

MARCUS VINÍCIUS DA SILVA

AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO COLETA
DE AMOSTRA SANGUÍNEA EM PAPEL DE FILTRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Ouro Preto, como requerimento parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho.

Co-Orientadora: Prof. Dra. Maria Terezinha Bahia.

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
2005

Suporte financeiro:

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Apoio:

CCZ/PBH – Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte.

LZOON/PBH – Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias.

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto.

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Epidemiologia e de Parasitologia/Histopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e no Laboratório de Sorologia da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças da Fundação Ezequiel Dias (FUNED – MG).

“A fé é o fundamento da esperança, é um meio de conhecer realidades que não se vêem”.

(Hebreus 11,1).

Dedico este trabalho a Deus, que realiza maravilhas na vida de seus filhos, em uma demonstração de inesgotável amor e bondade. Obrigado pela vida, pela oportunidade de estudar, pela proteção, pela benção, pela saúde, pela coragem, pela sabedoria, pelos ensinamentos, pela misericórdia e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. Agradeço também pela presença constante durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao Professor Doutor George Luiz Lins Machado Coelho, pela orientação, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelo incentivo, pela paciência e pela amizade construída desde a Iniciação Científica. Obrigado pela oportunidade de concluir mais uma etapa em minha formação. Trabalhar a seu lado foi para mim uma escola de vida.

À Professora Doutora Maria Terezinha Bahia, agradeço pela orientação, por seus ensinamentos, sua amizade, pelo apoio e incentivo constantes e por me receber tão bem em seu laboratório. Obrigado pela boa vontade em me auxiliar nos trabalhos e por sua valiosa contribuição à minha formação.

À Professora Doutora Marta de Lana por seus ensinamentos, sua atenção e pela ótima convivência desde os tempos em que fui seu aluno de graduação.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela contribuição à minha formação.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação, Cida, pessoa iluminada que, com boa vontade e dedicação, busca ajudar a todos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação: Juciane, Jaqueline, Marquinhos, Hélen, Eduardo, Jorgino, Lisvane, Anamaria, Kátia, Daniela, Ângelo e Marcelo.

Ao pessoal do Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto pelo agradável convívio.

Às alunas de iniciação científica do Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, Alexandra e Wandiclécia, pelo apoio, dedicação e ótimo trabalho em equipe.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia/Histopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto: Prof^ª. Cláudia, Prof. Alexandre, Sr. Ramiro, Paulo Marcos, Vanja, demais pós-graduandos, e a todos os alunos de iniciação científica, pelo apoio e amizade.

Ao Laboratório de Sorologia da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças da Fundação Ezequiel Dias, na pessoa da Doutora Eliane Furtado e da Doutora Ildikó Delkin de Miranda Pinto, pelo apoio e pela colaboração na execução deste trabalho. Agradeço também aos técnicos Márcio e Júlio César pela sempre presente boa vontade.

Ao Professor Doutor Wilson Mayrink pela colaboração e pelas facilidades a nós concedidas.

À Doutora Cláudia Di Lorenzo Oliveira, pela colaboração e pela geração de números aleatórios para a codificação das amostras.

Ao Professor Roney Luiz Carvalho Nicolato, pela amizade e pela disponibilização de seu laboratório para a leitura das lâminas de IFI.

Ao Floriano, técnico do Laboratório de Leishmanioses da Universidade Federal de Minas Gerais, por me treinar e apoiar nas culturas de Leishmânias.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, na pessoa da Doutora Maria do Carmo Araújo Ramos, por ter cedido as amostras sanguíneas de cães positivos.

Aos Veterinários, Doutor Adamastor Santos Bussolotti e Doutor Sérgio Leão Magalhães, e demais funcionários do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, por me auxiliarem na coleta das amostras e avaliação clínica dos cães.

Ao Farmacêutico-Bioquímico, Doutor Francisco Elias Nogueira da Gama, do Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, pela forma fraterna com que fui recebido, por sua amizade e por ter disponibilizado o laboratório para centrifugação dos soros.

Aos meus amigos da República Nós é Nós: Cássio, José Wilson, Matheus, Rodrigo, Savinho, Sheler, Thiago Darin e Webert por se fazerem minha segunda família.

Aos amigos Jáila Borges, Juliano Meireles e Júlio César do Vale, companheiros de tantas caminhadas, que se fizeram presentes para sempre.

A meus amados pais, Floripes e Erci, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e apoio incondicionais. Vocês serão sempre o meu referencial.

Ao estimado irmão Henrique – exemplo de competência, inteligência, perseverança, humildade, serenidade, dedicação e, acima de tudo, boa vontade – que, através de seu exemplo e de seus conselhos, iniciou tudo isso.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhado, cunhadas e à Ilza, por me trazerem tanta alegria.

À Carolina, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
Lista de ilustrações.....	xviii
Lista de tabelas.....	xxii
Lista de anexos.....	xxvi
Lista de abreviaturas e siglas.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A leishmaniose visceral.....	5
2.1.1. A leishmaniose visceral canina.....	8
2.1.2. Epidemiologia.....	9
2.1.3. Controle e profilaxia.....	11
2.1.4. Vigilância epidemiológica.....	16
2.1.5. Diagnóstico clínico.....	16
2.1.6. Diagnóstico laboratorial.....	17
2.1.6.1. Métodos parasitológicos.....	17
2.1.6.2. Métodos imunológicos.....	19
2.1.6.3. Métodos moleculares.....	23
2.2. Utilização do papel de filtro em sorologia.....	24
2.3. Inquéritos sorológicos da leishmaniose visceral.....	26
3. JUSTIFICATIVAS.....	28
4. OBJETIVOS.....	31
5. ANIMAIS EXPERIMENTAIS, MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1. Desenho experimental.....	34
5.2. Cálculo do tamanho da amostra.....	35
5.3. Categorização dos animais.....	36
5.4. Avaliação clínica.....	36

5.5. Coleta de amostras.....	37
5.6. Aliquotagem, codificação e conservação de amostras.....	37
5.7. Padronização da eluição do SDPF para obtenção da diluição ótima equivalente à do soro.....	40
5.8. Reações sorológicas.....	40
5.8.1. Reação de ELISA (ag. <i>L. major-like</i>).....	40
5.8.1.1. Obtenção do antígeno.....	40
5.8.1.2. Padronização da reação.....	42
5.8.1.3. Determinação das absorbâncias discriminantes de resultados positivos e resultados negativos.....	42
5.8.1.4. Procedimento operacional.....	43
5.8.2. Reação de ELISA (Bio-Manguinhos).....	45
5.8.2.1. Procedimento operacional.....	46
5.8.3. Reação de imunofluorescência indireta (IFI).....	49
5.8.3.1. Titulação do conjugado.....	49
5.8.3.2. Procedimento operacional.....	51
5.9. Análise dos resultados.....	55
6. RESULTADOS.....	57
6.1. Padronização.....	58
6.1.1. Padronização da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>).....	58
6.1.1.1. Concentração do antígeno.....	58
6.1.1.2. Diluição do soro.....	59
6.1.1.3. Concentração dos conjugados.....	60
6.1.2. Padronização da eluição do SDPF para obtenção da diluição ótima equivalente à do soro.....	62
6.2. Determinação da validade dos testes sorológicos.....	63
6.2.1. Determinação da validade intrínseca da IFI, ELISA (ag. <i>L. major-like</i>) e ELISA (Bio-Manguinhos), realizadas em soros de cães, em relação à presença de infecção nos cães.....	63

6.2.2. Determinação da validade intrínseca e extrínseca da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>) e ELISA (Bio-Manguinhos), realizadas em soros de cães, em relação a IFI em soros de cães (teste de referência).....	66
6.2.3. Determinação da validade intrínseca e extrínseca da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI, realizadas em eluatos sanguíneos, em relação a IFI em soros de cães (teste de referência).....	71
6.3. Avaliação da concordância entre os resultados obtidos através do uso de soros e eluatos sanguíneos para os testes sorológicos.....	79
6.3.1. Análise comparativa da IFI em soros e eluatos sanguíneos.....	79
6.3.2. Análise comparativa da ELISA(Bio-Manguinhos) em soros e eluatos.sanguíneos.....	80
6.3.3. Análise comparativa da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>) em soros e eluatos sanguíneos.....	81
6.4. Determinação da reatividade cruzada dos testes sorológicos em amostras de soros e eluatos sanguíneos obtidas de cães infectados por <i>T. cruzi</i>	84
6.5. Reprodutibilidade da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI em eluatos sanguíneos em função do tempo decorrido após a coleta.....	85
6.6. Reprodutibilidade intrateste dos resultados.....	89
6.7. Concordância de resultados entre dois laboratórios.....	91
6.8. Avaliação das imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 como marcadoras de patogenicidade dos cães infectados por <i>L. chagasi</i>	92
6.9. Avaliação dos níveis de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 em relação à classificação clínica dos cães infectados.....	96
7. DISCUSSÃO.....	101
7.1. Validade da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI, em amostras de soro e eluato de SDPF, para o diagnóstico da LVC.....	102
7.2. Reprodutibilidade da ELISA (ag. <i>L. major-like</i>), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI em eluatos de SDPF em função do tempo decorrido após a coleta.....	110

7.3. Reprodutibilidade intratestes e intertestes de resultados.....	112
7.4. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 em relação à classificação clínica dos cães infectados por <i>L. chagasi</i>	114
7.5. Desenho e limitações do estudo.....	115
8. CONCLUSÕES.....	117
9. RECOMENDAÇÕES.....	120
10. ANEXOS.....	122
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

RESUMO

A leishmaniose visceral vem apresentando mudanças importantes em seu padrão de transmissão, com progressiva urbanização e expansão geográfica, acometendo regiões anteriormente consideradas indenes. O controle da doença tem se mostrado difícil e laborioso, e a experiência adquirida nas últimas décadas revela a necessidade de se utilizar as medidas de controle de forma integrada. Incluída entre as estratégias preconizadas pelos órgãos públicos, a eliminação dos reservatórios caninos constitui uma importante ação que, para ser executada, exige uma correta identificação dos cães infectados. Outras medidas, como a vacinação dos cães, têm sido também utilizadas. Com a introdução no mercado de uma vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina (Leishmune[®]), capaz de ocasionar o desenvolvimento de altos níveis de anticorpos IgG, torna-se necessária a utilização de novos marcadores sorológicos. Além disso, para o diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania chagasi*, é desejável a utilização de sangue dessecado em papel de filtro (SDPF), pois apresenta vantagens sobre a utilização de soro obtido por punção venosa, principalmente com relação aos custos envolvidos com logística e às facilidades para utilização em condições de campo.

Assim, neste trabalho, buscou-se validar, em amostras de soro e de SDPF, um teste de imunofluorescência indireta (IFI), desenvolvido pela Bio-Manguinhos, e dois testes imunoenzimáticos (ELISA), sendo um deles também desenvolvido pela Bio-Manguinhos e o outro desenvolvido de acordo com a técnica descrita por Voller (1976) com modificações, utilizando antígeno solúvel obtido a partir de promastigotas de *L. major-like*. Avaliou-se também a reprodutibilidade dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 por estas reações sorológicas, ao longo do tempo decorrido após a coleta. Além disso, determinou-se a capacidade das imunoglobulinas IgG1 e IgG2 de se constituírem em marcadores de infecção ativa por *L. chagasi* e o comportamento das mesmas em amostras de SDPF.

As amostras de soro e eluato de SDPF obtidas de 161 cães – sendo 31 negativos, 10 chagásicos, 42 infectados assintomáticos, 45 infectados oligossintomáticos e 33 infectados

polissintomáticos – foram ensaiadas de forma pareada no 1º dia após a coleta (D.A.C.), sendo que no 15º, 30º e 60º D.A.C. foram ensaiadas alíquotas de amostras de eluato de SDPF e comparadas com os resultados obtidos com o soro no 1º D.A.C.

A validade das reações, em soro e em eluato, foi aferida através dos índices de co-positividade (icp), co-negatividade (icn), concordância de Youden (J) e dos valores preditivos positivo (vpp) e negativo (vpn), utilizando-se a reação de IFI em soros como referência, uma vez que esta reação demonstrou fidelidade em identificar corretamente os animais verdadeiramente positivos e negativos. As reações de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos), ELISA IgG (ag. *L. major-like*) e ELISA IgG2 (ag. *L. major-like*), em amostras de soro e eluato, se mostraram válidas para o diagnóstico sorológico da LVC. A distribuição cruzada dos resultados obtidos com soro e eluato, para cada reação avaliada, revelou ótimas e boas concordâncias para as reações de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos), ELISA IgG (ag. *L. major-like*) e ELISA IgG2 (ag. *L. major-like*). A análise da reprodutibilidade das reações em SDPF, armazenadas a 4°C na presença de sílica-gel., em função do tempo, demonstrou que níveis de imunoglobulinas específicas da classe IgG, presentes nas amostras de SDPF, mantiveram-se estáveis por até 30 D.A.C. pela reação de IFI e por até 60 D.A.C. pelas reações de ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major-like*). As imunoglobulinas específicas das subclasses IgG1 e IgG2, presentes nas amostras de SDPF, também mantiveram seus níveis estáveis por até 60 D.A.C. pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*). Não foi possível estabelecer uma correlação entre os níveis da imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi*.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis comes presenting important changes in its standard of transmission, with gradual urbanization and geographic expansion, attacking undamaged considered regions previously. The control of the illness if has shown difficult and laborious, e the experience acquired in the last decades discloses the necessity of if using the measures of control of integrated form. Enclosed it enters the strategies praised for the public agencies, the elimination of the canine reservoirs constitutes an important action that, to be executed, it demands a correct identification of the dogs with infection. Other measures, as the vaccination of the dogs, they have been also used. With the introduction in the market of a vaccine against the Canine Visceral Leishmaniasis (Leishmune[®]), capable to cause the development of high levels of IgG antibodies, the use of new serological markers becomes necessary. Moreover, for the serodiagnosis of the infection for *Leishmania chagasi*, the use of blood desiccated in filter paper (SDPF) is desirable, therefore it presents advantages on the use of serum gotten for venopuncture, mainly with relation to the involved costs with logistic and the easinesses for use in field conditions.

Thus, in this work, one searched to validate, in samples of serum and SDPF, one has tested of indirect fluorescence antibody (IFA), developed for the Bio-Manguinhos, e two enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), being one of them also developed by the Bio-Manguinhos and the other developed in accordance with the described technique for Voller (1976) with modifications, using dissolvable antigen gotten from promastigotas of *L. major-like*. The reproducibility of the levels of antibodies IgG, IgG1 and IgG2 was also evaluated, for these serological reactions, to long of the passed time after the collection. Moreover, it was determined capacity of the antibodies IgG1 and IgG2 of if constituting in markers of active infection of *L. chagasi* and their behavior in samples of SDPF.

The samples of serum and eluates of SDPF gotten of 161 dogs - being 31 negatives, 10 with *Trypanosoma cruzi* infection, 42 asymptomatic, 45 oligosymptomatic and 33 polisymptomatic for *L. chagasi* infection - they had been assayed in duplicate in the 1^o day

after collection (D.A.C.), being that in 15°, 30° and 60° D.A.C. they had been assayed aliquot of samples of eluates of SDPF and compared with the results gotten with the serum in 1° D.A.C. The validity of the reactions, in serum and eluates, it was surveyed through the indices of the co-positivity (icp), co-negativity (icn), agreement of Youden (j) and the preditivos values positive (vpp) and negative (vpn), using it reaction of IFA in serum as reference, a time that this reaction demonstrated allegiance in identifying the truly positive and negative animals correctly. The IFA, ELISA (Bio-Manguinhos), ELISA IgG (Ag. *L. major-like*) and ELISA IgG2 (Ag. *L. major-like*), in samples of serum and eluates, if they had shown valid for the serodiagnosis of the LVC. The crossed distribution of the results gotten with serum and eluates, for each evaluated reaction, it disclosed and good agreements for the IFI reactions excellent, ELISA (Bio-Manguinhos), ELISA IgG (Ag. *L. major-like*) and ELISA IgG2 (Ag. *L. major-like*). The analysis of the reproducibility of the reactions in SDPF, stored 4°C with silica-gel, in function of the time, it demonstrated that levels of specific antibodies IgG, gifts in the samples of SDPF, they had been remained steady for up to 30 D.A.C. for the reaction of IFI and up to 60 D.A.C. for the reactions of ELISA (Bio-Manguinhos) and ELISA (Ag. *L. major-like*). The specific antibodies of the subclasses IgG1 and IgG2, gifts in the samples of SDPF, also they had kept its steady levels for up to 60 D.A.C. for the reaction of ELISA (Ag. *L. major-like*). It was not possible to establish a correlation enters the levels of the antibodies IgG, IgG1 and IgG2 with the clinical classification of the dogs with *L. chagasi* infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma do estudo.

Figura 2: Coleta das amostras. (a) Punção venosa efetuada nos cães; (b) transferência do material sanguíneo para o papel de filtro; (c) transferência do restante do sangue para o tubo de vidro e (d) secagem dos papéis de filtro em suporte à temperatura ambiente.

Figura 3: Aliquotagem, codificação e transporte de amostras. (a) Aliquotagem e codificação dos soros em microtubos; (b) caixa térmica para transporte das amostras para o laboratório; (c) preparo dos picotes e (d) embalagens individuais, contendo os picotes em sílica-gel, devidamente seladas e rotuladas.

Figura 4: Esquema da adição do soro de título conhecido nas lâminas.

Figura 5: Esquema da adição das amostras de eluato nas lâminas.

Figura 6: Esquema da adição das amostras de soro nas lâminas.

Figura 7: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do antígeno.

Figura 8: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes diluições do soro.

Figura 9: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG canino.

Figura 10: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG1 canino.

Figura 11: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG2 canino.

Figura 12: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soro e eluato de um cão positivo e um negativo para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para as eluições preparadas utilizando diferentes volumes de PBS para eluir cada picote do papel de filtro Whatman nº 4.

Figura 13: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA (Bio-Manguinhos) em soros de cães.

Figura 14: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em soros de cães, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

Figura 15: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em soros de cães, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

Figura 16: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a IFI em eluatos sanguíneos, utilizando o título de 1:40 como limiar de reatividade.

Figura 17: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a IFI em eluatos sanguíneos, utilizando o título de 1:20 como limiar de reatividade.

Figura 18: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA (Bio-Manguinhos) em eluatos sanguíneos.

Figura 19: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em eluatos sanguíneos, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

Figura 20: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em eluatos, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

Figura 21: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados pela IFI (Bio-Manguinhos).

Figura 22: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos).

Figura 23: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like).

Figura 24: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* da subclasse IgG1, em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like).

Figura 25: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* da subclasse IgG2, em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like).

Figura 26: Títulos de imunoglobulina IgG canina, pela reação de IFI em soros, em relação à classificação dos cães.

Figura 27: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG canina, pela reação de ELISA (Bio-Manguinhos) em soros, em relação à classificação dos cães.

Figura 28: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major*-like) em soros, em relação à classificação dos cães.

Figura 29: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG1 canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major*-like) em soros, em relação à classificação dos cães.

Figura 30: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG2 canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major*-like) em soros, em relação à classificação dos cães.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo do diluente de amostra/conjugado.

Tabela 2: Diluição do conjugado.

Tabela 3: Preparo do substrato.

Tabela 4: Preparo da solução PBS-AE.

Tabela 5: Interpretação do índice de Kappa.

Tabela 6: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI, realizada em soros, de cães e da categorização dos animais.

Tabela 7: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

Tabela 8: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

Tabela 9: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

Tabela 10: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG (Bio-Manguinhos), realizada em soros de cães, e através da IFI em soros de cães.

Tabela 11: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros de cães e através da IFI em soros de cães.

Tabela 12: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros de cães e através da IFI em soros de cães.

Tabela 13: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI em eluatos sanguíneos e através da IFI em soros de cães.

Tabela 14: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

Tabela 15: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

Tabela 16: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

Tabela 17: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

Tabela 18: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela IFI, em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

Tabela 19: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG (Bio-Manguinhos), em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

Tabela 20: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

Tabela 21: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos sanguíneos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

Tabela 22: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos sanguíneos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

Tabela 23: Soropositividade de cães infectados por *T. cruzi*, para amostras de soro e eluato, pelas técnicas de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major*-like).

Tabela 24: Reprodutibilidade intratestes dos resultados pelo Teste “t de Student”.

Tabela 25: Avaliação da concordância de resultados entre os laboratórios de Parasitologia/Histopatologia da UFOP e de Sorologia da FUNED.

Tabela 26: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Tabela 27: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Tabela 28: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Tabela 29: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

LISTA DE ANEXOS

Figura 1: Ficha para avaliação clínica dos cães.

Figura 2: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados pelas reações de IFI (Bio-Manguinhos) (a), ELISA (Bio-Manguinhos) (b), ELISA IgG (ag. *L. major-like*) (c), ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*) (d) e ELISA IgG2 (ag. *L. major-like*) (e).

Figura 3: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média ajustada das absorbâncias, em soros e eluatos, em quatro momentos após a coleta, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*.

Figura 4: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em soros, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 5: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em eluatos no 1º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 6: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em eluatos no 15º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 7: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em eluatos no 30º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 8: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em eluatos no 60º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 9: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 1ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 10: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 2ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 11: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 3ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 12: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 4ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 13: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 5ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 14: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 6ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

Figura 15: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 7ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag. *L. major-like* – Antígeno bruto de *Leishmania major-like*.

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

CIE – Contra-imunoeletroforese.

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses.

D.A.C. – Dias Após a Coleta.

DAT – *Direct Agglutination Test*.

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.

E – Especificidade.

FAST – *Fast Agglutination Screening Test*.

FML – Ligante fucose-manose.

FN – Falso-negativo.

FP – Falso-positivo.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias.

gl – grau de liberdade.

HAI – Hemaglutinação indireta

icn – Índice de co-negatividade.

icp – Índice de co-positividade.

IFI – Imunofluorescência indireta.

IgG – Imunoglobulina da classe G.

IgG1 – Imunoglobulina da subclasse G1.

IgG2 – Imunoglobulina da subclasse G2.

IgG3 – Imunoglobulina da subclasse G3.

IgG4 – Imunoglobulina da subclasse G4.

IgM – Imunoglobulina da classe M.

J – Concordância de Youden.

LIT – *Liver Infusion Tryptose*.

LogMA – Logaritmo do múltiplo da absorbância.
LogRT – Logaritmo da recíproca dos títulos.
LV – Leishmaniose Visceral.
LVA – Leishmaniose Visceral Americana.
LVC – Leishmaniose Visceral Canina.
LZOON – Laboratório de Zoonoses.
MS – Ministério da Saúde.
NNN – Meio de cultivo de Nicole, Novy e Neal.
OPD – Ortofenilenodiamino.
PBH – Prefeitura de Belo Horizonte.
PBS – Salina Tamponada.
PBS-AE – Solução de azul de Evans em salina tamponada.
PBST – Solução Salina Tamponada – Tween.
PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral.
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia.
q.s.p. – quantidade suficiente para.
RFC – Reação de Fixação do Complemento.
S – Sensibilidade.
SDPF – Sangue Dessecado em Papel de Filtro.
TMB – Tetrametilbenzidina.
TRALd – Teste Rápido Anti-*Leishmania donovani*.
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto.
VN – Verdadeiro-negativo.
VP – Verdadeiro-positivo.
vpn – Valor preditivo do resultado negativo.
vpp – Valor preditivo do resultado positivo.
WHO – World Health Organization.

1. INTRODUÇÃO

A realização de inquéritos sorológicos constitui a base de informações para o direcionamento das medidas de controle e profilaxia de uma série de doenças. Das várias metodologias disponíveis, os testes sorológicos apresentam vantagens, como a elevada sensibilidade, que os fazem de escolha para serem usadas em diagnóstico coletivo, tornando possível a identificação das condições assintomáticas e subclínicas. A escolha das reações sorológicas a serem utilizadas constitui um dos principais aspectos para a viabilização destes estudos, sendo importante avaliar os custos, a validade do método empregado e a simplicidade metodológica. A utilização de amostras de sangue dessecado em papel de filtro (SDPF) em substituição ao tradicional uso do soro, apresenta inúmeras vantagens, relatos de excelentes índices de concordância entre soro e eluato sanguíneo, utilizados para a dosagem de anticorpos, em diferentes viroses causadoras de doença respiratória aguda (Chin *et al.*, 1966), na esquistossomose (Evengard *et al.*, 1988), na doença de Chagas humana (Machado-Coelho *et al.*, 1995), na toxoplasmose caprina (Bahia *et al.*, 1995) e na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (Gomes *et al.*, 2001). Entretanto permanece a dúvida sobre sua validade para o diagnóstico sorológico da LVC, uma vez que diversos autores têm relatado uma baixa sensibilidade dos testes sorológicos utilizando amostras de eluato sanguíneo (Evans *et al.*, 1990; Braga *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2004). Além disso, torna-se necessário avaliar sua reprodutibilidade ao longo do tempo decorrido após a coleta (D.A.C.), uma vez que em situações de acúmulo de amostras para análise nos laboratórios, como em surtos epidêmicos, é preciso armazenar parte delas para serem processadas posteriormente. Portanto, a validação de testes sorológicos utilizando amostras sanguíneas colhidas em papel de filtro constitui elemento de interesse de saúde pública, capaz de viabilizar a realização de inquéritos soropidemiológicos de maior escala.

As metodologias convencionais utilizadas para pesquisa de anticorpos específicos para a LVC objetivam a determinação dos níveis de IgG total anti-*Leishmania*. Entretanto, com a introdução no mercado de uma vacina canina anti-*Leishmania* (Leishmune[®]), capaz de ocasionar uma resposta celular e humoral, com altos níveis de IgG total anti-*Leishmania* (Borja-Cabrera *et al.*, 2002), torna-se necessária a utilização de um novo marcador sorológico, uma vez que pelos métodos sorológicos tradicionais – baseados na detecção de

anticorpos IgG totais – torna-se impossível diferenciar cães infectados de cães vacinados. Alguns pesquisadores passaram a buscar este marcador nas subclasses de IgG – IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Deplazes *et al.*, 1995; Mendes *et al.*, 2003; Quinnell *et al.*, 2003). Entretanto, dados os resultados controversos encontrados entre estes autores, fazem-se necessários novos estudos sobre o tema. Através da determinação dos níveis de IgG1 e de IgG2, este trabalho busca também estabelecer correlação entre os níveis destes com a classificação clínica dos cães. Estas imunoglobulinas poderiam vir a se constituir em marcadores capazes de diferenciar as diferentes formas clínicas, bem como se revelarem bons marcadores da infecção por *L. chagasi*, o que seria de grande utilidade para a diferenciação de animais infectados e animais vacinados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Leishmaniose Visceral.

A Leishmaniose Visceral ou Calazar é uma doença infecciosa ocasionada por três espécies de protozoários heteroxênicos do gênero *Leishmania* ROSS, 1903: *Leishmania (L.) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) ROSS, 1903 e *Leishmania (L.) infantum* Nicolle, 1908 no Velho Mundo, e *Leishmania (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no Novo Mundo. O gênero *Leishmania* é composto por um grande número de espécies, classificadas de acordo com critérios biológicos, bioquímicos, clínicos, imunológicos e genéticos. Esses protozoários digenéticos (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae) apresentam como formas evolutivas amastigotas – parasitas obrigatórios de células do Sistema Fagocitário Mononuclear do hospedeiro vertebrado – e promastigotas e paramastigotas no trato alimentar do hospedeiro invertebrado (Hoare & Wallace, 1966; Hommel, 1978; Walters, 1993). Multiplicam-se assexuadamente por divisão binária simples tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, apesar das evidências apontarem para a possibilidade de troca de material genético sexual e parasexualmente (Bastien et al., 1992).

Fêmeas de insetos da ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae quando infectados pelo parasita tornam-se vetores da doença, podendo transmiti-la para os hospedeiros vertebrados (Deane, 1956). No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor (Deane & Deane, 1954a; Deane et al., 1955 & Deane, 1956), sendo o único de grande importância quer por sua capacidade vetorial, quer por sua ampla distribuição geográfica no novo mundo. Outras espécies podem participar da transmissão, tais como *Lu. cruzi* e *Lu. Evansi*, capazes de atuar como vetores de importância secundária (Travi et al., 1996; Galati et al., 1997).

Nas Américas, os animais silvestres incriminados como hospedeiros vertebrados, até o momento são: as raposas *Dusycion vetulus* (= *Lycalopex vetulus*), encontrada infectada no Sudoeste do Ceará, Brasil (Deane & Deane, 1954) e *Cerdocyon thous*, na Região Amazônica – Brasil (Lainson et al., 1969), e o gambá *Didelphis marsupialis*, na Venezuela (Corredor et al., 1989). Os cães são incriminados como hospedeiros vertebrados

no ambiente doméstico e peridoméstico, a exemplo do que ocorre no Mediterrâneo (Cunha & Chagas, 1937).

São conhecidos dois ciclos epidemiológicos da doença: o Silvestre, mantido principalmente pelas raposas, e o Peridomiciliar, mantido pelo cão (Lainson & Shaw, 1987). Estes ciclos se superpõem, uma vez que as raposas possuem hábitos erráticos, visitando o domicílio e seus anexos (galinheiros) em busca de alimento. Assim, esses animais atuam como fonte de infecção para os flebotomíneos existentes no peridomicílio, que por sua vez transmitirão o parasita para os cães, principais reservatórios domiciliares da doença (Lainson *et al.*, 1969).

Em humanos, a doença pode não se manifestar, assumindo um curso assintomático, sem qualquer manifestação clínica aparente (Prata, 1957; Toledo *et al.*, 1983). Em outros casos, apresenta uma história natural característica, sendo denominada forma clássica do calazar. A evolução desta forma pode ser dividida nos períodos inicial, de estado e final.

O período inicial geralmente se apresenta de forma insidiosa, com febre sem um padrão definido, seguida de mal-estar, com progressivo aparecimento de esplenomegalia. Podem ocorrer ainda dispnéia e perturbações digestivas. Logo após esta fase, surge o período de estado, com febre, emagrecimento, edemas nos membros inferiores, anemia, alopecia, manifestações hemorrágicas e hipertrofia ganglionar. Ocorrem ainda hepatomegalia, distensão abdominal, circulação colateral e superficial, manifestações respiratórias, com tosse produtiva ou improdutiva e bronquite freqüentemente associada. Finalmente, sem o estabelecimento de terapêutica específica, ocorre o agravamento do estado geral do paciente, com grave emagrecimento – podendo chegar à caquexia, prostração, intensificação dos edemas, marcante hepatoesplenomegalia e, algumas vezes, ascite. Podem ainda ocorrer complicações infecciosas associadas, capazes de levar o paciente ao óbito (Prata, 1957). Na Europa e na América do Sul, a doença apresenta ainda freqüente associação com a AIDS (Estambale & Knight, 1992; Alvar *et al.*, 1996).

