 é caracterizada pela produção mais acentuada de imunoglobulinas da subclasse IgG2, associadas à resistência à doença com quadro clínico menos grave. Por outro lado, a geração de

uma resposta imune Th2 influencia a produção de imunoglobulinas da subclasse IgG1, associadas à progressão da doença e um quadro clínico mais acentuado (Pinelli *et al.*, 1994; Solano-Gallego, Laia *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Reis *et al.* (2006); Dos- Santos *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2013) reportaram uma forte associação entre os níveis de imunoglobulinas, o estado clínico e a densidade de parasitos no tecido, pela correlação positiva entre os títulos de IgG e IgG2 e a carga parasitaria nos linfonodos de cães infectados (Dos-Santos *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013). Além disso, vários estudos mostram aumento nos níveis de IgG2 anti-*Leishmania* em cães infectados (Deplazes *et al.*, 1995; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1999; Leandro *et al.*, 2001; Solano-Gallego, L *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2005).

A identificação ou presença do perfil de IgG1 em cães é mais controversa (Nieto *et al.*, 1999; Solano-Gallego, L *et al.*, 2001; Vercosa *et al.*, 2008). Costa *et al.* 2013 observaram aumento na concentração de IgG2 muito similar aos níveis de IgG total, em contraste, os níveis de IgG1 se apresentaram mais variáveis durante a infecção (Costa *et al.*, 2013). Alguns autores afirmam que o aumento de IgG1 está relacionado com a manifestação clínica severa nos cães, enquanto que elevados títulos de IgG2 estão associados aos cães naturalmente resistentes à doença ou protegidos pela vacina (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2011).

Além disso, vários estudos tem mostrado que a resposta imune tipo Th1 está associada a predominância de anticorpos IgG2 e a produção de IFN- γ , contribuindo, assim, com o controle da doença (Asl *et al.*, 2013; Cruz-Chan *et al.*, 2014). Outros trabalhos mostraram que altos níveis de IgG2 estão associados com a doença assintomática e altos níveis de IgG1 com a doença ativa. Apesar dos resultados controversos, ainda persiste a proposta que a análise comparada de níveis séricos de subclasses de IgG possa representar um método indireto e fácil de identificação de cães resistentes ou suscetíveis à doença (Deplazes *et al.*, 1995; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Iniesta *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006; Asl *et al.*, 2013).

1.8 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Para o diagnóstico da LVC, várias estratégias têm sido estabelecidas, visto que os achados clínicos não são patognomônicos. Desta forma O diagnóstico clínico, isoladamente, não é suficiente para identificar um cão infectado, portanto, o diagnóstico é baseado em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares.

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença (Ferrer, 1999). Os achados clínicos da LVC são comuns a outras doenças, tornando necessário o diagnóstico laboratorial ou parasitológico para a confirmação da doença (Singh e Sivakumar, 2003). Por outro lado, enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, a prevalência da doença clínica ocorre entre 3% e 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, o que dificulta o diagnóstico. O período de incubação na LVC é bastante variável, sendo de três meses a vários anos, e os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida (Gomes *et al.*, 2008). O teste diagnóstico mais confiável é a observação direta do parasito em esfregaços de medula óssea ou linfonodos, porém muitas vezes é impossível de detectar o parasito.

1.8.1 MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

O exame parasitológico serve para demonstração direta do parasito, é o método de certeza, invasivo e baseia-se na demonstração do parasito em material biológico obtido através de punção hepática, de linfonodos, baço, medula óssea e biópsia ou escarificação da pele. Possui especificidade de 100%, e a sensibilidade dependente do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos. É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo

é dado pela observação direta de formas de amastigotas (Ministério da Saúde, 2006), sendo considerado como padrão ouro para o diagnóstico da LVC (Tafuri *et al.*, 2001).

Dentre os métodos de detecção direta do parasito, os mais utilizados são a microscopia e a cultura. A microscopia consiste na observação direta da *Leishmania*, na forma amastigota livre ou no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, em lâminas de microscopia, fixadas em metanol e coradas com o Giemsa e o Leishman. É uma forma segura, simples, rápida e pouco traumática para o diagnóstico da doença. Apesar de ser rápida e ter um custo baixo, a principal desvantagem da microscopia é o fato do bom resultado depender de pessoal bem treinado. A especificidade desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador (Baneth e Aroch, 2008; Gomes-Silva *et al.*, 2008). Porém, a análise direta por microscopia ótica de amostras de aspirado de medula óssea ou linfonodo pode produzir resultados falso-negativos devido à baixa carga parasitária que ocorre principalmente em cães assintomáticos (Chulay e Bryceson, 1983). Nestes animais, a sensibilidade deste método é menor que 30% (Saridomichelakis *et al.*, 2005).

Quando os parasitos não são visíveis utiliza-se métodos parasitológicos indiretos, como, cultura a partir de aspirados de medula óssea e de linfonodos, a cultura do parasito também tem sido considerada como método padrão ouro para o diagnóstico da doença (Sundar e Rai, 2002b; Carvalho *et al.*, 2009). A cultura representa um método auxiliar para a técnica de diagnóstico direto, uma vez que, permite o isolamento do parasito e facilita a sua detecção. Na cultura, as formas promastigotas são cultivadas em meios específicos, como o Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) ou o RPMI-1640 (Aksoy Gokmen *et al.*, 2015).

No entanto, embora ofereça uma alta especificidade, já que permite a identificação do parasito, a sensibilidade deste método é muito baixa. As desvantagens da técnica são a demanda de muito tempo para liberação dos resultados, a dificuldade em isolar parasitos selvagens no meio de cultura, a dependência do número de parasitos presentes no material e as possíveis contaminações microbianas que inviabilizam a obtenção do resultado, além de ser dependente da experiência do

observador (Moreira *et al.*, 2007). A inoculação em animais experimentais como pode ser um método muito útil no caso de cepas de difícil crescimento ou inóculos contaminados (Cuba Cuba, 2000).

1.8.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANIA

Devido a problemas inerentes à pesquisa direta do parasito, métodos indiretos foram desenvolvidos para o diagnóstico da LVC, como a sorologia. Técnicas sorológicas são comumente empregadas no diagnóstico da LVC (Gomes *et al.*, 2008). Dentre elas incluem-se o ensaio imunoenzimático (ELISA), o ensaio de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e o teste rápido imunocromatográfico, sendo o RIFI e o ELISA os mais utilizados tanto na prática clínica quanto em inquéritos epidemiológicos e populacionais (Morales-Yuste *et al.*, 2012).

1.8.2.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI

A RIFI é um teste em que os anticorpos anti-IgG marcados com fluoróforos reagem com parasitos que foram fixados sobre uma placa, indicada como referência pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico sorológico da LVC (Gramiccia e Gradoni, 2005). O material recomendado para a realização do RIFI é o soro sanguíneo e o resultado considerado sororreagente é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40 (Ministério da Saúde, 2006).

A RIFI apresenta algumas desvantagens, entre as quais a dificuldade de padronização, assim como para interpretação dos resultados, já que está última

depende muito da experiência de quem realiza a leitura, portanto, a reprodutibilidade entre laboratórios varia. No entanto, apesar destas limitações, a RIFI continua sendo usada como um método de diagnóstico para o processamento de soros caninos, que é talvez, o teste mais amplamente utilizado para o diagnóstico da LVC e em alguns casos utilizado como um teste de confirmação. A sensibilidade e especificidade da RIFI varia com intervalos de 68 a 100% e 60 a 90%, respectivamente (Ferroglio *et al.*, 2006; Lira *et al.*, 2006).

O RIFI é um dos testes mais sensíveis, no entanto, um resultado negativo não exclui que o animal esteja afetado, uma vez que há animais que demoram algum tempo a desenvolver a resposta humoral e a atingir títulos de anticorpos considerados positivos. Assim, em animais clinicamente suspeitos ou com resultados duvidosos deve-se repetir o teste passadas 4 a 6 semanas ou recorrer a outro tipo de teste (Ministério Da Saúde, 2006).

1.8.2.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes em sobrenadante de cultura ou em amostra de soro, com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* spp. obtidos a partir de cultura *in vitro*, ligados a suportes sólidos. Este antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos são adicionados posteriormente. O ELISA é um método amplamente utilizado no diagnóstico da LVC, sendo a segunda técnica mais utilizada por pesquisadores europeus (Ministério da Saúde, 2006).

O ELISA tem como vantagens a facilidade para examinar grande número de animais em curto período de tempo e a versatilidade, sendo facilmente adaptável para ser usado com diversos tipos de antígenos, tais como do citoplasma total, antígenos purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes (Maia e Campino, 2008). Porém, apresenta limitações importantes para o diagnóstico da LVC, incluindo alterações na sensibilidade e especificidade, que são bastante influenciadas pelo tipo de antígeno utilizado (Sundar e Rai, 2002a). Além disso, têm sido demonstrado

resultados falsos-positivos, devido a reação cruzada com outros microrganismos como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma caninum*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis* (Ferreira Ede *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2012).

Alguns autores ressaltam vantagens na utilização de antígenos recombinantes na técnica do ELISA, ao comparar a utilização de antígenos recombinantes (purificados) com antígenos brutos, obtendo maior sensibilidade com a utilização de antígenos purificados (Carvalho *et al.*, 2002). Tais questões têm norteado muitos estudos na busca por antígenos adequados ao diagnóstico da LVC nas áreas endêmicas.

Os antígenos recombinantes K39 (rK39) e K26 (rK26) de *L. infantum*, parecem ser os mais adequados para o diagnóstico da LVC (Reithinger *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2003; Otranto *et al.*, 2004; Mettler *et al.*, 2005). O antígeno rK39 de *L. infantum*, uma sequência repetitiva de 39 aminoácidos imunodominantes, se caracteriza por ser bastante conservado entre as espécies de *Leishmania* viscero-trópicas, sendo largamente utilizado no diagnóstico da LVC. O antígeno rK39 apresenta uma boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LVC e LVH, quando empregado em testes sorológicos de ELISA (Burns *et al.*, 1993; Badaró *et al.*, 1996; Scalone *et al.*, 2002). Estes autores realizaram estudos com o antígeno rK39 utilizando a técnica do ELISA e verificaram que este foi mais sensível quando avaliados cães sintomáticos (100%) em comparação a cães assintomáticos (66%).

O antígeno rK26 é uma proteína hidrófila de 247 aminoácidos, com uma massa molecular prevista de 26,1 kDa. Uma característica interessante do rK26 é a presença de 11 repetições de uma sequência de 14 aminoácidos. A proteína K26 contém um potencial sítio de glicosilação, 12 potenciais sítios de fosforilação de proteína quinase C (PKC) e um local de fosforilação caseína quinase 2 (CK2). A proteína rK26 foi identificada e caracterizada de *L. infantum*, sendo específica na detecção de anticorpos em soros de pacientes infectados com LV (Bhatia *et al.*, 1999). O antígeno rK26, empregado em testes de ELISA, mostrou ter maior sensibilidade comparado ao antígeno rK39, especialmente para a detecção de LV na fase inicial da infecção (Sundar e Rai, 2002a; Rosati *et al.*, 2003). Além disso, é usado no diagnóstico da LVC apresentando uma sensibilidade de 100 e 98% para cães sintomáticos e assintomáticos respectivamente (Porrozzi *et al.*, 2007).

Métodos de diagnósticos precisos para LV, com elevada sensibilidade e especificidade, rápidos e de fácil realização e interpretação, que forneçam resultados rápidos, que independem de infraestrutura laboratorial e de profissionais especializados, tem sido cada vez mais procurados (Dourado *et al.*, 2008).

1.8.2.3 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

O diagnóstico da LVC é complexo, devido à presença de sinais clínicos não específicos e a presença de cães assintomáticos. Portanto, novos métodos baseados em imunocromatografia tem sido estabelecidos para o sorodiagnóstico da LVC apresentando bons resultados (Rosati *et al.*, 2003).

Estes métodos oferecem vantagens, já que são testes rápidos e de fácil aplicação em áreas de campo, além de serem mais específicos, por utilizarem tecnologia de DNA recombinante, que facilita a produção em grande escala e a reprodutibilidade de resultados em diferentes regiões. Além disso, o desempenho da sensibilidade e especificidade destes testes têm se mostrado mais elevada em relação aos testes sorológicos convencionais.

Estudos sobre novos métodos de diagnóstico objetivando a melhora da sensibilidade para a LV têm sido conduzidos. Proteínas recombinantes como a rK9, rK39 e rK26 têm sido utilizadas como antígenos para desenvolver testes rápidos imunocromatográficos, como também a utilização de proteínas extraídas de bactérias, tais como as proteínas A, que fazem parte dos reagentes marcadores dos testes para o diagnóstico da LV. A proteína A é extraída da bactéria *Staphylococcus aureus*, apresenta afinidade pelo ouro coloidal, e por uma região comum às moléculas das imunoglobulinas (segmento Fc), especialmente a IgG (Mongodin *et al.*, 2000; Iijima *et al.*, 2011; Queiroz Júnior, 2011).

O Instituto de Biotecnológicos da Fiocruz (Biomanguinhos) vem desenvolvendo testes imunocromatográficos voltados para o diagnóstico da LVC. Inicialmente, foi desenvolvido o teste denominado “lateral flow” (LF), mas sua tecnologia tem sido

substituída pela técnica de imunocromatografia Dual Path Platform” (TR DPP®LVC - Biomanguinhos) (DPP) (Schubach *et al.*, 2014).

O DPP, é uma inovadora tecnologia de imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte americana Chembio® e a empresa nacional Bio-Manguinhos®, Rio de Janeiro, Brasil (Queiroz Júnior, 2011). Baseado na utilização do antígeno recombinante rK28 (fusão das proteínas rK9, rK26 e rK39) específico de *Leishmania* ligado a uma membrana de nitrocelulose de um lado, e de outro a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal (Funed, 2013). Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com o antígeno rK28, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor. As vantagens são rapidez de execução, simplicidade e fácil uso, podendo ser realizado em campo (Grimaldi *et al.*, 2012; Coura-Vital *et al.*, 2014).

Recentemente, uma nova proteína imunodominante, rKLO8 da cepa *L. donovani* do Sudão, foi produzida e purificada (Abass *et al.*, 2013) usando *E. coli* M15 transformadas com o plasmídeo pQE41/KLO8. Esta proteína tem sido usada na detecção de anticorpos em pacientes com LV. As amostras de soros foram avaliadas mediante ELISA para pesquisa de anticorpos específicos contra rKLO8, sendo posteriormente comparadas com os dados obtidos por ELISA para anticorpos específicos contra o antígeno rK39 e outros dois kits comerciais. Foi observado que os soros de pacientes apresentaram uma maior reatividade com o antígeno rKLO8 em comparação com o antígeno rK39, rKLO8 mostrou uma maior sensibilidade e especificidade (98,1% e 96,1%, respectivamente) em comparação com o ELISA-rK39 que apresentou uma sensibilidade de 96,2% e especificidade de 94,8% (Abass *et al.*, 2013). Portanto, a análise da presença de marcadores sorológicos aplicáveis ao diagnóstico é de grande importância no desenvolvimento de estratégias de controle da leishmaniose.

Exames complementares como os testes moleculares (PCR), histopatológicos e imunohistoquímicos estão disponíveis nos laboratórios de Referência Nacional para elucidação de diagnóstico e caracterização de espécie (Ministério da Saúde, 2014).

1.8.3 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE DNA PARASITÁRIO

Dentre as mais modernas técnicas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, destacam-se as técnicas moleculares. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a que mais vem sendo utilizada em trabalhos sobre diagnóstico da LVC (Solano-Gallego, L. *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2007). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicas presentes no parasita, sendo um método bastante sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp em ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (Gomes *et al.*, 2008).

Com os avanços nas técnicas moleculares, tem sido relatado grande variedade de marcadores genéticos, sendo a PCR um importante método de diagnóstico molecular, potente e sensível para detectar *Leishmania* diretamente em amostras clínicas. Entretanto, sua sensibilidade pode variar amplamente, dependendo do tempo de infecção e da carga parasitária. A PCR também é utilizada para a detecção e caracterização de diferentes espécies dos parasitos (Degrave *et al.*, 1994; Wilson, 1995; Ramos *et al.*, 2012).