A leishmaniose visceral ocorre na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Encontra-se presente em quatro dos cinco continentes (Ásia, África, Europa e Américas Central e do Sul) sendo endêmica em 88 países (Monteiro *et al.*, 1994), com mais

de 90% dos casos provenientes de Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (Vannier-Santos *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2003) e quinhentos mil casos novos registrados anualmente no mundo (Mendes *et al.*, 2003).

Nas Américas, a grande maioria dos casos (acima de 90%) é autóctone do Brasil, onde ocorrem em 19 dos 27 estados e em quatro regiões políticas, excetuando-se a Região Sul (Monteiro, 2002). Os casos notificados encontram-se assim distribuídos: Região Nordeste (92%), Região Sudeste (4%), Região Norte (3%), Região Centro-Oeste (1%) (Vieira & Coelho, 1998). O número de municípios com casos notificados aumentou sensivelmente nos últimos anos, de 520 municípios em 1984 para 930 municípios em 2000 (Simplício *et al.*, 2002).

No Brasil, a leishmaniose visceral encontra-se em franca expansão e urbanização desde a década de 1980, (MS, 1984; Marzochi *et al.*, 1983;1985;1987; Genaro *et al.*, 1990; Jerônimo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997; Tavares, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001), atingindo municípios até então considerados indenes (Profeta-Da-Luz *et al.*, 2001). As más condições de vida da população das periferias urbanas, o êxodo rural, a existência de flebotomíneos vetores e de população canina susceptível são fatores determinantes para a urbanização. Ademais, a incapacidade operacional para a realização de inquéritos censitários, a fim de identificar os casos assintomáticos, inviabilizam a interrupção da transmissão nestas áreas.

2.1.1. Leishmaniose Visceral Canina:

A Leishmaniose Visceral, descrita pela primeira vez em cães por Nicolle (1908b), apresenta-se mais prevalente nesses animais do que em humanos. Nas Américas, a doença canina só veio a ser reconhecida com os trabalhos do grupo chefiado por Evandro Chagas no Estado do Pará (Chagas *et al.*, 1937). O importante papel do cão na manutenção da transmissão no ciclo peridomiciliar, atuando como reservatório, foi esclarecido por Deane & Deane (Deane, 1956; Deane & Deane, 1962). Estes autores, estudando importante foco da doença no Estado do Ceará, vieram esclarecer os principais aspectos epidemiológicos da doença.

Postula-se que o cão seja, a exemplo do homem, um hospedeiro acidental, uma vez que apresenta sintomatologia clínica atribuída à doença, indicando uma relação parasita-hospedeiro relativamente recente (Hommel *et al.*, 1995). O período de incubação é variável e difícil de ser determinado, uma vez que, em condições naturais, não se consegue estabelecer com segurança o momento da infecção. Em termos gerais, varia de 3 meses até vários anos (Genaro, 1993). A doença canina frequentemente se apresenta clinicamente inaparente por longos períodos (Longstaffe *et al.*, 1983).

O quadro clínico é bastante variável, certamente influenciado por fatores relacionados à resposta imunológica do cão e por fatores intrínsecos do parasita, bem como pela carga parasitária inoculada. É representado por um conjunto de sinais, tais como febre, emagrecimento progressivo, alopecia, anemia – geralmente normocítica e normocrômica, hipergamaglobulinemia, descamação cutânea e outras dermatites, ulceração cutânea – normalmente nas orelhas, articulações, focinho e cauda, áreas de hiperqueratose, conjutivite, onicogribose, apatia, diarreia, vômito, linfadenopatia, edema das patas e, tardiamente, paresia das patas posteriores e caquexia (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957; Alencar, 1959; Marzochi *et al.*, 1985; Abranches *et al.*, 1991b; Genaro, 1993).

Assim, de acordo com a clínica, os cães podem ser classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Mancianti *et al.*, 1988). Segundo estes autores, os assintomáticos são aqueles cães que não apresentam sintomas da infecção; os

oligossintomáticos apresentam somente linfadenopatia, emagrecimento e/ou pêlo opaco; os polissintomáticos apresentam, independentemente de associação com os sinais citados para os oligossintomáticos, alguns ou todos os outros sinais clássicos característicos do quadro clínico da doença.

Outra abordagem para classificação dos cães foi utilizada por Quinnell *et al.* (2003). Estes autores observaram a presença de alopecia, ulceração e descamação cutânea, conjuntivite, linfadenopatia, onicogribose, edema das patas e paresia das patas posteriores nos cães infectados. Através do somatório dos escores, atribuídos a cada um dos sintomas observados e de acordo com a intensidade das manifestações, classificaram os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos.

É sabido que a capacidade de atuar como fonte de infecção para o vetor está presente nos cães com os três tipos clínicos, uma vez que apresentam intenso parasitismo cutâneo, mesmo em pele sã (Adler & Theodor, 1931a). Alvar *et al.* (1994) demonstraram a capacidade de cães sintomáticos e assintomáticos de infectarem os flebotomíneos vetores.

2.1.2. Epidemiologia:

A análise dos diferentes aspectos epidemiológicos observados para o Calazar permite a distinção de três tipos da doença: o Calazar Indiano, o Calazar Mediterrâneo e o Calazar Americano. Diferem quanto ao agente causador, o vetor, a distribuição geográfica e os elementos que integram a cadeia de transmissão.

O Calazar Indiano é causado por *Leishmania (L.) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903. O homem constitui o único mamífero encontrado infectado, caracterizando uma antroponose. A transmissão parece ocorrer de homem a homem pelos vetores *Phlebotomus argentipes* e *P. alexandri* (Lainson & Shaw, 1987), ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão, Paquistão, Nepal e no leste da China (Grimaldi *et al.*, 1989). Além do quadro clínico clássico, foram descritos alguns casos de Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar, uma forma clínica encontrada quase exclusivamente neste tipo epidemiológico (Kar, 1995).

O Calazar Mediterrâneo é causado pela infecção com a *Leishmania (L.) infantum* Nicolle, 1908. Ocorre predominantemente em crianças (Brener, 1957), sendo encontrado na Ásia Central, Norte e Noroeste da China, Sudoeste da Ásia, África e na Europa, em Portugal e em todos os países do Mediterrâneo (Grimaldi *et al.*, 1989). Foram descritos diversos hospedeiros silvestres, como o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lupus*), a raposa (*Vulpes vulpes*), além de outros canídeos. No ambiente domiciliar, encontramos o cão (*Canis familiaris*). Como vetores temos várias espécies de flebotomíneos, como: *P. alexandri*, *P. chinensis*, *P. kandelaki*, *P. longicuspis*, *P. major*, *P. mongolensis*, *P. tobbi* e *P. transcaucasicus* (Martins *et al.*, 1978).

O Calazar Americano, entidade mórbida causada por *Leishmania (L.) chagasi* Cunha e Chagas, 1937, foi primeiramente descrito em Assunção – Paraguai, em um indivíduo proveniente do Mato Grosso – Brasil (Migone, 1913). Constitui uma antroponose, tendo além dos reservatórios silvestres, o cão como importante reservatório no peridomicílio (Cunha & Chagas, 1937). A transmissão ocorre, principalmente Cão – Homem e Cão – Cão, através do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Deane & Deane, 1954a; Deane *et al.*, 1955; Deane, 1956), e em algumas regiões também pelo *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* (Travi *et al.*, 1996; Galati *et al.*, 1997). Ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México e El Salvador (Lainson & Shaw, 1987).

Na Leishmaniose Visceral Americana (LVA), há uma predominância da doença em crianças (Vieira & Coelho, 1998), o que vem a reforçar a importância da transmissão peridomiciliar. Além disso, o estado nutricional apresenta-se como fator de risco para uma forma severa da infecção, uma vez a desnutrição é capaz de ocasionar a debilidade do sistema imunológico (Cerf *et al.*, 1987). Os cães são os responsáveis pela manutenção da transmissão, uma vez que, ao contrário dos humanos, conseguem infectar flebotomíneos com facilidade (Deane, 1956). Vários autores têm concentrado esforços na identificação dos fatores de risco de infecção para a população canina. Em relação à idade dos cães, está bem estabelecido na literatura que a prevalência é superior em animais de idade avançada (Alencar & Cunha, 1963; Abranches *et al.*, 1991a; Sideris *et al.*, 1996). Segundo Alencar

& Cunha (1963), o sexo do animal não interfere no risco de adquirir a doença. Cabrera *et al.* (2003) e Cardoso *et al.* (2004) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as prevalências da doença em cães machos e em fêmeas. Com relação à raça não há qualquer padrão estabelecido, havendo muitas discordâncias entre diversos autores (Pozio *et al.*, 1981; Sideris *et al.*, 1996; França-Silva, 1997). Entretanto, cães de trabalho constituem um grupo de risco, uma vez que dormem fora dos domicílios e, portanto, encontram-se mais propensos às picadas dos flebotomíneos (Dye *et al.*, 1992). Com relação ao fenótipo tipo de pêlo, observou-se que cães com pêlos curtos são mais susceptíveis a LVC, quando comparado com cães de pêlo longo, uma vez que nos primeiros o repasto sanguíneo é facilitado pelo tipo de pelagem (França-Silva *et al.*, 2003).

Quanto à distribuição geográfica, a LVA foi inicialmente identificada principalmente em áreas rurais, geralmente nos sopés de serra, onde a densidade vetorial se encontra aumentada (Deane, 1956). Casos de transmissão autóctone em regiões urbanas foram também identificados, apesar de em menor escala (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957). Posteriormente, novos focos de transmissão urbana foram descritos, caracterizando um processo de urbanização e de expansão da doença (MS, 1984; Marzochi *et al.*, 1983; 1985; 1987; Genaro *et al.*, 1990; Jerônimo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997; Tavares, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Profeta-Da-Luz *et al.*, 2001).

2.1.3. Controle e Profilaxia:

Na cadeia epidemiológica da LVA, existem três elos nos quais se focam as medidas de controle: o cão – reservatório (e, com menor importância epidemiológica, o homem – reservatório); o flebotomíneo – vetor; o homem susceptível (Marzochi, 1992).

Com a identificação dos cães infectados e posterior eliminação, espera-se a interrupção do ciclo peridomiciliar da doença. Como a confirmação parasitológica da infecção é inviável para estudos de campo, a soropositividade passa a indicar o sacrifício dos animais. Assim, esta medida está entre as recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990). Entretanto, alguns autores têm questionado esta medida de controle

(Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Dietze *et al.*, 1997; Ashford *et al.*, 1998). Vieira & Coelho (1998) não encontraram correlação entre casos caninos e humanos. Pelo contrário, Oliveira-Lima *et al.* (1996), Oliveira *et al.* (2001) e Margonari *et al.* (2004) estabeleceram uma clara correlação.

O tratamento dos cães, no Brasil, não possui o aval dos órgãos de saúde pública. Mesmo com a remissão dos sinais clínicos, os animais estão sujeitos a recidivas, além da possibilidade de seleção de cepas resistentes às drogas empregadas nos protocolos de tratamento humano (M.S., 2003). Além disso, Alvar *et al.* (1994), utilizando um total de seis cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, observaram que mesmo após o tratamento quimioterápico todos os animais se mantiveram capazes de infectar os flebotomíneos.

Medidas complementares dirigidas ao cão devem receber especial atenção, como é o caso do controle da população errante, estabelecendo-se uma rotina de captura e eliminação desses animais, e a utilização de telas em canis individuais (MS,2003). David *et al.* (2001) avaliaram a efetividade do uso de coleiras de deltametrina para proteger os cães contra picadas de flebotomíneos (*Lu. Longipalpis* e *Lu. Migonei*). Segundo estes autores, houve um potente efeito de inibição do repasto para ambas as espécies de flebotomíneos utilizadas, variando de 96% a 100% nas primeiras semanas de uso, com progressiva redução do efeito após vinte semanas. Além disso, observou-se também efeito letal sobre os vetores, com mortalidade máxima na terceira e quarta semanas (91% a 96%). Ademais, foi demonstrada a efetividade dos colares mesmo em animais expostos a intempéries, como sol e chuva, constituindo uma medida de grande valor para proteção individual dos animais (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; David *et al.*, 2001).

O combate ao vetor constitui outro importante foco para o controle da doença. O estudo das populações de flebotomíneos, incluindo a dinâmica da densidade populacional, o grau de antropofilia e de zoofilia das espécies, bem como a importância das diferentes espécies na transmissão, constituem fatores a serem considerados para o sucesso do programa de controle (Marzochi, 1992; Dye, 1996). A aplicação de inseticidas no interior e cercanias do domicílio encontra-se entre as medidas do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), elaborado pelo Ministério da Saúde (MS, 2003).

Os humanos podem funcionar como reservatório (Deane, 1956), embora com pequena importância epidemiológica. Medidas de proteção individual – principalmente para indivíduos que exercem contato com a mata, como repelentes e mosquiteiros, são válidas e auxiliam na diminuição da incidência da doença, mas muitas vezes constituem medidas utópicas, principalmente em países tropicais e em comunidades subdesenvolvidas (Marzochi, 1992). O diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos devem ser associados às demais medidas de controle, visando a redução dos índices de morbimortalidade.

Qualquer programa de controle da Leishmaniose Visceral deve ser integrado, com todas as medidas profiláticas executadas concomitantemente. Para Alencar (1961) e Sherlock & Almeida (1970) a eliminação de cães positivos e de vetores no domicílio têm um impacto significativo na redução dos casos humanos. Magalhães *et al.* (1980) conseguiram controlar a LVA no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, através do sacrifício de cães positivos pela RFC e/ou por exame de esfregaço por aposição da pele da orelha, do controle vetorial por aplicação de inseticidas e do tratamento de todos os casos humanos com glucantime®. Por outro lado, Ashford *et al.* (1998), trabalhando em região endêmica de Jacobina, BA, ao avaliarem o impacto da eliminação de cães soropositivos como medida de controle sobre a incidência da doença, não conseguiram a interrupção da transmissão, apesar da redução da prevalência de cães soropositivos em 26% (de 36% para 10%). Estes dados sugerem que a eliminação de cães, sem o concurso de outras medidas, é insuficiente para controlar a doença. Entretanto, os autores concluíram que a força de infecção para os cães expostos pode ser reduzida a cada programa de controle.

Braga *et al.* (1998), ao compararem um programa de eliminação tardia de cães soropositivos por IFI em eluatos com outro de eliminação rápida de cães soropositivos pela ELISA em soros, em duas áreas selecionadas, – sendo cada uma composta por quatorze localidades da região endêmica do Vale do Rio Curú, no Ceará – executaram a medição da prevalência do calazar canino antes e 10 meses após o início dos programas. Apesar de não terem alcançado a interrupção da transmissão, conseguiram com o primeiro programa uma redução de 9% na prevalência (de 37% para 28%) e, com o segundo programa, de 27% (de

46% para 19%). Segundo estes autores, os dados obtidos sugerem a importância da rápida eliminação dos animais infectados e da utilização de uma técnica sensível para o sucesso dos programas de controle.

De fato, a eliminação tardia dos cães, ocasionada pela baixa capacidade de processamento de amostras pelos laboratórios públicos, deixando-os por um longo período atuando como reservatórios, além da baixa sensibilidade dos testes diagnósticos e das dificuldades de identificar o cão assintomático de área endêmica parecem ser capazes de comprometer o sucesso dos programas de controle.

É importante destacar que as medidas de controle devem ser adaptadas à realidade local, de acordo com as características epidemiológicas da região. No entanto, muitos aspectos da epidemiologia da doença continuam obscuros, principalmente em relação à biologia do inseto vetor, seus hábitos, criadouros e condições naturais de evolução. Situações novas, como a urbanização, o caráter emergente e a associação com a AIDS, dificultam ainda mais o controle da transmissão.

A profilaxia da LVA através da vacinação dos cães constitui uma importante intervenção no ciclo epidemiológico, apresentando-se como uma medida ideal e com potencial para substituir a eutanásia dos cães – procedimento de grande rejeição por parte da população e das sociedades protetoras dos animais – com grande vantagem operacional e financeira. Ademais, a introdução de uma vacina eficaz representaria a atuação de forma profilática sobre o reservatório canino e, sua utilização em massa, certamente reduziria o número de cães infectados, amenizando o problema da permanência de animais assintomáticos, não diagnosticados, participando da transmissão.

Recentemente, foi desenvolvida uma vacina utilizando FML (ligante fucose-manose) obtida a partir de uma cepa de *Leishmania donovani*, pelo grupo de pesquisadores liderado pela Dra. Clarissa Palatinik de Sousa, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os dados preliminares apresentados foram favoráveis à sua utilização, uma vez que é capaz de ocasionar forte resposta humoral, levando à soroconversão 97% dos animais vacinados, e celular, representada pela intradermorreação positiva em 100% dos animais vacinados, com conseqüente proteção da população canina vacinada (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Esta

vacina, produzida pela Fort Dodge Saúde Animal Ltda, se encontra em comercialização (Leishmune[®]), com aprovação pelo Ministério de Agricultura. Entretanto, ainda existem dúvidas sobre a capacidade da vacina em impedir a infecção dos vetores, razão pela qual não houve aprovação da vacina pelo Ministério da Saúde. No momento, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em parceria com um instituto de pesquisa, está conduzindo um ensaio vacinal com esta vacina, no sentido de esclarecer melhor estas questões (MS, 2004).

A pesquisa de anticorpos específicos para a LVC tem sido conduzida através da detecção de IgG total. Como a vacinação induz forte resposta humoral, com elevados níveis de anticorpos IgG nos animais vacinados, a sorologia convencional torna-se incapaz de diferenciar animais vacinados de animais infectados, sendo necessária a utilização de novos marcadores. Assim, alguns pesquisadores passaram a buscá-los nas subclasses de IgG – IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Deplazes *et al.* (1995), através da pesquisa das subclasses IgG1 e IgG2, encontraram perfis diferenciados, com altos níveis de IgG1 e IgG2 para cães sintomáticos e altos níveis somente de IgG2 para cães assintomáticos. Além disso, houve manutenção dos altos níveis de IgG1 em animais não-responsivos à quimioterapia com glucantime[®], sendo esta subclasse de anticorpos indicativa de doença ativa. Outros autores encontraram níveis elevados de IgG1 em cães infectados e de IgG2 em animais vacinados (Mendes *et al.*, 2003). Ao contrário, Quinnell *et al.* (2003), não conseguiram correlacionar a forma clínica apresentada com os níveis das subclasses de IgG, concluindo pela presença de altos níveis de IgG1, IgG3 e IgG4 em todas as formas clínicas da doença canina.

Além do desenvolvimento de vacinas e de testes rápidos para uso em condições rurais, a suplementação alimentar da população humana é requerida, uma vez que a má nutrição constitui um fator de risco para a forma severa da doença e pode ser responsável pela debilidade do sistema imunológico antes da infecção ocorrer (Cerf *et al.*, 1987). É importante ressaltar que o Calazar exerce efeito direto sobre o estado nutricional do paciente (Harrison *et al.*, 1986).

2.1.4. Vigilância Epidemiológica:

O monitoramento da LVA através das atividades de vigilância epidemiológica busca a diminuição do risco de transmissão e das taxas de morbi-mortalidade em uma localidade, bem como fornecer informações para o planejamento das ações de controle. De acordo com a tendência atual, deve ser realizada não somente nas áreas endêmicas, mas em todos os municípios, uma vez que se trata de uma doença de rápida expansão, dada a ampla distribuição do vetor, a freqüente presença dos cães nos domicílios e as péssimas condições sanitárias dos subúrbios e pequenos logradouros em grande parte do país (MS, 2003). Além do mais, as correntes migratórias e o êxodo rural colocam em risco áreas livres de transmissão (MS, 1984).

Para o sucesso das ações de controle da LV, a vigilância deve abranger todos os elementos da cadeia de transmissão. Para tanto, é fundamental que haja um permanente controle sobre a população canina, com a realização de inquéritos sorológicos de freqüência e abrangência compatível com a classificação epidemiológica do município (MS, 2003). Além disso, são requeridas melhorias na resolutividade diagnóstica dos municípios, com capacitação dos profissionais de saúde e apoio logístico, essencial para o diagnóstico precoce dos casos humanos (Profeta-Da-Luz *et al.*, 2001). Por fim, destaca-se o controle entomológico, com a identificação da distribuição e da densidade vetorial em diferentes áreas (Marzochi, 1992), direcionando a aplicação de inseticidas de efeito residual no ambiente domiciliar e em seus anexos, tais como galinheiros, chiqueiros, currais e outros (Magalhães *et al.*, 1980).

2.1.5. Diagnóstico Clínico:

O Diagnóstico baseado na identificação dos sinais clínicos característicos do Calazar Canino é bastante dificultado, principalmente pela concorrência de outras patologias e quadros de desnutrição. Assim, nos casos em que se torna possível o diagnóstico, este se apresenta apenas presuntivo, mesmo em se tratando de cães de zona

endêmica. Soma-se a estas dificuldades o grande número de cães assintomáticos (Alvar *et al.*, 1997). Portanto, torna-se necessária a utilização de métodos laboratoriais, a fim de identificar, com maior segurança, os cães infectados.

2.1.6. Diagnóstico Laboratorial:

Quase sempre, a utilização de métodos laboratoriais torna-se indispensável para um diagnóstico seguro da LV. Composto o diagnóstico laboratorial desta doença, temos os métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares.

2.1.6.1. Métodos Parasitológicos:

Representa o diagnóstico de certeza da infecção. No entanto, muitas vezes é impossível a sua utilização, dado o seu caráter invasivo, o risco de complicações, as dificuldades operacionais e o custo envolvido para a utilização em maior escala, além da menor aceitação por parte dos proprietários dos cães. Ademais, os resultados obtidos com as técnicas disponíveis são enormemente discordantes, uma vez que as metodologias utilizadas variam enormemente para cada trabalho, além da falta de controle sobre variáveis como a carga parasitária e o grau de experiência do observador. Acrescenta-se a isso as dificuldades em identificar cães com parasitismo discreto e cães ainda na fase pré-patente da infecção (Brener, 1957). Outra desvantagem relevante é a pequena capacidade de processamento de amostras, uma vez que o exame do material colhido é lento e requer experiência do observador, o que em inquéritos amplos representa um fator limitante (Brener, 1957).

Estes métodos baseiam-se na observação do parasita em esfregaços e cortes de tecidos, tratados com corantes derivados de Romanowski – como Leishman e Giemsa, em isolamento por cultura ou em inoculação em animais. Dentre os órgãos pesquisados, se encontram o baço (Giraud & Cabassu, 1933), linfonodos (Giraud & Cabassu, 1936), medula óssea (Giraud & Cabassu, 1933; Alencar *et al.*, 1956), fígado (Giraud & Cabassu,

1933; Chagas *et al.*, 1938; Deane & Deane, 1954, 1955, 1955a; Brener, 1957) e pele (Giraud & Cabassu, 1932; Alencar *et al.*, 1956; Brener, 1957).

Diversos autores realizaram estudos buscando determinar os índices de positividade, a fim de indicar a melhor técnica. Lépine & Bifilger (1936) encontraram maior índice de positividade para o exame de material de punção de medula óssea (90%), quando comparados com material de punção esplênica (76,3%) e de punção hepática (38,1%). Brener (1957) comparou a punção hepática com a biópsia de pele em 19 cães, encontrando resultado positivo pela biópsia de pele e negativo pela punção hepática em 15 cães, e resultado positivo exclusivamente pela punção hepática em apenas 1 cão. Conclui o autor pela superioridade do exame de material da biópsia de pele. Siddig *et al.* (1988) encontraram índice de positividade superior para punção esplênica (98%) em relação à punção de medula óssea (54 a 86%) ou linfonodos (64%). Segundo Brener (1957), a comparação entre os resultados obtidos por diferentes autores dificilmente pode ser efetuada devido à falta de uniformidade entre as diferentes técnicas empregadas. No entanto, há um consenso na literatura quanto à baixa sensibilidade do exame de material obtido por punção hepática para o diagnóstico da LVC. Pela simplicidade operacional da biópsia de pele, e pelos bons índices de positividade relatados, esta técnica mostra-se superior aos exames de material hepático e esplênico. Ademais, para a execução destes últimos *in vivo* é necessária uma maior capacitação do pessoal da coleta, a fim de minimizar os riscos de complicações para o animal.

A cultura de material de biópsia, em paralelo ao exame de cortes e esfregaços de tecidos, aumenta sensivelmente os índices de positividade. Esta é normalmente executada em meio bifásico NNN/LIT (Mayrink, 1967), com temperatura de incubação variando entre 23°C e 26°C. Genaro *et al.* (1988) destacaram que a mielocultura é capaz de fornecer uma maior positividade, quando comparada ao mielograma e ao exame de pele.

O isolamento do parasita por inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*), de material de punção de fígado, baço ou medula óssea, constitui-se em uma alternativa para a melhoria da sensibilidade. Entretanto, apresenta pouco valor prático devido aos custos

elevados para manutenção de animais e ao tempo exigido para superar o período pré-patente e obter-se a positividade dos mesmos.

2.1.6.2. Métodos Imunológicos:

A Leishmaniose Visceral é reconhecida por determinar nos indivíduos acometidos, uma expansão policlonal de linfócitos B, traduzida por altos níveis de anticorpos, principalmente do tipo IgG e IgM (Tanner, 1996). A intensa produção de anticorpos causada pelo parasitismo faz com que os métodos sorológicos sejam amplamente utilizados e os torna de grande confiabilidade, tanto para o diagnóstico individual da doença, quanto para aplicação em inquérito epidemiológico (Magalhães *et al.*, 1980; Kar, 1995).

Os testes sorológicos apresentam vantagens que os tornam de escolha para utilização em inquéritos, uma vez que envolve procedimento de coleta relativamente pouco invasivo, viabilizando investigações sobre a prevalência da doença. Além disso, é possível identificar os casos assintomáticos, possibilitando o tratamento precoce de humanos e a eliminação dos cães. Entretanto, a reatividade cruzada com *Trypanosoma cruzi* constitui a maior desvantagem da maioria dos testes sorológicos (Bray, 1980), uma vez que dificulta a interpretação dos inquéritos epidemiológicos para o Calazar Canino, pois é comum a superposição geográfica das duas endemias (Costa *et al.*, 1991).

Atualmente estão disponíveis várias técnicas para o diagnóstico sorológico, como a RFC – Reação de Fixação do Complemento (Nussenzweig, 1957), IFI – Imunofluorescência Indireta (Duxbury & Sadun, 1964), HAI – Hemaglutinação indireta (Bray & Lainson, 1967), ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (Hommel, 1976; Hommel *et al.*, 1978), DAT – *Direct Agglutination Test* (Harith *et al.*, 1986) e FAST – *Fast Agglutination Screening Test* (Schoone *et al.*, 2001). Reações sorológicas inespecíficas, como o Teste de Bransmachari (Bransmachari, 1917) e a Reação de Formol-Gel (Fox & Mackie, 1921), que detectam a hipergamaglobulinemia, não são mais utilizadas, devido ao desenvolvimento de técnicas mais específicas, citadas anteriormente.

A RFC foi a primeira técnica dirigida para a detecção de anticorpos específicos a ser empregada no diagnóstico da Leishmaniose Visceral. Foi introduzida por Nussenzweig *et al.* (1957a, 1957b), sendo amplamente utilizada para o diagnóstico individual da doença e para inquéritos epidemiológicos (Brenner, 1957; Alencar, 1959). Entretanto, apresenta alto percentual de reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* (Nussenzweig, 1957; Pelegrino & Brenner, 1958), além de ocorrerem resultados anticomplementares em soros de humanos (Sen Gupta & Adhikari, 1952) e de cães (Brenner, 1957; Alencar, 1959; Hou *et al.*, 1960). Ademais, sua utilização em ampla escala, com distribuição de kits e controle de qualidade por laboratório de referência, é prejudicada pela dificuldade de padronização dos reagentes e baixa robustez da técnica, com prejuízo da reprodutibilidade.

Apesar das desvantagens apresentadas pela RFC, alguns autores buscaram o seu aperfeiçoamento, principalmente por variações no antígeno empregado (Cisalpino *et al.*, 1962). A padronização da técnica para utilização em eluato sanguíneo (Pelegrino & Brenner, 1958) trouxe vantagens para o emprego em inquéritos de maior amplitude, passando a ser largamente utilizada para inquéritos caninos (Alencar, 1959; Alencar & Cunha, 1963; Cunha *et al.*, 1963). Posteriormente, o advento da IFI – reação de mais fácil padronização e maior simplicidade técnica – fizeram com que sua utilização fosse progressivamente diminuída.

A IFI, introduzida no diagnóstico da LV por Duxbury & Sadun (1964), é considerada um método sorológico confiável para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral, sendo largamente utilizada em inquéritos epidemiológicos (Iverson *et al.*, 1983; Marzochi *et al.*, 1985; Coutinho *et al.*, 1985; Abranches *et al.*, 1991b; Costa *et al.*, 1991), sendo recomendada pelo Ministério da Saúde para avaliação de soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, para confirmar os cães sororreagentes pelo teste de ELISA ou como método sorológico de rotina (MS, 2003). Possui características favoráveis, como simplicidade técnica, fácil obtenção do antígeno, possibilidade de padronização dos kits e controle de qualidade por um laboratório central, possibilidade de ajuste do título do conjugado a fim de garantir a comparabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios, adaptação para utilização em amostra de eluato sanguíneo e alta sensibilidade – superior à

RFC (Mayrink *et al.*, 1967; Mansueto *et al.*, 1975) e às reações de HAI e de CIE (Mancianti & Meciani, 1988). Entretanto, é grupo-específico (Duxbury & Sadun, 1964; Kar, 1995), ocorrendo freqüentes resultados falso-positivos com outros tripanossomatídeos, como *T. cruzi*, em amostras de humanos (Shaw & Voller, 1964; Camargo, 1966; Araújo & Mayrink, 1968; Camargo & Rebonato, 1969) e de cães (Costa *et al.*, 1991). Estas reações inespecíficas ocorrem graças à grande complexidade antigênica dos tripanossomatídeos, que compartilham vários epitopos comuns (Badaró *et al.*, 1986). Portanto, a ocorrência das reações cruzadas constitui um dos principais problemas da IFI. Apesar disso, esta reação é capaz de fornecer elevados valores para a sensibilidade e especificidade (Mayrink *et al.*, 1967; Mansueto *et al.*, 1975; Mancianti & Meciani, 1988; Kar, 1995; Mancianti *et al.*, 1996). No entanto, apresenta limitada capacidade de processamento de amostras, pois exige leitura em microscópio de fluorescência, não sendo passível de automação. É de leitura subjetiva, podendo ocorrer discordâncias de resultados entre observadores diferentes. Para reduzir o problema, os laboratórios de referência recomendam a leitura por dois observadores e, em caso de discordâncias, confirmação por um terceiro.

A ELISA, descrita inicialmente por Engvall & Perlmann (1971), foi introduzida no diagnóstico das Leishmanioses por Hommel (1976). É de fácil automação, com leitura espectrofotométrica – proporcionando objetividade na leitura, rápida execução, baixo custo e simplicidade técnica, tornando possível a realização de um elevado número de amostras em um mesmo ensaio. Além disso, Gomes *et al.* (2001) concluíram que, para o diagnóstico da LVC por esta reação, amostras de SDPF podem ser ensaiadas em substituição ao uso tradicional de soro, havendo boa correlação com os resultados obtidos com este último ($r = 0,8690$; $p < 0,0001$). Estas características fazem da ELISA o método de escolha para o diagnóstico da LV em larga escala. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada em inquéritos caninos (Ashford *et al.*, 1992), podendo apresentar elevada sensibilidade e especificidade (Hommel *et al.*, 1978; Badaró *et al.*, 1986; Mancianti *et al.*, 1995). No entanto, o desempenho da reação pode variar de acordo com modificações técnicas, principalmente em relação ao antígeno empregado.

Reações que utilizam antígenos simples, como os antígenos solúveis apresentam, freqüentemente, reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, fornecendo menores especificidades. Por isso, antígenos mais específicos têm sido desenvolvidos, como os recombinantes e os purificados. Assim, proteínas identificadas, tanto em formas amastigotas quanto em promastigotas têm sido avaliadas como antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral, incluindo a gp63, a p32, o K26 (Okong'o-odera *et al.*, 1993; Tebourski *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1997; Bhatia *et al.*, 1999). Dentre os antígenos recombinantes desenvolvidos, o mais utilizado é o rK39, que contém uma unidade repetitiva de 39 aminoácidos de formas amastigotas de *L. chagasi* (Badaró *et al.*, 1996).

O antígeno FML (Ligante Fucose-Manose) foi utilizado no teste de ELISA para o diagnóstico de LVC por Borja-Cabrera *et al.* (1999). Estes autores encontraram valores de sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Entretanto, estes índices foram calculados a partir de apenas 38 cães com confirmação parasitológica da infecção.

O FAST-ELISA, validado por Ashford *et al.* (1993), nasceu da necessidade de testes rápidos e de fácil utilização em situações de campo. Utiliza conjugados de proteína A, com execução da técnica em aproximadamente 30 minutos, permitindo que as leituras sejam realizadas a olho nu. Estes autores encontraram valores de sensibilidade e especificidade comparáveis com a ELISA convencional.

A técnica de ELISA comporta inesgotáveis possibilidades de variação. Com a sua introdução, testes de maior complexidade técnica, como a RFC, a HAI e a CIE caíram em desuso para o diagnóstico da LV (Grimaldi *et al.*, 1993). A HAI é considerada um teste específico (Kar, 1995), mas o antígeno utilizado é de difícil preservação (Bray, 1976).

O DAT constitui um teste de grande simplicidade técnica, facilmente executável. Entretanto, possui tempo de incubação prolongado (em torno de 18 horas). Apresenta ainda limitações quanto à especificidade, mostrando-se inferior à IFI e à ELISA (Harith *et al.*, 1986;1987; Montijin & Harith, 1987). Schoone *et al.* (2001) desenvolveu um teste rápido de aglutinação direta (FAST), reduzindo o tempo de incubação para em torno de 3 horas. Tanto o DAT quanto o FAST podem ter a reprodutibilidade facilmente comprometida por pequenas variações técnicas. Acrescenta-se a isto a difícil padronização dos reagentes,

dificultando o controle de qualidade e a comparabilidade de resultados entre diferentes laboratórios.

Um teste imunocromatográfico, utilizando proteína A conjugada ao ouro coloidal, foi desenvolvido para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, possibilitando a obtenção de resultado em poucos minutos. Conhecido como TRALd – Teste Rápido Anti-*Leishmania donovani*, este teste tem se mostrado adequado para utilização em condições de campo, dada sua simplicidade técnica (Badaró *et al.*, 1996), possibilitando sua utilização a um custo considerado baixo. Genaro *et al.* (1997), utilizando uma amostra de 306 cães provenientes de região endêmica (Montes Claros, Minas Gerais, Brasil), encontraram um índice de co-positividade de 92,2% e de co-negatividade de 99,5%, utilizando-se como referência os resultados obtidos com a IFI. Utiliza o antígeno específico rk39, o que favorece sua especificidade. Entretanto, este teste não é capaz de detectar anticorpos em todo o espectro da doença, possuindo baixa sensibilidade para detectar indivíduos com infecção assintomática por *Leishmania chagasi* (Badaró *et al.*, 1996). Além disso, em soros de humanos, ocorrem reações cruzadas com malária, leishmaniose tegumentar e doença de Chagas (Dardo *et al.*, 2001).

2.1.6.3. Métodos Moleculares:

Com o progresso da Biologia Molecular, experimentado nas últimas décadas, o diagnóstico da LV veio a ser incrementado, a exemplo de outras doenças. Tornou-se possível a pesquisa do DNA do parasita em material biológico por hibridização ou através da PCR (Saiki *et al.*, 1985). Esta última, introduzida no diagnóstico das leishmanioses por Rodgers *et al.* (1990), constitui-se no principal método molecular da LV, sendo validada para a pesquisa de DNA de leishmania em diferentes materiais biológicos (Rodrigues *et al.*, 1994; Mathis & Deplazes, 1995; Ashford *et al.*, 1995; Osman *et al.*, 1997). A comparação de resultados encontrados entre diferentes autores é prejudicada – a exemplo do diagnóstico parasitológico – pela falta de padronização metodológica entre eles. Entretanto, diversos autores relataram, para a PCR, elevadas sensibilidades (Mathis & Deplazes, 1995; Ashford

et al., 1995; Osman *et al.*, 1997; Roura *et al.*, 1999; Campino *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001a), variando de acordo com a técnica e a amostra utilizada.

Mathis & Deplazes (1995), ao compararem a PCR com o cultivo *in vitro*, encontraram sensibilidades de 100% (16 de 16 cães infectados) utilizando amostras de aspirado de linfonodo e de 38,5% (5 de 13 cães infectados) com amostras sanguíneas.

Osman *et al.* (1997), ao utilizarem amostras de pacientes clinicamente suspeitos de LV, nos quais não foi possível demonstrar a infecção por microscopia direta, encontraram resultados positivos pela PCR em 12 de 23 pacientes (52,2%) utilizando aspirado de linfonodo, 8 de 12 pacientes (66,7%) utilizando aspirado de medula óssea e em 2 de 11 pacientes (19%) utilizando amostras sanguíneas. Para pacientes com diagnóstico parasitológico confirmado, as sensibilidades da PCR e da microscopia direta, ambas em amostras de aspirado de medula óssea e linfonodo, foram equivalentes. Concluem os autores pelo uso da PCR em amostras sanguíneas para triagem em pacientes clinicamente suspeitos e da PCR em amostras de linfonodo e/ou medula óssea para os pacientes negativos pela triagem. Roura *et al.* (1999), utilizando aspirado de medula óssea de 46 cães comprovadamente infectados e de 41 cães não-infectados, encontraram 97,8% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Entretanto, apesar de se mostrar potencialmente sensível e específica, a PCR apresenta limitações como o custo elevado, laboratórios com equipamentos sofisticados e a inadequação para utilização em condições de campo (Reed, 1996).

2.2. Utilização do papel de filtro em Sorologia:

Desde a introdução do papel de filtro para coleta de amostras sanguíneas (Stapp & Berks, 1948), esta nova abordagem na obtenção de amostras para dosagens sorológicas veio sendo utilizada em um número crescente de doenças. Constitui uma alternativa à coleta de sangue por punção venosa, com grandes vantagens: necessita de volume reduzido de material sanguíneo – capilar ou venoso; as amostras podem ser obtidas por punção dérmica, em lóbulo de orelha, polpa digital ou calcanhar, sendo um procedimento menos

invasivo que a coleta de sangue venoso e apresentando melhor aceitação pela população em geral; é de mais simples execução; elimina a necessidade de separação do soro; elimina a exigência de agulhas, seringas, tubos de vidro, centrífuga, caixas térmicas; diminui os custos com transporte – não sendo necessária a refrigeração – podendo ser realizado por via postal; diminui a ocorrência de perdas, com quebra de tubos; reduz os custos com armazenamento de amostras (Mathews, 1981; Guimarães, 1983). Portanto, a coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro proporciona uma otimização da logística, viabilizando a realização de inquéritos soropidemiológicos de grande escala.

No entanto, para a validação da coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro para dosagem de anticorpos contra uma dada doença, alguns critérios devem ser observados: a estabilidade do anticorpo no papel de filtro; a padronização da eluição do SDPF e a equivalência do eluato em relação ao soro; as condições ideais e o tempo máximo de armazenamento das amostras; o método de coleta de amostras em condições de campo. Na execução de testes sorológicos utilizando amostras de SDPF deve-se atentar para duas potenciais fontes de erros experimentais: a estimativa da diluição do eluato e a desnaturação das imunoglobulinas presentes no sangue depositado no papel de filtro, ao longo do tempo (Guimarães, 1983).

A coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro foi primeiramente utilizada para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral por Pelegriño & Brener (1958), empregando a RFC. A partir daí, passou a ser largamente utilizada no Brasil pelo Ministério da Saúde para levantamentos soropidemiológicos do calazar (Costa *et al.*, 1991). A estabilidade de anticorpos IgG em papel de filtro se mostrou superior à dos anticorpos IgM (Guimarães *et al.*, 1985). Entretanto, não se sabe até quantos dias após a coleta os níveis de anticorpos no papel se mantêm estáveis. Considera-se que fatores externos como altas temperaturas e umidade exercem um efeito degradante sobre os anticorpos presentes nos papéis (Marinkelle *et al.*, 1978), além de favorecerem a contaminação das amostras por fungos (Guimarães, 1983). Portanto, o acondicionamento com agentes dessecantes como a sílica-gel e o armazenamento sob refrigeração a 4°C tem sido recomendado (Marinkelle *et al.*, 1978). Com relação à obtenção de sangue, existem

duas abordagens equivalentes, podendo-se obter o sangue por punção venosa (sangue venoso) ou punção epidérmica (sangue capilar) (Guimarães, 1983).

Evans *et al.* (1990) ao compararem amostras pareadas de soro e eluato de 405 cães, obtidos em inquérito sorológico realizado na localidade de Brotas, interior do Ceará, através da IFI para LVC, encontraram 69 (17%) soros positivos e 33 (8,1%) eluatos positivos. Braga *et al.* (1998) ao realizarem o diagnóstico sorológico da LVC em região endêmica, detectaram de 1,84 a 2,85 vezes mais cães soropositivos com a ELISA em soros do que com a IFI em eluatos, destacando assim uma baixa sensibilidade desta última reação. Costa & Vieira (2001) recomendam a execução dos testes sorológicos em soro para a pesquisa de anticorpos específicos anti-*L. chagasi*.

Por outro lado, existem relatos favoráveis à utilização do eluato de SDPF para o diagnóstico sorológico de várias doenças infecciosas, mostrando elevados índices de concordância com os resultados obtidos com o uso de soro ou plasma, em diferentes viroses causadoras de doença respiratória aguda (Chin *et al.*, 1966), na esquistossomose (Evengard *et al.*, 1988), na doença de Chagas humana (Machado-Coelho *et al.*, 1995), na toxoplasmose caprina (Bahia *et al.*, 1995) e na LVC (Gomes *et al.*, 2001).

2.3. Inquéritos Sorológicos da Leishmaniose Visceral:

Integrando as atividades do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde, inúmeros inquéritos sorológicos para a identificação e eliminação de cães infectados tem sido executados (Monteiro *et al.*, 1994). A definição de uma metodologia confiável, de fácil e rápida execução, a um baixo custo constitui elemento de grande importância para a efetividade e viabilidade de qualquer programa de controle envolvendo o reservatório canino.

Os primeiros trabalhos visando a identificação de cães infectados por *Leishmania* utilizaram o diagnóstico parasitológico para este fim (Giraud & Cabassu, 1932; Ho *et al.*, 1947; Deane & Deane, 1955; Alencar & Coelho-Neto, 1956; Brener, 1957 e outros). Os métodos parasitológicos constituíram elementos limitantes para os inquéritos, dado o

grande tempo dispensado em sua execução, além do incremento dos custos operacionais. Posteriormente, passou a ser utilizada a RFC (Brener & Pelegriño, 1958) que, uma vez adaptada para utilização em amostras de papel de filtro, veio a ter sua utilização bastante difundida (Alencar, 1959; Alencar & Cunha, 1963; Cunha *et al.*, 1963). Entretanto, dificuldades com a padronização dos reagentes, aliadas à baixa simplicidade técnica estimularam sua substituição pela IFI. Esta técnica, em eluatos sanguíneos, apresentou bons índices de sensibilidade e especificidade, passando a ser amplamente utilizada na confirmação dos resultados positivos por uma triagem sorológica inicial por ELISA, uma vez que esta última apresenta maior capacidade de processamento de amostras, além de elevadas sensibilidades.

Entretanto, a validade destas técnicas sorológicas utilizando amostras sanguíneas colhidas em papel de filtro e o tempo de estabilidade dos níveis de anticorpos presentes nestas mesmas amostras, quando armazenados sob condições ideais, precisam ser determinados para fornecer o suporte técnico necessário para a consolidação da coleta em papel de filtro como método de escolha para estudos soropidemiológicos de campo. A solução destas dúvidas é condição indispensável para a viabilização financeira e operacional dos inquéritos sorológicos em grande escala.

Outra questão de importância é o controle de qualidade entre laboratórios diferentes, já que em inquéritos sorológicos de maior abrangência torna-se necessária a utilização de uma rede de laboratórios. Autores como Prata *et al.* (1975) e Camargo *et al.* (1987), destacaram resultados discordantes entre diferentes laboratórios. Pelo contrário, Machado *et al.* (2004), encontraram elevada concordância entre laboratórios. Assim, uma boa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios constitui-se em uma condição fundamental para a adoção de uma determinada técnica nestes inquéritos.

3. JUSTIFICATIVAS

A Leishmaniose Visceral Americana no Brasil apresenta grande capacidade de expansão geográfica, assumindo caráter emergente. Encontra-se em franca urbanização desde a década de 1980 (MS, 1984; Marzochi *et al.*, 1983; 1985; 1987; Genaro *et al.*, 1990; Jerônimo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997; Tavares, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001), processo este que encontra nas más condições de vida da população, sobretudo nas periferias, fatores que contribuem com a disseminação e com a expansão da doença para áreas circunvizinhas.

O controle da doença, baseado no tripé de ações – combate ao vetor, eliminação dos reservatórios e tratamento dos humanos –, se mostra difícil e laborioso, e os dados disponíveis indicam claramente que a efetividade deste está na aplicação integrada das medidas de controle (Magalhães *et al.*, 1980).

Para o efetivo controle do reservatório canino é preciso haver agilidade na identificação correta e eliminação dos cães infectados e no controle da população canina errante. Para tanto, é necessário dispor de métodos diagnósticos confiáveis, de grande sensibilidade e de baixo custo.

A coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro, em substituição à obtenção de soro, apresenta inúmeras vantagens como: constitui um procedimento de simples execução e pouco invasivo, reduzindo as necessidades com treinamento de pessoal e levando a uma maior aceitação por parte da população; diminui drasticamente os custos com logística; reduz as perdas por quebra de tubos, conservação inadequada durante o transporte; diminui os custos da análise laboratorial, com menores gastos com armazenamento e conservação de amostras (Mathews, 1981; Guimarães, 1983). Portanto, constitui uma metodologia capaz de viabilizar a realização de inquéritos soropidemiológicos em grande escala.

A técnica de IFI em amostras de SDPF vem sendo amplamente utilizada em inquéritos sorológicos (Iverson *et al.*, 1983; Marzochi *et al.*, 1985; Coutinho *et al.*, 1985; Abranches *et al.*, 1991b; Costa *et al.*, 1991). Alguns autores demonstraram boa concordância entre os resultados obtidos com a utilização do soro e do papel de filtro no diagnóstico sorológico da LV (Coutinho *et al.*, 1985) e de outras doenças infecciosas (Chin *et al.*, 1966; Evengard *et al.*, 1988; Machado-Coelho *et al.*, 1995; Bahia *et al.*, 1995).

Outros autores, entretanto questionaram a sensibilidade da IFI em eluato sanguíneo, uma vez que houve maior número de falso-negativos em relação à mesma reação em soro. (Evans *et al.*, 1990; Braga *et al.*, 1998; Palatinik-de-Sousa *et al.* 2001; Ferreira *et al.*, 2004). Costa & Vieira (2001) questionam a validade dos testes sorológicos utilizando eluato sanguíneo, preconizando a utilização de soro nos inquéritos caninos. Provavelmente, estas discordâncias observadas entre estes autores são decorrentes da falta de padronização na conservação e na estimativa da eluição dos papéis, uma vez que estes dois pontos constituem importantes fontes de erros experimentais (Guimarães *et al.*, 1983).

Somam-se à falta de consenso na literatura sobre a validade do papel de filtro como método de coleta de sangue para o diagnóstico sorológico da LVC, as dúvidas quanto à reprodutibilidade dos resultados obtidos com o eluato sanguíneo em função do tempo decorrido após a coleta. É necessário responder estas questões a fim de fornecer o suporte técnico-científico para os laboratórios, uma vez que em situações de grande demanda é necessário realizar o armazenamento das amostras para posterior processamento. Assim, tornou-se necessário avaliar o desempenho das técnicas sorológicas utilizadas pelos serviços de controle da LVC com coleta de material sanguíneo em papel de filtro, bem como avaliar por quanto tempo os níveis de imunoglobulinas específicas presentes em amostras de SDPF são capazes de se manter constantes, obedecidas as condições ideais de armazenamento.

Outra questão a ser respondida é se, através da determinação dos níveis de imunoglobulinas específicas das subclasses IgG1 e IgG2, é possível acessar a classificação clínica dos animais. Pelos testes sorológicos disponíveis até o momento – baseados na pesquisa de imunoglobulinas específicas da classe IgG – não é possível distinguir animais infectados de animais vacinados. Portanto, as imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 poderiam vir a se constituir em novos marcadores para a infecção por *L. chagasi*. Além disso, é preciso verificar se é possível obter níveis detectáveis destas imunoglobulinas nos papéis de filtro e por quanto tempo o papel de filtro é capaz de manter os seus níveis, obedecidas as condições ideais de armazenamento.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

Padronizar e validar os testes de ELISA e IFI para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando eluato de sangue colhido em papel de filtro.

4.2. Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a validade intrínseca e extrínseca dos testes de IFI e ELISA para LVC produzidos pela Bio-Manguinhos e ELISA utilizando antígeno solúvel de *Leishmania major-like*, através da determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo do resultado positivo e valor preditivo do resultado negativo, para cada técnica, em amostras de soro e eluato sanguíneo.
- 2) Determinar os índices de concordância entre os resultados obtidos com soro e eluato sanguíneo, para as três técnicas sorológicas avaliadas.
- 3) Avaliar o erro atribuível ao acaso, para cada reação sorológica, através da determinação das concordâncias intratestes e intertestes.
- 4) Avaliar a reprodutibilidade dos níveis de anticorpos, no decorrer do tempo, em amostras de eluato sanguíneo, em ensaio mascarado, processadas 1, 15, 30 e 60 dias após a coleta.
- 5) Preconizar uma metodologia sorológica a ser utilizada em inquéritos sorológicos caninos.
- 6) Estabelecer a correlação dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 com a classificação clínica dos cães.

5. ANIMAIS EXPERIMENTAIS, MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Desenho Experimental:

O experimento foi executado de acordo com o fluxograma abaixo:

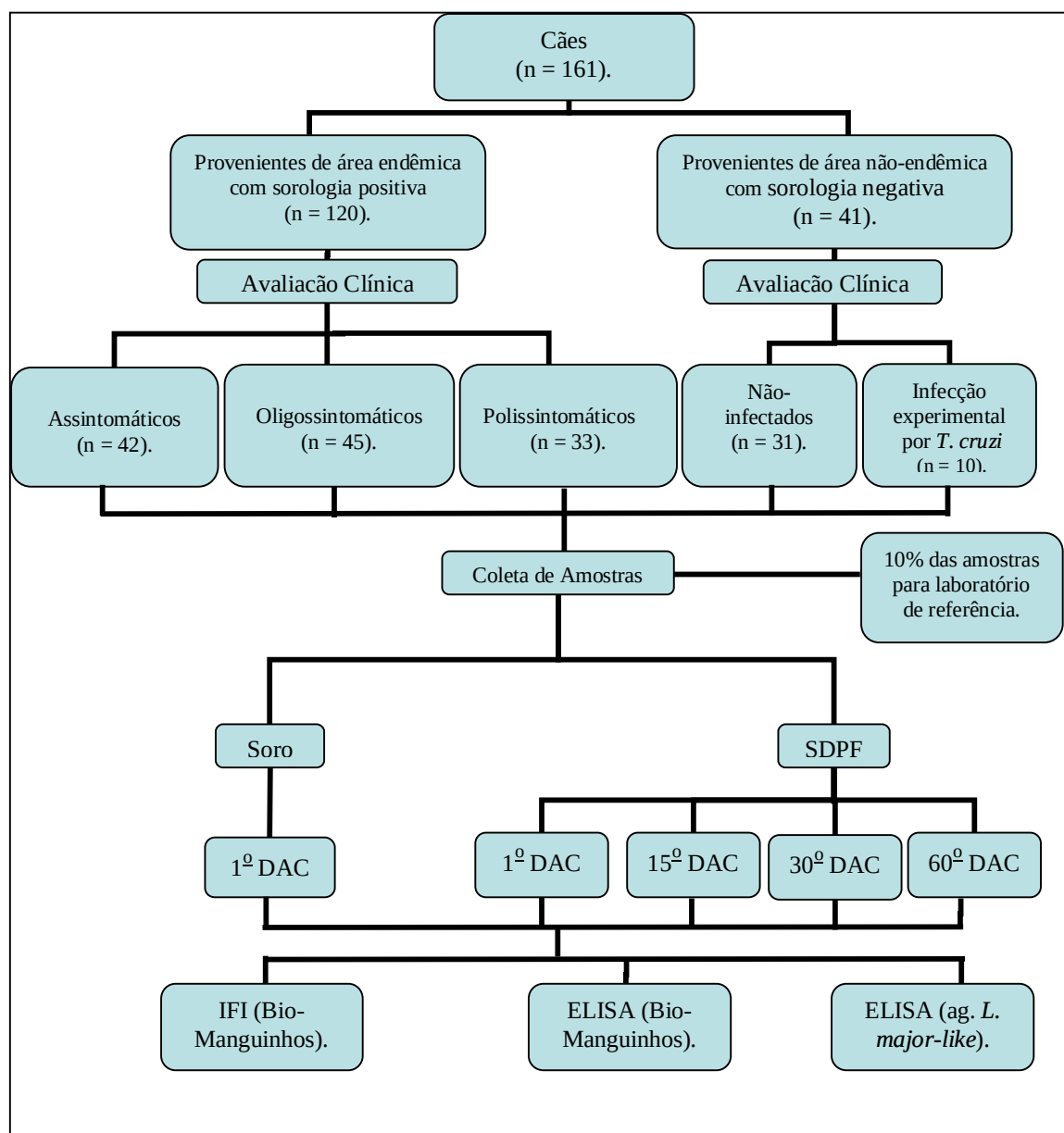


Figura 1: Fluxograma do estudo.

No presente estudo, com execução mascarada, foram compostos cinco grupos de cães. Os cães infectados formaram três grupos: assintomáticos (26%), oligossintomáticos (28%) e polissintomáticos (20,5%). Os não infectados de área não endêmica (25,5%) foram subdivididos em: não infectados por *Trypanosoma cruzi* e infectados experimentalmente por *T. cruzi*. Amostras de soro e SDPF de todos os cães foram processadas por três técnicas de diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina – IFI (Bio-Manguinhos), ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major-like*). As amostras de soro e SDPF foram ensaiadas no 1º DAC, para fins de avaliação da concordância entre soro e papel de filtro. Todas as amostras de SDPF foram processadas, adicionalmente, no 15º, 30º e 60º D.A.C., para que a reprodutibilidade em função do tempo pudesse ser acessada. 10% das amostras foram ensaiadas em duplicata e outras 10% foram enviadas para o laboratório de referência (Laboratório de Sorologia da Fundação Ezequiel Dias – FUNED) para avaliar a reprodutibilidade intratestes e intertestes, respectivamente.

5.2. Cálculo do tamanho da amostra:

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com o Manual de Determinação de Amostra (WHO, 1986), estabelecendo e aceitando como verdadeiras as seguintes premissas:

- (1) A positividade dos soros de cães infectados por *Leishmania chagasi* obtidos através da IFI é de aproximadamente de 90%;
- (2) O percentual de reações inespecíficas obtidas em soro canino testado com a IFI é de aproximadamente de 5%;
- (3) A diferença mínima real de positividade a ser detectada entre soros e eluatos foi assumida em 15%;
- (4) Foram assumidas perdas de 10% das amostras.

A partir destas premissas, estabeleceu-se que uma amostra de 123 cães portadores de leishmaniose visceral (sendo 41 assintomáticos, 41 oligossintomáticos e 41 sintomáticos) e

de 41 comprovadamente não-infectados por *Leishmania chagasi* seria suficiente para detectar a existência, ou não, de diferença significativa entre os títulos obtidos no soro e no eluato de papel de filtro ao nível de significância de 5% e poder do teste de 90%.

5.3. Categorização dos animais:

Os animais participantes deste estudo foram incluídos em duas categorias: infectados e não-infectados. A categorização foi realizada baseada em critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais descritos a seguir:

- a) Critérios de elegibilidade para o grupo dos infectados: para compor este grupo, foram selecionados cães provenientes de Belo Horizonte – MG, zona endêmica para a LVC. Os animais, submetidos à triagem sorológica por ELISA e com confirmação sorológica por IFI (Laboratório de Zoonoses/PBH) foram enviados ao CCZ/PBH. Após avaliação clínica, foram separados em subgrupos (assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos).
- b) Critérios de elegibilidade para o grupo dos não-infectados: este grupo foi composto por cães nascidos e criados em área não endêmica (Ouro Preto – MG), provenientes do canil da UFOP e que, portanto, nunca tiveram contato com regiões endêmicas. Todos os animais se mostraram negativos por triagem sorológica pelo método de ELISA.
- c) Critérios de elegibilidade para o grupo dos chagásicos: Neste grupo foram incluídos cães também nascidos e criados no canil da UFOP, infectados experimentalmente por *T. cruzi* e submetidos à confirmação sorológica por ELISA e parasitológica por exame de sangue a fresco e hemocultura.

5.4. Avaliação Clínica:

A avaliação clínica foi realizada de acordo com Quinnell *et al.* (2003), com modificações, avaliando-se os seguintes sintomas: alopecia; ulceração/descamação cutânea; conjutivite; linfadenopatia; onicogribose; edema das patas; paresia das patas posteriores e

emagrecimento. Para cada sintoma foi estabelecido um escore de acordo com a intensidade da manifestação: 0 – ausência; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – grave (figura 1 dos anexos). De acordo com a soma dos escores, cada cão foi assim classificado: 0 – 2: assintomático; 3 – 6: oligossintomático; 7 – 24: polissintomático.

5.5. Coleta de amostras:

Para cada cão, foi coletada amostra de sangue da veia braquial. Dada a necessidade de execução de um número elevado de testes, foi utilizado o sangue venoso para impregnar os papéis, em detrimento da utilização de sangue capilar. Imediatamente após a coleta, parte do sangue foi transferida, por aposição, para o papel de filtro Whatman nº 4 qualitativo, de acordo com a técnica descrita por Guimarães *et al.* (1978). Os papéis de filtro foram colocados para secar na sombra e à temperatura ambiente, adaptados em um suporte (haste de metal apoiada sobre duas bases de madeira), de forma a evitar o contato entre os papéis, neutralizando o risco de contaminação entre as amostras. O restante do sangue foi deixado coagular e os soros separados por centrifugação, a 3000 rpm, durante 20 minutos (figura 2).

5.6. Aliquotagem, codificação e conservação de amostras:

Os soros foram aliqüotados, logo após a obtenção dos mesmos, em três microtubos por soro, devidamente rotulados com o código identificador do cão. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório em condições refrigeradas. A partir do SDPF, foram preparados discos circulares de 6mm de diâmetro (picotes), com o auxílio de um picotador de papel. Os picotes foram acondicionados em pequenos sacos plásticos contendo sílica-gel (agente dessecante), protegendo-os da umidade, e selados através de uma seladora de sacos plásticos. Todas as amostras, soro e papel, foram codificadas com números distintos, para a realização das análises em caráter mascarado. Os picotes com sílica-gel foram armazenados a 4°C e os microtubos a -20°C (figura 3).