Uma ampla variação na sensibilidade da PCR é observada entre os diferentes estudos, que pode ser explicada pela distribuição heterogênea do parasito em cada tecido (Maia *et al.*, 2009), assim como a eficácia da técnica depende do primer, material biológico, e do método utilizado para extração do DNA (Alvar *et al.*, 2004; Maia e Campino, 2008), logo, o resultado negativo no diagnóstico por PCR de um cão com suspeita clínica, não é suficiente para afastar a possibilidade de infecção.

Considerando a prevalência crescente da LVC, o desenvolvimento e aplicação de técnicas de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade é fundamental para controlar esta doença (Alvar *et al.*, 2004). Além disso, a falha de métodos convencionais para diagnosticar com precisão cães assintomáticos, quando comparados com técnicas de biologia molecular, tem sido relatada (Solano-Gallego, L. *et al.*, 2001).

Além da PCR convencional, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é outro método molecular utilizado no diagnóstico de doenças infecciosas. A qPCR permite a monitorização das amplificações das sequências específicas de DNA durante o decorrer da reação e possibilita a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado na PCR convencional (Maia e Campino, 2008; De Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009). Como uma das características da infecção por *Leishmania* spp é o animal apresentar parasitos em latência, as abordagens quantitativas são convenientes para elucidar o status de positivos dos cães de áreas endêmicas, monitorando a carga parasitária e sua resposta ao tratamento, bem como para acompanhar o desenvolvimento de novas vacinas (Manna *et al.*, 2004; Mary *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006).

Os resultados da qPCR tornam-se extremamente importantes quando se busca um diagnóstico sensível e rápido, particularmente em casos onde os diagnósticos sorológicos são duvidosos. Assim, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são inúmeras e incluem, a redução do tempo de ensaio, redução do risco de contaminação, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade, capacidade quantitativa e melhora da sensibilidade (Gomes *et al.*, 2008; De Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009).

Entretanto, em estudo recente, a sensibilidade obtida na PCR convencional (88,9%) realizada a partir de fragmentos de baço foi maior quando comparada a encontrada na PCR em tempo real (83,3%), demonstrando que nem sempre a sensibilidade da técnica quantitativa é superior (Solcà *et al.*, 2012). Contudo a PCR em tempo real é muito útil no diagnóstico da leishmaniose canina, pois permite que a carga parasitária seja monitorada durante e depois do tratamento em diferentes amostras, proporcionando a previsão de recidiva da doença associada a carga parasitária residual (Maia e Campino, 2008).

Entretanto, estas técnicas moleculares têm um custo consideravelmente maior que as técnicas sorológicas (Maia *et al.*, 2009), dificultando a sua utilização de forma rotineira pelos laboratórios oficiais das leishmanioses, por requerer laboratórios bem equipados e habilidade técnica (Ministério Da Saúde, 2006).

1.9 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Existe um número limitado de agentes quimioterapêuticos disponíveis para o tratamento das leishmanioses caninas, entre eles, estão alopurinol, aminosidina, pentamidina, glucantime, domperidona (Pennisi *et al.*, 2008; Gómez-Ochoa *et al.*, 2009; Trigo *et al.*, 2010; Sabaté *et al.*, 2014). Recentemente a miltefosina foi lançada para uso veterinário nos países do Mediterrâneo e no Brasil ((Dujardin *et al.*, 2008). Apesar do tratamento recuperar clinicamente o animal, com concomitante diminuição da carga parasitária e dos títulos de anticorpos circulantes, observado em uma grande porcentagem de cães tratados, não garante que esses estejam livres da infecção, escondendo assim o problema epidemiológico no ciclo da transmissão da doença (WHO, 2010).

O tratamento de cães infectados, prática comum em países da União Européia, poderia ser uma alternativa a contribuir para o controle da LV, uma vez que reduz significativamente a carga parasitária e a infectividade de cães para flebotomíneos (Ribeiro *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011). No Brasil, o tratamento da LVC é um tema bastante polêmico e controverso. É defendido pela ANCLIVEPA (Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais) e proibido pelo Ministério da Saúde. O Ministério da Saúde em parceria com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicaram em 11 de julho de 2008 a Portaria Interministerial nº 1426 que “proíbe” o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – “MAPA” (Ministério da Saúde, 2008). Segundo nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, foi autorizado o registro do produto importado Milteforan (princípio ativo Miltefosina) no MAPA, porém o medicamento ainda não está disponível no Brasil. Essa mesma nota ressalta que o tratamento de cães com LVC não se configura uma medida de saúde pública para o controle da doença. Assim, destaca-se que o animal tratado continua como reservatório, não sendo, assim, a solução do problema (Conselho Regional De Medicina Veterinária Do Rio Grande Do Sul, 2016). Considerando isso, e a necessidade de mais pesquisas sobre o tratamento canino, principalmente no que se

refere à cura clínica e parasitológica, associado à polêmica da eutanásia, a vacina surge como uma alternativa para o controle (Gontijo, 2004).

Atualmente no Brasil, existem no mercado uma vacina contra a LVC, Leish-tec®. A vacina preconiza o exame sorológico antes da vacinação para comprovação da soronegatividade e o mesmo protocolo vacinal que compreende a aplicação de três doses, respeitando-se um intervalo de 21 dias entre elas e revacinação anual. A Leish-tec® é uma vacina recombinante que utiliza o antígeno A2, uma proteína específica do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*), e tem como adjuvante a saponina (Junqueira, 2008). A proposta desta vacina é induzir resposta imune celular protetora contra a infecção em cães, devido à capacidade imunoestimulante do antígeno vacinal recombinante A2 (rA2) (Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). Mas ensaios clínicos e epidemiológicos ainda são necessários para provar a sua eficácia (Oliveira *et al.*, 2008).

Em estudo da fase II, cães foram imunizados com a Leish-Tec®, verificando-se um aumento significativo de IFN- γ e baixos níveis de interleucina 10 (IL-10) nos animais vacinados. Além disso, foi demonstrado que seis meses após a infecção experimental houve diferença significativa para IgG2, com aumento nos níveis de IgG2, mas não para IgG1, entre cães vacinados que não foram infectados e em cães vacinados que foram infectados. Portanto a imunização com a proteína recombinante A2 induz uma proteção parcial nos cães (Fernandes *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram que as titulações das subclasses de IgG podem ser utilizadas como marcadores para avaliar a susceptibilidade ou resistência a esta doença infecciosa crônica letal em cães (Asl *et al.*, 2013).

O controle da LV no Brasil está regulamentado pelo Decreto Federal Nº 51.838, de 14 de março de 1963, que dispõem sobre normas técnicas para uma rigorosa vigilância epidemiológica. Estão dispostos em seu Art. 1º que o combate às leishmanioses tem por objetivo a interrupção da transmissão da doença do animal ao homem, que deverão ser realizados inquéritos extensivos para a descoberta de cães infectados e ainda, em seu Art. 9º, que cães encontrados doentes deverão ser sacrificados (Secretaria de Estado de Saúde, 2015). Cabe destacar que as

recomendações do Ministério da Saúde do Brasil estão de acordo com as preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), dispostas em diversos documentos, resultantes de consensos de especialistas internacionais e baseados em evidências científicas, como, por exemplo, o Relatório do Comitê de especialistas da OMS (WHO, 2010). Por outro lado, o controle da LV está associado à uma rigorosa vigilância epidemiológica: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; atividades de educação em saúde da comunidade; combate ao vetor para reduzir a sua densidade populacional, utilizando-se inseticidas residuais como cipermetrina e deltametrina aspergidos no domicílio e peridomicílio. Mesmo com essas medidas, a prática de eutanásia dos cães é comumente utilizada de forma isolada e tem sido o único método de controle da LVC utilizado pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil (Ministério da Saúde, 2006).

Além ser uma medida onerosa, a eutanásia de cães encontra resistência ética e emocional, sendo questionada sua eficiência na redução da incidência da doença humana (Courtenay *et al.*, 2002; Maia e Campino, 2008). Os cães eutanasiados são imediatamente substituídos por filhotes que são altamente suscetíveis ao protozoário, adquirindo rapidamente a infecção, num período de aproximadamente dois meses, quando introduzidos em áreas conhecidamente endêmicas (Dye, 1996). Assim, estudos para definir a eficácia desta prática no controle da LV sempre suscitam dúvidas a respeito da sustentabilidade desta estratégia (Ashford e Bates, 1998; Souza *et al.*, 2008).

Demonstrada por algumas pesquisas realizadas na Europa, a utilização de coleiras impregnadas com inseticida deltametrina a 4% pode reduzir o risco do cão contrair a leishmaniose, e diminuir o tempo de vida dos flebotomíneos, diminuindo conseqüentemente, a propagação da doença (Reithinger *et al.*, 2004; Travi, 2014). Para a realidade brasileira, o custo inviabiliza a utilização da coleira para a maior parte da população de áreas endêmicas, sendo sua manutenção uma prática de difícil aplicação.

1.10 DIAGNÓSTICO ATUAL DA LVC NO BRASIL

Apesar dos inúmeros testes de diagnóstico disponíveis para a LVC, o tema continua representando um desafio, pois não existe um único método capaz de obter sensibilidade e especificidade máximas, de forma a permitir um diagnóstico preciso da doença (Ministério Da Saúde, 2006; 2014). Além disso, o efetivo controle da LVC no Brasil enfrenta entraves que se iniciam no diagnóstico da doença (Ministério da Saúde, 2006), baseado principalmente em três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas; alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível. Afirma-se também que o diagnóstico parasitológico é o método de certeza e baseia-se na demonstração do parasito obtido de material biológico de punções hepáticas, linfonodos, esplênica, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele. O mesmo manual declara, entretanto, que tais técnicas são impraticáveis em programas de saúde pública (Ministério Da Saúde, 2006), evidenciando assim que muitos cães são eutanasiados sem a confirmação do diagnóstico.

No Brasil, desde dezembro de 2011, foi preconizado pela Nota Técnica do Ministério da Saúde (MS), Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis o uso do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®-Bio-Manguinhos como método de triagem nos inquéritos caninos de LVC, sendo combinado ao Kit EIE Bio-Manguinhos (Ensaio Imunoenzimático), como teste confirmatório, que emprega os antígenos totais de *L. major* e exame parasitológico (certeza da positividade) (Funed, 2013; Ministério da Saúde, 2014).

O DPP é o único teste de diagnóstico da LVC disponível no mercado atual que oferece resultado em 15 minutos. É de fácil manipulação, pois não necessita de pessoal especializado para a sua execução, é de baixo custo e pode ser realizado em campo. O DPP possui alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico da LVC em soro, plasma ou sangue total.

Em 2011 foram realizados trabalhos de validação desta técnica para diagnóstico da LVC, sendo demonstrada uma elevada sensibilidade e especificidade do DPP no

diagnóstico de cães sintomáticos em comparação ao teste de imunofluorescência indireta (IFI) (Queiroz Júnior, 2011) e em relação ao teste parasitológico direto (De Santis *et al.*, 2013). Apesar de o DPP demonstrar excelente desempenho para identificar os cães sintomáticos (98%), este mostrou menor eficácia para o diagnóstico de animais assintomáticos (47%) (Grimaldi *et al.*, 2012). A eficácia das técnicas imunocromatográficas para o diagnóstico da LVC ainda precisa ser melhorada e novas estratégias devem ser implementadas a fim de favorecer o diagnóstico da LVC em cães sintomáticos e assintomáticos (Courtenay *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2011; Quinnell *et al.*, 2013).

Visto a inexistência de vacina aprovada contra a leishmaniose, e que os pilares das medidas de controle adotadas pelo Ministério da Saúde visam: diagnóstico, tratamento precoce dos casos detectados e vigilância entomológica e de reservatórios, e considerando que a enzootia canina precede a ocorrência de casos em humanos, a análise de marcadores sorológicos aplicáveis ao diagnóstico da leishmaniose canina é de grande importância no desenvolvimento de estratégias de controle epidemiológico da doença. Mediante isso, faz-se necessário o desenvolvimento de testes com antígenos que apresentem maior sensibilidade e especificidade e que possibilitem um diagnóstico da doença rápido, eficaz e precoce, contribuindo para aprimoramento das medidas de controle da incidência da doença na população canina e humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho dos antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a reatividade sorológica de cães do município de Governador Valadares frente ao antígeno rKLO8 aplicado no diagnóstico da LVC.
- Analisar o perfil das classes de imunoglobulinas (IgG, IgM) específicas para o antígeno rKLO8, e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) reativas ao antígeno rKLO8, em soros de cães com diagnóstico positivo (DPP⁺EIE⁺) e negativo (DPP⁻EIE⁻) para a LVC.
- Comparar a reatividade sorológica, a sensibilidade e especificidade obtidas mediante ELISA para rKLO8 em comparação ao ELISA para rK26 no diagnóstico da LVC em cães do município de Governador Valadares -MG.
- Avaliar a acurácia da mistura de antígenos rKLO8+rK26 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizando análises de curva ROC.
- Comparar os métodos rKLO8-ELISA, rK26-ELISA, e rKLO8+rK26-ELISA com os métodos oficialmente utilizados no diagnóstico da LVC (DPP e EIE), utilizando estatística Kappa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANTÍGENOS

O antígeno recombinante KLO8 de *L. donovani* do Sudão foi recentemente clonado e purificado por Abass et al. (2013), usando *E. coli* M15 (Qiagen GmbH, Alemanha) transformadas com o plasmídeo pQE41/KLO8. Resumidamente, os genes foram amplificados por PCR e clonados no vector de expressão bacteriana pQ41 (Qiagen GmbH, Alemanha), contendo um marcador de histidina N-terminal. A pureza e tamanho foram verificados por eletroforese em gel e western blotting com anticorpos anti-His e os soros de pacientes com LV (Abass et al., 2013).

A proteína rKLO8 tem 294 aminoácidos (AA), com uma massa molecular prevista de 32,4 kilodaltons (kDa) e um ponto isoelétrico (IP) de 4,39. A rKLO8 exhibe identidade de aminoácidos de 93% com a proteína rK39 de *L. infantum* cepa BA-2 do Brasil (GenBank: AAA29254.1); uma identidade de 88% com a proteína KE16 de *L. donovani* cepa KE16 da Índia (GenBank: AAT40474 0,1).

O antígeno rKLO8 foi, gentilmente, doado pelo professor Dr. Ulrich Steinhoff, da Universidade de Marburgo (Marburg - Germany) Alemanha. Os antígenos vieram na forma liofilizada e foram diluídos inicialmente em água destilada estéril e estocados em PBS a -20 °C, até seu uso nos ensaios, sendo utilizados na concentração de 50 ng/ml.

O antígeno recombinante K26 estudado é uma proteína hidrófila de 247 aminoácidos, contém 11 repetições de um trecho de 14 aminoácidos que compreendem cerca de 64% da proteína total, sendo encontrada especificamente em *L. donovani* e *L. infantum*. Estudos mostraram que rK26 é eficiente na detecção de anticorpos em soros de pacientes com LV, a qual já é empregada no teste diagnóstico DPP (Bhatia et al., 1999). A proteína rK26 usada no estudo foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Renato Porrozi do Laboratório de Pesquisa de Leishmaniose, Fiocruz, Rio De Janeiro.

3.2 SOROS DE CÃES

Inicialmente, 900 amostras de soros de cães provenientes do banco de soro da Gerência de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG foram utilizadas neste estudo. No Brasil, desde dezembro de 2011, foi preconizado pelo Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis o uso do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®-Bio-Manguinhos (DPP), como método de triagem para o diagnóstico da LVC, sendo combinado ao Kit EIE Bio-Manguinhos (Ensaio Imunoenzimático), usado como teste confirmatório. Dessa maneira, os cães foram previamente submetidos a esse protocolo de diagnóstico pelos profissionais da Secretaria de Saúde do Município de Governador Valadares, seguindo as instruções do fabricante (Anexos 1 e 2). De acordo com os resultados obtidos em cada teste de diagnóstico realizado, as amostras foram inicialmente divididas nos seguintes grupos:

- 1) Grupo 1: formado por 300 soros de cães negativos para DPP (DPP⁻).
- 2) Grupo 2: formado por 300 soros de cães positivos para DPP e negativos para EIE (DPP⁺/EIE⁻);
- 3) Grupo 3: formado por 300 soros de cães positivos para DPP e EIE (DPP⁺/EIE⁺).

Após padronização e avaliação das 900 amostras de soros de cães, decidiu-se utilizar grupos menores formados por um novo grupo de 100 soros de cães negativos para DPP e EIE (DPP⁻/EIE⁻), considerado o grupo negativo para LVC, e 100 amostras selecionadas ao acaso de soros de cães do grupo 2 (DPP⁺/EIE⁻), e 100 amostras do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺). Essas foram organizadas em três novos grupos de soros de cães para alcançar os objetivos propostos neste estudo, totalizando 300 amostras de soro.

Grupo 1: 100 amostras do novo grupo de soros de cães negativos para DPP e negativos para EIE (DPP⁻/EIE⁻), substituindo ao grupo 1 de amostras de soros de cães negativos só para DPP (DPP⁻);

Grupo 2: 100 amostras selecionadas aleatoriamente do grupo de soros positivos para DPP e negativos para EIE (DPP⁺/EIE⁻);

Grupo 3: 100 amostras selecionadas aleatoriamente do grupo de soros de cães positivos para DPP e positivas para EIE (DPP⁺/EIE⁺).

Neste estudo, a definição do teste de referência foi feita de acordo com os critérios usados pelas entidades de saúde pública no Brasil, que é o resultado do teste de DPP seguido por EIE para obter resultados positivos ou inconclusivos da DPP. Neste sentido, o grupo 1 foi considerado cães soronegativos, e apenas as amostras com resultados positivos de DPP e EIE (Grupo 3) foram considerados animais soropositivos. Não foi feito outro teste parasitológico para o diagnóstico da LVC nesses animais.

Além desses grupos, seis amostras de soros de cães de Juiz de Fora MG, área onde a leishmaniose não é endêmica, negativos para DPP, foram incluídos no estudo como grupo controle negativo de região não endêmica. O teste DPP para este grupo de amostras de soros de cães foi realizado no laboratório de imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

De todos os cães selecionados foram obtidas as seguintes informações: nome, idade, gênero e procedência (rua, bairro). As amostras de sangue foram coletadas anteriormente por profissionais previamente treinados. Cerca de 10 ml de sangue venoso foram coletados por punção venosa, usando tubos vacutainer sem heparina. Os tubos com sangue coletados foram deixados à temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, após a coagulação sanguínea, os soros foram coletados, codificados e estocados à -20°C. Os soros dos grupos 1, 2 e 3 foram gentilmente cedidos para esta pesquisa, conforme autorização da Secretaria de Saúde do Município de Governador Valadares. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo CEUA/UFJF (Protocolo -016/2015), Anexo 3.

3.3 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM, IgG, E SUBCLASSES DE IgG (IgG1 E IgG2) ESPECÍFICOS PARA OS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26 UTILIZANDO O MÉTODO DE ELISA.

Os testes sorológicos foram realizados utilizando o método de ELISA indireto de acordo com Abass et al. (2013) com modificações. Em resumo, as placas de poliestireno, de 96 poços foram sensibilizadas com os antígenos rKLO8 e rK26, 50ng/ml (50ul/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C e, em seguida, lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS 0,15M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). As placas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente com 100ul/poço de solução bloqueio PBS-T contendo 2% de albumina de soro bovino (BSA). As amostras de soro foram adicionadas (50ul/poço, em duplicata) na diluição de 1/2000 em PBS-T contendo 0,01% BSA para IgG, 1/200 para IgM, 1/1000 para IgG1 e IgG2. Após incubação de 1h a 37°C, as placas foram novamente lavadas e o conjugado, anticorpo policlonal anti-IgG (1/10000), anti-IgM (1/20000) de acordo com o estabelecido pelo fabricante (Sigma-Aldrich, USA), policlonal anti-IgG1 (1/10000) e policlonal anti-IgG2 (1/5000) (AbD Serotec, A Bio- Rad Company, USA), ligados à peroxidase foram adicionados (50ul/poço) e posteriormente as placas foram incubadas por 1h a 37°C. As concentrações dos anticorpos policlonal/reagentes anti-IgG1 e anti-IgG2 foram escolhidas de acordo com a padronização descrita anteriormente. Em seguida as placas foram lavadas novamente, sendo adicionado o substrato tetrametilbenzidina (TMB) (50ul/poço). Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N e as leituras foram efetuadas em leitor de ELISA Spectramax-190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 450nm. Os resultados foram expressos em absorbância, que corresponde à média dos valores das densidades ópticas (D.O.) de cada amostra.

3.4 PONTO DE CORTE

O ponto de corte (*cut-off*) necessário para diferenciar as 900 amostras de soros de cães avaliadas inicialmente, foi estabelecido de acordo com as densidades ópticas (D.O.) de seis amostras de soros de cães negativos para o DPP provenientes de Juiz de Fora MG (área não-endêmica), usados como controles negativos, os quais foram avaliados para antígeno rKLO8 nas condições descritas anteriormente. O valor do cut-off foi determinado pela média (X) das D.O dos seis controles negativos mais três vezes o desvio padrão (DP), (Ponto de corte = $X + 3DP$). Portanto o título de anticorpo é expresso em D.O e as amostras de soros de cães que apresentaram valores de densidades óptica maior que o ponto de corte foram consideradas positivas e as que apresentaram valores de densidades ópticas igual ou menor ao ponto de corte foram consideradas negativas.

O ponto de corte necessário para diferenciar as 300 amostras avaliadas foi estabelecido de acordo com as densidades ópticas (D.O.) de cem amostras de soros de cães negativos para DPP e EIE (DPP⁻/EIE⁻) usados como controles negativos e cem amostras de soros de cães positivos para DPP e EIE (DPP⁺/EIE⁺) usados como controle positivos, os quais foram avaliados utilizando os antígenos rKLO8 e rK26 nas condições descritas anteriormente. O valor do cut-off foi determinado pela análise da curva ROC (de "*Receiver Operating Characteristic curve*"), mediante o programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html).

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo vertical e do complemento da especificidade (taxa de falso positivo) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte¹, determinando assim a área sob a curva (ASC). A ASC é a probabilidade de classificar corretamente um par de indivíduos sadio e doente,

¹ Pontos de corte são valores normativos, que permite resumir os resultados de uma escala continua em duas categorias: positivo e negativos valores normativos um teste é considerado positivo e abaixo dos quais o teste é considerado negativo.

selecionados ao acaso na população, mediante os resultados obtidos ao aplicar-se o teste diagnóstico. A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior ASC, passando pelo canto superior esquerdo, onde a sensibilidade e especificidade tomam valores máximos, significa mais próximo do valor 1, sendo melhor o desempenho do método avaliado, ou seja maior é a precisão global do teste (Mcfall e Treat, 1999; Langlotz, 2003). A curva ROC além de indicar a acurácia global dos testes avaliados permite identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste. Cada ponto do gráfico representa também os índices de sensibilidade e especificidade (100) de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da interseção sensibilidade/especificidade.

Além disso, a curva ROC permite realizar comparações de pontos de duas curvas que apresentam igual sensibilidade ou especificidade e um enfoque global de confrontação da precisão de dois testes em todo o espectro de pontos de corte, comparando seus ASC. O desenho do estudo de comparação pode ser de dados pareados, nos quais realizam-se dois ou mais testes nos mesmos indivíduos, os resultados dos testes estão geralmente associados ou correlacionados. Quando realizado em grupos independentes, os diferentes testes são realizados em indivíduos distintos.

De maneira geral a curva ROC é índice da precisão diagnóstica e proporciona um critério unificador no processo de avaliação de um teste, devido a suas diversas aplicações: avaliação visual (qualitativa) da precisão; comparação visual entre testes; análises estatística e avaliação quantitativa da precisão mediante ASC (Burgueñoa *et al.*, 1995).

3.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO ELISA-rKLO8 EM RELAÇÃO A ELISA-rK26 NO DIAGNÓSTICO DA LVC

Os resultados obtidos mediante o uso de ELISA-rKLO8 utilizando o IgG *anti-cão* marcado com peroxidase, foram comparados com os obtidos na avaliação dos soros de cães com o antígeno rK26, mediante o uso da curva ROC, para análises dos valores de acurácia – área sob a curva ROC, sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança. A sensibilidade foi definida como a percentagem de amostras de soro de cães considerados positivos para LVC com resultados positivos. A especificidade foi avaliada em percentagem do total de amostras de soro de cães considerados negativos para a doença com resultados negativos. As curvas foram obtidas mediante o programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). A razão de verossimilhança é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença dividida pela probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença. Para um teste dicotômico (positivo/negativo), a razão de verossimilhança é calculada para o resultado positivo e para o resultado negativo. A razão de verossimilhança positiva (RV+) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em cães doentes quando comparado com cães sadios, e a razão de verossimilhança negativa (RV-) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em cães doentes quando comparado com cães sadios (Langlotz, 2003).

3.6 AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DO ELISA-rKLO8 E ELISA-rK26, COM DPP E EIE-BIO-MANGUINHOS

Para avaliar a utilidade do teste ELISA-rKLO8, os resultados do ELISA utilizando os antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da LVC foram comparados com os obtidos

com o teste rápido DPP e EIE, que foram realizados pelos técnicos da Gerência de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG, de acordo com as instruções do fabricante.

A concordância entre os testes foi avaliada usando o coeficiente Kappa de Cohen (Cohen, 1968), e interpretados de acordo com a seguinte escala: 0,00 – 0,20, insignificante; 0.21- 0.40, baixa concordância; 0.41-0.60, moderada; 0.61-0.80 bom e 0.81-1.00 excelente (Landis e Koch, 1977). Foi usado o software estatístico GraphPad software para tais análises.

3.7 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgG2 ESPECÍFICOS PARA A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26 USANDO O ELISA E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DO ELISA COM A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26

As amostras de soros (n=300) foram avaliadas por ELISA usando a combinação de rKLO8+rK26, estando em acordo com Abass et al. (2013) com modificações. Para a sensibilização ou “coating” das placas, cada proteína (antígeno) foi usada na concentração de 25ng/ml resultando numa concentração final de 50ng/ml (50ul/poço), em tampão carbonato/bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, sendo as placas incubadas por 18 horas a 4°C. Usando as condições descritas anteriormente no protocolo de ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26.

Os resultados obtidos mediante o uso de ELISA-rKLO8+rK26, foram usados para análises dos valores de sensibilidade, especificidade, acurácia – área sob a curva ROC e razões de verossimilhança, e comparados com os obtidos na avaliação dos soros de cães com os antígeno rKLO8 e rK26 separadamente, conforme descrito anteriormente.

A concordância entre o ELISA-rKLO8+rK26 com os testes atualmente usados no diagnóstico da LVC (DPP e EIE-Bio-Manguinhos) foi obtida mediante o uso do

coeficiente Kappa de Cohen (Cohen, 1968), usando o software estatístico GraphPad Software.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.00, pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunns. As diferenças de valores de $p < 0,05$ foram considerados significativas. A curva ROC foi usada para avaliar a sensibilidade e a especificidade e para determinar o ponto de corte ótimo que discrimina claramente entre soros positivo e negativo, usando a média dos valores de absorbância a 450nm (A_{450}) para 100 controles negativos (soros do grupo 1) e 100 controles positivos (soros do grupo 3) de cães provenientes de Governador Valadares, MG, Brasil.

A área sob a curva (ASC) foi utilizada como medida da acurácia do teste de diagnóstico que permite proporcionar um meio de discriminação entre os soros verdadeiramente positivos e negativos, mediante o programa estatístico MedCalc Estatística-versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). Para testar a significância das diferenças entre as curvas ROC dos antígenos, foi utilizado o teste de Wilcoxon.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO OS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26 PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-rKLO8 E ANTI- rK26

Após completada a padronização do método de ELISA, avaliamos a presença de anticorpos IgG específicos contra os antígenos rKLO8 e rK26 de *L. donovani*. Utilizando grupos de soros cedidos pela Gerência de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG. Foram avaliados os grupos de cães DPP⁻/EIE⁻ (n=100), DPP⁺/EIE⁻ (n=100) e DPP⁺/EIE⁺ (n=100).

Os resultados mostraram que do total das 300 amostras avaliadas por ELISA-rKLO8, 110 foram reativas para este antígeno com densidades ópticas (D.O.) iguais ou superiores ao ponto de corte estabelecido pela análise da curva ROC (ponto de corte = 0,17); o que indica soroprevalência de 36,66%. As 190 amostras restantes (63,34%) apresentaram títulos de anticorpos com D.O. inferiores ao ponto de corte estabelecido, portanto foram consideradas negativas (Figura 7).

É importante ressaltar que das 100 amostras avaliadas do grupo 1 (DPP e EIE negativo), 89 amostras foram negativas e 11 amostras foram positivas para rKLO8, indicando que existem diferenças entre os testes utilizados para o diagnóstico da LVC. Das 100 amostras do grupo 2 (DPP⁺/EIE⁻) 29 amostras apresentaram níveis altos de anticorpos IgG contra o antígeno rKLO8, com valores de D.O. igual ou maiores que o ponto de corte estabelecido, sendo consideradas positivas. Setenta e um (71) dessas amostras foram negativas apresentando valores de D.O. inferiores ao ponto de corte estabelecido. Das 100 amostras avaliadas do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺), 70 amostras foram consideradas positivas e 30 foram determinadas negativas por apresentar valores de D.O. inferior ao ponto de corte estabelecido. Os resultados indicam que existem diferenças entre os testes diagnósticos utilizados, bem como há diferenças nos resultados quanto ao antígeno empregado para a detecção de anticorpos específicos de *L. donovani* para o diagnóstico da LVC em cães.

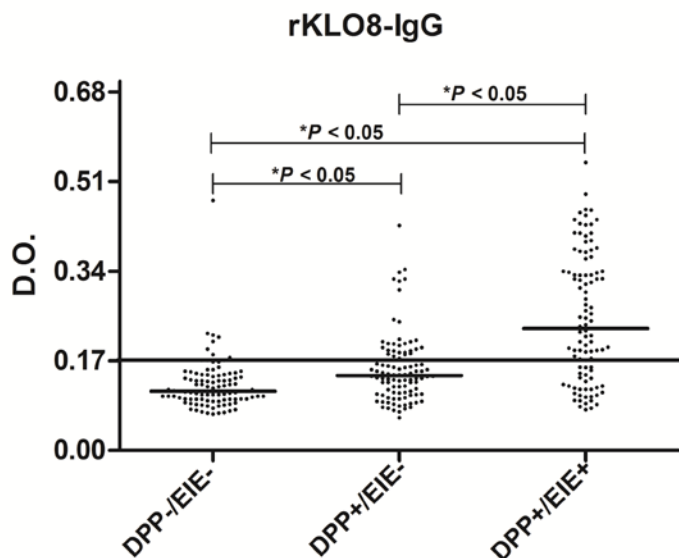


Figura 7. Detecção de anticorpos IgG específicos para o antígeno rKLO8.

Soros ($n=100$ cada grupo) de cães DPP^-/EIE^- , soros DPP^+/EIE^- e soros DPP^+/EIE^+ foram testados na diluição 1/2000 através do ELISA. O cut off para rKLO8 (0,17) foi estabelecido através da curva ROC. A barra horizontal, em cada grupo, representa a mediana das densidades ópticas (D.O.).

De acordo com os valores obtidos na leitura das D.O. do ELISA com o antígeno rK26, os resultados mostraram que das 300 amostras avaliadas, 119 apresentaram níveis elevados de IgG específicos para o antígeno rK26. Essas amostras foram consideradas positivas por apresentarem valores iguais ou maiores que o ponto de corte estabelecido pela análise da curva ROC (ponto de corte = 0,17), indicando soroprevalência de 39,66%. As 178 amostras restantes mostraram valores de D.O. inferiores ao estabelecido, sendo consideradas como negativas pelo teste de ELISA-rK26 (Figura 8).

É importante ressaltar que das 100 amostras do grupo 1 (DPP^-/EIE^-) avaliadas por ELISA-rK26, 9 apresentaram valores de D.O. iguais ou superiores ao ponto de corte, e foram estabelecidas como positivas e 91 amostras foram consideradas negativas por apresentarem valores de D.O. inferiores a 0,17. Estes resultados indicam que entre os testes utilizados para o diagnóstico da LVC existem diferenças, portanto é essencial determinar se existem amostras falso-negativas obtidas pelo teste DPP/EIE ou falso-positivas pelo método de ELISA- rK26.