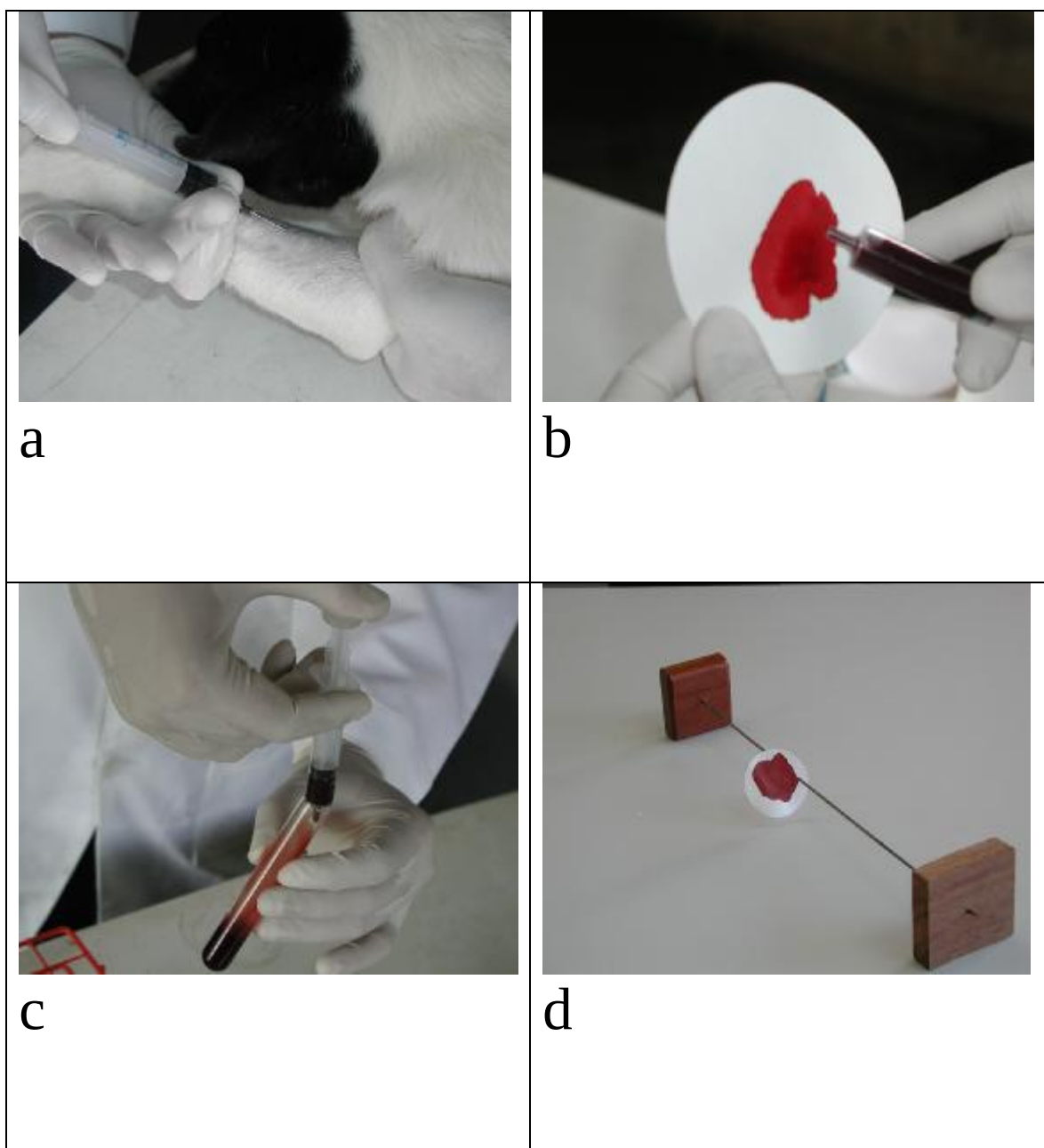


Figura 2: Coleta das amostras. (a) Punção venosa efetuada nos cães; (b) transferência do material sanguíneo para o papel de filtro; (c) transferência do restante do sangue para o tubo de vidro e (d) secagem dos papéis de filtro em suporte à temperatura ambiente.

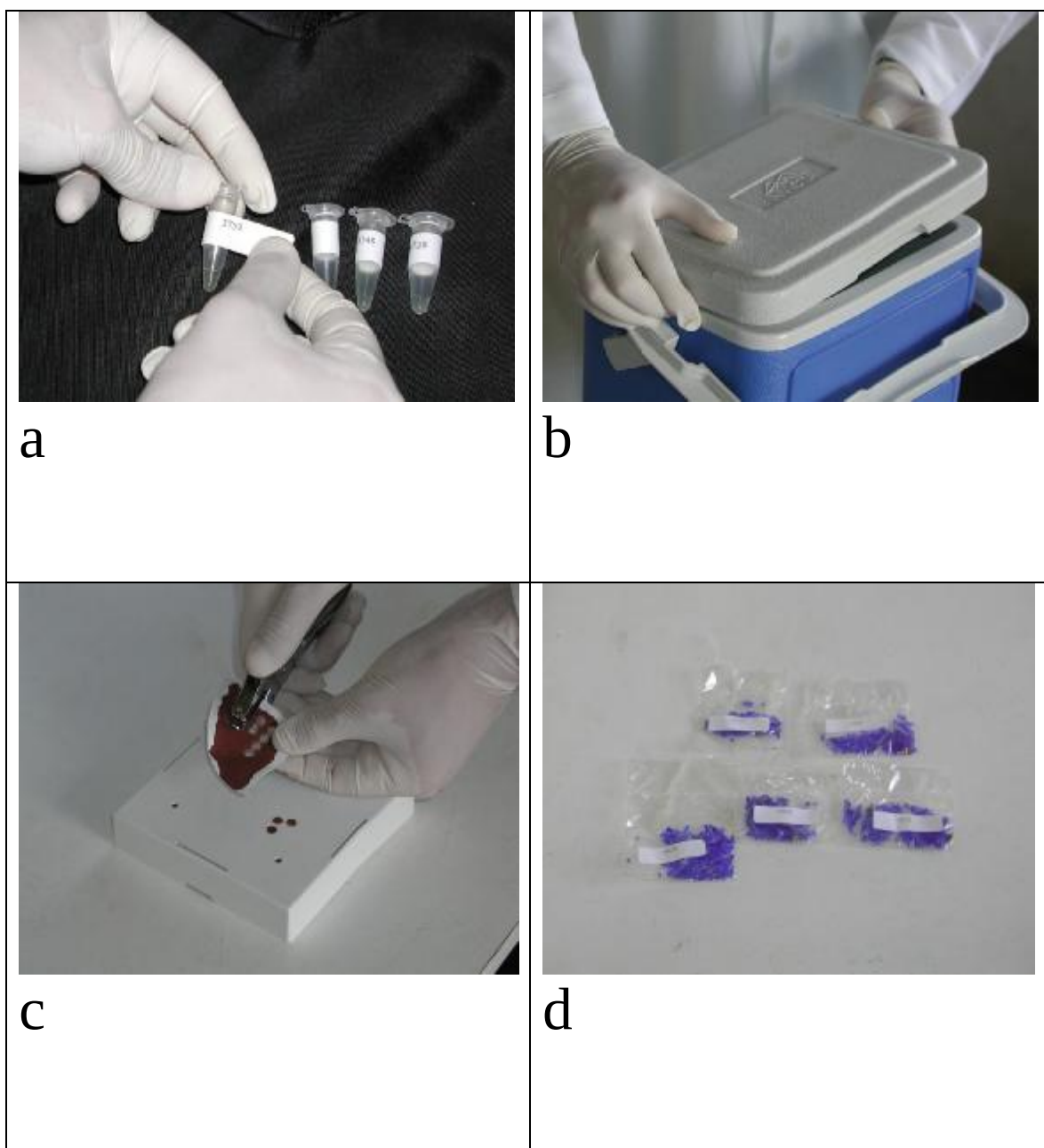


Figura 3: Aliquotagem, codificação e transporte de amostras. (a) Aliquotagem e codificação dos soros em microtubos; (b) caixa térmica para transporte das amostras para o laboratório; (c) preparo dos picotes e (d) embalagens individuais, contendo os picotes em sílica-gel, devidamente seladas e rotuladas.

5.7. Padronização da eluição do sangue dessecado em papel de filtro para obtenção da diluição ótima equivalente à do soro:

A estimativa do volume de PBS utilizado para eluir o sangue presente no papel de filtro, a fim de se obter uma diluição equivalente à diluição ótima do soro, é um ponto crítico para a obtenção de resultados confiáveis e a correta avaliação da validade dos métodos sorológicos. Para padronizar a eluição dos papéis, foi utilizada a reação de ELISA (ag. *L. major-like*), de acordo com o método empírico para estimativa da eluição descrito por Evengard *et al.* (1988). Foram selecionados dois animais infectados, a partir dos quais obtiveram-se amostras de soro e de SDPF. Para cada cão, e em uma mesma placa, foi ensaiado o soro, em sua diluição ótima (1:80), e cinco eluatos sanguíneos diferentes, obtidos da mesma amostra de SDPF da seguinte forma: a um picote de SDPF, foram adicionados, respectivamente, 200 µL; 350 µL; 500 µL; 650 µL e 800 µL PBS PH 7,2. Foi escolhida a eluição que forneceu valores de absorbância aproximadamente iguais aos obtidos com as amostras de soro do mesmo cão.

5.8. Reações Sorológicas:

5.8.1. Reação de Elisa (ag. *L. major-like*):

Este ensaio imunoenzimático foi padronizado para fins de comparação com os kits de ELISA e IFI da Bio-Manguinhos, bem como para a dosagem de imunoglobulinas caninas anti-*Leishmania* dos subgrupos IgG1 e IgG2. A técnica utilizada foi a descrita por Voller *et al.* (1976), com modificações.

5.8.1.1. Obtenção do antígeno:

Utilizou-se a *Leishmania major-like*, cepa MHOM/BR/71/BH121, mantidas em meio monofásico acelular (LIT) no Laboratório de Parasitologia/Histopatologia da UFOP,

para a obtenção do antígeno. Foram realizados quatro repiques consecutivos em garrafas de vidro a fim de conseguirmos promastigotas em fase estacionária. Cada repique foi realizado na proporção de 1:5 (10 mL de cultura e LIT q.s.p. 50 mL). A partir das culturas, obteve-se um concentrado de parasitas através do protocolo descrito a seguir:

1. Centrifugar 50 mL de cultura (em tubo Falcon) a 3000 rpm, 4°C, por 17 minutos.
2. Desprezar o sobrenadante retirando-o cuidadosamente.
3. Ressuspender o precipitado em 10 mL de salina.
4. Centrifugar a 3000 rpm, 4°C, por 17 minutos.
5. Desprezar o sobrenadante.
6. Ressuspender em 10 mL de salina.
7. Centrifugar a 3000 rpm, 4°C, por 17 minutos.
8. Desprezar o sobrenadante.
9. Ressuspender em 1 mL de salina.
10. Transferir para um microtubo.
11. Centrifugar a 10000 rpm, 4°C, por 10 minutos.
12. Desprezar o sobrenadante.
13. Conservar o precipitado (concentrado) no freezer a -86°C.

Foi realizado a seguir o processamento do concentrado para obtenção do antígeno:

1. Ressuspender a massa em aproximadamente 4 mL de PBS.
2. Transferir para um tubo Falcon de 50 mL.
3. Levar ao sonicador, aplicando 3 ciclos de 30 segundos cada, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo.
4. Observar ao microscópio para confirmar a lise do parasita.
5. Transferir para um tubo de boa resistência a altas rotações.
6. Centrifugar a 10000 rpm, 4°C, por 30 minutos.
7. Separar o sobrenadante em microtubos, desprezando o precipitado.

8. Conservar em freezer a -86°C .

Foi realizada a dosagem protéica pelo método de Lowry *et al.* (1951). A concentração protéica do antígeno foi de 1505 $\mu\text{g/mL}$.

5.8.1.2. Padronização da reação:

A padronização deste teste objetivou estabelecer as concentrações ótimas do antígeno, do soro e dos conjugados anti-imunoglobulina canina (IgG, IgG1 e IgG2), sendo que na determinação de cada uma das concentrações, as demais eram fixadas. Assim, para cada uma das três curvas de titulação, determinou-se o ponto onde ocorre uma boa discriminação entre os soros positivos e negativos, na menor diluição possível, correspondendo este ponto à diluição ótima. Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços e fundo chato, marca DSK, referência 1155198.

Na padronização da concentração do antígeno, foram testadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$. O soro foi testado nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:120, 1:140 e 1:160.

Foram utilizados conjugados anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2, marcados com peroxidase (Bethyl laboratories), marcados com peroxidase, a saber: IgG total (h + 1), IgG1 e IgG2. Os conjugados foram testados nos títulos de 1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10000, 1:15000, 1:20000, 1:25000, 1:30000 e 1:35000.

5.8.1.3. Determinação das absorbâncias discriminantes de resultados positivos e resultados negativos:

A absorbância discriminante entre os cães positivos e negativos foi determinada pela média dos títulos dos cães negativos, acrescida de 2 ou 3 desvios-padrão para soros e eluatos. Em cada placa foram adicionados oito soros controles negativos para fins de cálculo da média das absorbâncias e do desvio-padrão da média.

Todos os soros controles negativos utilizados eram provenientes de cães não infectados para *L. chagasi* ou outros tripanossomatídeos. Além disso, todos os animais eram nascidos e criados em área não endêmica (Ouro Preto – MG) e nunca se ausentaram da mesma.

5.8.1.4. Procedimento Operacional:

Uma vez padronizada a concentração de antígeno, a diluição do soro, a concentração dos conjugados e a eluição dos papéis de filtro, e escolhida a placa de microtitulação a ser utilizada, executou-se a reação de ELISA de acordo com o protocolo utilizado no Laboratório de Parasitologia/Histopatologia da UFOP. Trata-se de uma reação utilizando os conjugados marcados com peroxidase, e a solução substrato composta por H₂O₂ (substrato) e OPD (cromógeno). A leitura espectrofotométrica foi realizada em 490 nm. O procedimento técnico foi realizado de acordo com as etapas descritas abaixo.

Etapa 1: Sensibilização das placas.

- i) No dia anterior à análise, adicionar 10 µL de antígeno (1505 µg/mL) a 10 mL de tampão de ligação para obter-se o antígeno a aproximadamente 1,5 µg/mL (q.s.p. uma placa).
- ii) Colocar 100 µL desta solução antígeno por poço nas placas, cobrir com papel alumínio e incubar por 12 horas a 4°C.

Etapa 2 a: Diluição dos soros.

- i) Adicionar 5 µL de soro em 400 µL de PBST (Solução Tween em PBS a 0,05%) em tubos de hemólise para obter a diluição de 1:80.

Etapa 2 b: Eluição das amostras de SDPF.

- i) Adicionar 1 picote de SDPF em 500 µL de PBST em tubos de hemólise e cobrir com papel alumínio.
- ii) Incubar por 12 horas a 4°C.
- iii) Deixar sob agitação, em agitador orbital tipo Kline, por uma hora. O eluato obtido equivale à diluição de 1:80 do soro.

Etapa 3: Execução da reação.

- i) Lavar a placa sensibilizada, por duas vezes, com solução de lavagem (9g de NaCl, 500µl de Tween e 1 L de água destilada), secando-a por inversão sobre papel absorvente.
- ii) Bloquear a placa utilizando a solução de bloqueio (1000 µL de Soro Fetal Bovino em 19 mL de PBS), adicionando-se 100 µL por poço.
- iii) Incubar em estufa a 37°C por 45 minutos.
- iv) Lavar a placa como descrito no item i.
- v) Adicionar 100 µL de soro diluído ou eluato, em cada poço.
- vi) Incubar em estufa a 37°C por 30 minutos.
- vii) Lavar a placa, por quatro vezes, com solução de lavagem, secando-a por inversão sobre papel absorvente.

viii) Diluir os conjugados (anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2) nas seguintes concentrações:

Anti-IgG: 1:10000;

Anti-IgG1: 1:2500;

Anti-IgG2: 1:10000.

ix) Adicionar 100 µL do conjugado por poço na placa.

x) Incubar em estufa a 37°C por 30 minutos.

xi) Lavar a placa como descrito no item vii.

xii) Preparar o substrato (para 1 placa) : Adicionar 15 mL de solução de ácido cítrico e 3 µL de H₂O₂ (30 Vol.) em 3 mg de OPD no momento do uso e em frasco âmbar.

xiii) Adicionar 100 µL da solução substrato nas placas.

xiv) Incubar em estufa a 37°C e em câmara escura por 20 minutos.

xv) Adicionar 32 µL de H₂SO₄ 5N para parar a reação.

xvi) Proceder a leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

5.8.2. Reação de ELISA (Bio-Manguinhos):

Foi realizada pesquisa de anticorpos da classe IgG para a LVC através do kit produzido pela Bio-Manguinhos. Este kit utiliza conjugado marcado com peroxidase, H₂O₂ como substrato e TMB como cromógeno. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm. A execução de todo o procedimento segue o protocolo descrito a seguir.

5.8.2.1. Procedimento Operacional:

Etapa 1: Preparação do diluente de amostra / conjugado.

O diluente de amostra/conjugado deve ser preparado conforme descrito na tabela 1:

Tabela 1: Preparo do diluente de amostra/conjugado.

Nº de fileiras duplas	Nº de reações	R – 01	R - 02	Água destilada
1	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	Até 64	10 mL	1,0 g	40 mL
5	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

Etapa 2: Diluir o soro e eluir as amostras de SDPF.

Adicionar 5 µL de soro em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (tampão de incubação) em tubos de hemólise ou 2 µL de soro em 200 µL deste diluente em placa de diluição. A diluição do soro obtida é de 1:100.

Adicionar 1 picote de SDPF em 500 µL do diluente de amostra/conjugado em tubos de hemólise, deixando incubar por 12 horas a 4°C. Agitar por uma hora, utilizando agitador orbital tipo Kline.

Etapa 3: Execução da reação.

i) Retirar as placas sensibilizadas e bloqueadas do freezer e esperar quinze minutos para secar as gotículas de água presentes em sua superfície.

ii) Colocar 100 μ L das amostras diluídas e dos controles por poço, na placa de ELISA e selar as fileiras.

Obs.: adicionar os controles por último.

iii) Incubar na estufa a 37°C por 30 minutos.

iv) Diluir o conjugado no diluente de amostra / conjugado, de acordo com a tabela 2:

Tabela 2: Diluição do conjugado.

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

Obs.: Adicionar o conjugado ao diluente somente alguns instantes antes de findar a incubação anterior.

v) Lavar a placa por seis vezes, utilizando a solução de lavagem na proporção de 200 μ L/poço. Aguardar cerca de 30 segundos entre cada lavagem.

vi) Colocar 100 μ L do conjugado preparado por poço e selar as fileiras.

vii) Incubar na estufa a 37°C por 30 minutos.

viii) Lavar a placa por quatro vezes, utilizando a solução de lavagem na proporção de 200 µL/poço. Aguardar cerca de 30 segundos entre cada lavagem.

ix) Preparar o substrato (alguns minutos antes do uso e em frasco âmbar), de acordo com a tabela 3:

Tabela 3: Preparo do substrato.

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

x) Colocar rapidamente 100 µL da solução substrato por poço.

xi) Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente e em câmara escura.

xii) Parar a reação com 50 µL de H₂SO₄ 2M por poço.

xiii) Proceder a leitura em espectrofotômetro a 450 nm.

Nota: Determinação do limiar de reatividade (*cut off*) :

Cut off = Média aritmética dos controles negativos x 2 (para soro).

Cut off = Média aritmética dos controles negativos x 3 (para eluato).

5.8.3. Reação de Imunofluorescência Indireta:

Foi utilizado o kit para IFI produzido pela Bio-Manguinhos na pesquisa de IgG anti-*Leishmania*, em amostras de soro e eluato sanguíneo. Este kit utiliza conjugado marcado com FITC. A leitura foi realizada através do microscópio Olympus modelo BX41 equipado com kit para detecção de fluorescência utilizando lâmpada de halogênio. O protocolo utilizado para a execução da reação encontra-se descrito a seguir.

5.8.3.1. Titulação do Conjugado:

- i) Proceder a diluição seriada para um soro de título conhecido (preferencialmente um soro de médio título – 1:160 por exemplo) a partir de 1:40, obtendo-se as seguintes diluições: 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280.
- ii) Diluir um controle negativo para obter a diluição de 1:40 (25µL de soro em 1000µL de PBS).
- iii) Distribuir 10µL de soro de título conhecido (nas diferentes diluições), do controle negativo e do PBS nas lâminas, conforme figura 4.

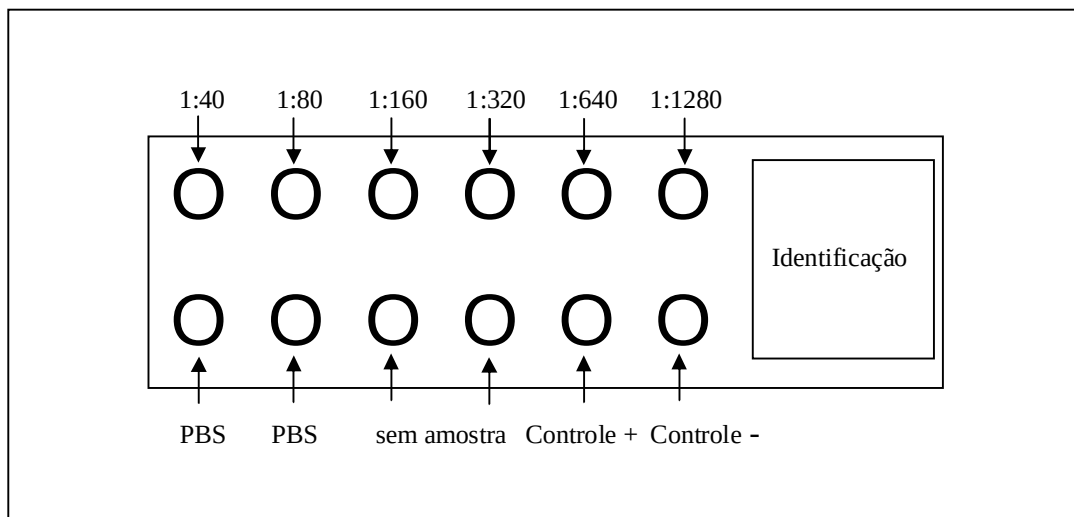


Figura 4: Esquema da adição do soro de título conhecido nas lâminas.

iv) Seguir execução da técnica conforme procedimento operacional.

v) Diluir o conjugado, seguindo os seguintes títulos: 1:80; 1:100; 1:200; 1:300; 1:400; 1:500. Recomenda-se pingar um mínimo de 5µL de conjugado para cada diluição. Quando julgar necessário, ir além do título 1:500.

vi) Distribuir 15 µL dos conjugado em cada orifício das lâminas. Utilizar uma lâmina para cada título do conjugado

vii) Seguir execução da técnica conforme procedimento operacional.

OBS.: Considera-se o título ótimo a maior diluição do conjugado que fornece o título fiel do soro conhecido. As amostras sempre deverão ser ensaiadas utilizando o título ótimo do conjugado para o lote em questão.

5.8.3.2. Procedimento operacional:

Etapa 1: Fixação do antígeno nas lâminas.

i) Adicionar 10 µL de antígeno por orifício, no dia anterior à análise, deixando-as secar à temperatura ambiente por 12 horas.

Obs.: Após a sensibilização das lâminas, é necessário evitar o atrito com a parte superior das mesmas (onde se encontra o antígeno fixado).

Etapa 2 a: Eluição das amostras de SDPF e diluição dos soros.

i) Colocar 2 picotes de SDPF em 250 µL de PBS, em tubo de hemólise, para obter a diluição de 1:20.

ii) Colocar 10 µL de soro em 190 µL de PBS em tubo de hemólise ou placa de diluição, para obter a diluição de 1:20.

Etapa 2 b: Diluição seriada dos eluatos e soros.

i) A partir das amostras a 1:20, utilizar o fator 2 de diluição para obter as demais diluições, em tubo de hemólise, até 1:320:

1:40: 100 µL da diluição 1:20 em 100 µL de PBS;

1:80: 100 µL da diluição 1:40 em 100 µL de PBS;

1:160: 100 µL da diluição 1:80 em 100 µL de PBS;

1:320: 100 µL da diluição 1:160 em 100 µL de PBS.

ii) Diluir os soros controles positivo e negativo a 1:40 adicionando-se 5 µL de soro em 200 µL de PBS.

iii) Para as amostras randomicamente selecionadas, prosseguir até a diluição de 1:10240:

1:640: 100 µL da diluição 1:320 em 100 µL de PBS;

1:1280: 100 µL da diluição 1:640 em 100 µL de PBS;

1:2560: 100 µL da diluição 1:1280 em 100 µL de PBS;

1:5120: 100 µL da diluição 1:2560 em 100 µL de PBS;

1:10240: 100 µL da diluição 1:5120 em 100 µL de PBS.

Etapa 3: Execução da reação.

i) Adicionar 10 µL das diluições dos controles e das amostras de eluato e soro a serem processadas na reação, nas lâminas postas em câmara úmida, conforme as figuras 5 e 6.

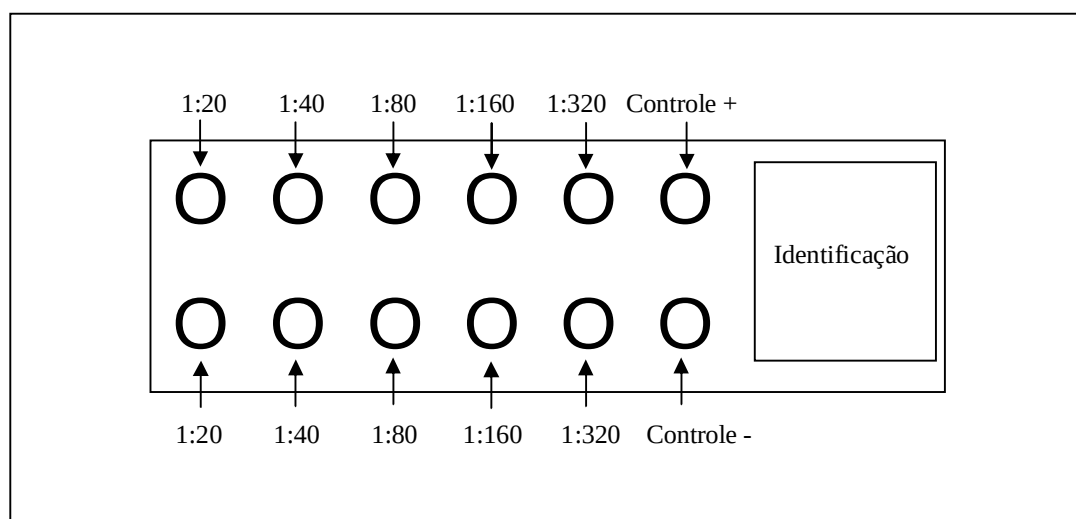


Figura 5: Esquema da adição das amostras de eluato nas lâminas.

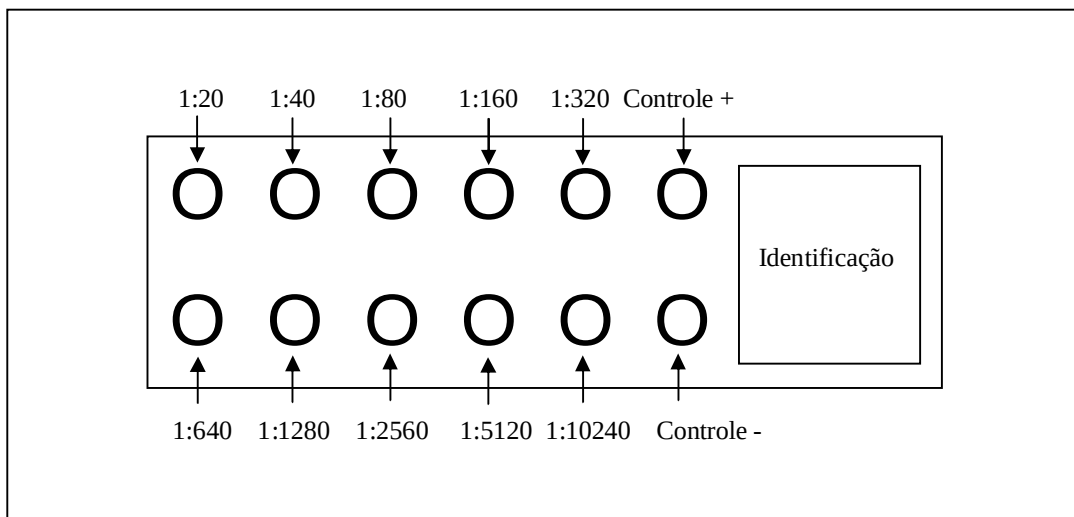


Figura 6: Esquema da adição das amostras de soro nas lâminas.

ii) Incubar por 30 minutos em estufa a 37°C.

Obs.: Deve-se tomar cuidado para que as diluições não se misturem durante a incubação.

iii) Executar a lavagem da seguinte forma:

Lavar as lâminas 2 vezes com PBS, nas cubas de lavagem (5 minutos cada banho).

Lavar as lâminas rapidamente em água destilada (cubas de lavagem).

iv) Colocar as lâminas para secar a temperatura ambiente, com auxílio de ventilador (20 a 30 minutos), ou aproximadamente 10 minutos na estufa a 37°C (não exceder muito nesta etapa).

v) Preparar a solução PBS-AE, conforme tabela abaixo:

Tabela 4: Preparo da solução PBS-AE.

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

vi) Diluir o conjugado em solução PBS-AE, para obter o título determinado pela titulação. Para fins de descrição dos cálculos, utilizamos um título hipotético de 1:300:

5 µL de conjugado para 1500 µL de solução PBS-AE (q.s.p. seis lâminas).

vii) Adicionar 15 µL do conjugado diluído em cada orifício das lâminas postas em câmara úmida.

viii) Incubar por 30 minutos em estufa a 37°C.

ix) Executar a lavagem conforme descrito no item iii.

x) Secar as lâminas conforme descrito no item iv.

xi) Montar as lâminas com glicerina tamponada (cerca de 4 gotas por lâmina) e lamínulas. Deve ser evitada a formação de bolhas de ar.

xii) Proceder a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência, utilizando aumento de 400x e filtro compatível com FITC.

5.9. Análise dos Resultados:

A hipótese nula de ausência de concordância entre os resultados obtidos para as medidas dos níveis de anticorpos, obtidos em soros e eluatos, foi testada através da distribuição cruzada dos títulos (para a IFI) ou faixas de absorbância (para as ELISA).