No grupo 2 (DPP^+/EIE^-) 33 amostras foram identificadas como positivas por apresentarem valores de D.O. iguais ou superiores ao ponto de corte, e 67 amostras

foram consideradas negativas por apresentarem valores inferiores ao ponto de corte. Além disso, no grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) a maioria das amostras foi positiva (77), e o restante delas (23) foi considerado negativo.

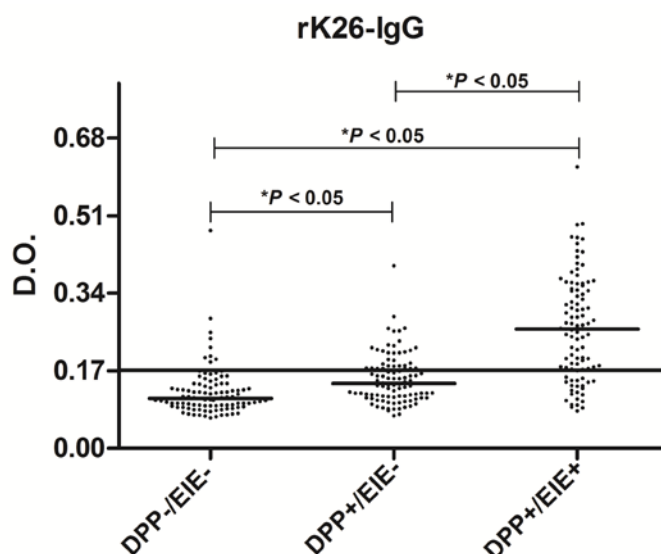


Figura 8. Detecção de anticorpos IgG específicos para o antígeno rK26. Soros ($n=100$ cada grupo) de cães DPP⁻/EIE⁻, DPP⁺/EIE⁻ e DPP⁺/EIE⁺ foram testados na diluição 1/2000 através do ELISA. O cut off para rK26 (0,17) foi estabelecido por meio da curva ROC. A barra horizontal, em cada grupo, representa a mediana das densidades ópticas (D.O.).

Pode-se inferir que os níveis de anticorpos IgG contra antígenos recombinantes rKLO8 (figura 9) e rK26 (figura 10) foram significativamente mais elevados no soro de cães do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) quando comparado com o grupo 1 (DPP⁻/EIE⁻) ($p < 0,05$). Além disso, soros de cães do grupo 2 (DPP⁺/EIE⁻) apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG em comparação com os soros do grupo 1 (DPP⁻/EIE⁻) ($p < 0,05$). Os resultados obtidos pelo ELISA- rKLO8 em comparação ao ELISA-rK26 foram muito semelhantes. Sugerindo que esses antígenos apresentam capacidade semelhante de discriminar os grupos de soros de cães avaliados quanto aos métodos DPP e EIE.

De maneira geral os resultados obtidos pelo ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26 na discriminação dos grupos de soros de cães avaliados por DPP e EIE, indicam que existem diferenças entre os testes diagnósticos utilizados, bem como há diferenças nos resultados quanto ao antígeno empregado para a detecção de anticorpos específicos

de *L. donovani* para o diagnóstico da LVC em cães como se resume na tabela 1. Dentre as 11 amostras positivas para o ELISA-rKLO8 e 9 amostras positivas para o ELISA-rK26 do grupo de soros de cães DPP⁻/EIE⁻, apenas 7 amostras correspondem aos mesmos soros de cães que foram positivos para ambos os ELISAS (ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26). Dentre as 29 amostras positivas para o ELISA-rKLO8 e 33 positivas para o ELISA-rK26 do grupo de soros de cães DPP⁺/EIE⁻, só 18 amostras foram positivas para ambos os antígenos avaliados. Dentre as 30 amostras de soros de cães negativas para o ELISA-rKLO8 e 23 negativas para o ELISA-rK26 do grupo de soros de cães DPP⁺/EIE⁺, 20 amostras correspondem aos mesmos soros que foram negativos para os dois antígenos (rKLO8 e rK26), indicando haver boa correspondência entre os dois antígenos avaliados, exceto no grupo DPP⁺/EIE⁻.

Tabela 1 - Número de amostras positivas e negativas dos grupos de soros de cães avaliados obtidas mediante ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26.

Grupos de soros de cães avaliados	ELISA-rKLO8		ELISA- rK26		ELISA-rKLO8 e ELISA- rK26 (Mesmos soros de cães)	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
DPP ⁻ /EIE ⁻ (n=100)	11	89	9	91	7	87
DPP ⁺ /EIE ⁻ (n=100)	29	71	33	67	18	54
DPP ⁺ /EIE ⁺ (n=100)	70	30	77	23	65	20

Grupo DPP⁻/EIE⁻ = soros de cães negativos por DPP (teste rápido “Dual Path Platform (Biomanguinhos) e negativos por EIE= Ensaio Imunoenzimático (Biomanguinhos); grupo DPP⁺/EIE⁻ = soros de cães positivos por DPP e negativos por EIE; grupo DPP⁺/EIE⁺ = soros de cães positivos por DPP e positivos por EIE; ELISA-rKLO8 = Ensaio imunoenzimático com o antígeno rKLO8 e ELISA-rK26 = Ensaio imunoenzimático com o antígeno rK26.

Além da análise de anticorpos IgG contra os antígenos rKLO8 e rK26, também foi feita uma análise dos níveis séricos de anticorpos IgM reativos contra os antígenos rKLO8 e rK26 nos grupos estudados. Os resultados mostraram níveis elevados de anticorpos IgM no soro de cães DPP⁺/EIE⁺ em comparação ao grupo DPP⁻/EIE⁻, e em comparação ao grupo DPP⁺/EIE⁻ (p<0,05). Esses resultados indicam haver uma alta resposta de anticorpos IgM no grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺), o que sugere existência de uma infecção recente com *L. infantum* (Figura 9 A e B). O ponto de corte foi estabelecido mediante a curva ROC, (0,24 para o ELISA-rKLO8 e 0,15 para o ELISA-rK26).

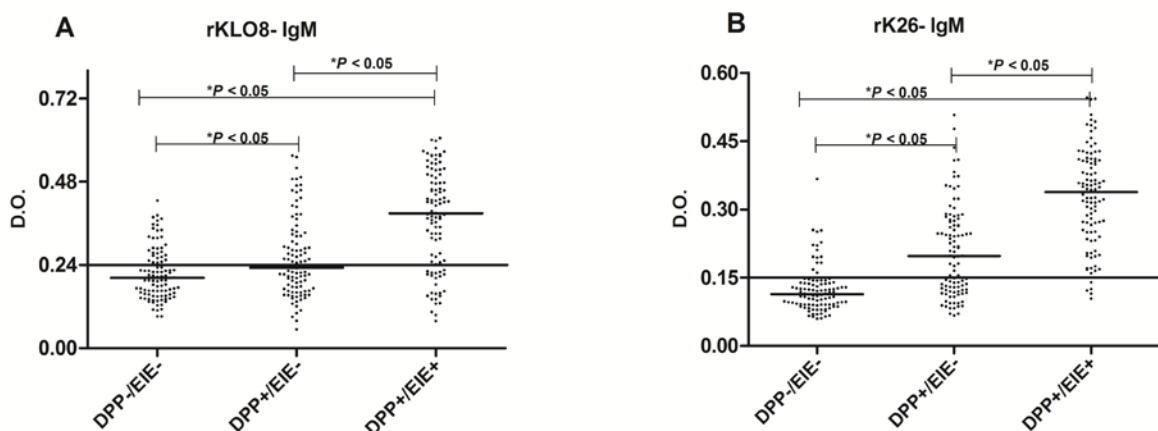


Figura 9. Níveis séricos de anticorpos IgM específicos para os antígenos rKLO8 e rK26. Soros (1/200) de cães DPP-/EIE- (n=100), DPP+/EIE- (n=100) e DPP+/EIE+ (n=100), foram testados através do ELISA. O cut off para rKLO8 (0,24) e para rK26 (0,15) foi estabelecido através da curva ROC. A barra horizontal, em cada grupo, representa a mediana das densidades ópticas (D.O.).

4.2 AVALIAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG PARA OS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26

Tendo sido observado títulos elevados de anticorpos IgG anti-rKLO8 e anti-rK26 no soro de cães com LVC, foi investigado, em seguida, a resposta humoral específica contra os antígenos em questão para subclasses de IgG. Os resultados mostraram que os níveis séricos de anticorpos IgG2 em cães do grupo 3 (DPP+/EIE+) foram maiores que os níveis de IgG1 ($p < 0,0001$) tanto em relação ao antígeno rKLO8 quanto em relação ao antígeno rK26) (Figura 10).

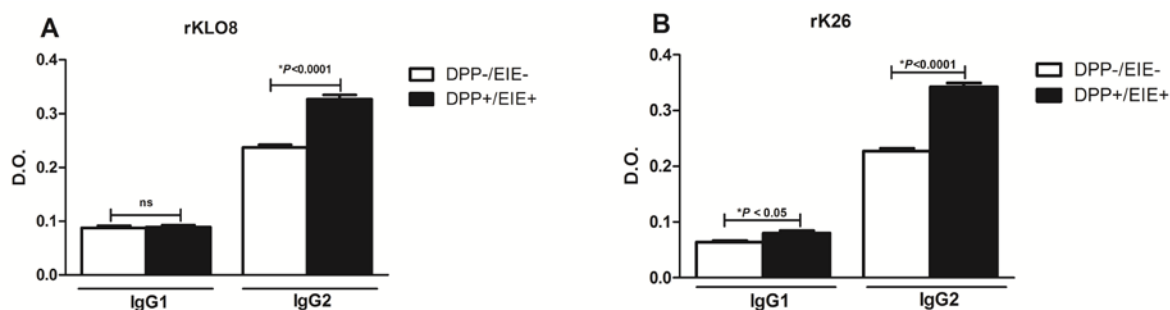


Figura 10. Níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos para os antígenos rKLO8 e rK26. Soros (1/1000) de cães DPP-/EIE- (n=100) e DPP+/EIE+ (n=100), foram testados através do ELISA. D.O. = densidade óptica.

4.3 ESTUDO DAS CURVAS ROC DOS TESTES DE ELISA PARA OS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26

A análise da curva ROC foi realizada para identificar aplicabilidade dos antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da LVC. Os parâmetros avaliados na curva ROC incluem a acurácia do teste, representada pela área sob a curva ROC (ASC) e os valores de sensibilidade e especificidade, bem como as razões de verossimilhança positiva e negativa, quando necessário. Na detecção de anticorpos IgG anti-rKLO8 e anti-rK26, os resultados da comparação das curvas ROC para os dois antígenos avaliados mostraram que o valor da área sob a curva (ASC) do rK26 de 0,884 (IC 95%: 0,831 a 0,925), foi maior ($p < 0,05$) que o valor da ASC do antígeno rKLO8 (ASC= 0,825, IC 95%: 0,765 a 0,875) (Figura 11 A). Além disso, foram comparadas as curvas ROC obtidas mediante a avaliação das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) com os antígenos rKLO8 e rK26. Os resultados da comparação das curvas ROC (IgG1) para os antígenos avaliados mostraram que o valor de ASC do rK26 de 0,640 (IC 95%: 0,569 a 0,706), foi semelhante ao valor do rKLO8 (ASC= 0,547, IC 95%: 0,476 a 0,618), não apresentando diferença estatística ($p = 0,075$), (Figura 11 B). Ao comparar as curvas ROC dos antígenos avaliados na detecção de IgG2 nos soros de cães dos grupos DPP⁻/EIE⁻ e DPP⁺/EIE⁺, os resultados mostraram que o valor da ASC do rK26 de 0,898 (IC 95%: 0,847 a 0,936) foi maior que o valor da ASC do antígeno rKLO8 (ASC= 0,822, IC 95%: 0,762 a 0,873, $p < 0,05$) (Figura 11 C). A comparação das curvas ROC para IgG, IgG1 e IgG2 mostrou que o antígeno rK26 apresenta melhor acurácia (maior ASC) que o antígeno rKLO8, no entanto, como o nível de significância foi bem próximo do limite do intervalo de confiança, essa diferença foi considerada pouco relevante. Em conjunto, esses resultados sugerem que os dois antígenos avaliados têm um perfil muito semelhante no diagnóstico da LVC.

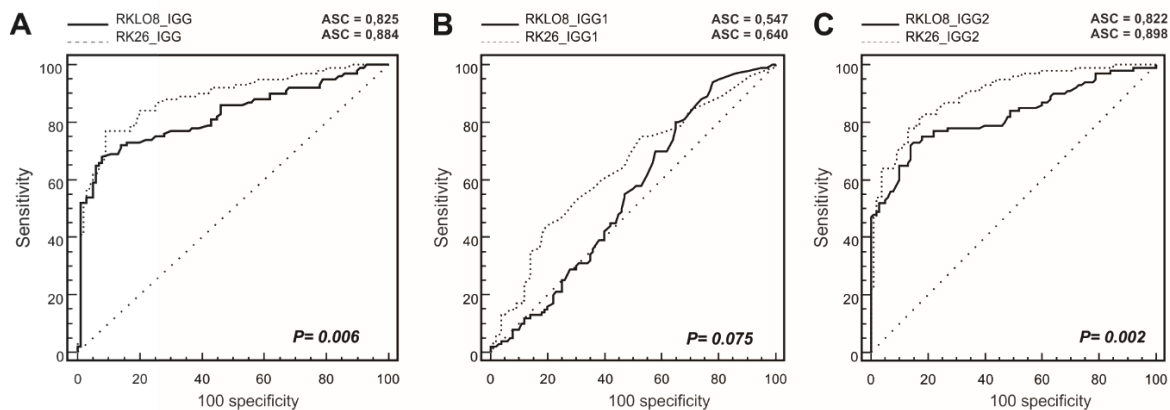


Figura 11. Comparação dos antígenos rKLO8 e rK26, através da curva ROC (receiver operator characteristic).

As curvas ROC permitem comparar o desempenho dos antígenos rKLO8 versus e rK26 na detecção de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) no diagnóstico da LVC.

4.4 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A avaliação da sensibilidade e especificidade pela curva ROC de IgG mostrou que os antígenos rKLO8 e rK26 apresentaram sensibilidade de 68% (IC 95%: 57,9-77,0), e 77% (IC 95%: 67,5-84,8) respectivamente, e especificidade de 92% (IC 95%: 84,8-96,5) e 91% (IC 95%: 83,6-95,8), respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%. Em termos de razão de verossimilhança (RV) para antígenos rKLO8 e rK26, os valores foram de 8,5 e 8,56, respectivamente, para razão de verossimilhança positiva; e 0,35 e 0,25, respectivamente, para razão de verossimilhança negativa (Tabela 2). Estes resultados confirmam o desempenho similar dos antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da LVC.

Tabela 2 - Parâmetros estatísticos avaliados para os antígenos rKLO8 e rK26 no sorodiagnóstico da LVC.

Antígenos	Cut off (A ₄₅₀)	Sensibilidade %	Especificidade %	RV +	RV -	Área sob a curva ROC
rKLO8	0,17	68	92	8,50	0,35	0,825
rK26	0,17	77	91	8,56	0,25	0,884

O cut off, dados de sensibilidade e especificidade e valores de verossimilhança positivo (RV+) e negativo (RV-) foram determinados pela análise das curvas ROC. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%. RV+ e RV- correspondem a valor preditivo positivo e negativo, respectivamente.

4.5 AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DIAGNÓSTICA DO ELISA-rKLO8 E ELISA-rK26, EM RELAÇÃO AOS TESTES DPP E EIE BIO-MANGUINHOS.

De acordo com o número de amostras dos grupos 1 (DPP⁻/EIE⁻) e 3 (DPP⁺/EIE⁺), positivas e negativas, obtidas pelos testes de ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26 em comparação com os testes DPP e EIE (Tabela 3), foi calculada a correlação entre eles utilizando o coeficiente de concordância Kappa de Cohen.