Para avaliar a reprodutibilidade dos níveis de anticorpos, no decorrer do tempo, obtidos pela IFI e pelas ELISA em eluato, alíquotas do eluato foram processadas no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C., tomando-se como referência os títulos de anticorpos nos soros, obtidos no 1º D.A.C.. Nesta análise, as variações nos valores das absorbâncias, observadas para as amostras ensaiadas nos diferentes momentos após a coleta, foram corrigidas através de ajustamento direto. Assim, foram eliminadas as diferenças correspondentes à variação média da absorbância dos controles positivos e dos controles negativos, para amostras provenientes de cães positivos e negativos, respectivamente. A hipótese nula de ausência de correlação entre os títulos obtidos, em soro e eluato, em função do tempo foi testada através da regressão linear. Para a análise dos resultados, a recíproca do título e o múltiplo da absorbância sofreram transformação logarítmica. Adicionou-se uma unidade em todas as medidas em função dos valores iguais a zero.

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos para as diversas reações, em soro e em eluato, com os resultados obtidos através da IFI em soros revelou os verdadeiros positivos (VP), os verdadeiros negativos (VN), os falso-positivos (FP) e os falso-negativos (FN).

A validade intrínseca das técnicas, em soro e em eluato, foi avaliada através dos índices de co-positividade (icp) e de co-negatividade (icn), calculados de acordo com Buck & Gart (1966), assumindo como referência os resultados obtidos em soro na IFI. Para avaliar a validade extrínseca, foram calculados os valores preditivo positivo (vpp) e preditivo negativo (vpn), de acordo com Vecchio (1966), para as prevalências de 1, 5, 10, 25 e 50%. A concordância obtida entre as reações foi avaliada de acordo com Youden (1950).

Com a finalidade de verificar a concordância dos resultados em um mesmo ensaio, 10% das amostras foram ensaiadas em duplicata e comparados através do teste de significância para comparação de duas médias, ou teste “t” de Student.

Para acessar a reprodutibilidade interteste de resultados, foi avaliada a concordância de resultados entre os dois laboratórios através do índice de Kappa, de acordo com Fleiss (1973). A interpretação do índice de Kappa foi efetuada de acordo com a tabela 5:

Tabela 5: Interpretação do índice de Kappa.

Valor de Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Para a avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 detectados em cada grupo de animais, foi utilizada a representação gráfica dos resultados, em termos da média do múltiplo das absorbâncias e da média do logaritmo da recíproca dos títulos.

6. RESULTADOS

6.1. Padronização:

6.1.1. Padronização da ELISA (ag. *L. major-like*):

6.1.1.1. Concentração de antígeno:

Na figura 7 estão apresentadas as absorbâncias obtidas pela ELISA (ag. *L. major-like*), para amostras de soros de cães positivos e negativos para *L. chagasi*, utilizando diferentes concentrações do antígeno. A primeira concentração que apresentou a maior discriminação entre soros positivos e negativos foi a de 1,5 µg/ml, revelando-se a concentração ótima.

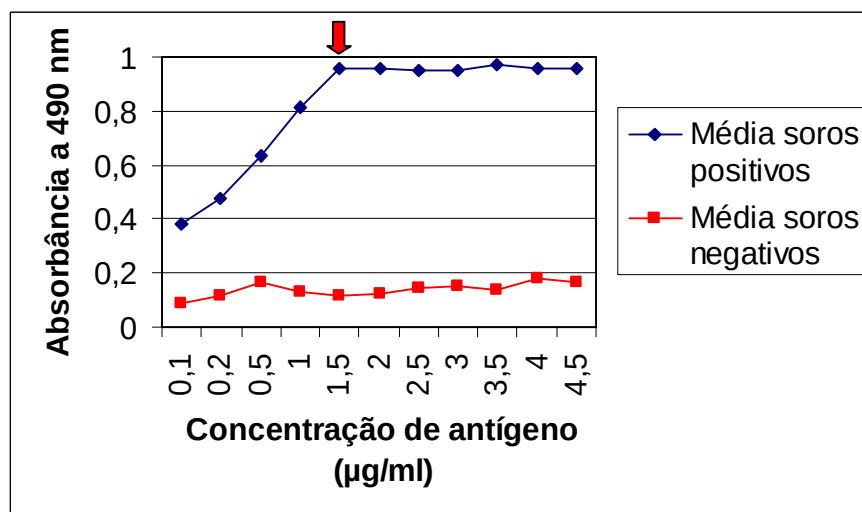


Figura 7: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do antígeno.

6.1.1.2. Diluição do Soro:

Na figura 8 estão apresentadas as absorvâncias obtidas pela ELISA (ag. *L. major-like*), para soros de cães positivos e negativos para *L. chagasi*, utilizando diferentes diluições do soro. A última diluição que forneceu a maior discriminação entre soros positivos e negativos foi a de 1:80, sendo considerada a diluição ótima. A partir desta diluição, houve menor discriminação entre os soros positivos e negativos.

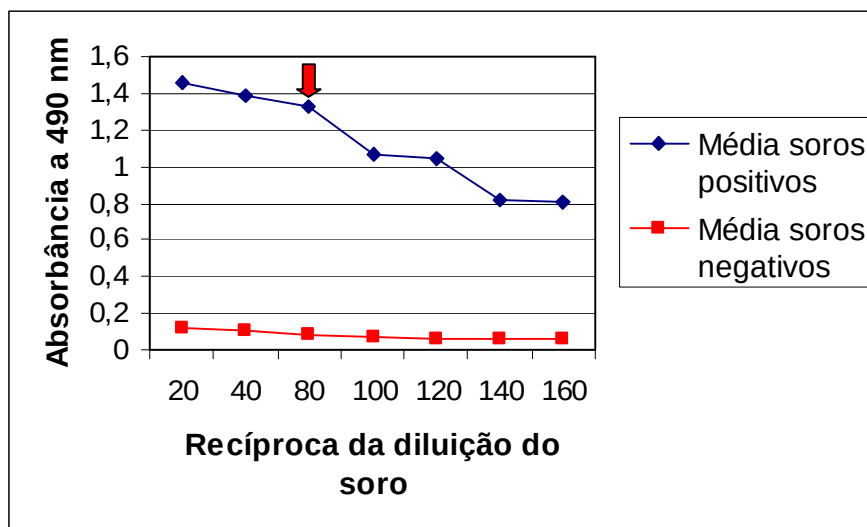


Figura 8: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes diluições do soro.

6.1.1.3. Concentração dos Conjugados:

Na figura 9 estão apresentadas as absorbâncias obtidas pela ELISA (ag. *L. major-like*) utilizando diferentes diluições do conjugado anti-IgG canino. A primeira diluição que apresentou uma boa discriminação entre soros positivos e negativos foi a de 1:10000, sendo portanto considerada a sua diluição ótima.

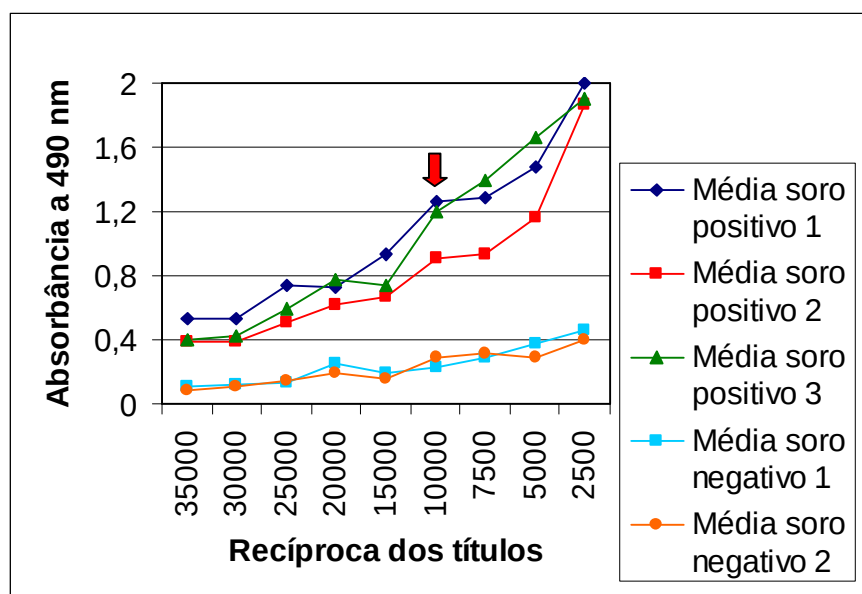


Figura 9: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG canino.

Na figura 10 estão apresentadas as absorvâncias obtidas pela ELISA (ag. *L. major-like*), para soros de cães positivos e negativos para *L. chagasi*, utilizando diferentes diluições do conjugado anti-IgG1 canino. A diluição de 1:2500 foi a que apresentou a maior discriminação entre soros positivos e negativos, sendo considerada a diluição ótima.

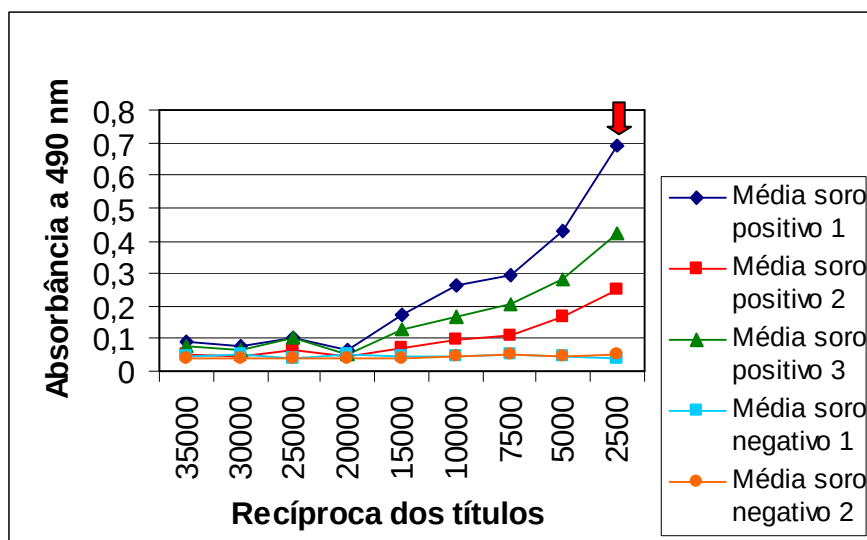


Figura 10: Média das absorvâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG1 canino.

Na figura 11 estão apresentadas as absorvâncias obtidas pela ELISA (ag. *L. major-like*), para soros de cães positivos e negativos para *L. chagasi*, utilizando diferentes diluições do conjugado anti-IgG2 canino. A sua diluição ótima foi obtida com 1:10000, uma vez que foi a primeira diluição a apresentar a maior discriminação entre soros positivos e negativos.

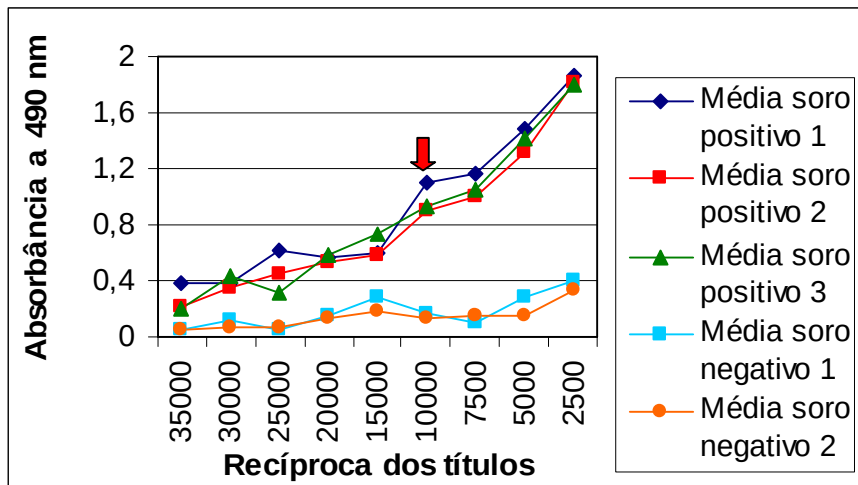


Figura 11: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soros de cães positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para diferentes concentrações do conjugado anti-IgG2 canino.

6.1.2. Padronização da eluição do sangue dessecado em papel de filtro para obtenção da diluição ótima equivalente à do soro:

Na figura 12 estão apresentadas as absorbâncias obtidas, para dois cães, com o ensaio dos soros, em sua diluição ótima, e dos eluatos correspondentes, em cinco eluições diferentes, variando-se o volume de PBS utilizado para eluir cada picote. A eluição equivalente à diluição ótima do soro (1:80) foi obtida com 500 µl de PBS para cada picote do papel de filtro Whatman nº 4.

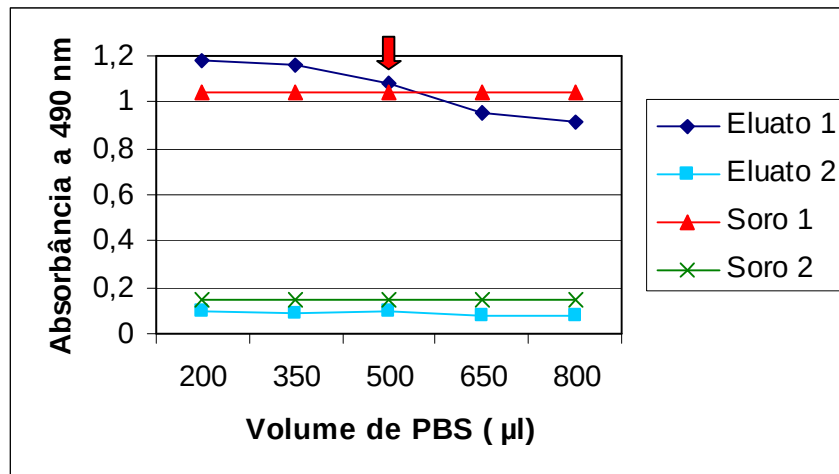


Figura 12: Média das absorbâncias a 490 nm obtidas pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para amostras de soro e eluato de um cão positivo e um negativo para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas para as eluições preparadas utilizando diferentes volumes de PBS para eluir cada picote do papel de filtro Whatman nº 4.

6.2. Determinação da validade dos testes sorológicos:

6.2.1. Determinação da validade intrínseca da IFI, ELISA (ag. *L. major-like*) e ELISA (Bio-Manguinhos), realizadas em soros de cães, em relação à presença de infecção nos cães:

A comparação dos resultados obtidos através da IFI, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, com a presença ou ausência de infecção nos cães está apresentada na tabela 6.

Foram encontrados índices de sensibilidade (S), Especificidade (E) e Concordância de Youden (J) iguais a 98,3%, 93,6% e 91,9%, respectivamente. Ocorreram dois resultados falso-negativos – sendo um obtido de um cão oligossintomático e o outro de um cão polissintomático – e dois resultados falso-positivos – ambos de títulos baixos (1:40).

O Qui-quadrado de McNemar, com um grau de liberdade, foi igual a 0,25. Este valor, por ser inferior ao valor tabelado (3,84), demonstra não haver diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 6: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI, realizada em soros, de cães e da categorização dos animais.

IFI soro	Infecção		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	118	2	120
Negativo	2	29	31
Total	120	31	151

Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

χ^2 McNemar = 0,25; 1gl

A comparação dos resultados obtidos através da ELISA (Bio-Manguinhos), em soros, com a presença ou ausência de infecção nos cães está apresentada na tabela 7.

Foram encontrados índices S, E e J iguais a 87,5%, 100,0% e 87,5%, respectivamente. Ocorreram quinze resultados falso-negativos, sendo onze obtidos de cães assintomáticos e quatro obtidos de cães oligossintomáticos. Não foram observados resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 13,07, demonstrando a tendência de resultados falsos.

Tabela 7: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

ELISA IgG (Bio-Manguinhos) soro	Infecção		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	105	0	105
Negativo	15	31	46
Total	120	31	151

χ^2 McNemar = 13,07; 1gl.

A comparação dos resultados obtidos através da ELISA (ag. *L. major-like*) para IgG, em soros, utilizando-se dois desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com a presença ou ausência de infecção nos cães está apresentada na tabela 8.

Foram encontrados índices S, E e J iguais a 93,3%, 77,4% e 70,8%, respectivamente. Ocorreram oito resultados falso-negativos, sendo quatro obtidos de cães assintomáticos e quatro obtidos de cães oligossintomáticos, e sete resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 0,00, demonstrando não haver diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 8: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major-like*), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

ELISA IgG (ag. <i>L. major-like</i>)*	Infecção		Total
	Presente	Ausente	
soro			
Positivo	112	7	119
Negativo	8	24	32
Total	120	31	151

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

χ^2 McNemar = 0,00; 1gl.

A comparação dos resultados obtidos através da ELISA (ag. *L. major-like*) para IgG, em soros, utilizando-se três desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com a presença ou ausência de infecção nos cães está apresentada na tabela 9.

Os índices S, E e J foram iguais a 82,5%, 100,0% e 82,5%, respectivamente. Ocorreram vinte e um resultados falso-negativos, sendo oito obtidos de cães assintomáticos, doze de cães oligossintomáticos e um de um cão polissintomático. Não foram observados resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 19,05. Há portanto a tendência de ocorrência de resultados falso -negativos.

Tabela 9: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major-like*), realizada em soros de cães, e da categorização dos animais.

ELISA IgG (ag. <i>L. major-like</i>)*	Infecção		Total
	Presente	Ausente	
soro			
Positivo	99	0	99
Negativo	21	31	52
Total	120	31	151

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

χ^2 McNemar = 19,05; 1gl.

6.2.2. Determinação da validade intrínseca e extrínseca da ELISA (ag. *L. major-like*) e ELISA (Bio-Manguinhos), realizadas em soros de cães, em relação a IFI em soros de cães (teste de referência):

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA (Bio-Manguinhos), em soros, com os resultados obtidos com a IFI, também em soros, está apresentada na tabela 10.

Foram obtidos os índices de co-positividade (icp), co-negatividade (icn) e concordância de Youden (J) iguais a 86,5 %, 97,4 % e 84,0 %, respectivamente. Ocorreram dezessete resultados falso-negativos – onze de baixos títulos (dez com título de 1:40 e um com título de 1:80) e seis de médios títulos (quatro com título de 1:160 e dois com título de 1:320). Foi encontrado também um resultado falso-positivo.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 12,50, o que demonstra a tendência de ocorrência de resultados falso-negativos.

Tabela 10: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG (Bio-Manguinhos), realizada em soros de cães, e através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (Bio-Manguinhos) soro	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	109	1	110
Negativo	17	38	55
Total	126	39	165

*Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

χ^2 McNemar = 12,50; 1gl.

Na figura 13 estão apresentados os resultados dos valores preditivos de um resultado positivo (vpp) e de um resultado negativo (vpn), considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (Bio-Manguinhos), em soros.

Para as prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50% foram obtidos os respectivos vpp – 25,4%, 64,0%, 78,9%, 91,8% e 97,1% – e vpn – 99,9%, 99,3%, 98,5%, 95,6% e 87,8%.

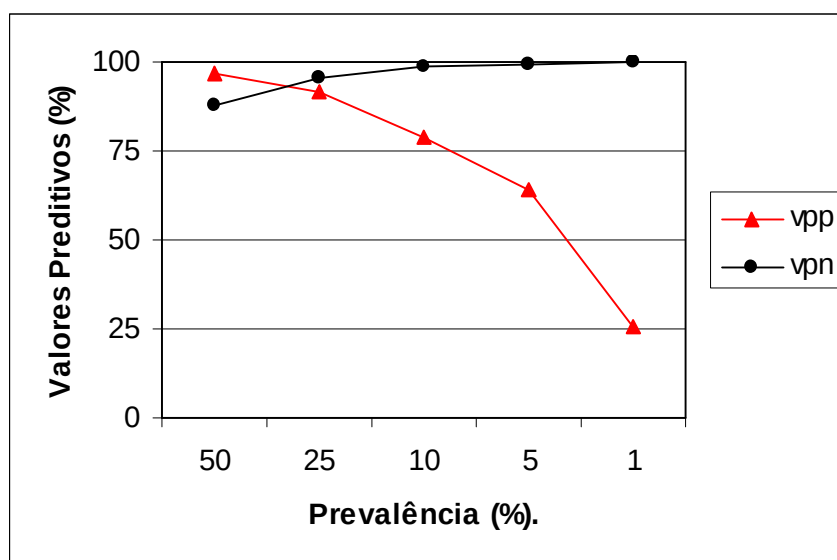


Figura 13: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA (Bio-Manguinhos) em soros de cães.

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA (ag. *L. major-like*) para IgG, em soros, utilizando dois desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com os resultados obtidos com a IFI, também em soros, estão apresentados na tabela 11.

Os índices icp, icn e J foram iguais a 92,9 %, 64,1 % e 57,0 %, respectivamente. Ocorreram nove resultados falso-negativos – oito de baixos títulos (seis com título de 1:40 e dois com título de 1:80) e um de médio título (com título de 1:160). Foram encontrados ainda quatorze resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 0,70, demonstrando não haver diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 11: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em soros de cães e através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (ag. <i>L. major-like</i>) ⁺ soro	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	117	14	131
Negativo	9	25	34
Total	126	39	165

*Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

+O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

X² McNemar = 0,70; 1gl.

Na figura 14 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (ag. *L. major-like*) IgG, em soros, utilizando-se dois desvios padrões para o cálculo do limiar de reatividade.

Observam-se os vpp de 2,6%, 12,0%, 22,3%, 46,3% e 72,1% e os vpn de 99,9%, 99,4%, 98,8%, 96,4% e 90,0% para as respectivas prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

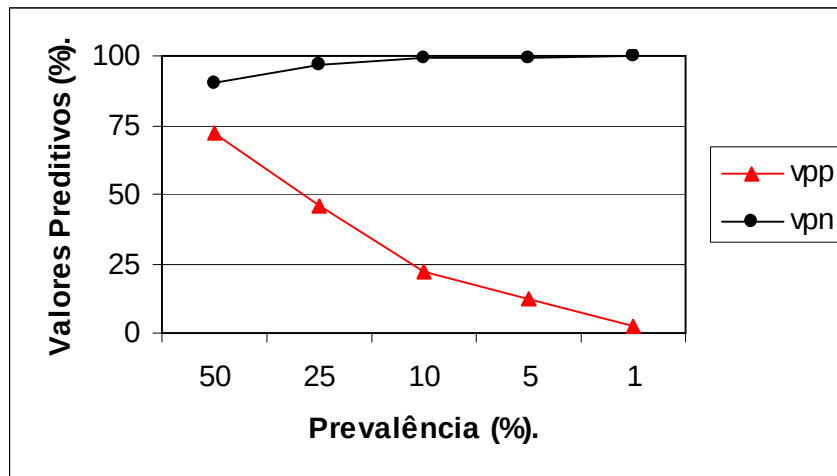


Figura 14: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros de cães, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA (ag. *L. major*-like) para IgG, em soros, utilizando três desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com os resultados obtidos com a IFI, também em soros, estão apresentados na tabela 12.

Foram obtidos índices icp, icn e J iguais a 82,5 %, 87,2 % e 69,7 %, respectivamente. Ocorreram vinte e dois resultados falso-negativos – doze de baixos títulos (nove com título de 1:40 e três com título de 1:80), seis de médios títulos (cinco com título de 1:160 e um com título de 1:320) e quatro de altos títulos (três com título de 1:640 e um com título de 1:1280). Foram encontrados também cinco resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 9,48. Este valor demonstra a tendência de ocorrência de resultados falso-negativos.

Tabela 12: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros de cães e através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) ⁺	IFI soro*		
soro	Positivo	Negativo	Total
Positivo	104	5	109
Negativo	22	34	56
Total	126	39	165

*Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

+O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão

χ^2 McNemar = 9,48; 1gl.

Na figura 15 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (ag. *L. major*-like) IgG, em soros, utilizando-se três desvios padrões para o cálculo do limiar de reatividade.

Observam-se os vpp de 6,1%, 25,3%, 41,7%, 68,2% e 86,6% e os vpn de 99,8%, 99,0%, 97,8%, 93,7%, 83,3% para as respectivas prevalências de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

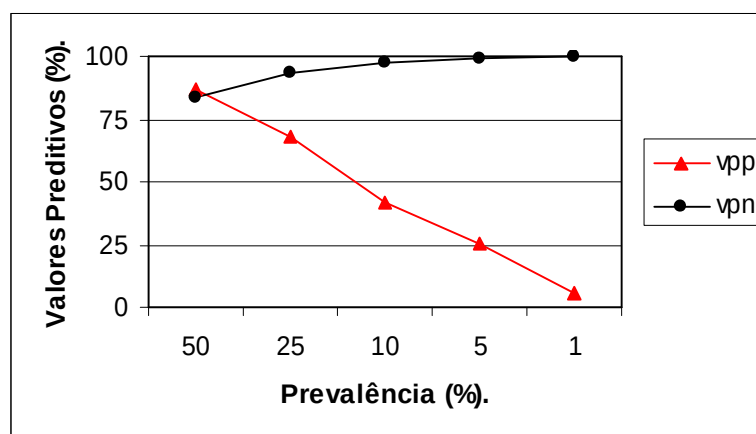


Figura 15: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros de cães, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

6.2.3. Avaliação da validade intrínseca e extrínseca da IFI, ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major-like*), realizadas em eluatos sanguíneos, em relação a IFI em soros de cães (teste de referência):

A comparação entre os resultados obtidos através da IFI em eluatos, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, e os resultados obtidos com a IFI em soros, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, estão apresentados na tabela 13.

Foram encontrados índices icp, icn e J iguais a 92,9 %, 92,3 % e 85,2 %, respectivamente. Foram encontrados ainda nove resultados falso-negativos – sete de títulos baixos (seis com título de 1:40 e um com título de 1:80) e dois de títulos médios (um com título de 1:160 e o outro com título de 1:320), além de três resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 2,08, o que demonstra não haver diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 13: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI em eluatos sanguíneos e através da IFI em soros de cães.

IFI eluato*	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	117	3	120
Negativo	9	36	45
Total	126	39	165

* Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

χ^2 McNemar = 2,08; 1gl.

Na figura 16 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de IFI, em eluatos, utilizando-se o título de 1:40 como limiar de reatividade.

Para as prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50% foram obtidos os respectivos vpp – 10,9%, 38,9%, 57,3%, 80,1% e 92,4% – e vpn – 99,9%, 99,6%, 99,2%, 97,5% e 92,8%.

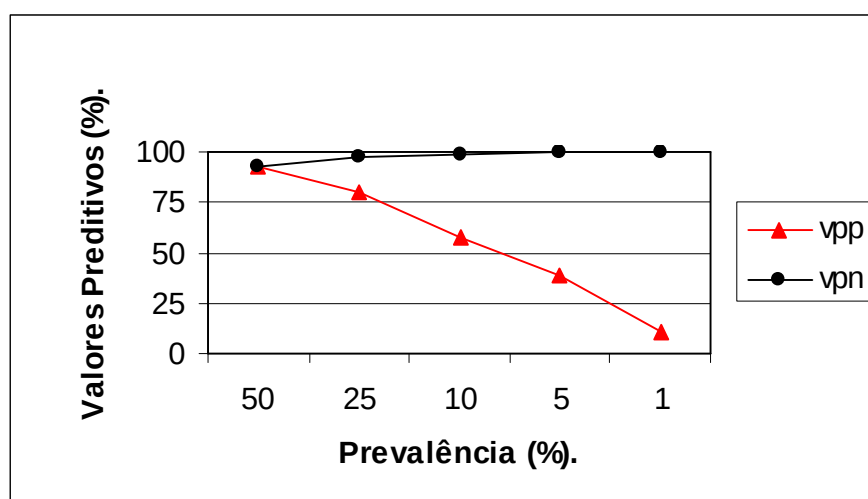


Figura 16: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a IFI em eluatos sanguíneos, utilizando o título de 1:40 como limiar de reatividade.

A comparação entre os resultados obtidos através da IFI em eluatos, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:20, e os resultados obtidos com a IFI em soros, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, estão apresentados na tabela 14.

Foram encontrados índices icp, icn e J iguais a 97,6 %, 89,7 % e 87,4 %, respectivamente. Foram encontrados também três resultados falso-negativos – todos de títulos baixos (dois com título de 1:40 e um com título de 1:80), além de quatro resultados falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 0,00, o que demonstra a inexistência de diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 14: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

IFI eluato ⁺	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	123	4	127
Negativo	3	35	38
Total	126	39	165

* Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

⁺ Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:20.

χ^2 McNemar = 0,00; 1gl.

Na figura 17 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de IFI, em eluatos, utilizando-se o título de 1:20 como limiar de reatividade.

Observam-se os vpp de 8,8%, 33,4%, 51,4%, 76,0% e 90,5% e os vpn de 99,9%, 99,9%, 99,7%, 99,1% e 97,4% para as respectivas prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

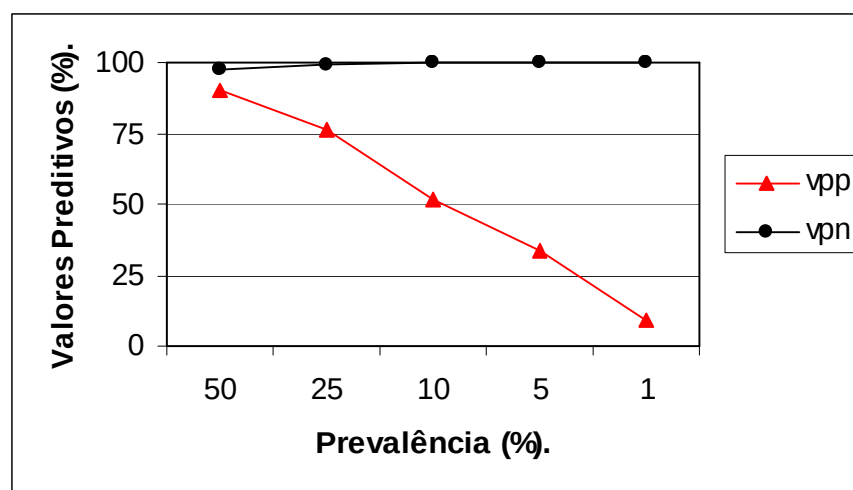


Figura 17: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a IFI em eluatos sanguíneos, utilizando o título de 1:20 como limiar de reatividade.

A distribuição cruzada dos resultados obtidos através da ELISA (Bio-Manguinhos) para IgG, em eluatos, com os resultados obtidos com a IFI em soros, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, estão apresentados na tabela 15.

Foram encontrados índices icp, icn e J iguais a 79,4 %, 97,4 % e 76,8 %, respectivamente. Foram encontrados também vinte e seis resultados falso-negativos - quinze de títulos baixos (onze com título de 1:40 e quatro com título de 1:80) e onze de títulos médios (cinco com título de 1:160 e seis com título de 1:320), além de um resultado falso-positivo.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 21,33, o que demonstra a tendência de ocorrência de resultados falso-negativos.

Tabela 15: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (Bio-Manguinhos)	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
eluato			
Positivo	100	1	101
Negativo	26	38	64
Total	126	39	165

* Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

χ^2 McNemar = 21,33; 1gl.

Na figura 18 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (Bio-Manguinhos), em eluatos.

Observam-se os vpp de 23,8%, 62,0%, 77,5%, 91,2% e 96,9% e os vpn de 99,8%, 98,9%, 97,7%, 93,4% e 82,5% para as respectivas prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

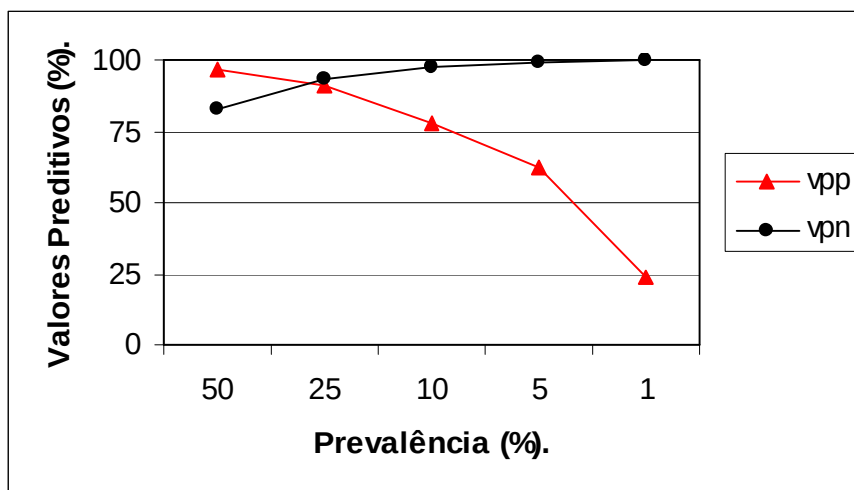


Figura 18: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA (Bio-Manguinhos) em eluatos sanguíneos.

A distribuição cruzada dos resultados obtidos através da ELISA (ag. *L. major-like*) para IgG, em eluatos, utilizando dois desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com os resultados obtidos com a IFI em soros, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, estão apresentados na tabela 16.

Foram encontrados índices icp, icn e J iguais a 93,7 %, 87,2 % e 80,8 %, respectivamente. Foi observada a ocorrência de oito resultados falso-negativos – cinco de baixos títulos (com título de 1:40), um de médio título (com título de 1:160) e dois de títulos elevados (com título de 1:640), além de cinco falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 0,31, o que demonstra não haver diferenças entre as proporções de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Tabela 16: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (ag. <i>L. major-like</i>) ⁺ eluato	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	118	5	123
Negativo	8	34	42
Total	126	39	165

*Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

+ O Limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

χ^2 McNemar = 0,31; 1gl.

Na figura 19 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (ag. *L. major-like*) IgG, em eluatos, utilizando-se dois desvios-padrão para o cálculo do limiar de reatividade.

Observam-se os vpp de 6,9%, 27,8%, 44,8%, 70,9% e 88,0% e os vpn de 99,9%, 99,6%, 99,2%, 97,6% e 93,2% para as respectivas prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

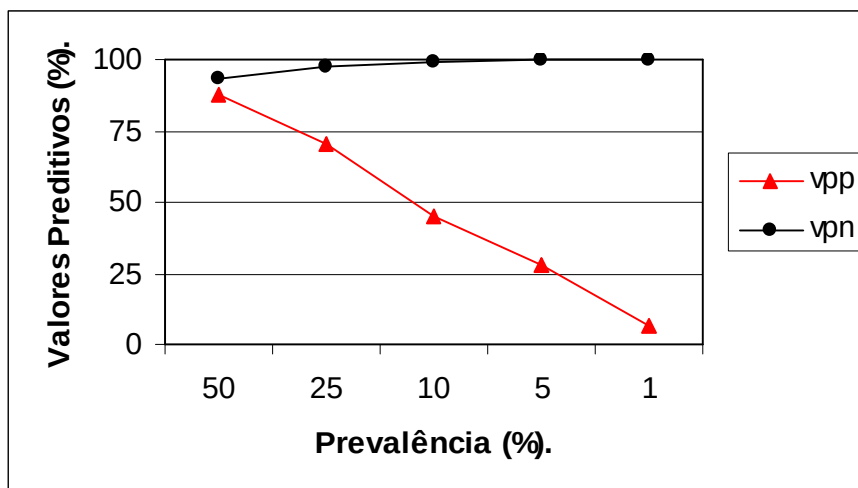


Figura 19: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em eluatos sanguíneos, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

A distribuição cruzada dos resultados obtidos através da ELISA (ag. *L. major-like*) para IgG, em eluatos, utilizando três desvios padrões na determinação do limiar de reatividade, com os resultados obtidos com a IFI em soros, considerando-se como positivos os soros reagentes nos títulos maiores ou iguais a 1:40, estão apresentados na tabela 17.

Foram encontrados índices icp, icn e J iguais a 83,3 %, 89,7 % e 73,1%, respectivamente. Foram encontrados ainda vinte e um resultados falso-negativos – oito de títulos baixos (seis com título de 1:40 e dois com título de 1:80), seis de títulos médios (cinco com título de 1:160 e um com título de 1:320) e sete de títulos altos (quatro com título de 1:640, dois com título de 1:1280 e um com título de 1:5120), além de quatro falso-positivos.

O Qui-quadrado de McNemar observado, com um grau de liberdade, foi igual a 10,24, o que, de acordo com a tabela 17, demonstra a tendência de ocorrência de resultados falso-negativos.

Tabela 17: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em eluatos sanguíneos e dos obtidos através da IFI em soros de cães.

ELISA IgG (ag. <i>L. major-like</i>) ⁺ eluato	IFI soro*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	105	4	109
Negativo	21	35	56
Total	126	39	165

*Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

+O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

χ^2 McNemar = 10,24; 1gl.

Na figura 20 estão apresentados os resultados dos vpp e vpn, considerando-se cinco prevalências estimadas para a LVC, para a reação de ELISA (ag. *L. major-like*) IgG, em eluatos, utilizando-se três desvios-padrão para o cálculo do limiar de reatividade.

Observam-se os vpp de 7,6%, 30,0%, 47,5%, 73,0% e 89,0% e os vpn de 99,8%, 99,0%, 98,0%, 94,2% e 84,3% para as respectivas prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50%.

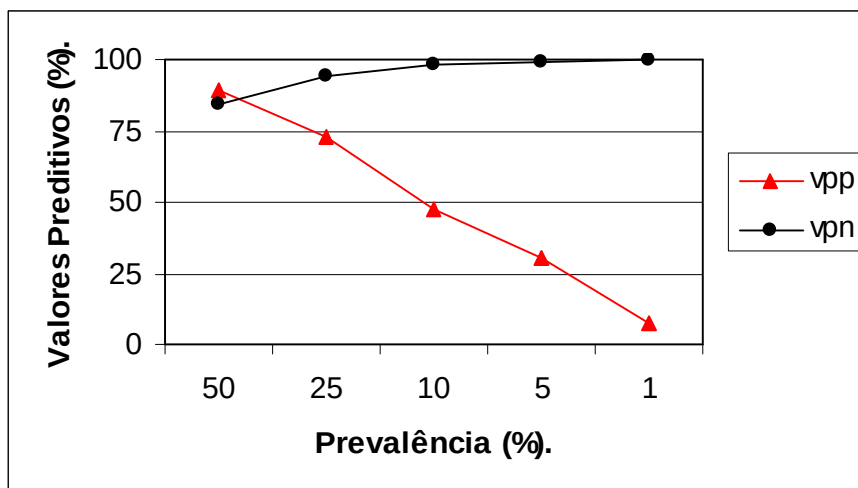


Figura 20: Valores preditivos positivos (vpp) e valores preditivos negativos (vpn), em diferentes prevalências estimadas, para a ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em eluatos, estabelecendo-se o limiar de reatividade pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

6.3. Avaliação da concordância entre os resultados obtidos através do uso de soros e eluatos sanguíneos para os testes sorológicos:

6.3.1. Análise comparativa da IFI em soros e eluatos sanguíneos:

O cruzamento dos resultados positivos e negativos obtidos através da IFI em soros com os obtidos através da IFI, em eluatos, com limiares de reatividade iguais a 1:20 e 1:40, revelou ótimas concordâncias de Youden, de 87,4% e de 85,2%, respectivamente.

A análise das dispersões de títulos de anticorpos obtidos pela IFI em soros e em eluatos está apresentada na tabela 18. Foi observada uma boa concordância de títulos. Segundo Marinkelle *et al.* (1978), variações de um título na IFI são tidas como insignificantes. Portanto, consideram-se discordantes os resultados com variações de dois ou mais títulos. Assim, a zona de concordância é representada pelas áreas amarela e cinza.

Tabela 18: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela IFI, em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

IFI (Bio-Manguinhos). Eluato	Soro						Total
	10	20	40	80	160	≥ 320	
10	32	3	2	1			38
20	1		4		1	1	7
40	1	1	5	4	1	2	14
80		1	5	6	8	6	26
160				2	7	16	25
≥ 320			1	4	8	42	55
Total	34	5	17	17	25	67	165

Dentre as discordâncias observadas, destacam-se duas (em vermelho) em que houve positividade nos eluatos e negatividade nos respectivos soros. É possível que, nesses casos, tenha ocorrido contaminação, uma vez que as amostras se encontravam em lâminas contendo amostras positivas (títulos iguais a 1:320).

6.3.2. Análise comparativa da ELISA IgG (Bio-Manguinhos) em soros e eluatos sanguíneos:

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos) em soros e eluatos revelou ótima concordância de Youden (86,4%).

A análise das dispersões de títulos de anticorpos obtidos pela ELISA IgG (Bio-Manguinhos) em soros e em eluatos está apresentada na tabela 19. Foi observada uma ótima concordância de faixas de absorbância. Para as reações de ELISA, os valores de absorbância foram agrupados em faixas, de forma a possibilitar a avaliação da concordância entre soro e eluato, por esta reação.

Tabela 19: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG (Bio-Manguinhos), em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

ELISA IgG (Bio-Manguinhos).	Soro								Total
Eluato	0 – 0,199	0,200 – 0,399	0,400 – 0,599	0,600 – 0,799	0,800 – 0,999	1,000 – 1,199	1,200 – 1,399	≥ 1,400	
0,000 – 0,199	58	4							62
0,200 – 0,399	5	26	11						42
0,400 – 0,599		4	18	7					29
0,600 – 0,799		1	4	8	2				15
0,800 – 0,999	1	1		1	9	2			14
1,000 – 1,199					1		2		3
1,200 – 1,399									
≥ 1,400									
Total	64	36	33	16	12	2	2		165

Pode-se observar que em uma das discordâncias (em vermelho), houve positividade no eluato e negatividade no soro respectivo. É possível que tenha ocorrido contaminação, pois havia três amostras positivas próximas ao orifício contendo a amostra em questão.

6.3.3. Análise comparativa da ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros e eluatos sanguíneos:

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos, considerando-se dois ou três desvios-padrão para o cálculo do limiar de reatividade, revelou boas e ótimas concordâncias de Youden, variando entre 75,0% e 83,2%.

A análise das dispersões de títulos de anticorpos obtidos pela ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros e em eluatos está apresentada na tabela 20. Foi observada uma ótima concordância de faixas de absorbância.

Tabela 20: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like).	Soro								Total
	0 - 0,199	0,200 - 0,399	0,400 - 0,599	0,600 - 0,799	0,800 - 0,999	1,000 - 1,199	1,200 - 1,399	≥ 1,400	
Eluato									
0,000 – 0,199	3	21	3						27
0,200 – 0,399		12	10						22
0,400 – 0,599		1	4	4	1	1			11
0,600 – 0,799		1	3	2	5	2			13
0,800 – 0,999			3	3	15	7			28
1,000 – 1,199				2	6	20	6		34
1,200 – 1,399		1		1	4	5	2	2	15
≥ 1,400							6	9	15
Total	3	36	23	12	31	35	14	11	165

Pode-se observar que em uma das discordâncias (em vermelho), houve positividade no eluato e negatividade no soro respectivo. Possivelmente ocorreu contaminação, uma vez que havia quatro amostras positivas próximas ao orifício contendo a amostra em questão.

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos, considerando-se dois ou três desvios-padrão para o cálculo do limiar de reatividade, revelou regulares e boas concordâncias de Youden, variando entre 46,3% e 62,4%.

A análise das dispersões de títulos de anticorpos obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like) em soros e em eluatos está apresentada na tabela 21. Foi observada uma boa concordância de faixas de absorbância.

Tabela 21: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos sanguíneos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like).	Soro								Total
Eluato	0 – 0,199	0,200 – 0,399	0,400 – 0,599	0,600 – 0,799	0,800 – 0,999	1,000 – 1,199	1,200 – 1,399	≥ 1,400	
0,000 – 0,199	56	10	2						68
0,200 – 0,399	28	15	4	2					49
0,400 – 0,599	6	7	5	2		1	1		22
0,600 – 0,799		4	2				1		7
0,800 – 0,999	1			2		2			5
1,000 – 1,199	1				1			1	3
1,200 – 1,399					1	2	1		4
≥ 1,400							1	6	7
Total	93	36	12	6	2	5	4	7	165

Pode-se observar que em oito amostras discordantes, houve positividade no eluato e negatividade no soro respectivo. Apesar de ter sido possível a ocorrência de contaminação, pois em todos os casos havia amostras positivas próximas ao orifício contendo a amostra em questão, o mais provável é que tais discordâncias sejam produto de uma baixa precisão da técnica para dosagem de anticorpos da subclasse IgG1, dado o grande número de discordâncias.

A distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos através da ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos, para diferentes valores de *cut off*, revelou boas e ótimas concordâncias de Youden, variando entre 70,9% e 82,2%.

A análise das dispersões de títulos de anticorpos obtidos pela ELISA IgG (ag. *L. major*-like) em soros e em eluatos está apresentada na tabela 22. Foi observada boa concordância de faixas de absorbância.

Tabela 22: Títulos de anticorpos anti-*L. chagasi* obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), em soros e eluatos sanguíneos, no 1º D.A.C.. As áreas amarela e cinza representam a zona de concordância.

ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like).	Soro								Total
	0 – 0,199	0,200 – 0,399	0,400 – 0,599	0,600 – 0,799	0,800 – 0,999	1,000 – 1,199	1,200 – 1,399	≥1,400	
Eluato									
0,000 – 0,199	22	13	1						36
0,200 – 0,399	1	9	4	2					16
0,400 – 0,599		1	5	1	1	1			9
0,600 – 0,799		2	2	3	7		2		16
0,800 – 0,999			1	7	10	6	2		26
1,000 – 1,199			1	3	10	22	6	2	44
1,200 – 1,399				1		7	5	2	15
≥ 1,400							1	2	3
Total geral	23	25	14	17	28	36	16	6	165

6.4. Determinação da reatividade cruzada dos testes sorológicos em amostras de soros e eluatos sanguíneos obtidas de cães infectados por *T. cruzi*:

A avaliação da especificidade das reações sorológicas foi executada com amostras de soro e SDPF de 10 cães experimentalmente infectados por *T. cruzi*. A tabela 23 resume os resultados, onde se observa a reatividade cruzada para cada reação. Todas as reações cruzadas, em soro e em eluato, ocorreram em baixos-títulos (menores ou iguais a 1:80).

TABELA 23: Soropositividade de cães infectados por *T. cruzi*, para amostras de soro e eluato, pelas técnicas de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major*-like).

Nº de cães com infecção por <i>T.cruzi</i> .	Positividade									
	IFI*		IFI**		ELISA IgG Bio-Manguinhos		ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) [#]		ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) ⁺	
	soro	Eluato	soro	eluato	soro	eluato	soro	eluato	soro	eluato
	10	2	2	5	3	1	0	8	6	6

* Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:40.

** Resultados positivos pela IFI para títulos maiores ou iguais a 1:20.

[#] O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

⁺ O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

6.5. Reprodutibilidade da ELISA (ag. *L. major-like*), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI em eluatos sanguíneos em função do tempo decorrido após a coleta.

A análise da reprodutibilidade ao longo do tempo, realizada por regressão linear e por demonstração gráfica (figura 21 e figura 2a dos anexos), demonstrou a manutenção dos títulos de anticorpos pela IFI, até 30 D.A.C., para todos os grupos – negativos ($p = 0,833$), títulos baixos ($p = 0,981$), títulos médios ($p = 0,309$) e títulos elevados ($p = 0,428$). Aos 60 D.A.C. houve queda significativa de títulos para três grupos – títulos baixos ($p = 0,001$), títulos médios ($p = 0,000$) e títulos elevados ($p = 0,000$), com manutenção de títulos para o grupo dos negativos ($p = 0,303$).

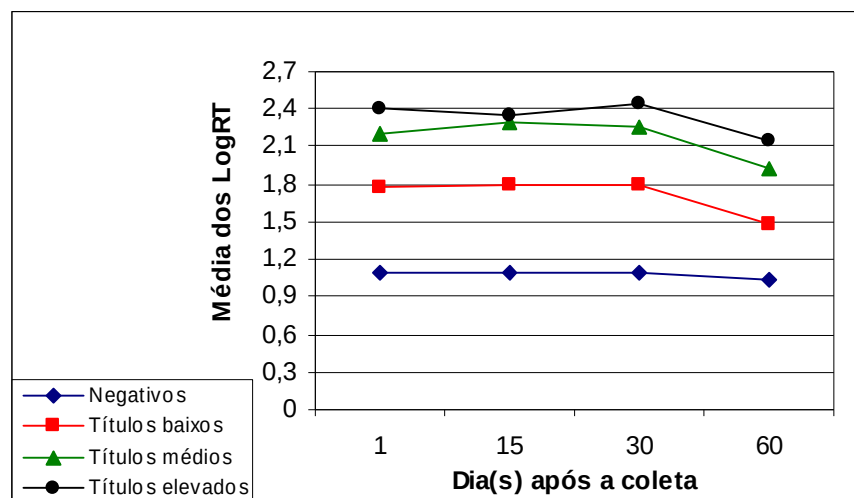


Figura 21: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados pela IFI (Bio-Manguinhos).

Para a reação de ELISA IgG (Bio-Manguinhos), a regressão linear e a representação gráfica (figura 22 e na figura 2b dos anexos) demonstraram a manutenção dos níveis de anticorpos até 60 D.A.C., para todos os grupos – negativos ($p = 0,960$), títulos baixos ($p = 0,357$), títulos médios ($p = 0,848$) e títulos elevados ($p = 0,326$).

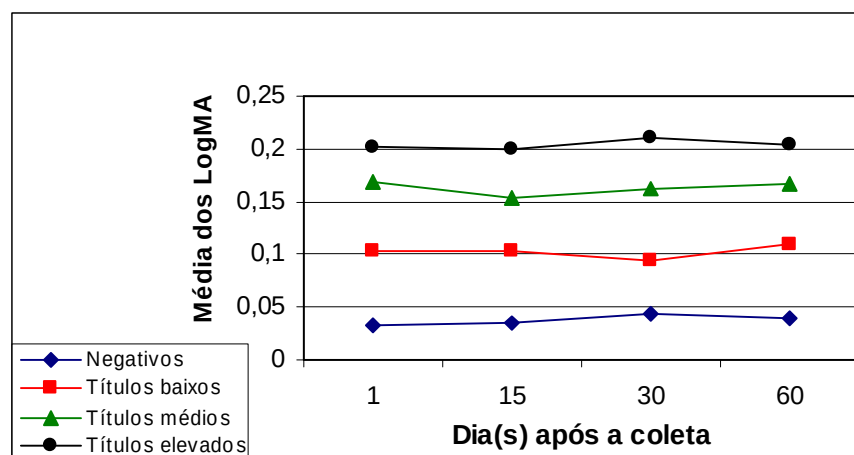


Figura 22: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG (Bio-Manguinhos).

A manutenção dos níveis de anticorpos foi também observada na reação de ELISA IgG (ag. *L. major*-like), utilizando a regressão linear e a representação gráfica dos resultados (figura 23 e figura 2c dos anexos), até os 60 D.A.C., para todos os grupos – negativos ($p = 0,210$), títulos baixos ($p = 0,573$), títulos médios ($p = 0,742$) e títulos elevados ($0,789$).

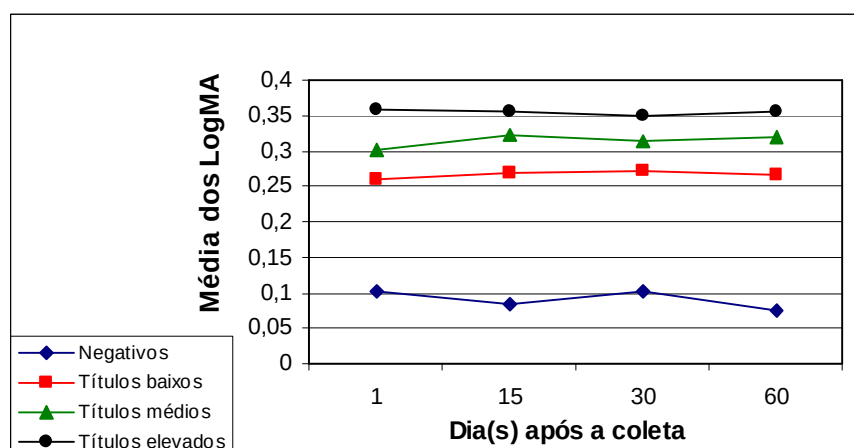


Figura 23: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG (ag. *L. major*-like).

Através da regressão linear e da representação gráfica dos resultados (figura 24 e figura 2d dos anexos) foi demonstrada também a manutenção dos níveis de anticorpos da subclasse IgG1, pela reação de ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), até os 60 D.A.C., para três grupos – negativos ($p = 0,363$), títulos baixos ($p = 0,068$) e títulos médios ($p = 0,053$), com exceção do grupo dos títulos elevados, onde houve queda significativa de títulos ($p = 0,028$). Entretanto, esta queda de títulos não comprometeu a positividade das amostras.

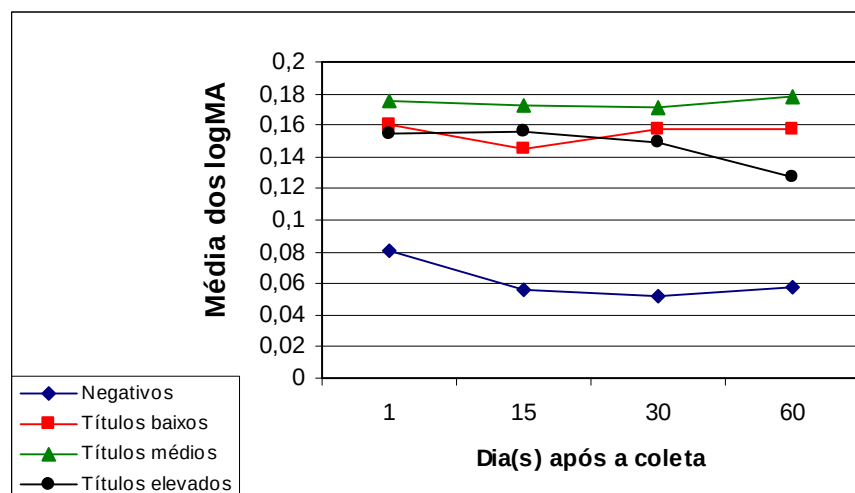


Figura 24: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* da subclasse IgG1, em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like).

A regressão linear e a representação gráfica dos resultados (figura 25 e figura 2e dos anexos) demonstraram a manutenção dos níveis de anticorpos da subclasse IgG2, pela reação de ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like) até os 60 D.A.C., para três grupos – negativos ($p = 0,538$), títulos baixos ($p = 0,960$) e títulos médios ($p = 0,104$), com um aumento significativo de títulos para o grupo dos títulos elevados ($p = 0,011$).

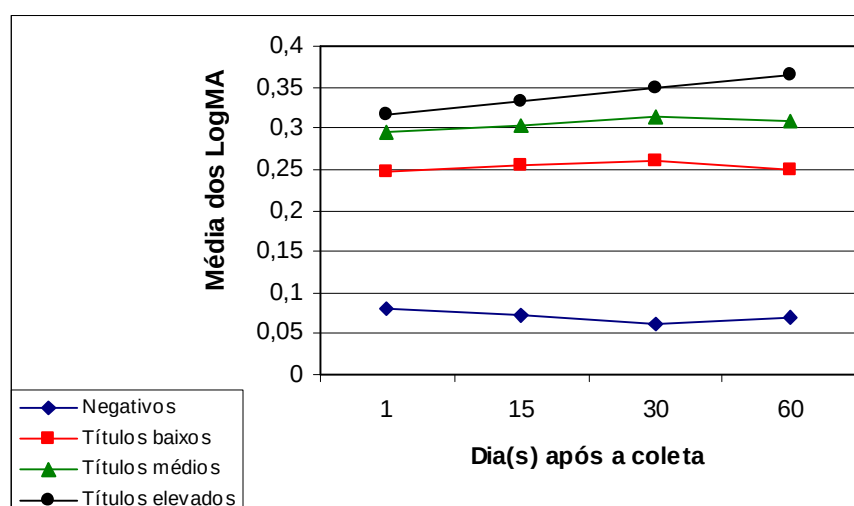


Figura 25: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* da subclasse IgG2, em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados através da ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like).

6.6. Reprodutibilidade intratestes dos resultados:

A partir das amostras de soro e eluato, ensaiadas em duplicata (10%) para as diversas reações sorológicas, nos diversos momentos após a coleta, foi avaliada a reprodutibilidade intratestes dos resultados, utilizando-se para tanto o teste “t” de Student.

A tabela 24 apresenta as diferenças entre os logaritmos das médias das réplicas. Pode-se observar que tais diferenças não foram significativamente diferentes de zero ($p > 0,05$), para todas as reações e em todos os momentos, com exceção da reação de ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like) em eluatos no 30º D.A.C..

Tabela 24: Reprodutibilidade intrateste dos resultados, para 18 amostras ensaiadas em duplicata por cada reação sorológica, avaliada através da comparação das médias dos resultados pelo Teste “t de Student”.

Reações	P	Diferença entre as médias	Intervalo de confiança (95%) das diferenças entre as médias	
			Limite inferior	Limite superior
IFI soros 1 ^o D.A.C.	0,786	0,0334	-0,223	0,290
IFI eluatos 1 ^o D.A.C.	0,149	0,1338	-0,053	0,320
IFI eluatos 15 ^o D.A.C.	0,263	0,0836	-0,069	0,236
IFI eluatos 30 ^o D.A.C.	1,000	0,0000	-0,103	0,103
IFI eluatos 60 ^o D.A.C.	0,875	-0,0167	-0,237	0,204
ELISA IgG (Bio-Manguinhos) soros 1 ^o D.A.C.	0,950	0,0010	-0,032	0,034
ELISA IgG (Bio-Manguinhos) eluatos 1 ^o D.A.C.	0,078	0,0530	-0,007	0,113
ELISA IgG (Bio-Manguinhos) eluatos 15 ^o D.A.C.	0,384	-0,0171	-0,057	0,023
ELISA IgG (Bio-Manguinhos) eluatos 30 ^o D.A.C.	0,445	0,0334	-0,057	0,123
ELISA IgG (Bio-Manguinhos) eluatos 60 ^o D.A.C.	0,729	0,0218	-0,109	0,152
ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) soros 1 ^o D.A.C.	0,664	-0,0118	-0,068	0,045
ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 1 ^o D.A.C.	0,255	-0,0187	-0,052	0,015
ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 15 ^o D.A.C.	0,347	-0,0165	-0,052	0,019
ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 30 ^o D.A.C.	0,443	-0,0084	-0,031	0,014
ELISA IgG (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 60 ^o D.A.C.	0,142	0,0349	-0,013	0,083
ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like) soros 1 ^o D.A.C.	0,534	0,0529	-0,123	0,229
ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 1 ^o D.A.C.	0,854	-0,0079	-0,097	0,081
ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 15 ^o D.A.C.	0,095	-0,0458	-0,101	0,009
ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 30 ^o D.A.C.	0,044	-0,0446	-0,088	-0,001
ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 60 ^o D.A.C.	0,970	-0,0030	-0,170	0,164
ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like) soros 1 ^o D.A.C.	0,531	0,0135	-0,031	0,058
ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 1 ^o D.A.C.	0,145	0,0394	-0,015	0,094
ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 15 ^o D.A.C.	0,084	-0,0183	-0,039	0,003
ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 30 ^o D.A.C.	0,440	-0,0176	-0,065	0,029
ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like) eluatos 60 ^o D.A.C.	0,333	-0,0447	-0,139	0,050

6.7. Concordância de resultados entre dois laboratórios:

A tabela 25 apresenta a avaliação da concordância entre os resultados de dois laboratórios, para cada reação, em soro e eluato e em quatro momentos após a coleta.

A reação de IFI em soros apresentou boa concordância de resultados, a exemplo da reação de ELISA em soros. Considerando-se os resultados obtidos com eluatos, a reação de ELISA demonstrou boa e ótimas concordâncias para todos os momentos após a coleta. Por outro lado, para a reação de IFI em eluatos, foram obtidas boa e ótima concordâncias somente até o 15º D.A.C.. Para o 30º e o 60º D.A.C., as concordâncias foram classificadas em sofrível e fraca, respectivamente.

Tabela 25: Avaliação da concordância de resultados entre os laboratórios de Parasitologia/Histopatologia da UFOP e de Sorologia da FUNED.

Reação	D.A.C.	Kappa	Concordância
IFI em soros	1	0,68	Boa
IFI em eluatos	1	0,85	Ótima
	15	0,72	Boa
	30	0,36	Sofrível
	60	0,09	Fraca
ELISA			
(Bio-Manguinhos)	1	0,73	Boa
em soros			
ELISA	1	0,77	Boa
(Bio-Manguinhos)	15	0,87	Ótima
em eluatos	30	0,87	Ótima
	60	0,85	Ótima

6.8. Avaliação das imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 como marcadoras de patogenicidade dos cães infectados por *L. chagasi*.