Tabela 3 - Número de amostras positivas e negativas obtidas mediante os seguintes teste (DPP, EIE, ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26).

MÉTODO DIAGNÓSTICO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
DPP	100	100	200
EIE	100	100	200
ELISA - KLO8	69	131	200
ELISA - rK26	86	114	200

Número total de soros de cães avaliados para os diferentes métodos de diagnóstico.

Os resultados de concordância obtidos pelo índice Kappa de Cohen, ao comparar o ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26 com os testes DPP e EIE utilizados para o diagnóstico da LVC, indicam que o ELISA-rKLO8 tem um perfil semelhante no diagnóstico da LVC em comparação ao ELISA-rK26, quando ambos são comparados com os testes DPP e EIE. As análises Kappa mostraram que o ELISA-rKLO8 tem uma concordância moderada com DPP e com o EIE, de acordo com a escala de margens para validar o

grau de concordância em função do índice Kappa, estabelecida em 1977 por Landis e Koch (Landis e Koch, 1977), apresentando valor Kappa de 0,590 (IC 95% 0,484 – 0,696) quando comparado com os testes usados atualmente no diagnóstico da LVC. O ELISA-rK26 apresentou uma boa concordância com DPP e com o EIE, com valor Kappa de 0,680 (IC 95% 0,579 - 0,781) (Tabela 4), de acordo com a escala de margens para validar o grau de concordância de Landis e Koch, (1977). Além disso, Ao comparar o ELISA-rKLO8 com ELISA-rK26, a análise Kappa permitiu estabelecer que o ELISA-rKLO8 apresentou uma boa concordância com ELISA-rK26, com um valor Kappa de 0,739 (IC 95% 0,644 – 0,833), (Tabela 4), considerado bom de acordo com a escala de margens para validar o grau de concordância. Estes resultados sugerem que ELISA-rKLO8 tem um desempenho similar ao ELISA-rK26 no diagnóstico, assim a combinação desses antígenos pode representar uma ferramenta adicional para o diagnóstico da LVC, podendo reforçar o teste de DPP. Estes resultados permitem sugerir a utilidade do ELISA-rKLO8 no diagnóstico da LVC, sendo isto inédito e inovador.

Tabela 4 - Concordância entre os testes de ELISA (ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26) e ensaios padrão (DPP e EIE-Bio-Manguinhos) usados para o diagnóstico da LVC.

MÉTODO DIAGNÓSTICO	DPP ^a	EIE ^b	ELISA- rK26
ELISA-rKLO8	0,590 ^c (IC 95% 0,484 – 0,696) Moderado	0,590 ^c (IC 95% 0,484 – 0,696) Moderado	0,739 ^c (IC 95% 0,644 – 0,833) Bom
ELISA- rK26	0,680 ^c (IC 95% 0,579- 0,781) Bom	0,680 ^c (IC 95% 0,579- 0,781) Bom	ND

a. DPP = teste rápido “Dual Path Platform (Biomanguinhos);

b. EIE = Ensaio Imunoenzimático (Biomanguinhos);

c. O coeficiente Kappa foi calculado de acordo a estatística de Cohen;

IC = Intervalo de confiança e ND = Não determinado.

4.6 ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS rKLO8 E rK26 NA LVC

Mediante os resultados obtidos em relação ao desempenho similar entre os antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da LVC, e de acordo com estudos que reportaram uma possível forma de melhorar o diagnóstico da leishmaniose visceral canina mediante o uso do ELISA com a combinação de antígenos recombinantes que apresentaram um melhor rendimento no diagnóstico da doença (Porrozzi *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012), foi avaliada a acurácia da mistura de antígenos rKLO8 + rK26 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, tendo como objetivo aperfeiçoar a sensibilidade e especificidade do teste.

A reatividade de anticorpos IgG frente a combinação das duas proteínas recombinantes, KLO8 e K26, foi avaliada mediante ELISA utilizando os grupos de soros cedidos pela Gerencia de Controle de Zoonoses/ Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares – MG. Foram avaliados os grupos de soros de cães DPP⁻/EIE⁻ (n= 100), e DPP⁺/EIE⁺ (n=100). Os resultados mostraram que os níveis de anticorpos IgG no soro de cães do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) reativos para a combinação dos antígenos rKLO8+rK26-ELISA, foram significativamente mais elevados que os do grupo 1 (DPP⁻/EIE⁻) ($p < 0.0001$). O ponto de corte que permitiu diferenciar entre as amostras positivas e negativas foi estabelecido pela curva ROC (ponto de corte = 0,21) (Figura 12).

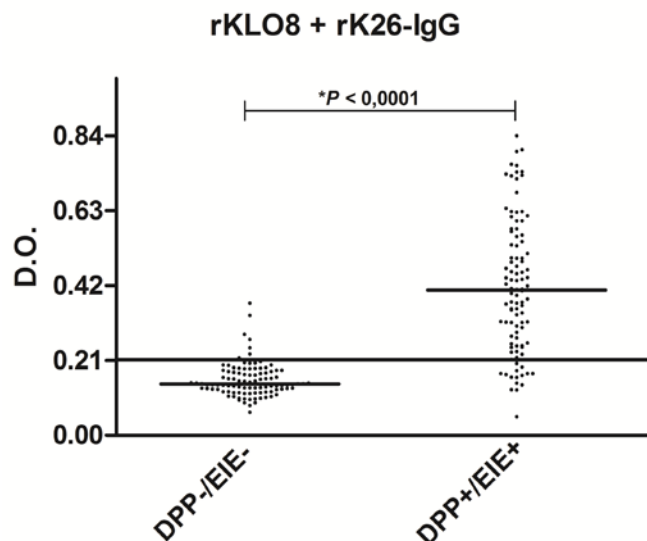


Figura 12. Detecção de anticorpos IgG anti-rKLO8+rK26.

Soros (diluídos a 1/2000) de cães DPP-/EIE- (n=100), e soros DPP+/EIE+ (n=100) foram testados através do ELISA. O cut off para rKLO8+rK26 (0,21) foi estabelecido por a curva ROC. A barra horizontal, em cada grupo, representa a mediana das densidades ópticas (D.O.).

Na avaliação dos níveis de IgG2 para a combinação dos antígenos avaliados (rKLO8+rK26), os resultados mostraram que os níveis séricos de anticorpos IgG2 em cães do grupo 3 (DPP+/EIE+), foram maiores que no grupo 1 (DPP-/EIE-) ($p < 0,0001$), sendo semelhante ao encontrado quando os antígenos foram testados em separado (Figura 13).

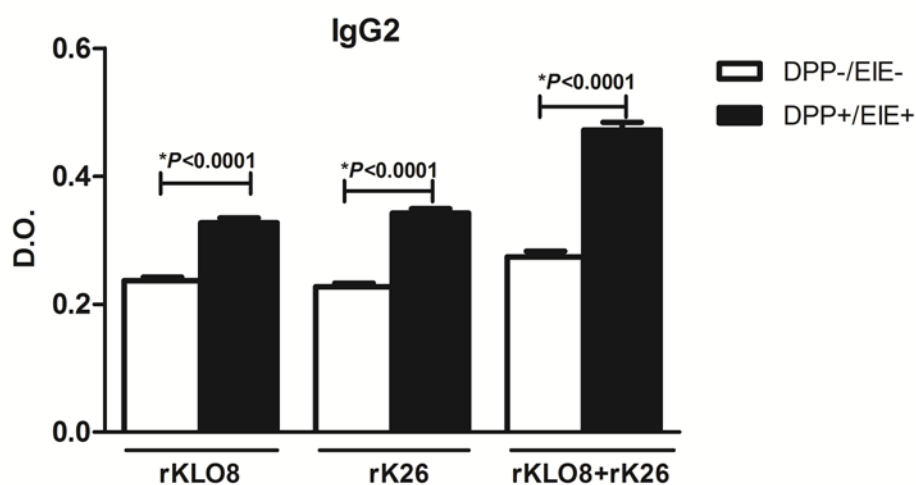


Figura 13. Níveis de anticorpos IgG2 específicos para os antígenos rKLO8, rK26 e rKLO8+rK26.

Soros (n=100/grupo) de cães DPP-/EIE- e DPP+/EIE+ foram testados na diluição 1/1000 através do ELISA.

Os resultados da comparação das curvas ROC obtidas no ELISA-rKLO8+rK26, ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26 para a detecção de anticorpos IgG, mostraram que o ELISA-rKLO8+rK26 apresentou uma maior área sob a curva (ASC) com valores de 0,930 (IC 95%: 0,885–0,961) comparado ao ELISA-rKLO8 que apresentou $ASC_{rKLO8} = 0,825$ (IC 95%: 0,765 – 0,875) e ao ELISA-rK26 com $ASC_{rK26} = 0,884$ (IC 95%: 0,831 – 0,925) (Figura 14 A-C). Estes dados indicam que a combinação dos dois antígenos avaliados rKLO8 + rK26 apresenta uma melhor acurácia no diagnóstico da LVC que a observada nos antígenos rKLO8 e rK26 usados separadamente na detecção de anticorpos IgG.

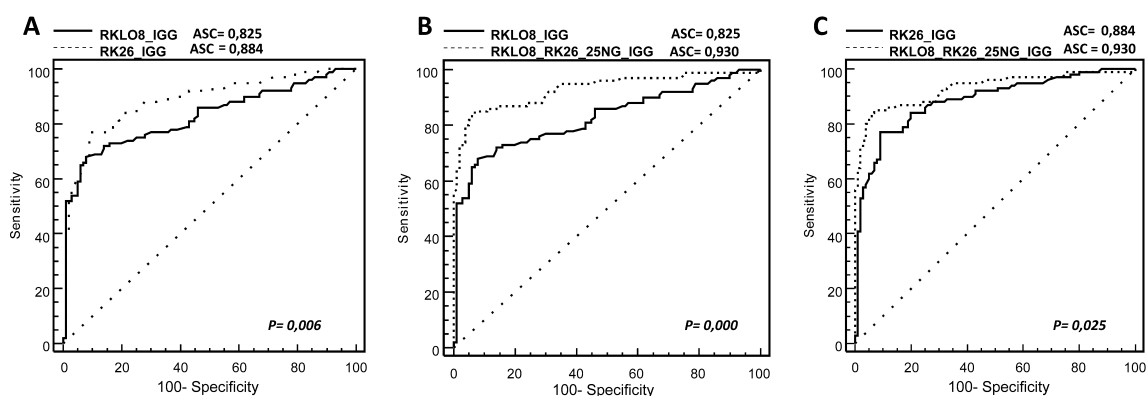


Figura 14. Comparação da combinação dos antígenos rKLO8 e rK26, através da curva ROC. A análise das curvas ROC permite comparar o desempenho da combinação dos antígenos rKLO8 + rK26 versus os antígenos rKLO8 e rK26 em separado, na detecção de IgG. **A** = rKLO8 versus rK26; **B** = rKLO8 + rK26 versus rKLO8, e **C** = rKLO8+ rK26 versus rK26.

A análise da curva ROC foi realizada para determinar os valores de sensibilidade e especificidade na avaliação da combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 e sua aplicabilidade no diagnóstico da LVC. A avaliação da sensibilidade e especificidade na detecção dos anticorpos IgG anti-rKLO8 com rK26 pela curva ROC, mostrou que o ELISA usando a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 (ELISA-rKLO8+rK26) apresentou uma sensibilidade de 85% (IC 95%: 76,5 a 91,3), e uma especificidade de 93% (IC 95%: 86,1 a 97,1), sendo maiores (sensibilidade e especificidade) que a observada quando os antígenos rKLO8 e rK26 foram avaliados em separado (Tabela 5). Em termos de razão de verossimilhança (RV) para a combinação dos antígenos avaliada, os valores foram de 12,14 para razão de verossimilhança positiva e 0,16 para

razão de verossimilhança negativa (Tabela 5). Estes resultados confirmam o bom desempenho do ELISA-rKLO8+rK26 no diagnóstico da LVC.

Tabela 5 - Parâmetros estatísticos avaliados para a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 no sorodiagnóstico da LVC.

Antígenos	Cut off (A_{450})	Sensibilidade %	Especificidade %	RV +	RV -	Área sob a curva ROC
rKLO8	0,17	68	92	8,50	0,35	0,825
rK26	0,17	77	91	8,56	0,25	0,884
rKLO8+rK26	0,21	85	93	12,14	0,16	0,930

O cut off, dados de sensibilidade e especificidade e valores de verossimilhança positivo (RV+) e negativo (RV-) foram determinados pela análise das curvas ROC. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%. RV+ e RV- correspondem a valor preditivo positivo e negativo, respectivamente.

De acordo com o número de amostras dos grupos 1 (DPP-/EIE-) e 3 (DPP+/EIE+) positivas e negativas obtidas pelo ELISA-rKLO8+rK26, em comparação com os resultados obtidos pelos testes de diagnóstico usados na LVC (DPP e EIE), foi calculada a correlação entre eles utilizando o coeficiente de concordância Kappa de Cohen. Os resultados mostraram que, quando ELISA-rKLO8+rK26 foi comparado com o teste rápido DPP, a análise Kappa mostrou que o ELISA utilizando a combinação dos dois antígenos recombinantes tem uma boa concordância com o DPP com valor Kappa de 0,700 (IC 95: 0,602 – 0,798); considerado bom de acordo com a escala de margens para validar o grau de concordância em função do índice Kappa. Além disso, a comparação entre ELISA-rKLO8+rK26 e EIE-Bio-Manguinhos mostrou que estes testes têm uma boa concordância com valor de Kappa de 0,700 (IC 95: 0,602 – 0,798); considerado bom de acordo com o índice Kappa (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a combinação dos antígenos rKLO8 + rK26 pode representar uma ferramenta adicional para o diagnóstico da LVC.

Tabela 6 - Acordo entre o teste ELISA-rKLO8+rK26 e ensaios de referências (DPP e EIE-Bio-Manguinhos) usados para o diagnóstico da LVC.

MÉTODO DIAGNÓSTICO	DPP^a	EIE^b
ELISA-rKLO8+rK26	0,700^c (IC 95% 0,602 – 0,798) Bom	0,700^c (IC 95% 0,602 – 0,798) Bom

a. DPP= teste rápido “Dual Path Platform (Biomanguinhos);

b. EIE= Ensaio Imunoenzimático (Biomanguinhos);

c. coeficiente Kappa foi calculado de acordo a estatística de Cohen; IC = Intervalo de confiança.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo uma nova proteína recentemente descrita para o diagnóstico da LV, denominada rKLO8, foi testada em comparação com o antígeno rK26, considerado antígeno de referência no diagnóstico da LV (Abass *et al.*, 2013; Abass *et al.*, 2015).

Os principais achados deste presente estudo foram: **1)** Níveis elevados de anticorpos IgG anti-rKLO8 e rK26 foram encontrados no soro de cães do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) em relação ao grupo controle negativo DPP⁻/EIE⁻; **2)** Níveis elevados de IgM anti-rKLO8 e rK26 foram apresentados por cães do grupo DPP⁺/EIE⁺ em relação ao grupo DPP⁻/EIE⁻; **3)** Cães DPP⁺/EIE⁺ apresentaram níveis maiores de IgG2 em relação aos níveis de IgG1 para os antígenos rKLO8 e rK26; **4)** O antígeno rKLO8 apresentou um perfil semelhante ao antígeno rK26, quando avaliados e comparados pelas curvas ROC para os anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2; **5)** A análise de concordância, pelo teste Kappa, mostrou que o antígeno rKLO8 apresentou uma concordância moderada quando comparado com o teste DPP e EIE, e rK26 apresentou um bom grau de concordância quando comparado com o teste DPP e EIE, além disso, foi observada uma boa concordância entre os dois antígenos quando avaliados por ELISA; **6)** Níveis elevados de anticorpos IgG e IgG2 anti-rKLO8+rK26 foram encontrados no soro de cães do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) em relação ao grupo controle negativo DPP⁻/EIE⁻ sendo os resultados semelhantes aos obtidos pelos antígenos usados em separado; **7)** A combinação dos antígenos rKLO8+rK26 apresentou uma melhor acurácia no diagnóstico da LVC, com uma maior sensibilidade e área sobre a curva que os antígenos rKLO8 e rK26 usados por separado quando avaliados e comparados pelas curvas ROC para a detecção de IgG; **8)** Análise de concordância, pelo teste Kappa, mostrou que a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 apresentou um bom grau de concordância quando comparados com o teste DPP e com o teste EIE quando avaliada por ELISA.