Na tabela 26 estão apresentados os resultados positivos e negativos obtidos pela reação de ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soro de cães positivos pela reação de IFI para dosagem de anticorpos IgG (teste de referência), executada também em amostras de soro, para as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. Pode-se observar que os anticorpos IgG1, dosados por esta reação, foram ineficazes enquanto marcadores de infecção ou de forma clínica da infecção. Entretanto, podem ser observadas diferenças entre o percentual de resultados positivos (66,6% para assintomáticos, 48.8% para oligossintomáticos e 35.5% para polissintomáticos).

Tabela 26: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Cães infectados por <i>L. chagasi</i>	ELISA IgG1 (ag. <i>L. major</i> -like)* soro		
	Positivo	Negativo	Total
Assintomáticos	28 (66.6%)	14	42
Oligossintomáticos	22 (48.8%)	23	45
Polissintomáticos	11 (35,5%)	20	31
Total	61	57	118

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

$$X^2_{2gl} = 7,17; P = 0,027.$$

Na tabela 27 estão apresentados os resultados positivos e negativos obtidos pela reação de ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soro de cães positivos pela reação de IFI para dosagem de anticorpos IgG (teste de referência), executada também em amostras de soro, para as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. Como destacado anteriormente, não é possível estabelecer uma correlação entre os resultados positivos e negativos para a dosagem dos anticorpos IgG1 pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) com a presença ou ausência de infecção ou ainda com as diferentes formas clínicas da infecção, sendo observada ausência de diferenças significativas entre o percentual de resultados positivos (33.3% para assintomáticos, 35,5% para oligossintomáticos e 22.5% para polissintomáticos).

Tabela 27: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Cães infectados por <i>L. chagasi</i>	ELISA IgG1 (ag. <i>L. major-like</i>)* soro		
	Positivo	Negativo	Total
Assintomáticos	14 (33,3%)	28	42
Oligossintomáticos	16 (35,5%)	29	45
Polissintomáticos	7 (22,5%)	24	31
Total	37	81	118

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

$$X^2_{2gl} = 1,55; P = 0,45.$$

Na tabela 28 estão apresentados os resultados positivos e negativos obtidos pela reação de ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soro de cães positivos pela reação de IFI para dosagem de anticorpos IgG (teste de referência), executada também em amostras de soro, para as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. Pode-se observar que os anticorpos IgG2, dosados por esta reação, estão presentes de forma indistinta entre as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. Entretanto, foram encontrados apenas quatro resultados negativos, sendo dois em assintomáticos e outros dois em oligossintomáticos. Portanto, os anticorpos IgG2 se comportam de forma semelhante aos anticorpos IgG.

Tabela 28: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se dois desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Cães infectados por <i>L. chagasi</i>	ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like)* soro		
	Positivo	Negativo	Total
Assintomáticos	40 (95,2%)	2	42
Oligossintomáticos	43 (95,5%)	2	45
Polissintomáticos	31 (100,0%)	0	31
Total	114	4	118

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 2 vezes o desvio-padrão.

$X^2_{2gl} = 1,48$; $P = 0,47$.

Na tabela 29 estão apresentados os resultados positivos e negativos obtidos pela reação de ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soro de cães positivos pela reação de IFI para dosagem de anticorpos IgG (teste de referência), executada também em amostras de soro, para as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. Mais uma vez, observa-se que os anticorpos IgG2, dosados por esta reação, estão presentes de forma indistinta entre as diferentes formas clínicas da infecção por *L. chagasi*. No entanto, destaca-se a ocorrência de resultados falso-negativos ao serem estabelecidos três desvios-padrão para o cálculo do limiar de reatividade.

Tabela 29: Distribuição cruzada dos resultados positivos e negativos obtidos pela ELISA IgG2 (ag. *L. major*-like), utilizando-se três desvios-padrão na determinação do limiar de reatividade, em amostras de soros de cães, com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi* com resultados positivos para a dosagem de anticorpos IgG pela reação de IFI, executada também em soro (teste de referência).

Cães infectados por <i>L. chagasi</i>	ELISA IgG2 (ag. <i>L. major</i> -like)* soro		
	Positivo	Negativo	Total
Assintomáticos	36 (85,7%)	6	42
Oligossintomáticos	38 (84,4%)	7	45
Polissintomáticos	28 (90,3%)	3	31
Total	102	16	118

*O limiar de reatividade foi estabelecido pela média dos controles negativos, acrescida de 3 vezes o desvio-padrão.

$X^2_{2gl} = 0,57$; $P = 0,75$.

6.9. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 em relação à classificação clínica dos cães infectados:

A figura 26 apresenta os títulos de imunoglobulina IgG canina, obtidos através da reação de IFI em soros, para cada grupo clínico de cães. Observa-se a ocorrência de reações cruzadas com os cães chagásicos, todas em títulos baixos e a inexistência de correlação entre forma clínica e título de imunoglobulinas.

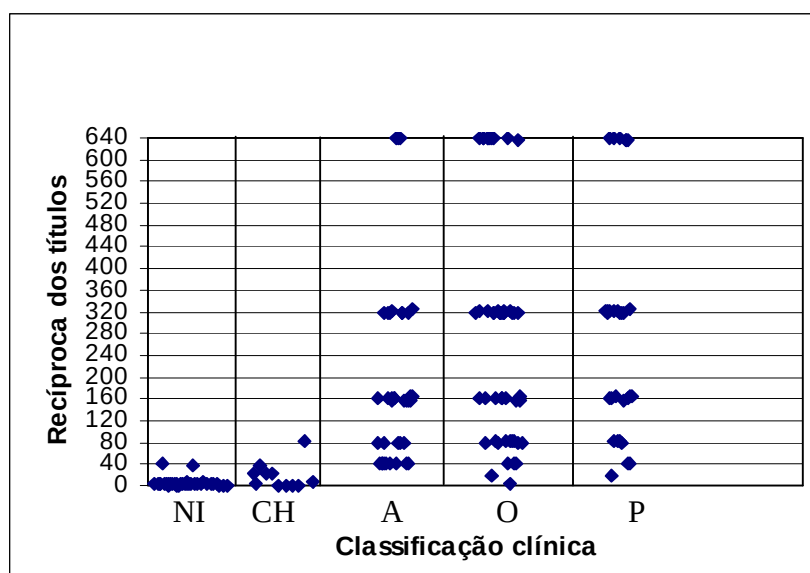


Figura 26: Títulos de imunoglobulina IgG canina, pela reação de IFI em soros, em relação à classificação dos cães (NI = não-infectados; CH = chagásicos; A = Infectados assintomáticos; O = Infectados oligossintomáticos; P = Infectados polissintomáticos).

A figura 27 apresenta os níveis de imunoglobulina IgG canina, obtidos através da reação de ELISA (Bio-Manguinhos) em soros, para cada grupo clínico de cães. Pode-se perceber uma tênue tendência de aumento dos níveis de imunoglobulinas para as formas clínicas mais severas, apesar de não ser possível estabelecer uma correlação nítida entre forma clínica e os valores de absorvância para as imunoglobulinas.

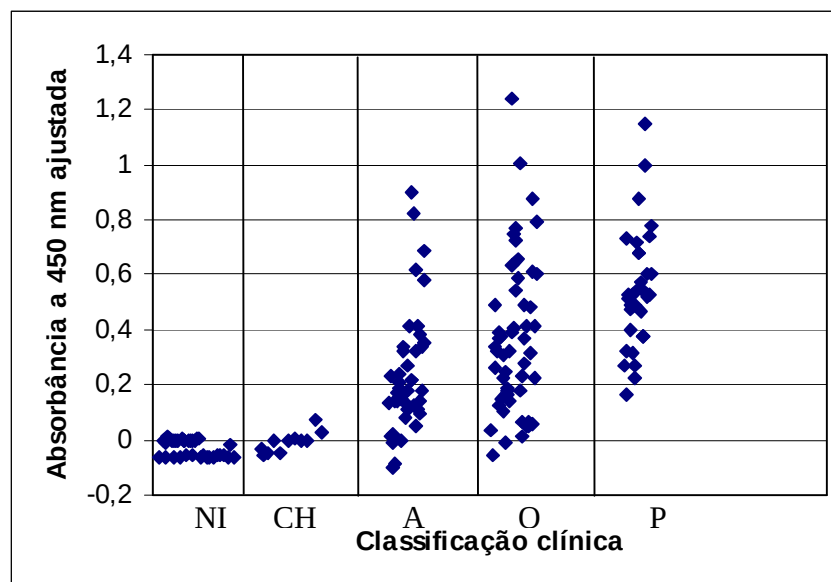


Figura 27: Valores de absorvância ajustada para imunoglobulina IgG canina, pela reação de ELISA (Bio-Manguinhos) em soros, em relação à classificação dos cães (NI = não-infectados; CH = chagásicos; A = Infectados assintomáticos; O = Infectados oligossintomáticos; P = Infectados polissintomáticos).

A figura 28 apresenta os níveis de imunoglobulina IgG canina, obtidos através da reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, para cada grupo clínico de cães. Destaca-se a ocorrência de reações cruzadas com cães chagásicos em valores elevados de absorbância. Observa-se para o grupo dos polissintomáticos uma concentração dos animais em absorbâncias maiores. Entretanto, na mesma faixa de absorbância é possível observar inúmeros cães assintomáticos e oligossintomáticos. Portanto, não é possível estabelecer correlação entre forma clínica e os valores de absorbância para as imunoglobulinas.

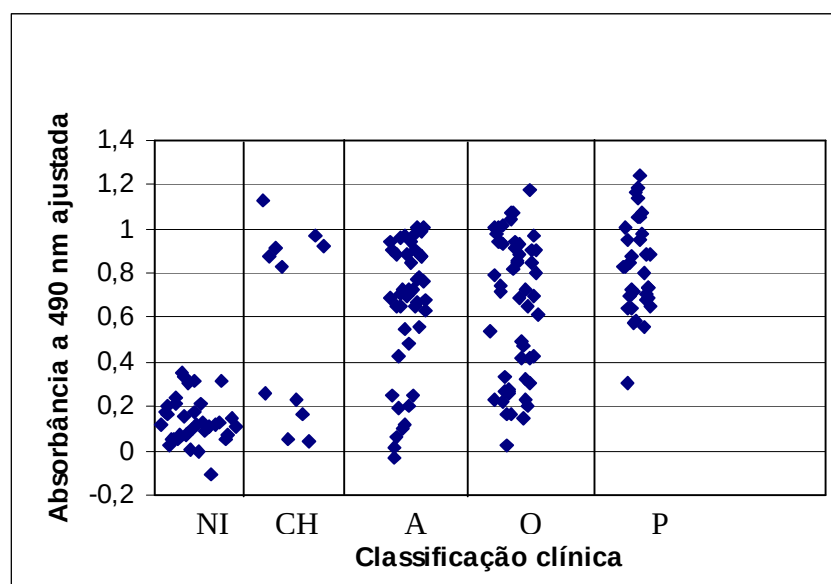


Figura 28: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, em relação à classificação dos cães (NI = não-infectados; CH = chagásicos; A = Infectados assintomáticos; O = Infectados oligossintomáticos; P = Infectados polissintomáticos).

A figura 29 apresenta os níveis de imunoglobulina IgG1 canina, obtidos através da reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, para cada grupo clínico de cães. Através desta figura e pela análise das figuras 3 a 15 dos anexos pode-se afirmar não ser possível estabelecer qualquer correlação entre forma clínica e os valores de absorbância para estas imunoglobulinas. Além disso, não houve discriminação entre infectados e não-infectados.

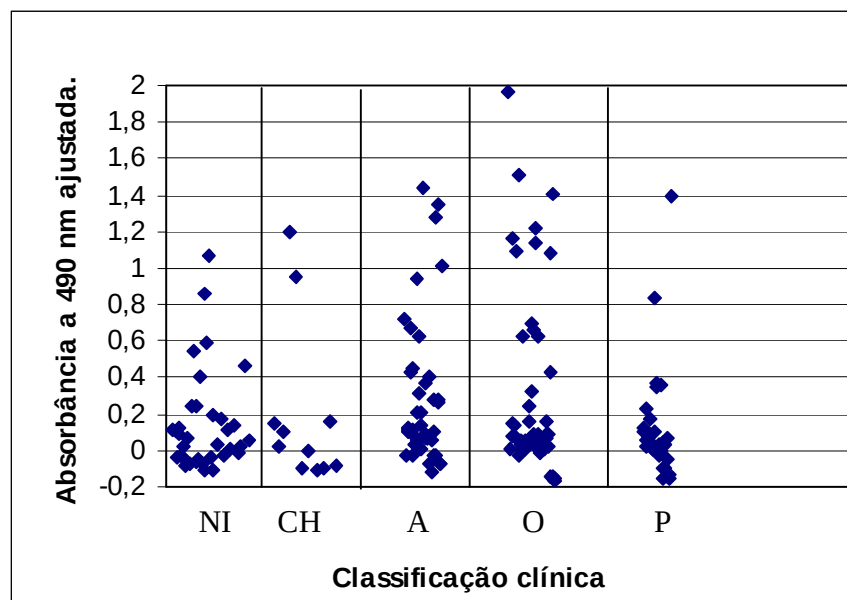


Figura 29: Valores de absorbância ajustada para imunoglobulina IgG1 canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, em relação à classificação dos cães (NI = não-infectados; CH = chagásicos; A = Infectados assintomáticos; O = Infectados oligossintomáticos; P = Infectados polissintomáticos).

A figura 30 apresenta os níveis de imunoglobulina IgG2 canina, obtidos através da reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, para cada grupo clínico de cães. Observa-se para o grupo dos polissintomáticos uma concentração dos animais em absorvâncias maiores. Entretanto, na mesma faixa de absorvância é possível observar inúmeros cães assintomáticos e oligossintomáticos. Portanto, conforme se observar nesta figura e nas figuras 3 a 15 dos anexos, não é possível estabelecer correlação entre forma clínica e os valores de absorvância para as imunoglobulinas.

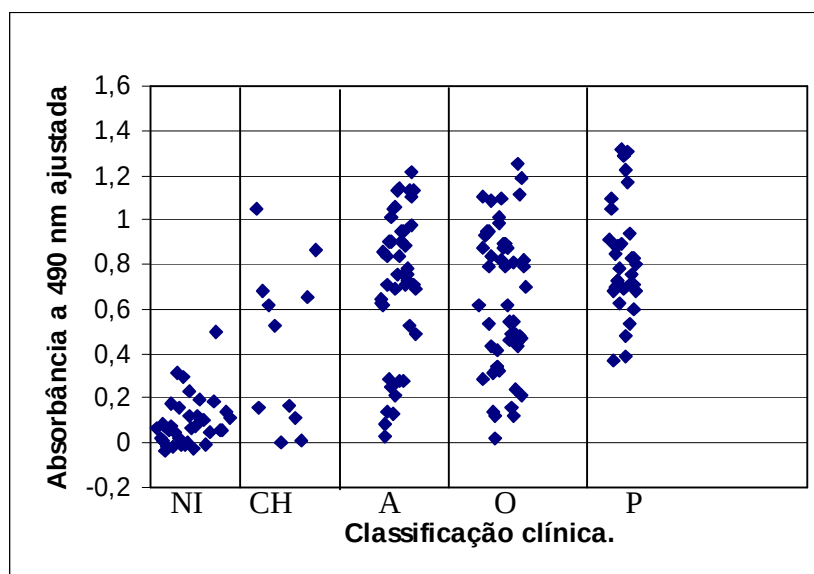


Figura 30: Valores de absorvância ajustada para imunoglobulina IgG2 canina, pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*) em soros, em relação à classificação dos cães (NI = não-infectados; CH = chagásicos; A = Infectados assintomáticos; O = Infectados oligossintomáticos; P = Infectados polissintomáticos).

7. DISCUSSÃO

A realização de inquéritos caninos em áreas onde se suspeita da ocorrência de transmissão da leishmaniose visceral é de fundamental importância para o controle e a profilaxia da doença, uma vez que permite identificar os principais focos, delimitando a extensão geográfica dos mesmos, e direcionar as medidas de intervenção sobre o reservatório canino, o vetor e o homem susceptível.

A exeqüibilidade destes inquéritos é dependente da disponibilidade de recursos humanos e financeiros e de uma metodologia válida para o diagnóstico da doença, de fácil aplicação e capaz de ser utilizada em maior escala. Apesar de suas elevadas especificidades, os métodos parasitológicos são inadequados para este fim, uma vez que são invasivos e dependem de grande experiência do observador, sendo de execução lenta. Além disso, indiscutivelmente deixam de apontar muitos casos com parasitismo discreto ou em fase de incubação (Brenner, 1957). Neste sentido, os métodos sorológicos são considerados de grande aplicabilidade. Entretanto, a tradicional utilização de amostras de soro acarreta aumento de custos com a logística dos inquéritos, inviabilizando-os na maioria das vezes. Assim, este trabalho buscou, dentre outros objetivos, validar os métodos sorológicos mais amplamente utilizados para o diagnóstico da LVC (ELISA e IFI) utilizando amostras de SDPF.

7.1. Validade da ELISA (ag. *L. major-like*), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI, em amostras de soro e eluato de SDPF, para o diagnóstico da LVC:

A validade de um teste diagnóstico pode ser descrita em termos do grau com que as amostras (ou os indivíduos) são corretamente categorizadas para a presença ou ausência de uma doença, parâmetro ou condição. Neste sentido, a IFI se mostrou a melhor das reações, uma vez que demonstrou grande capacidade de identificar corretamente os cães infectados e não infectados. Assim, este teste foi assumido como referência para validar as demais técnicas. Entretanto, uma vez que esta reação não é capaz de identificar corretamente todos os cães infectados ou não-infectados, a validade intrínseca dos métodos foi aferida através dos índices de co-positividade e co-negatividade (Buck & Gart, 1965), calculados em

relação à reação tomada como referência e sendo considerados índices representativos da sensibilidade e da especificidade, respectivamente.

Para as amostras de soros, a reação de ELISA utilizando antígeno bruto de *L. major-like* apresentou icp e icn baixos, indicando a necessidade de melhoria do antígeno, a fim se obter um teste mais sensível e específico. Barbosa-de-Deus *et al.* (2002), utilizando antígeno solúvel de *L. major-like*, da mesma cepa utilizada para a obtenção de nosso antígeno, encontrou uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 95% para o diagnóstico da LVC, sendo que o processo de obtenção do antígeno utilizado por estes autores consiste em romper as promastigotas por congelamento-descongelamento, sem o emprego da sonicação utilizada em nosso protocolo. A técnica utilizada por estes autores apresenta outras diferenças técnicas (diluição do conjugado, concentração do antígeno, etc) com a empregada neste estudo, podendo ser responsável pelas diferenças observadas. A reação de ELISA (Bio-Manguinhos) apresentou-se como um teste específico, apesar de também utilizar um antígeno bruto, o que reforça a necessidade de melhorias no processo de obtenção do antígeno de *L. major-like*. Entretanto, esta reação mostrou-se pouco sensível, o que revela uma inadequação para a triagem sorológica. Desta forma, este teste estaria subestimando a prevalência da infecção canina. Estes resultados vão de encontro ao observado por Lira *et al.* (2004), que ao avaliarem o desempenho dos kits de ELISA para LVC produzidos pela Bio-Manguinhos, observaram uma baixa sensibilidade (50%) e uma especificidade de 100%, preconizando a utilização destes kits para a confirmação de resultados positivos obtidos por testes de triagem. Entretanto, foi utilizada uma amostra de apenas 19 cães. Pelo contrário, Ferreira *et al.* (2004), em amostra de soros de 230 cães, conseguiram identificar um número maior de cães pela ELISA (Bio-Manguinhos) (144 cães (62,6%)) do que pela IFI (Bio-Manguinhos) (119 cães (51,7%)). A utilização de diferentes lotes destes kits por estes três estudos poderia explicar as diferenças encontradas.

Para amostras de eluato sanguíneo, de uma maneira geral, todas as reações testadas demonstraram icp e icn semelhantes ao observado pelas mesmas reações em soro. A reação de ELISA (Bio-Manguinhos) mostrou-se menos sensível em eluatos do que em soros, ao contrário do observado para a reação de ELISA (ag. *L. major-like*). Para esta última reação,

o acréscimo no icp observado em eluatos se deve ao fato de termos assumido um limiar de reatividade menor para eluatos.

Para a reação de IFI em eluatos, foram obtidos índices icp e icn insatisfatórios, quando se utiliza o limiar de reatividade de 1:40. Entretanto, ao assumirmos o título de 1:20 como limiar de reatividade, a reação apresentou um importante acréscimo no icp com uma pequena perda do icn, mostrando-se mais adequado para uma primeira triagem sorológica. Estratégia semelhante foi preconizada por Machado-Coelho *et al.* (1995) para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas humana, utilizando amostras de SDPF. No entanto, a despeito do elevado icp apresentado pela IFI com limiar de reatividade igual a 1:20, fica evidenciado a necessidade da busca de testes ainda mais sensíveis, a um custo que viabilize sua ampla utilização. Vale ressaltar que a IFI utilizada neste trabalho, produzida pela Bio-Manguinhos, apresentou os seguintes inconvenientes: (a) baixa aderência do antígeno na lâmina; (b) antígeno muito diluído, acarretando em um número inadequado de parasitas por campo; (c) variações no PH da glicerina tamponada, entre diferentes kits de um mesmo lote. Acreditamos que uma vez solucionados estes problemas de ordem técnica, a reação de IFI poderia vir a se constituir em um teste ainda mais sensível. De fato, Mancianti & Meciani (1988) relataram sensibilidade e especificidade iguais a 100% para a IFI, utilizando-se um antígeno de promastigotas de *L. infantum*. Badaró *et al.* (1983), trabalhando com uma reação de IFI utilizando promastigotas de *L. chagasi* como antígeno, relataram uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98%.

Os índices representativos de sensibilidade e especificidade são utilizados para a tomada de decisão sobre a escolha de um teste diagnóstico. Uma vez aplicado o teste, interessa-nos agora avaliar qual a probabilidade de doença dado que o resultado do teste é positivo, ou ainda, qual a probabilidade de não-doença dado que o resultado é negativo (Fletcher *et al.*, 1989). Para este fim, foram utilizados os valores preditivos positivos e negativos de um teste, que variam de acordo com a prevalência da doença. Para o cálculo destes valores, é preciso estimar a prevalência da população na qual este teste será aplicado. Magalhães *et al.* (1980), examinando 81162 cães provenientes do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, através da RFC, encontraram uma soroprevalência da doença canina de 8,4%, com

variações de 0,2% a 40,09%, dependendo da localidade. França-Silva *et al.* (2003), em inquérito canino realizado na cidade de Montes Claros, Minas Gerais, através do exame de 33937 cães pela IFI em eluatos de SDPF, encontraram uma prevalência para a LVC de 9,7%, variando de 0,7% a 46,7%, de acordo com a área pesquisada. Cabrera *et al.* (2003), em inquérito canino realizado em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, examinando amostras de soro de 365 cães pela IFI em soros, encontraram uma prevalência para a LVC de 25%. Cardoso *et al.* (2004), utilizando o DAT em soros e eluatos sanguíneos, encontraram para três zonas geográficas distintas da Vila de Alijo, Província de Alto Douro, Portugal, as respectivas prevalências de 2,5%, 11,4% e 49,9% para a LVC. A partir destes relatos, foram utilizadas as prevalências estimadas de 1%, 5%, 10%, 25% e 50% para o cálculo dos valores preditivos das reações.

A reação de ELISA (Bio-Manguinhos), em soros e eluatos, apresentou elevados vpn para as diferentes prevalências. Com relação aos vpp, seus valores foram considerados aceitáveis apenas em prevalências superiores a 10%. Para prevalências inferiores a esta, há uma baixa confiabilidade nos resultados positivos.

A reação de ELISA (ag. *L. major*-like) apresentou, em soros e eluatos, por sua vez, vpp ainda menores, com valores regulares somente em prevalências elevadas (50%). Portanto, este teste é virtualmente inútil para identificar corretamente os cães não-infectados em baixas prevalências, incorrendo em grande proporção de resultados falso-positivos. Com relação ao vpn, esta reação apresentou valores elevados somente em prevalências inferiores a 10%.

A reação de IFI em eluatos, mostrou-se útil em identificar corretamente os cães não-infectados em todas as prevalências estimadas, dados os elevados vpn, e apresentou baixos vpp em prevalências inferiores a 10%, com conseqüentemente baixa confiabilidade nos resultados positivos. Estes dados, em acordo com o elevado icp desta reação, habilitam-na enquanto teste de triagem sorológica.

Neste estudo, foram obtidas boas ou ótimas concordâncias entre os resultados obtidos com soros e eluatos para todas as reações, com exceção da ELISA para dosagem de IgG1. Estes dados apontam para a capacidade do eluato de SDPF em refletir os níveis de

anticorpos IgG totais e IgG2 em amostras de soros de cães infectados por *L. chagasi*. O mesmo não pode ser dito com relação aos anticorpos da subclasse IgG1, o que pode ser reflexo de uma incapacidade do papel de filtro em conservar os níveis desta imunoglobulina, bem como de uma baixa precisão da reação de ELISA padronizada para a dosagem de seus níveis.

Chin *et al.* (1966), trabalhando com amostras de soro e eluato sanguíneo de crianças portadoras de doença respiratória aguda, realizou a dosagem de imunoglobulinas específicas para diferentes viroses responsáveis por esta doença (adenovirus, influenza tipos A e B, dentre outros), através da RFC. A correlação de títulos entre soro e eluato de SDPF foi excelente, com variações quase sempre de apenas um título. Concluem os autores pelo grande valor da coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro, dada a concordância observada e a pequena quantidade de sangue requerida, permitindo a utilização de sangue capilar.

De acordo com Guimarães *et al.* (1983), dois fatores podem ser responsáveis pelas discordâncias entre soro e eluato de SDPF: a estimativa da diluição do eluato e a desnaturação das imunoglobulinas presentes no SDPF, ao longo do tempo.

Evengard *et al.* (1988) conseguiram estimar a diluição do eluato equivalente à diluição ótima do soro através da comparação dos valores das absorbâncias, obtidas na reação de ELISA, para imunoglobulinas específicos, em soro e eluato de SDPF (método empírico). Esta abordagem para padronização da eluição do SDPF é potencialmente menos sujeita a erros, uma vez que acessa diretamente a diluição do eluato para a população utilizada, sem a necessidade de estabelecer um valor teórico para o hematócrito (Alvarez *et al.*, 1971), já que ele pode variar entre diferentes populações.

Com relação à desnaturação das imunoglobulinas presentes no papel de filtro, considera-se que a temperatura e a umidade exercem um efeito degradante sobre os anticorpos (Marinkelle *et al.*, 1978).

Machado-Coelho *et al.* (1995) ao realizarem um ensaio de reprodutibilidade dos níveis de anticorpos específicos para *T. cruzi* em humanos, em diferentes papéis de filtro (Melita[®], Klabi[®] e Whatman[®]), mantidos sob refrigeração a 4°C e sem qualquer controle

da umidade, observaram uma queda significativa dos títulos de anticorpos até o 7^o D.A.C., sendo mais pronunciada em amostras de títulos elevados. Por outro lado, estes autores encontraram excelentes índices de validade para as técnicas de IFI, ELISA e HAI em eluatos sanguíneos, além de encontrarem boa correlação de títulos entre amostras pareadas de soro e eluato.

Bahia *et al.* (1995), empregando as reações de IFI, ELISA e dot-ELISA para a dosagem de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos, mantendo as amostras de SDPF protegidas de umidade pela utilização de sílica-gel, observaram a manutenção dos níveis de anticorpos por todo o período testado (45 dias), mesmo para as amostras mantidas a temperatura ambiente. Além disso foram obtidas excelentes concordâncias entre soro e papel de filtro, variando entre 97 a 100%, além dos elevados icp e icn para todas as reações utilizadas. Estes dados permitem concluir pela validade das reações sorológicas utilizadas, em amostras de eluato sanguíneo, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina.

Gomes *et al.* (2001), ao compararem a ELISA, em soro e eluato, para o imunodiagnóstico da LVC, encontraram uma boa correlação entre os resultados ($r = 0,8690$; $p \leq 0,0001$), demonstrando a viabilidade da utilização do papel de filtro para coleta de amostras sanguíneas em condições de campo. Do mesmo modo, Cardoso *et al.* (2004), encontraram boa correlação ($k = 0,83$) entre os resultados obtidos com soro e eluato sanguíneo pelo DAT para o diagnóstico da LVC.

Por outro lado, Kagan (1972), avaliando a HAI para o diagnóstico soropidemiológico da malária, verificou maior sensibilidade em soros (93,9%) do que em eluatos (82,6%), destacando a maior ocorrência de resultados falso-negativos pelo papel de filtro. Evans *et al.* (1990), utilizando a IFI para o diagnóstico sorológico da LVC verificaram falta de concordância entre soro e eluato. Para uma amostra de 405 cães, foram observados resultados positivos no soro de 69 (17%) animais e no eluato de 33 (8,1%). Braga *et al.* (1998) incriminaram a baixa sensibilidade da IFI em eluatos como um dos fatores responsáveis pela permanência de cães infectados no campo e pela manutenção da transmissão da LV.

Baseados nestes resultados controversos com relação à sensibilidade dos testes sorológicos para LVC utilizando amostras de SDPF, o Ministério da Saúde tem recomendado a utilização de amostras de soro em inquéritos caninos. Entretanto, com relação à normatização técnica, em seu Manual de Controle da Leishmaniose Visceral (MS, 2003), não oferece qualquer referência à utilização do papel de filtro como método de coleta, limitando-se à recomendação do uso do soro. Acreditamos que a baixa sensibilidade para reações em eluato observada pelos autores citados seja fruto de problemas na padronização da eluição e de condições inadequadas de colheita e armazenamento das amostras de SDPF. A coleta de amostras sanguíneas em papel de filtro se constitui em uma alternativa à coleta de sangue por punção venosa, com grandes vantagens: necessita de volume reduzido de material sanguíneo – capilar; as amostras podem ser obtidas por punção dérmica, em lóbulo de orelha, polpa digital ou calcanhar, sendo um procedimento menos invasivo que a coleta de sangue venoso e apresentando melhor aceitação pela população em geral; é de mais simples execução; elimina a necessidade de separação do soro; elimina a exigência de agulhas, seringas, tubos de vidro, centrífuga, caixas térmicas; diminui os custos com transporte, que pode ser realizado por via postal comum; diminui a ocorrência de perdas, com quebra de tubos; reduz os custos com armazenamento de amostras (Mathews, 1981; Guimarães, 1983). Portanto, proporciona uma otimização da logística, sendo capaz de viabilizar a realização de inquéritos soropidemiológicos de grande escala.