Na avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG contra os antígenos rKLO8 e rK26 de *L. donovani* em cães, os resultados mostraram que os cães do grupo DPP⁺/EIE⁺ considerados positivos para LVC apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG anti-rKLO8 e rK26 em relação ao grupo de soros de cães DPP⁻/EIE⁻ considerados negativos para LVC. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que também detectaram níveis altos de IgG em soros de cães com leishmaniose visceral (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2006; Porrozzi *et al.*, 2007) No entanto, em relação aos resultados obtidos no grupo DPP⁻/EIE⁻, no qual algumas amostras apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG contra os antígenos rKLO8 e rK26, tal fato poderia ser explicado pela diferença entre as técnicas usadas no diagnóstico da LVC. Assim, foi relatado que pacientes com LV do Sudão com níveis baixos de anticorpos tendem a dar resultados falsos negativos em testes rápidos (Abass *et al.*, 2013). Provavelmente, o teste DPP está diagnosticando alguns casos falsos negativos, o que poderia contribuir para a manutenção da infecção. Os resultados obtidos com as amostras do grupo DPP⁺/EIE⁻, nos quais a maioria das amostras apresentou níveis baixos de IgG contra os antígenos avaliados, indicam uma possível ocorrência de casos falsos-positivos observados no grupo DPP⁺, mostrando uma melhor concordância entre o ELISA-rKLO8 e ELISA-rK26 com o teste EIE usado como teste confirmatório no diagnóstico da LVC no Brasil. Estas diferenças entre o testes usados no diagnóstico da LVC também foi observada por Castro *et al.* (2014), mostrando diferença entre o DPP e a PCR convencional ou PCR em tempo real, em que dos doze cães diagnosticados positivos pelo DPP, nove foram positivos para a técnica molecular, considerada mais sensível e específica para o diagnóstico da doença (Castro-Júnior *et al.*, 2014). Portanto para o controle das leishmanioses estudos adicionais são necessários para confirmar o desempenho do teste DPP no diagnóstico da LVC (Cavalcanti *et al.*, 2015).

Níveis elevados de IgM foram apresentados nos soros de cães do grupo DPP⁺/EIE⁺ em relação ao grupo DPP⁻/EIE⁻, indicando uma possível infecção recente com *L. infantum*, nesses animais. Estudos realizados na Itália e na Espanha mostraram uma menor soroprevalência de IgM (60% e 69,5%, respectivamente) (Orndorff *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2006) corroborando com nossos resultados, que mostraram a

soroprevalência de 76% para rKLO8 nos soros do grupo DPP⁺/EIE⁺. Ryan et al. (2002), observaram alta soroprevalência de IgM (97,5%) em 40 dos 41 cães avaliados no Brasil (Ryan *et al.*, 2002), valor próximo ao observado no presente estudo, frente ao antígeno rK26 (95%). As discrepâncias observadas na soroprevalência de IgM de uma região para outra pode ser explicada, em parte, pelas diferenças da origem do parasito, da carga parasitaria, e do estado imunológico dos cães avaliados (Rodriguez *et al.*, 2006).

As diferenças observada na resposta de IgM entre rKLO8 e rK26 mostra que o ELISA-rK26 é mais sensível que o ELISA-rKLO8 na detecção de anticorpos IgM, o qual pode ser explicado pela diferenças da origem do parasito usado nos antígenos testados. Abass et al.(2013), observaram que o ELISA-rKLO8, que emprega uma proteína expressa a partir de uma cepa de *L. donovani* autóctone do Sudão, mostrou uma maior sensibilidade (98,1%), em comparação com o antígeno rK39 (96,2%) na detecção de anticorpos em controles e pacientes com LV no Sudão (Abass *et al.*, 2013). Portanto, as dificuldades no diagnóstico da doença podem ser superadas usando no sistema de detecção antígenos derivados de parasitos autóctones procedentes da mesma área endêmica (Ribeiro *et al.*, 2007).

Embora anticorpos IgM geralmente são considerados como um marcador imunológico fortemente associado com a fase aguda de doenças parasitárias. No entanto, IgM anti-*L. infantum* são detectados, respectivamente, após o primeiro e quinto mês de infecção aguda e crônica, mantendo níveis elevados durante o curso da infecção (Genaro, 1993). Títulos elevados de IgM estão presentes em cães, que são naturalmente infectados com *L. infantum*, e não existe nenhuma diferença entre os títulos de animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Reis, 2001). Além disso, tem sido mostrado que níveis altos de IgM podem ser detectados durante a fase crônica da LVC, inclusive até um ano depois do tratamento. Apesar disso, pouco se conhece sobre o perfil de IgM na LVC, tornando-se necessária a busca por informações para compreender a importância biológica da persistência de IgM na resposta humoral em cães infectados por *Leishmania* de maneira crônica (Reis *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2006; De Freitas *et al.*, 2012).

A diferenciação e a proliferação dos linfócitos B é usualmente regulada diretamente pelas células T e citocinas as quais influenciam nos isotipos de anticorpos produzidos. Dessa forma, avaliar as concentrações das diferentes subclasses de IgG pode refletir indiretamente a mudança do perfil de resposta imune (Th1 ou Th2) em cães sintomáticos e assintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994; Asl *et al.*, 2013). Vários estudos na LVC, demonstraram a existência de uma correlação entre o estado clínico e os níveis das subclasses de IgG (Deplazes *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2005; Iniesta *et al.*, 2005; Asl *et al.*, 2013), sendo que a manifestação clínica da leishmaniose canina está associada com altos níveis de IgG1, enquanto IgG2 está relacionada com infecções subclínicas em cães.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, os cães DPP⁺/EIE⁺ apresentaram níveis maiores de IgG2 que os níveis de IgG1 para os antígenos rKLO8 e rK26 ($p < 0,0001$). Apesar da carência dos dados clínicos dos cães estudados, as amostras avaliadas são provenientes de um banco de soros de cães, coletados aleatoriamente nas áreas que reportaram casos ativos de LV em humanos, estes refletem possivelmente uma população predominante de animais DPP⁺/EIE⁺ assintomáticos. Dessa maneira podemos correlacionar, os níveis elevados de IgG2 no grupo de cães DPP⁺/EIE⁺ e os níveis menores de IgG1, com a prevalência de um estado subclínico da doença nesse grupo considerado infectado, apesar da falta de dados clínicos. Desplazes *et al.* (1995) e Asl, Sharifi *et al.* (2013), mostraram uma relação entre a alta expressão de IgG2 com infecções assintomáticas, e alta expressão de IgG1 com leishmaniose ativa. Além disso, tem sido descrito uma alta expressão de IgG e IgG2 no grupo de cães assintomáticos infectados que no grupo não infectado, e uma alta expressão de IgG1 e IgE nos animais sintomáticos (Iniesta *et al.*, 2005). Além disso, altos níveis de IgG2 nos cães vacinados com o ligando fucose-manose (FML) de *L. donovani*, foram correlacionados com a proteção proporcionada por vacinas (De Oliveira Mendes *et al.*, 2003).

Por outro lado, tem sido demonstrado que os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* são indicadores mais confiáveis da doença que a IgG total, e possivelmente podem ser usados para o prognóstico de acompanhamento da quimioterapia, especialmente em humanos (Asl *et al.*, 2013; Bhattacharyya *et al.*,

2014). Foi mostrado também que a resposta imune Th1 caracterizada por predominância de anticorpos IgG2 e uma maior produção de IFN- γ parece estar associada ao controle do parasito contribuindo com a manutenção do quadro assintomático (Asl *et al.*, 2013; Cruz-Chan *et al.*, 2014). De acordo com esses autores e considerando a expressão predominante de IgG2 nos soros de cães do grupo DPP⁺/EIE⁺ avaliados, pode-se sugerir a ocorrência de um desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1 nos animais avaliados no presente estudo, embora os dados clínicos dos cães não tenha sido avaliado, por falta de registro dessas informações no Centro de controle de Zoonoses de Governador Valadares.

Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos pelas análises da curva ROC para rKLO8 (68% e 92%, respectivamente) e para rK26 (77% e 91%, respectivamente) confirmam o bom desempenho do antígeno rKLO8 no diagnóstico da LVC, embora o antígeno rK26 tenha exibido valores de ASC para a IgG total e IgG2 um pouco melhores em comparação com rKLO8. O antígeno rKLO8 também apresentou uma alta especificidade de 96,1% no diagnóstico da LV em humanos, em estudos realizados no Sudão e na Índia, quando comparado com o antígeno rK39 (Abass *et al.*, 2013; Abass *et al.*, 2015). Além disso, no presente trabalho foi demonstrado o desempenho semelhante do antígeno rKLO8 e do rK26 no diagnóstico da LVC.

Em contraste aos nossos resultados de sensibilidade para os antígenos avaliados, Porrozzi *et al.* (2007) reportaram que o antígeno rK26 tem uma sensibilidade de 100 e 98% para cães sintomáticos e assintomáticos respectivamente, em estudo realizado com amostras provenientes de uma área endêmica rural no noroeste de Espírito Santo, Brasil. Esses achados sugerem a existência de variação em relação a sensibilidade e especificidade do mesmo antígeno quando o mesmo é usado em localidades diferentes, o que pode ser associado com a heterogeneidade do parasito *Leishmania* de diferentes regiões endêmicas (Abass *et al.*, 2015), ou, alternativamente, podem refletir características diferentes relacionadas com a resposta do hospedeiro infectado. Em concordância, soros de pacientes da Índia demonstraram respostas de anticorpos significativamente maiores para rKLO8 e rK39 em comparação com soros de Sudão ($p < 0,0001$) e França ($p < 0,0037$) (Abass *et al.*, 2015). As dificuldades no diagnóstico da doença em algumas áreas geográficas podem ser superadas quando o

sistema de detecção se baseia em antígenos derivados de parasitos autóctones procedentes da mesma área endêmica (Garcez *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2007).

De maneira geral, ao comparar o desempenho do antígeno recombinante rKLO8, avaliado pela primeira vez no diagnóstico da LVC, com o antígeno de referência rK26, os resultados mostraram um bom desempenho para o novo antígeno em questão. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados pelo antígeno rKLO8 foram similares aos apresentados pelo antígeno rK26, quando comparados pelas curvas ROC para os anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2.

O acordo moderado entre ELISA- rKLO8 com DPP e EIE (valores de Kappa = 0,590), e o bom acordo entre ELISA- rK26 com DPP e EIE (valores de Kappa = 0,680), indicam que rK26 tem uma melhor concordância com os testes utilizados no diagnóstico da LVC. No entanto, a boa concordância observada quando os dois antígenos foram comparados por análises Kappa 0,739, reforça que rKLO8 tem um desempenho semelhante em comparação com rK26, na detecção da LVC, independentemente do método de diagnóstico utilizado (Porrozzi *et al.*, 2007). Outros estudos mostraram uma pobre concordância com baixa sensibilidade quando os testes com as proteínas recombinantes C1, C8 e C9 de *Leishmania* foram comparados com o EIE Bio-Manguinhos e teste rápido DPP (64% e 73%, respectivamente). Esses resultados conflitantes poderiam ser explicados pelos diferentes antígenos utilizados nos testes. Alternativamente, as propriedades intrínsecas da proteína e da plataforma empregada no teste pode ter influência no desempenho e poderia ser responsável pelas diferenças observadas (Fonseca *et al.*, 2014). Logo, o presente trabalho sugere que o ELISA utilizando o antígeno rKLO8 poderia ser implementado para o diagnóstico da LVC. Alguns autores apontam que o uso de combinações de antígenos recombinantes no DPP, poderia melhorar o rendimento do teste e contribuir para eficiência do diagnóstico da LVC (Coura-Vital *et al.*, 2014). Portanto, a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 ou a inclusão do antígeno rKLO8 no teste DPP, poderia ser uma potencial ferramenta para o diagnóstico da LVC.

A combinação dos antígenos rKLO8 e rK26, usados de forma simultânea no diagnóstico da LVC mostrou níveis mais elevados de anticorpos IgG e IgG2 anti-rKLO8+rK26 nos soros de cães do grupo 3 (DPP⁺/EIE⁺) em relação ao grupo controle

negativo DPP⁻/EIE⁻. A expressão predominante de IgG e IgG2 nos soros de cães do grupo DPP⁺/EIE⁺ avaliados, pode-se sugerir o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 nesses animais infectados, como foi discutido anteriormente para os antígenos rKLO8 e rK26 utilizados em separado, estando de acordo com outros trabalhos da literatura (Asl, Saharifi et al (2013) e Cruz- Chan, Aguilar- Cetina et al. (2014)) que indicam que uma resposta imune Th1, caracterizada pela predominância de anticorpos IgG2 e uma maior produção de IFN- γ parece estar associada ao controle da infecção por *Leishmania*, contribuindo com a manutenção de um quadro assintomático. Além disso, Desplazes et al. (1995) e Asl, Sharifi et al. (2013), mostraram relação entre a alta expressão de IgG2 com infecções assintomáticas e alta expressão de IgG1 com a doença.

Com a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26, foi observada uma melhor sensibilidade e especificidade (85% e 93%, respectivamente), obtida pela análise da curva ROC do que para os antígenos avaliados em separado (sensibilidade de 68% para rKLO8, 77% para rK26, e especificidade de 92% e 91%, respectivamente). A maior área sobre a curva, com valores de 0,930, em comparação com a observada para os antígenos rKLO8 e rK26 testados separadamente (ASC rKLO8= 0,825 e ASC rK26= 0,884) sugerem que a combinação de rKLO8 e rK26 produz uma precisão melhor no diagnóstico da LVC que os antígenos rKLO8 e rK26 usados separadamente. Outros autores também descreveram sensibilidade e especificidade superiores a 95% em cães mediante ELISA, usando a formação de um antígeno quimérico recombinante, que expressa três epítomos imunoreativos de *L. infantum*. A simples estratégia da combinação de diferentes antígenos em um mesmo ensaio é uma abordagem a ser explorada no diagnóstico da LVC, já que permitiria adicionar sequências disponíveis para aumentar a sensibilidade do teste (Boarino *et al.*, 2005).

No entanto, sabe-se que a sensibilidade do teste DPP depende da situação clínica dos cães, sendo mais elevada em cães sintomáticos (98%) que em assintomáticos (47%) (Grimaldi *et al.*, 2012). Isso indica que é necessário inserir mais antígenos no teste rápido para tornar a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* mais eficaz na fase inicial da doença. Novas pesquisas no intuito de aumentar a sensibilidade do teste de triagem (DPP), principalmente em cães assintomáticos,

devem ser estimuladas (Grimaldi *et al.*, 2012; Marcondes *et al.*, 2013; Coura-Vital *et al.*, 2014).

A boa concordância apresentada entre a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 com o teste DPP, atualmente usado como triagem no diagnóstico da LVC no Brasil (Kappa= 0.710 para ELISA-rKLO8+rK26), e a boa concordância observada com o EIE, teste confirmatório no programa de controle da LVC no Brasil (Kappa de 0.710), sugerem que a combinação dos antígenos avaliados mostrou uma boa concordância com o teste DPP e com o teste EIE. Outros autores reportaram a concordância moderada entre o DPP em combinação com outros antígenos (DPP rLci1A / rLci2B) (Fraga *et al.*, 2014). Logo, o presente trabalho indica que um ELISA utilizando a combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 poderia ser implementado para o diagnóstico da LVC, ou a inclusão do antígeno rKLO8 no teste DPP poderia ser uma potencial ferramenta para o diagnóstico da doença. Esses achados reforçam a sugestão de que o uso de combinações de antígenos recombinantes no DPP, pode melhorar o rendimento do teste e contribuir para uma maior eficiência do diagnóstico da LVC (Coura-Vital *et al.*, 2014).