A concordância entre os resultados obtidos com o uso do soro e do papel de filtro, observada em nosso estudo, em acordo com vários autores já citados, nos habilita a discordar das normas do Ministério da saúde. As condições ideais de armazenamento, com refrigeração das amostras de SDPF a 4°C, na presença de agente dessecante, além da padronização da eluição por um método menos sujeito a erros (conforme descrito por Evengard *et al.*, 1988), podem explicar os resultados por nós obtidos. Conhecendo-se as condições de conservação das amostras de SDPF, deve-se procurar a aplicação universal destas condições ideais. A existência de limitações e cuidados a serem tomados no armazenamento das amostras de papel de filtro não justifica a abolição deste método. Ao

contrário, devem ser consideradas na normatização da rotina laboratorial, seja nos procedimentos operacionais padrão das reações, seja nos critérios para rejeição de amostras.

Através do estudo da especificidade das reações em amostras de soro e eluato sanguíneo, obtidas de animais infectados pelo *T. cruzi*, foram observados testes cruzados em todas as reações, sempre em títulos baixos, inferiores a 1:80. Estes testes ocorreram mais freqüentemente na reação de ELISA (ag. *L. major-like*). Este fato pode ser facilmente justificado pelo antígeno utilizado na reação, que por utilizar antígeno solúvel, apresenta maior probabilidade de reações cruzada com soros de animais infectados com outros tripanossomatídeos, já que há grande complexidade antigênica entre eles, que compartilham vários epitopos comuns (Badaró *et al.*, 1986). Apesar de também utilizar este mesmo tipo de antígeno, a reação de ELISA (Bio-Manguinhos) apresentou testes cruzados em apenas uma amostra de soro e em nenhuma amostra de eluato sanguíneo. Este dado vem a reforçar a necessidade de melhorias no processo de obtenção do antígeno bruto obtido de promastigotas de *L. major-like*.

A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, em substituição aos antígenos brutos tem se revelado como uma estratégia para a obtenção de testes mais específicos. Borja-cabrera *et al.* (1999), testaram uma reação de ELISA utilizando o antígeno purificado FML, alcançando valores de sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Badaró *et al.* (1996), utilizando uma ELISA com antígeno recombinante rK39 para o imunodiagnóstico da LV humana e canina, encontraram elevadas sensibilidades (98% e 99%, respectivamente), além de elevada especificidade (100%). Entretanto, foram observados valores mais elevados para as absorbâncias nas amostras provenientes de indivíduos com doença ativa em comparação com as absorbâncias encontradas nos indivíduos assintomáticos. Genaro *et al.* (1997), utilizando uma amostra de 306 cães provenientes de área endêmica para LV, realizaram a pesquisa de anticorpos séricos pelo TRALd, utilizando o antígeno rK39. Estes autores encontraram um índice de co-positividade de 92,2% e de co-negatividade de 99,5%, utilizando-se como referência os resultados obtidos pela IFI. Apesar do ganho com a especificidade, este antígeno

mostra-se incapaz de identificar todo o espectro de indivíduos infectados, possuindo baixa sensibilidade para a detecção dos indivíduos com infecção assintomática por *L. chagasi* (Ferreira & Ávila, 2001). Portanto, o grande desafio atual é conseguir um teste específico e capaz de identificar todo o espectro da doença, sem prejuízo da sensibilidade.

Com relação à IFI, houve a ocorrência de reações cruzadas em duas amostras, quando se considerou como positivos resultados iguais ou superiores a 1:40. Com a utilização de um limiar de reatividade inferior (1:20), ocorreu reação cruzada em três amostras de eluato sanguíneo. Estas observações vão de encontro a autores como, Shaw & Voller (1964), Camargo, (1966), Araújo & Mayrink (1968) e Costa *et al.* (1991), que revelaram freqüentes reações cruzadas com *T. cruzi*. Portanto, os inquéritos caninos poderiam superestimar o número de cães infectados por *L. chagasi*, justificando assim a busca de testes mais específicos, uma vez que existem áreas de sobreposição da doença de Chagas e da LV (Costa *et al.*, 1991; Corredor-Arjona *et al.*, 1999). Contudo, a utilização de testes não tão específicos poderia levar ao sacrifício tanto de cães infectados com *L. chagasi* quanto os infectados por *T. cruzi*, o que constituiria uma medida de controle para as duas endemias (Costa *et al.*, 1991).

7.2. Reprodutibilidade da ELISA (ag. *L. major-like*), ELISA (Bio-Manguinhos) e IFI em eluatos de SDPF em função do tempo decorrido após a coleta:

A reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de imunoglobulinas específicas presentes nas amostras de SDPF, avaliada por regressão linear, demonstrou a manutenção destes níveis por até 30 D.A.C. pela reação de IFI para todos os grupos – negativos, títulos baixos, títulos médios e títulos elevados. A partir dos 30 D.A.C., houve queda significativa de títulos para três grupos – títulos baixos, títulos médios e títulos elevados – com manutenção dos níveis para o grupo dos negativos. Conseqüentemente, houve a negatização de algumas amostras de título baixo (4,2% do total de amostras).

Com relação à reação de ELISA IgG (Bio-Manguinhos), foi demonstrada a manutenção dos níveis de anticorpos até os 60 D.A.C., para todos os grupos – negativos,

títulos baixos, títulos médios e títulos elevados. Da mesma forma, foi observada para a reação de ELISA (ag. *L. major-like*) a manutenção dos níveis de anticorpos até os 60 D.A.C. para todos os quatro grupos. Estes dados evidenciam a capacidade do papel de filtro Whatman nº 4 de manter estáveis os níveis de anticorpos da classe IgG por até 30 dias pela IFI e por até 60 dias pelas reações de ELISA, desde que armazenados sob refrigeração, a 4°C, na presença de agente dessecante (sílica-gel). O tempo de manutenção dos níveis de anticorpos superior pelas reações de ELISA pode ser explicado pela maior sensibilidade analítica desta reação, dada sua capacidade de discriminar títulos mínimos de anticorpos específicos.

Ao contrário do observado neste estudo, Machado-Coelho *et al.* (1995), avaliando os níveis de anticorpos específicos para *T. cruzi* em humanos, em amostras de SDPF, através das reações de IFI, ELISA e HAI, observaram uma queda significativa dos títulos de anticorpos até o 7^º D.A.C., sendo mais pronunciada em amostras de títulos elevados. Acreditamos que as condições de armazenamento das amostras possam ser responsabilizadas por estas diferenças, uma vez que foram mantidas sem qualquer controle da umidade.

Bahia *et al.* (1995), empregando as reações de IFI, ELISA e dot-ELISA para a dosagem de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos, mantendo as amostras de SDPF protegidas de umidade pela utilização de sílica-gel, observaram a manutenção dos níveis de anticorpos por todo o período testado (45 dias), mesmo para as amostras mantidas a temperatura ambiente. Portanto, pode ser obtida boa reprodutibilidade das reações sorológicas em amostras colhidas em papel de filtro, desde que observada as condições adequadas de conservação destas amostras.

A avaliação da reprodutibilidade dos anticorpos dos subgrupos IgG1 e IgG2 revelou a manutenção dos níveis de ambas as imunoglobulinas também por até 60 D.A.C. para todos os grupos, com exceção do grupo dos títulos elevados que apresentaram queda significativa de títulos de anticorpos IgG1 e aumento significativo de títulos de anticorpos IgG2. Entretanto, por se tratar de amostras com títulos elevados, em ambos os casos, estas alterações de títulos não apresentam valor prático, uma vez que não acarretam negativação

de amostras. A queda de títulos pode ser facilmente explicada por uma desnaturação de anticorpos presentes nos papéis de filtro. Entretanto, para o segundo caso, acreditamos que o aumento dos níveis de anticorpos possa estar relacionado com uma imprecisão desta técnica para dosagem de anticorpos do subgrupo IgG2.

7.3. Reprodutibilidade intratestes e intertestes de resultados:

A concordância de resultados dentro de um mesmo laboratório se constitui em uma medida da precisão, avaliando a capacidade das reações de fornecerem o mesmo resultado para uma dada amostra. Por sua vez, a concordância de resultados entre diferentes laboratórios se constitui em parâmetro da grande importância na validação de testes diagnósticos de ampla utilização, como é o caso dos inquéritos caninos de maior amplitude, já que, em grande parte dos casos, se faz necessária a formação de uma rede de laboratórios e a criação de um laboratório de referência, a fim de executar o treinamento de pessoal e de realizar o controle de qualidade externo dos laboratórios. Portanto, a reprodutibilidade intratestes e intertestes de resultados são ferramentas, respectivamente, para o controle de qualidade interno e externo das reações, atestando assim a qualidade na execução dos ensaios e, como destacado anteriormente, avaliando a precisão destas reações.

Na avaliação da reprodutibilidade intratestes de resultados, não foram observadas diferenças significativas entre as médias para todas as três reações ensaiadas, em soros e eluatos, e em todos os momentos testados (1, 15, 30 e 60 D.A.C.), com exceção da reação de ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*) em eluatos no 30º D.A.C.. Apesar desta discordância isolada, estes dados validam os resultados, fornecendo uma avaliação positiva do controle interno dos ensaios.

A avaliação da reprodutibilidade intertestes de resultados, ou seja, a concordância entre dois laboratórios, efetuada através do índice de Kappa, destacou boas e ótimas concordâncias em todas as reações, em soros e eluatos, e nos diferentes momentos após a coleta, com exceção da IFI em eluatos nos 30º e 60º D.A.C., onde a concordância foi classificada como sofrível e fraca, respectivamente. O armazenamento não pôde ser

responsabilizado por tais achados, uma vez que, para cada amostra, os picotes eram armazenados em pequenos sacos plásticos selados e individuais contendo sílica-gel em quantidade suficiente para o controle da umidade e que, após o recebimento, as amostras eram prontamente colocadas sob refrigeração à 4°C. Desta forma, não nos foi possível identificar a causa exata para a queda abrupta de títulos observada pelo laboratório de referência para a reação de IFI.

Autores como Prata *et al.* (1975) e Camargo *et al.* (1987), trabalhando com a Doença de Chagas, relataram baixa reprodutibilidade interteste de resultados, com a frequente ocorrência de discordâncias entre laboratórios. Boelaert *et al.* (1999), em um estudo multicêntrico para avaliação da reprodutibilidade do DAT para o diagnóstico da LV em humanos, encontraram resultados discordantes entre diferentes laboratórios. Estes autores incriminaram alterações na temperatura de conservação dos antígenos e a falta de padronização de leitura entre os laboratoristas dos diferentes laboratórios como as possíveis explicações para as discordâncias. Neste estudo, o protocolo de análises e o armazenamento das amostras foram padronizados através de um procedimento operacional padrão utilizado nos dois laboratórios. Com relação à leitura, participamos de um treinamento para o diagnóstico sorológico da LVC, realizado no laboratório de referência, antes de iniciarmos as análises. Ademais, as discordâncias observadas para a IFI após os 30 D.A.C. não se referem somente a diferenças de títulos, mas sim a negatificação de várias amostras na IFI executada no laboratório referência. Portanto, a despeito da subjetividade de leitura da IFI entre observadores diferentes, outros fatores de ordem técnica devem estar envolvidos, já que os kits de IFI produzidos pela Bio-Manguinhos apresentavam alguns problemas técnicos, citados anteriormente, capazes de comprometer o seu desempenho. Além disso, a manutenção dos níveis de anticorpos pela reação de ELISA (Bio-Manguinhos) por todo o período testado (60 dias) pelos dois laboratórios sugere a existência de problemas restritos à reação de IFI, se bem que a primeira apresenta maior capacidade discriminatória de títulos mínimos de anticorpos específicos. Machado *et al.* (2004), ao compararem os resultados entre oito laboratórios para o diagnóstico sorológico da LVC, utilizando as reações de IFI e ELISA, demonstrou um alto grau de concordância entre resultados positivos e negativos

para LVC. Portanto, é necessário executar nova avaliação da concordância entre diferentes laboratórios, utilizando um novo lote dos kits de IFI produzidos pela Bio-Manguinhos, livres dos inconvenientes técnicos ressaltados.

7.4. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 em relação à classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi*:

Os métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico da LVC se fundamentam na pesquisa de anticorpos IgG. São considerados métodos de escolha para a pesquisa de animais infectados em uma grande amostra de cães, uma vez que a infecção por *L. chagasi* determina nos animais infectados uma expansão policlonal de linfócitos B, traduzida por elevados níveis de anticorpos IgG e IgM (Tanner, 1996), justificando a grande confiabilidade atribuída a estes métodos. Ademais, os métodos sorológicos são capazes de revelar a infecção mesmo em cães assintomáticos ou mesmo em casos com parasitismo discreto. Soma-se a estas vantagens o relativo baixo custo envolvido em sua aplicação, constituindo metodologia menos invasiva, sem riscos para o animal e de maior aceitação pelos proprietários. Portanto, o diagnóstico sorológico tem sido amplamente aplicado em humanos e em cães.

Recentemente, foi desenvolvida uma vacina utilizando FML obtida a partir de uma cepa de *L. donovani*, capaz de ocasionar forte resposta humoral, levando à soroconversão de 97% dos animais vacinados (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). A introdução desta vacina no mercado (Leishmune[®]), ocasionou um grave problema de saúde pública, uma vez que os testes sorológicos disponíveis são incapazes de diferenciar os animais vacinados de animais infectados. Portanto, é importante a busca de outros marcadores sorológicos.

Assim, os anticorpos IgG das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, potenciais marcadores de patogenicidade dos animais infectados, surgiram como uma possível alternativa para a discriminação de animais infectados de animais vacinados. Deplazes *et al.* (1995) conseguiram relacionar os níveis de imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 com as formas clínicas apresentadas pelos cães infectados por *L. chagasi*. Segundo estes

autores, foram encontrados altos níveis de ambas as imunoglobulinas para os cães sintomáticos e níveis elevados somente de IgG2 para os assintomáticos. Outros autores ainda estabeleceram diferenciação entre animais infectados – com altos níveis de IgG1 – e animais vacinados – com níveis elevados de IgG2 (Mendes *et al.*, 2003). Ao contrário destas observações, Quinnell *et al.* (2003) não conseguiram estabelecer uma correlação entre as formas clínicas da doença canina e os níveis de imunoglobulinas das subclasses de IgG. Estes autores observaram a presença de níveis detectáveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, indistintamente, em todas as formas clínicas, com níveis de IgG2 inferiores ao das demais imunoglobulinas.

Em acordo com estes autores, os resultados deste estudo apontam para a ausência de uma correlação entre os níveis de IgG1 e IgG2 com as formas clínicas apresentadas pelos cães infectados, uma vez que estas imunoglobulinas foram detectadas indistintamente para os grupos dos assintomáticos, dos oligossintomáticos e dos polissintomáticos. Além do mais, a representação gráfica dos níveis de anticorpos específicos nos diferentes grupos de animais, para as reações de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos), ELISA IgG (ag. *L. major-like*), ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*) e ELISA IgG2 (ag. *L. major-like*), sinalizou para a ausência de correlação nítida entre forma clínica e níveis de anticorpos. Em concordância com estes resultados, Abranches *et al.* (1991) não conseguiram estabelecer relação entre sintomatologia dos cães e níveis de anticorpos IgG. Reis (2001) observou títulos maiores de anticorpos IgG em cães polissintomáticos, apesar de, através destes níveis, não conseguir diferenciar o grupo dos assintomáticos do grupo dos oligossintomáticos. Neste estudo, foi observado também que muitos cães positivos para IgG pela reação de ELISA, apresentaram-se negativos para a pesquisa de IgG1. Os resultados sugerem uma inadequação de IgG1 e IgG2 enquanto marcadores de infecção ativa por *L. chagasi*.

7.5. Desenho e limitações do estudo:

Para minimizar a ocorrência de viés do observador, os testes laboratoriais foram realizados de forma totalmente mascarada, através da codificação das amostras com

números aleatórios, obtidos no programa EPI-INFO. Além disso, foi realizado o controle interno das reações a partir das réplicas, e o controle externo pelo envio de alíquotas de aproximadamente 10% das amostras para o laboratório de referência.

Para compor o grupo dos não-infectados, foram utilizados animais nascidos e criados no canil da UFOP (área não endêmica). Portanto, a possibilidade de infecção por *L. chagasi* nestes animais pode ser seguramente excluída. Com relação ao grupo de animais infectados, foram incluídos cães com sorologia positiva por IFI e ELISA e provenientes de região endêmica para a LV (Belo Horizonte – MG). Assim, a despeito da positividade pela ELISA e pela IFI – que constitui a técnica considerada como referência para o diagnóstico sorológico desta doença – quase sempre em títulos médios ou elevados, é possível a presença, neste grupo, de animais não portadores da infecção (viés de classificação). A utilização destes critérios para definir infecção deve-se à impossibilidade de termos efetuado a confirmação parasitológica destes animais, pois o encaminhamento dos cães pelas carrocinhas era finalizado à tarde e, pelo regulamento vigente no CCZ, o sacrifício dos cães soropositivos para LVC deve ser realizado no mesmo dia do recebimento dos animais.

O número de cães utilizado foi obtido de acordo com o Manual de Determinação de Amostra (WHO, 1990), a fim de minimizar a ocorrência de variações aleatórias, devidas ao acaso. A amostra total foi subdividida em cinco grupos: infectados experimentalmente por *T. cruzi*, não-infectados por *L. chagasi* e outros três grupos, formados por animais infectados por *L. chagasi*: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Para garantir a comparabilidade dos resultados obtidos entre os grupos, foram selecionados, para cada um deles, o mesmo número de animais, a partir de uma amostra maior de cães do CCZ. Entretanto, a composição da população de cães pode diferir, com maior ou menor percentual de um determinado grupo. Portanto, a ocorrência de viés de representatividade não pode ser excluída.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. A reação de IFI em soros, utilizando o título de 1:40 como limiar de reatividade, é capaz de identificar corretamente a grande maioria dos casos verdadeiramente positivos e negativos, justificando sua utilização como teste de referência.
2. As reações de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA IgG (ag. *L. major-like*) em eluatos de SDPF constituem técnicas válidas para o diagnóstico sorológico da LVC.
3. A reação de ELISA (Bio-Manguinhos) é inadequada para triagem sorológica.
4. O antígeno obtido de promastigotas de *L. major-like* (MHOM/BR/71/BH121) apresenta elevada frequência de reações cruzadas com *T. cruzi* (8/10 em soros e 6/10 em eluatos).
5. Reações inespecíficas com amostras de cães infectados por *T. cruzi* ocorrem nos testes de IFI 1:40 (2/10 para soro e eluato), IFI 1:20 (5/10 em soros e 3/10 em eluatos) e ELISA Bio-Manguinhos (1/10 em soros).
6. Há ótimas e boas concordâncias entre os resultados obtidos em soros e em eluatos de SDPF, para as reações de IFI, ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA IgG (ag. *L. major-like*).

7. As imunoglobulinas específicas da classe IgG, presentes nas amostras de SDPF, armazenadas a 4°C na presença de sílica-gel, permanecem estáveis por até 30 D.A.C. pela reação de IFI e por até 60 D.A.C. pelas reações de ELISA (Bio-Manguinhos) e ELISA (ag. *L. major-like*).
8. As imunoglobulinas específicas das subclasses IgG1 e IgG2, presentes nas amostras de SDPF, armazenadas a 4°C na presença de sílica-gel, permanecem estáveis por até 60 D.A.C. pela reação de ELISA (ag. *L. major-like*).
9. Não há correlação entre os níveis das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 com a classificação clínica dos cães infectados por *L. chagasi*.
10. A reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para detecção de anticorpos da subclasse IgG1 não apresenta boa concordância entre soros e eluatos de SDPF.
11. A reação de ELISA (ag. *L. major-like*) para detecção de anticorpos da subclasse IgG2 apresenta boa concordância entre soros e eluatos de SDPF.
12. A concordância entre os diferentes laboratórios varia de boa a ótima, com exceção dos resultados da IFI em eluatos no 30^o e 60^o D.A.C..

9. RECOMENDAÇÕES

A revisão bibliográfica e os resultados deste estudo possibilitam a formulação das seguintes recomendações:

(1) São necessárias alterações de ordem técnica no kit de IFI LVC, produzido pela Bio-Manguinhos a fim de eliminar os seguintes inconvenientes: (a) baixa aderência do antígeno na lâmina; (b) antígeno muito diluído, ocasionando um número inadequado de parasitas por campo; (c) variações no PH da glicerina tamponada, entre diferentes kits de um mesmo lote.

(2) Os inquéritos sorológicos caninos deveriam ser executados de acordo com a seguinte metodologia: (a) as amostras de SDPF seriam armazenadas em pequenos sacos plásticos selados e individuais contendo sílica-gel, sendo que as amostras a serem processadas em um mesmo dia seriam colocadas em um envelope e mantidas sob refrigeração à 4°C; (b) o tempo máximo de armazenamento seria de 30 dias para amostras a serem ensaiadas pela IFI e de 60 dias para as ensaiadas pela ELISA; (c) as amostras colhidas em papel de filtro seriam submetidas à triagem sorológica pela reação de IFI, utilizando-se a diluição de 1:20; (d) as amostras de SDPF com resultados positivos pela triagem seriam tituladas pela reação de IFI, considerando-se como reagentes os resultados maiores ou iguais a 1:40; (e) para os casos em que, pela titulação do eluato sanguíneo, fossem obtidos resultados iguais a 1:20, seriam solicitadas amostras de soro para confirmação. Portanto, os levantamentos seriam utilizados em duas etapas, a fim de minimizar a ocorrência de resultados falso-negativos, sem aumentar de forma significativa os custos envolvidos.

10. ANEXOS

Ficha clínica do cão

Nome:

Nº registro:

Procedência:

Sorologia:

Laboratório:

Data:

Veterinário:

Clínica	0	1	2	3
Alopecia				
Ulceração/Descamação Cutânea				
Conjuntivite				
Linfadenopatia				
Onicogrifose				
Edema das patas				
Paresia das patas posteriores				
Emagrecimento				

Figura 1: Ficha para avaliação clínica dos cães.

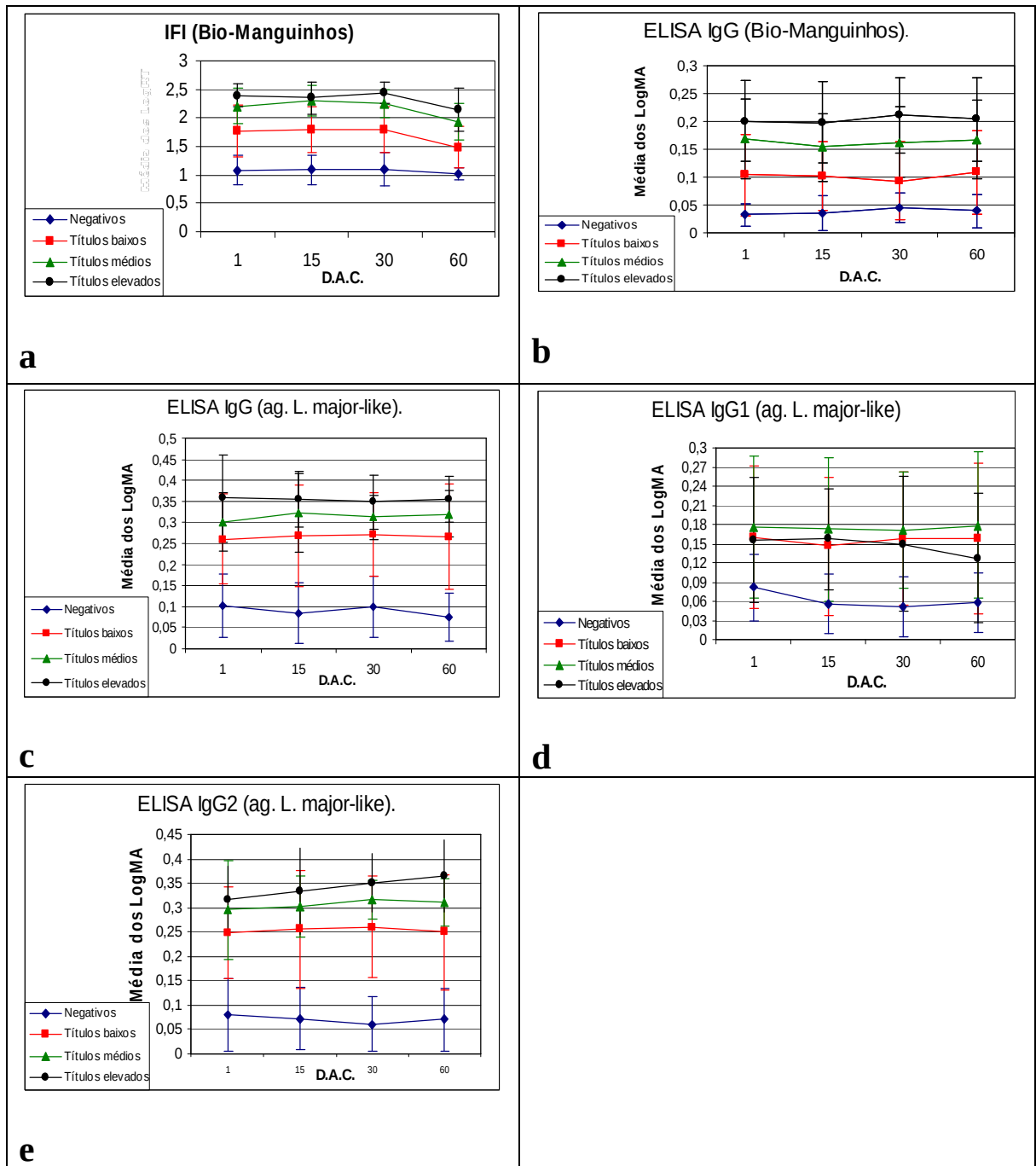


Figura 2: Reprodutibilidade ao longo do tempo dos níveis de anticorpos anti-*L. chagasi* em eluato de sangue dessecado em papel de filtro, detectados pelas reações de IFI (Bio-Manguinhos) (a), ELISA (Bio-Manguinhos) (b), ELISA IgG (ag. *L. major-like*) (c), ELISA IgG1 (ag. *L. major-like*) (d) e ELISA IgG2 (ag. *L. major-like*) (e).

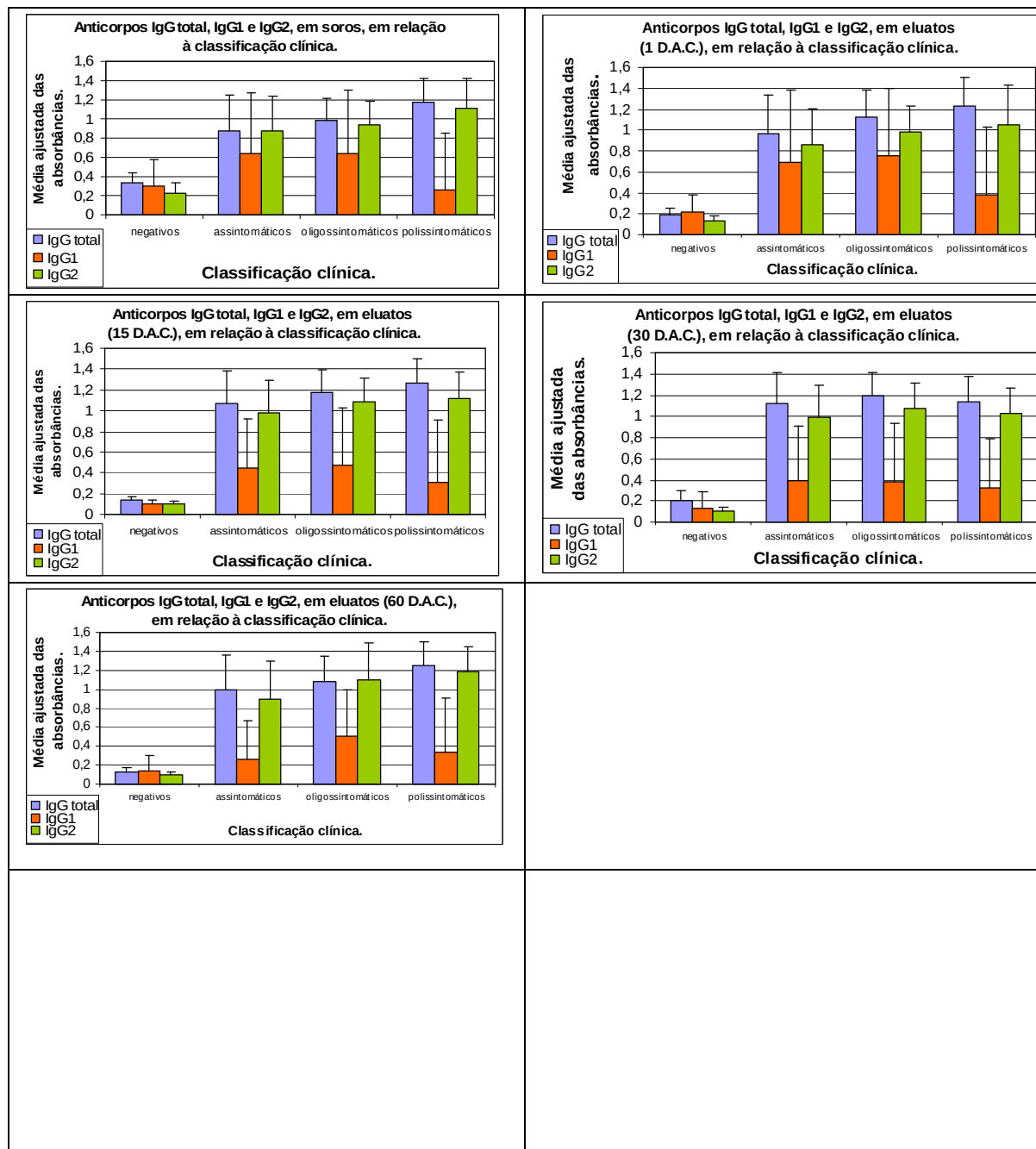


Figura 3: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média ajustada das absorvâncias, em soros e eluatos, em quatro momentos após a coleta, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Com a finalidade de eliminar os efeitos das variações entre as leituras de placas de ELISA diferentes, todas as absorvâncias sofreram ajuste pela variação da absorvância dos controles positivos.