De acordo com o panorama atual do diagnóstico da LVC, os métodos de diagnóstico usados atualmente precisam ser melhorados significativamente, visto que os resultados determinam se os cães serão sacrificados ou não nas áreas endêmicas, evitando consequências diretas para os cães (eutanásia), e consequências indiretas para os donos dos animais como traumas emocionais, algumas vezes desnecessários, já que os animais podem não estar de fato infectados. Por outro lado, os resultados falsos negativos são inaceitáveis, por conduzirem a manutenção de reservatórios do parasito. De acordo com os dados apresentados neste trabalho sobre o antígeno rKLO8, uma possível forma de melhorar o diagnóstico da LVC é a implementação de um novo ELISA com antígenos recombinantes que apresentem um melhor rendimento no diagnóstico da LVC (Porrozzi *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012), sendo assim, o antígeno rKLO8 pode representar uma ferramenta adicional no diagnóstico da LVC.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado pela primeira vez a avaliação do antígeno rKLO8 no diagnóstico da LVC. O antígeno rKLO8 mostrou um desempenho semelhante em comparação com a proteína rK26, considerado antígeno de referência no diagnóstico da leishmaniose visceral. Os resultados apresentados indicam o potencial do ELISA-rKLO8 como ferramenta adicional para o diagnóstico da LVC. O nível elevado de anticorpos IgG2 contra os antígenos rKLO8 e rK26 sugere a existência de cães com uma resposta imunológica de perfil Th1. O uso da combinação dos antígenos rKLO8 e rK26 no diagnóstico da LVC mediante ELISA permitiu melhorar a sensibilidade do teste, indicando o ELISA-rKLO8+rK26 como uma potencial ferramenta a ser implementada no diagnóstico da LVC.

7 REFERÊNCIAS

- ABASS, E. et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2322, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23875052> >.
- ABASS, E. et al. Heterogeneity of *Leishmania donovani* Parasites Complicates Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Comparison of Different Serological Tests in Three Endemic Regions. **PLoS One**, v. 10, p. e0116408, 2015.
- ADAMAMA-MORAITOU, K. K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 1, p. 53-7, Jan 2007. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637.
- AKSOY GOKMEN, A. et al. An alternative biphasic nutrient medium for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Mikrobiyol Bul**, v. 49, n. 2, p. 266-71, Apr 2015. ISSN 0374-9096 (Print) 0374-9096.
- ALMEIDA, M. A. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 1-2, p. 151-8, Jun 15 2005. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911002> >.
- ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. In: (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v. Volume 57, 2004. p.1-88. ISBN 0065-308X.
- ALVES, A. S. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 3, p. 1329-33, Dec 2012. ISSN 0034-5288.
- ARESU, L. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, n. 5, p. 569-72, Sep 2007. ISSN 1040-6387 (Print) 1040-6387.
- ASHFORD, R.; BATES, P. Leishmaniasis in the old world. **Topley & Wilson's**, p. 215-242, 1998.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 9// 1996. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0738081X96000417> >. Acesso em: 1996/10//.

ASL, A. S. et al. Evaluation of canine anti-*Leishmania* IgG subclasses and their relation with skin signs in naturally infected dogs in the northwest of Iran. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 37, p. 512-515, 2013.

AVERSI-FERREIRA, T. A. et al. Casos de leishmaniose visceral registrados no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 30, n. 2, 2008. ISSN 1807-8648; 1679-9291. Disponível em: < b >.

BADARÓ, R. et al. rK39 A Cloned Antigen of *Leishmania chagasi* that Predicts Active Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 758- 761, 1996.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14-15, 2008. ISSN 1090-0233.

BARATA, R. A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Res. Int.**, v. 2013, 2013.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 7, p. 329-37, Jul 2006. ISSN 0141-9838 (Print) 0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842269> >.

BATES, P. A.; ASHFORD, R. Old world leishmaniasis. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 2006. ISSN 0470688610.

BENITES, A. P. et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 72-77, 2011. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000100011&nrm=iso >.

BHATIA, A. et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 249-261, 8/20/ 1999. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685199000985> >.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128-134, 2013. ISSN 0037-8682.

BHATTACHARYYA, T. et al. Significantly Lower Anti-*Leishmania* IgG Responses in Sudanese versus Indian Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001. ISSN 1090-0233.

BOARINO, A. et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 5, p. 647-53, May 2005. ISSN 1071-412X (Print); 1071-412X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879027> >.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17-26, 2000. ISSN 1600-065X.

BOURDOISEAU, G. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 59, n. 1, p. 21-30, 1997. ISSN 0165-2427.

BRANDONISIO, O. et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clinical and experimental medicine**, v. 2, n. 3, p. 125-129, 2002. ISSN 1591-8890.

BURGUEÑO, M. J.; GARCÍA-BASTOS, J. L.; J.M., G.-B. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. **Medicina clínica** v. 104, n. 17, 1995.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 775-779, 1993. ISSN 0027-8424 (Print)\n0027-8424 (Linking).

CARVALHO, D. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 2, p. 120-124, 2009.

CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 8// 2002. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889302004108> >.

CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* Infection in dogs from juiz de fora, minas gerais state, brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 56, p. 225-229, 2014.

CAVALCANTI, A. S. et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123009, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic); 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875101> >.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on continuing education for the practising veterinarian-north american edition.**, v. 25, n. 5, p. 358-369., 2003. ISSN 0193-1903.

COELHO, E. A. F. et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, 2003. ISSN 0019-9567.

COELHO, M.; FALCÃO, A. Aspectos epidemiológicos do calazar em Minas Gerais. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 10, n. 1, p. 259-262, 1966.

COHEN, J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. **Psychological Bulletin**, v. 70, n. 4, p. 213-220, 1968.

CONNOR, D. H. et al. **Pathology of infectious diseases. Volume 1.** Appleton & Lange, 1997. ISBN 0838576931.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO RIO GRANDE DO SUL. **Confirmação de Caso Autóctone de Leishmaniose Visceral em um Paciente Humano em Porto Alegre.** 2016

CORREDOR, A. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 5, p. 480-486, May 1, 1989 1989. Disponível em: < <http://www.ajtmh.org/content/40/5/480.short> >.

CORTESE, L. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and Ehrlichia canis. **Vet J**, v. 188, n. 1, p. 118-21, Apr 2011. ISSN 1090-0233.

COSTA, D. J. et al. Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-6, 2014.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p.

e2583, 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416460> >.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314–1320, 2002.

CRUZ-CHAN, J. V. et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. **Parasites Vectors**, v. 7, p. 361, 2014.

CRUZ, A. K. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Current drug targets**, v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009. ISSN 1389-4501.

CUBA CUBA, C. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 17, n. 1-4, p. 39-52, 2000. ISSN 1726-4634.

CHULAY, J. D.; BRYCESON, A. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 3, p. 475-479, 1983. ISSN 0002-9637.

DA COSTA, R. T. et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003. ISSN 0035-9203.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 3-4, p. 139-46, Nov 10 2007. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703890> >.

_____. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites Vectors**, v. 2 Suppl 1, p. S1, 2009. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426440> >.

DE A. MARZOCHI, M.; F. MARZOCHI, K. B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging. **Cad. Saúde Públ, Riode Janeiro**, v. 10, n. supplement 2, p. 359-375, 1994.

DE CAMARGO-NEVES, V. et al. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. **Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD.**, 2006.

DE CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta tropica**, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010. ISSN 0001-706X.

DE FREITAS, J. C. et al. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 2, p. 705-9, Oct 2012. ISSN 1532-2661 (Electronic); 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226072> >.

DE GOPUGUI, M.; RUIZ, R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. **Int J Dermatol**, v. 37, p. 801-14, 2003.

DE OLIVEIRA MENDES, C. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003. ISSN 5521256083.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet J**, v. 182, n. 2, p. 356-8, Nov 2009. ISSN 1090-0233.

DE SANTIS, B. et al. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991. ISSN 0022-1007.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991. ISSN 0022-1007.

DEANE, L.; DEANE, M. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEANE, L.; GRIMALDI, G. Leishmaniasis in Brazil. **Leishmaniasis, Elsevier, Amsterdam**, p. 247-281, 1985.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-9, Jul-Sep 1994. ISSN 0074-0276 (Print); 0074-0276.

DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite immunology**, v. 17, n. 9, p. 451-458, 1995. ISSN 1365-3024.

DINIZ, S. A. et al. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. **Veterinary Pathology Online**, v. 42, n. 5, p. 650-658, September 1, 2005 2005. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/42/5/650.abstract>>.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 251-259, 2008.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors** v. 5, n. 276, 2012.

DOURADO, Z. F. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2008. ISSN 1980-8178.

DUJARDIN, J. C. et al. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1013-8, Jul 2008. ISSN 1080-6040 (Print).

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996. ISSN 0002-9637.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008. ISSN 0264-410X.

FERREIRA EDE, C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v. 146, n. 3-4, p. 235-41, May 31 2007. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. International Canine Leishmaniasis Forum, 1999. p.6-10.

FERROGLIO, E. et al. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 7, p. 636-41, Jul 2006. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 141-5, 2009.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, p. 193-196, 2010.

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. Apostgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 31, p. 359–377, 2007.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25-30, 2014. ISSN 0001-706X.

FRAGA, D. B. M. et al. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites vectors**, v. 7, p. 136, 2014.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Apr 30 2006. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473467> >.

FUNED. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Instituto Octávio Magalhães - Lacen - MG**, p. 1-20, 2013.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. **Revue scientifique et technique-Office international des épizooties**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004. ISSN 0253-1933.

GARCEZ, L. M. et al. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infections of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* using the direct agglutination test. **Acta Trop**, v. 68, n. 1, p. 65-76, Oct 14 1997. ISSN 0001-706X.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. Universidade Federal de Minas Gerais

GOMES-SILVA, A. et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 135-141, 2008. ISSN 0037-8682 (Print)\r0037-8682 (Linking).

GOMES, A. H. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 144, n. 3-4, p. 234-41, Mar 31 2007. ISSN 0304-4017 (Print)0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196339> >.

GOMES, C.; COSTA, C. H. N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Vet J**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 1// 2008. ISSN 1090-0233. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023306002358> >.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009. ISSN 1090-0233.

GONTIJO, C. M. F. M., M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-80, Oct 2005. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519.

GRIMALDI, G.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993. ISSN 0893-8512.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 54-59, 2012. ISSN 1878-3503 (Electronic)\r0035-9203 (Linking).

HERNÁNDEZ, D. et al. Dog (*Canis familiaris*) infectivity to *Lutzomyia youngi* in Trujillo, Venezuela. **Biomédica**, v. 26, p. 242-248, 2006. ISSN 0120-4157.

IJIMA, M. et al. Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. **Biomaterials**, v. 32, n. 6, p. 1455-1464, 2011. ISSN 0142-9612.

INIESTA, L.; GALLEGO, M.; PORTUS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 77-81, Jan 10 2005. ISSN 0165-2427 (Print); 0165-2427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626463> >.

JUNQUEIRA, H. V. Manual-tecnico Leish-Tec Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. 2008.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 177-85, May 2010. ISSN 0974-8245 (Electronic) 0974-777X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606974> >.

KEMP, M. et al. Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. **Immunology and cell biology**, v. 71, p. 583-583, 1993. ISSN 0818-9641.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis - distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox cerdocyon thous (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135-137, 1990. ISSN 0074-0276. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761990000100027&nrm=iso >.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**, 2005. ISSN 0470688610.

LAINSON, R. et al. **Evolution, classification and geographical distribution**. Academic Press, 1987. ISBN 0125521014.

LAINSON, R.; WARD, R.; SHAW, J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 199, n. 1135, p. 309-320, 1977. ISSN 0080-4649.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers. **Biometrics**, v. 33, n. 2, p. 363-374, 1977. ISSN 0006341X. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/2529786> >.

LANGLOTZ, C. P. Fundamental measures of diagnostic examination performance: usefulness for clinical decision making and research. **Radiology**, v. 228, n. 1, p. 3-9, Jul 2003. ISSN 0033-8419 (Print) 0033-8419.

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 79, n. 3, p. 273-284, 2001. ISSN 0165-2427.

LIRA, R. A. et al. 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**, v. 137, n. 1-2, p. 11-6, Apr 15 2006. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446034> >.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919674> >.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 12/20/ 2008. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708003889> >.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142-144, 1// 2009. ISSN 1090-0233. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002948> >.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1484, Jan 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303488> >.

MANCIANTI, F. et al. 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**, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988. ISSN 0035-9203.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 125, n. 3-4, p. 251-62, Nov 10 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482882> >.

MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Vet Parasitol**, v. 197, p. 649-652, 2013.

MARY, C. et al. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5249-55, Nov 2004. ISSN 0095-

1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528722> >.

MAURICIO, I. L. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, n. 04, p. 393-403, 2001. ISSN 1469-8161. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182001007466> >. Acesso em: 2001.

MAZZA, G. et al. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. **Journal of immunological methods**, v. 161, n. 2, p. 193-203, 1993. ISSN 0022-1759.

MCCALL, L. I. et al. Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, n. 10, p. 1420-5, Feb 27 2013. ISSN 1873-2518 (Electronic) 0264-410X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219435> >.

MCFALL, R.; TREAT, T. Quantifying the information value of clinical assessments with signal detection theory. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 50, n. 1, p. 215-241, 1999. Disponível em: <
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.psych.50.1.215> >.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. sup 1, p. 41-45, 2004.

METTLER, M. et al. 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**, v. 43, n. 11, p. 5515-9, Nov 2005. ISSN 0095-1137 (Print); 0095-1137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272479> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual vigilância controle leishmaniose visceral **Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 1, 2006.

_____. Portaria Interministerial Nº 1.426, de 11 de Julho De 2008. 2008.

_____. **Guia de Vigilância em Saúde, Leishmaniose Visceral**. 2014

MIRANDA, T. M. D. et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 27-35, 2011. ISSN 2176-6223.

MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 52, 2011.

MOLANO, I. et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 1–2, p. 1-13, 3/20/ 2003. ISSN 0165-2427. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524270200315X> >.

MONGODIN, E. et al. Cell wall-associated protein A as a tool for immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in infected human airway epithelium. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 523-533, 2000. ISSN 0022-1554.

MORALES-YUSTE, M. et al. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. **Parasitol Res**, v. 111, n. 1, p. 155-64, Jul 2012. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231267> >.

MOREIRA, M. A. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, Apr 30 2007. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257764> >.

MURRAY, H. W. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 175, n. 6, p. 1477-1479, 1997. ISSN 0022-1899.

NIETO, C. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999. ISSN 0165-2427.

OLIVEIRA, C. D. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2953-2958, 2008. ISSN 0102-311X.

ORDEÑANA-PILOTOS, R. Optimización de la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), para la identificación de especies de *Leishmania* (tesis). **Ciudad de La Habana: Instituto Pedro Kourí**, 2005.

ORNDORFF, G. R. et al. Canine visceral leishmaniasis in Sicily. **Mil Med**, v. 165, n. 1, p. 29-32, Jan 2000. ISSN 0026-4075 (Print) 0026-4075.

OTRANTO, D. et al. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2769-70, Jun 2004. ISSN 0095-1137

(Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184465>>.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1-15, 2012. ISSN 1664-3224.

PALTRINIERI, S. et al. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 393-395, 12// 2010. ISSN 1090-0233. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023309003487>>.

PEARSON, R.; DE QUEIROZ, A. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 1-13, 1996.

PENNISI, M. et al. Clinical efficacy of two different drug combinations for the treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary research communications**, v. 32, n. 1, p. 303-305, 2008. ISSN 0165-7380.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994. ISSN 0019-9567.

PINELLI, E. et al. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, v. 49, n. 7, p. 696-699, 1999. ISSN 0093-7711.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 5, p. 544-8, May 2007. ISSN 1556-6811 (Print) 1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314229>>.

PREFEITURA GOVERNADOR VALADARES-MG. **UFOP pesquisa vacina contra leishmaniose em Governador Valadares**. Diário Oficial Eletrônico Governador Valadares-MG 2014.

QUEIROZ JÚNIOR, E. M. D. S. p. 1-77, 2011.

QUINNELL, R. J. et al. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Trop. Dis.**, v. 7, 2013.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-34, Dec 2009.

ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835643> >.

RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, n. 19–20, p. 2474-2484, 6/2/ 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0300032X> >.

RAMOS, R. A. et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012. ISSN 1984-2961.

REIS, A. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. **Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2001.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102-116, 2006. ISSN 0165-2427 (Print)\r0165-2427 (Linking).

REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International journal for parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004. ISSN 0020-7519.

REITHINGER, R. et al. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002. ISSN 0095-1137.

RIBEIRO, F. C. et al. Use of elisa employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of Canine visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 5, p. 283-289, 2011. ISSN 0036-4665.

RIBEIRO, F. C. et al. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 200-206, 2007. ISSN 0304-4017 (Print)\r0304-4017 (Linking).

RIBEIRO, R. R. et al. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v.

52, n. 7, p. 2564-72, Jul 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458133> >.

RODRIGUEZ, A. et al. Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. **J Vet Intern Med**, v. 20, n. 3, p. 495-8, May-Jun 2006. ISSN 0891-6640 (Print) 0891-6640.

ROSATI, S. et al. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1153-1156, 2003. ISSN 1556-6811.

RYAN, J. R. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1037-1043, 2002. ISSN 0095-1137.

SABATÉ, D. et al. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive veterinary medicine**, v. 115, n. 1, p. 56-63, 2014. ISSN 0167-5877.

SANDOVAL, C., ANGULO, V. , GUTIÉRREZ, R. MUÑOZ, G. ; FERRO, C. Especies de *Lutzomyia* (Diptera Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia. **Biomédica**, v. 18, n. 2, p. 161-168, 1998.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008. ISSN 0932-0113.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 1, p. 82-6, Jul 2005. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637.

SCALONE, A. et al. 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**, v. 104, n. 4, p. 275-85, Apr 2 2002. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995. ISSN 0022-1767.

SCHUBACH, E. Y.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 108, n. 9, p. 568-74, Sep 2014. ISSN 1878-3503 (Electronic) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25015665> >.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. **Informações gerais acerca da leishmaniose visceral**. 2015

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SHIO, M. T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **J Trop Med**, v. 2012, p. 819512, 2012. ISSN 1687-9694 (Electronic) 1687-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131998> >.

SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Vet Parasitol**, v. 179, n. 1-3, p. 257-61, Jun 30 2011. ISSN 0304-4017.

SILVESTRINI, P. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 568-574, 2012. ISSN 1939-165X.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of postgraduate medicine**, v. 49, n. 1, p. 55, 2003. ISSN 0022-3859.

SOARES, M. R. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 6-9, 2011. ISSN 0001-706X.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1, p. 163-166, 2001. ISSN 0304-4017.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 86, 2011. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21599936> >.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 560-3, Feb 2001. ISSN 0095-1137 (Print).

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001. ISSN 0304-4017 (Print)\r0304-4017 (Linking).

SOLCÀ, M. D. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 133-140, 3/23/ 2012. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711005735> >.

SOUZA, V. M. M. D. et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, p. 97-106, 2008. ISSN 1679-4974. Disponível em: < http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742008000200003&nrm=iso >.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 951-8, Sep 2002a. ISSN 1071-412X (Print) 1071-412x.

_____. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002b. ISSN 1556-6811.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001. ISSN 0304-4017.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17-23, 9// 2004. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175904001930> >.

TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of small animal practice**, v. 46, n. 11, p. 549-552, 2005. ISSN 1748-5827.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica**, v. 34, p. 7-12, 2014. ISSN 0120-4157. Disponível em: < http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572014000100002&nrm=iso >.

TRIGO, J. et al. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine**, v. 28, n. 19, p. 3333-40, Apr 26 2010. ISSN 1873-2518

(Electronic) 0264-410X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206667> >.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania–macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011. ISSN 0891-5849.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-5, Dec 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557140> >.

VERCOSA, B. L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res**, v. 4, p. 45, 2008. ISSN 1746-6148 (Electronic) 1746-6148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990238> >.

VOLF, P.; HOSTOMSKA, J.; ROHOUSOVA, I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 237-243, 2008. ISSN 1252-607X 1776-1042.

WHO. **Control of the leishmaniasis, Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva.** 2010

_____. **Leishmaniasis.** February 2015. 2015. (WHO Technical Report Series No. 375)

WIJEYARATNE, P.; ARSENAULT, L. J.; MURPHY, C. Endemic disease and development: the leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 349-364, 1994. ISSN 0001-706X.

WILSON, S. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 89, p. 95-100, 1995. ISSN 0003-4983.

YOUNG, D. G. A review of the blood sucking psychodid flies of Colombia (Diptera, Phlebotominae and Sycoracinae). Revisión de las moscas psicódidas de Colombia (Diptera, Phlebotominae y Sycoracinae). **Florida Agricultural Experiment Stations Bulletin.**, n. 806, p. 1-262, 1979.

ZANIN, F. H. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007. ISSN 1286-4579.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1: MANUAL DE INSTRUÇÕES DA APLICAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – BIO- MANGUINHOS

TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos (USO VETERINÁRIO)

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

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total venoso.
O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios.
O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A *Leishmania* está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Índia, Itália, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana¹. Entre os anos de 1994 a 1999, 37.254 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde².

ALV, algumas vezes referida como Kala-azar é uma doença crônica e potencialmente fatal se não tratada antes de apresentar-se a sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no baço, fígado e glândulas linfáticas.
A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotomíneos através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimitóticos pentamínico ou meglumina de sódio³.

ALV é uma zoonose na qual os canídeos têm sido implicados como importantes reservatórios para o parasita⁴. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebotomo fêmea infectado. Programas de controle para LV incluem a instalação de cães infectados identificados através de teste sorológico. Este procedimento tem provedo ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil⁵.

Viagens em áreas com alta incidência de leishmaniose visceral humana são consideradas de alto risco. Alguns testes sorológicos como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para este diagnóstico^{6,7} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).
O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem, imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania*, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2°C a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

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

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

MATERIAL FORNECIDO

Suporte DPP® contendo Proteínas Recombinantes K28 de *Leishmania* (e-antígeno + r-antígeno + CrAg) + Chaperon e a Proteína A Conjugada ao Ouro Coloidal, aderidos em Membranas de Nitrocelulose.

Tampão de Corrida	20 suportes
Alças Coletoras Descartáveis (5 µL)	01 frasco (5 mL)
Lancetas Descartáveis	20 alças
Manual de Instrução de Uso	20 lancetas
	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Cronômetro ou relógio
- Micropipetador calibrado para 5 µL (como alternativa à alça coletora)
- Lâminas descartáveis
- Recipiente seguro para descarte de material biológico
- Alcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

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

CONDIÇÕES E PRECAUÇÕES

Servente para uso em diagnóstico *in vitro*.
Somente para uso veterinário.
Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observe as precauções de biosegurança necessárias.
A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

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

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

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

COLETA DE AMOSTRA

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

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

Sangue total

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

Sangue Total Venoso

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

Soro

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

Plasma

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

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

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

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



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



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



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



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



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



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

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



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

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

Leitura Visual

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

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são interpretados visualmente. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

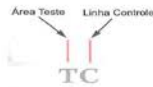
Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.



Resultado REAGENTE

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

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



Resultado INVÁLIDO

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



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.
- Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.
- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos deve ser utilizado seguindo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.
- Preceda a leitura do teste em, no máximo, 29 minutos.
- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.
- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para *Leishmania* na amostra testada.
- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição à *Leishmania* ou infecção por *Leishmania*. Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.
- Um animal infectado com *Leishmania* que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os índices de sensibilidade e especificidade do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos foram determinados pela avaliação da capacidade de detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em amostras clínicas (sangue, soro e plasma) de cães. Usando como referência o teste parasitológico de 62 cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 100% (sangue), 100% (soro) e entre 92,9% - 100% (plasma) e especificidade entre 87,5% - 91,7% (sangue), 87,5% - 91,7% (soro) e 85,0% - 89,6% (plasma). Quando comparado ao Teste EIE Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos, para 77 amostras de cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos apresentou uma sensibilidade entre 89,7% - 96,6% (sangue), 89,7% - 93,1% (soro) e 89,7% - 100% (plasma) e uma especificidade entre 97,9% - 100% (sangue), 93,8% - 97,9% (soro) e 95,6% - 97,9% (plasma).

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055/0015-30 SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br Indústria Brasileira

Aprovação de Arte: abril/13

Arte: BM-BUL-053-07-R-17359

Texto: M_DPLVLC_08



TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA *Leishmania* EM SORO, PLASMA OU SANGUE TOTAL VENOSO (material fornecido para 20 determinações)



8.2 ANEXO 2: MANUAL DE INSTRUÇÕES DA APLICAÇÃO DO TESTE RÁPIDO EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – BIO- MANGUINHOS

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

INDICAÇÃO DE USO

O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* like, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE

O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* like obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de micropilças/ "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para micropilça em comprimento de onda de 450 nm.

ESQUEMA DO TESTE

Reagente



Não Reagente



MATERIAL FORNECIDO

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

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Luvas descartáveis;
- Banquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37°C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de micropilças;

- Tampas para as placas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de micropilças, equipado com filtro de 450 nm;
- Balança semi-analítica.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

Manter entre 2°C e 8°C: Diluyente de amostra/conjugado [5X], Lectina de leite, Tampão de lavagem [20X], Diluyente do Substrato, Cromógeno (TMB), Substrato H₂O₂, Ácido Sulfúrico 2M. Manter a -20°C: Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado, "Strip" Sensibilizada.

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

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

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico "In vitro".

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao 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 laboratoriais, tais como:

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

PROCEDIMENTO DO TESTE

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

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

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

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

1. Preparo do diluyente de amostras/conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluyente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lectina de Leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

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

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 1	Amostra 16	Amostra 32	Amostra 48	Amostra 64	Amostra 80	Amostra 96	Amostra 112	Amostra 128	Amostra 144	Amostra 160
B	CP	Amostra 17	Amostra 33	Amostra 49	Amostra 65	Amostra 81	Amostra 97	Amostra 113	Amostra 129	Amostra 145	Amostra 161	Amostra 177
C	CN	Amostra 9	Amostra 25	Amostra 41	Amostra 57	Amostra 73	Amostra 89	Amostra 105	Amostra 121	Amostra 137	Amostra 153	Amostra 169
D	CN	Amostra 13	Amostra 29	Amostra 45	Amostra 61	Amostra 77	Amostra 93	Amostra 109	Amostra 125	Amostra 141	Amostra 157	Amostra 173
E	CN	Amostra 17	Amostra 33	Amostra 49	Amostra 65	Amostra 81	Amostra 97	Amostra 113	Amostra 129	Amostra 145	Amostra 161	Amostra 177
F	SS	Amostra 1	Amostra 16	Amostra 31	Amostra 47	Amostra 62	Amostra 77	Amostra 92	Amostra 107	Amostra 122	Amostra 137	Amostra 152
G	SS	Amostra 8	Amostra 24	Amostra 40	Amostra 56	Amostra 72	Amostra 88	Amostra 104	Amostra 120	Amostra 136	Amostra 152	Amostra 168
H	Amostra 15	Amostra 31	Amostra 47	Amostra 63	Amostra 79	Amostra 95	Amostra 111	Amostra 127	Amostra 143	Amostra 159	Amostra 175	Amostra 191

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

4. Tampar as placas e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min.

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

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

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

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	até 16	2 mL	36 mL
02	até 32	3 mL	57 mL
03	até 48	4 mL	78 mL
04	até 64	5 mL	99 mL
05	até 80	7 mL	133 mL
06	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

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

6. Destampar cuidadosamente a placa, 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 diluyente de amostra/conjugado, preparado anteriormente. Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluyente de Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	até 16	3 mL	5 µL
02	até 32	5 mL	5 µL
03	até 48	10 mL	10 µL
04	até 64	10 mL	15 µL
05	até 80	15 mL	15 µL
06	até 96	15 mL	15 µL

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

9. Tampar as placas e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

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

11. Preparo do substrato:

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

- 12. Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.
- 13. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min
- 14. Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2N em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

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

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

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

VALIDAÇÃO DO TESTE

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

Controle Positivo: ≥ 0,500 de DO

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

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

Cálculo do Cut-Off (CO)

CO = XCN x 2
XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
DO = Densidade ótica
CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO CN 1 = 0,100
DO CN 2 = 0,098
DO CN 3 = 0,101
CO = XCN x 2
0,099 x 2 = 0,199

Exemplo 2:

DO CN 1 = 0,110
DO CN 2 = 0,090
DO CN 3 = 0,131 → Fora da faixa de validação do teste = descartar
CO = XCN x 2
0,100 x 2 = 0,200

Exemplo 3:

DO CN 1 = 0,110
DO CN 2 = 0,080
DO CN 3 = 0,040 → Fora da faixa de validação do teste = descartar
CO = XCN x 2
0,095 x 2 = 0,190

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

FC = CO x 1,2

Exemplo: CO = 0,322

FC = CO x 1,2

FC = 0,322 x 1,2

FC = 0,386

RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

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

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em equívocos epidemiológicos: o caso de epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1990-1997. *Cad.S.Pub. RJ*, 2004; 20(1):259-265.
2. ASFORD, D.A. BADARÓ, R. EDUARDO, C. ET AL. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the fecal assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FASTEIE) for *Leishmania* visceral leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg*, 1993; 48(1):1-8.
3. BADARÓ, R. DUMITE, M.J.S. *Leishmaniose Visceral*. In: VERRONESI, R. FOCACCIA, R. *Estado de Infectologia*, 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, P.A.A. CHAREST, H. ZAVARES, C.A.P. ET AL. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania* denonense 92 antigen. *Diag. Microb. And Infect. Disease*, 2002; 43: 289-295.
7. COBA, C.A. MANSSEN, J.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIANI, L. *Diagnóstico parasitológico e Imunológico de Leishmaniose tegumentar americana*. *Bol. Of.sant. Parana*, 1990; 69: 95-208.
8. MEDRONHO, R.A. ET AL. *Epidemiologia* 2003. Cap 18p. 259-270.
9. MONTONA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labeled 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): 359-405.
11. NAWANE, F.K. IMAWATI, A. *Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation*. *J. Histochem Cytochem*, 1974; 22(12):1094-1091.
12. PINPAS, M.G. HALIMOSWSKI, R. HOCHMEYER, W.T. *Dot enzyme linked immunosorbent assay (DOE-LISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis*. *J. Immunol.Methods*, 1983; 11(1): 64(1-2): 205-14.
13. RETHINGER, R. DAVIES, C.R. *Canine Leishmaniasis: novel strategies for control*. *Trends in Parasitology*, 2002; 18(7): 289-290.

Responsável Técnico: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº 1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ
Av Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055.00015-30
SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
Indústria Brasileira

Aprovação de Anv: março/14 Anv: BBI-BUL-030-05-R-2330 Texto: ML_EIE_LVC_09

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

Produto: Partida nº: Vencimento:
Seção: EIE nº: Data:
Início: h min Término: h min

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

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

Cálculo do Cut-Off (CO)
CO = XCN x 2
XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
X = Média das DO.
DO = Densidade ótica.
CN = Controle Negativo.
CO = DO CN 1 + DO CN 2 + DO CN 3 = XCN x 2
CO = X x 2 =

Técnico Responsável:
Observações:

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

Produto: Partida nº: Vencimento:
Seção: EIE nº: Data:
Início: h min Término: h min

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

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

Cálculo do Cut-Off (CO)
CO = XCN x 3
XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
X = Média das DO.
DO = Densidade ótica.
CN = Controle Negativo.
CO = DO CN 1 + DO CN 2 + DO CN 3 = XCN x 3
CO = X x 3 =

Técnico Responsável:
Observações:



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

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

8.3 ANEXO 3: COMITÊ DE ÉTICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 016/2015 – CEUA sobre “Avaliação de proteína recombinante rKLO8 no diagnóstico de leishmaniose visceral canina” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de HENRIQUE COUTO TEIXEIRA com a colaboração de LILY PAOLA MARTINEZ ABAD, CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA e ANA MÁRCIA MATTOS - está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/09/2016. O desenvolvimento será no período de 01/08/2015 a 31/07/2017.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 016/2015 - CEUA about “Avaliação de proteína recombinante rKLO8 no diagnóstico de leishmaniose visceral canina” under responsibility of HENRIQUE COUTO TEIXEIRA and collaboration of LILY PAOLA MARTINEZ ABAD, CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA and ANA MÁRCIA MATTOS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 06/09/2016. The development is the period of 01/08/2015 to 31/07/2017.

Juiz de Fora, 15 de Setembro de 2015

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA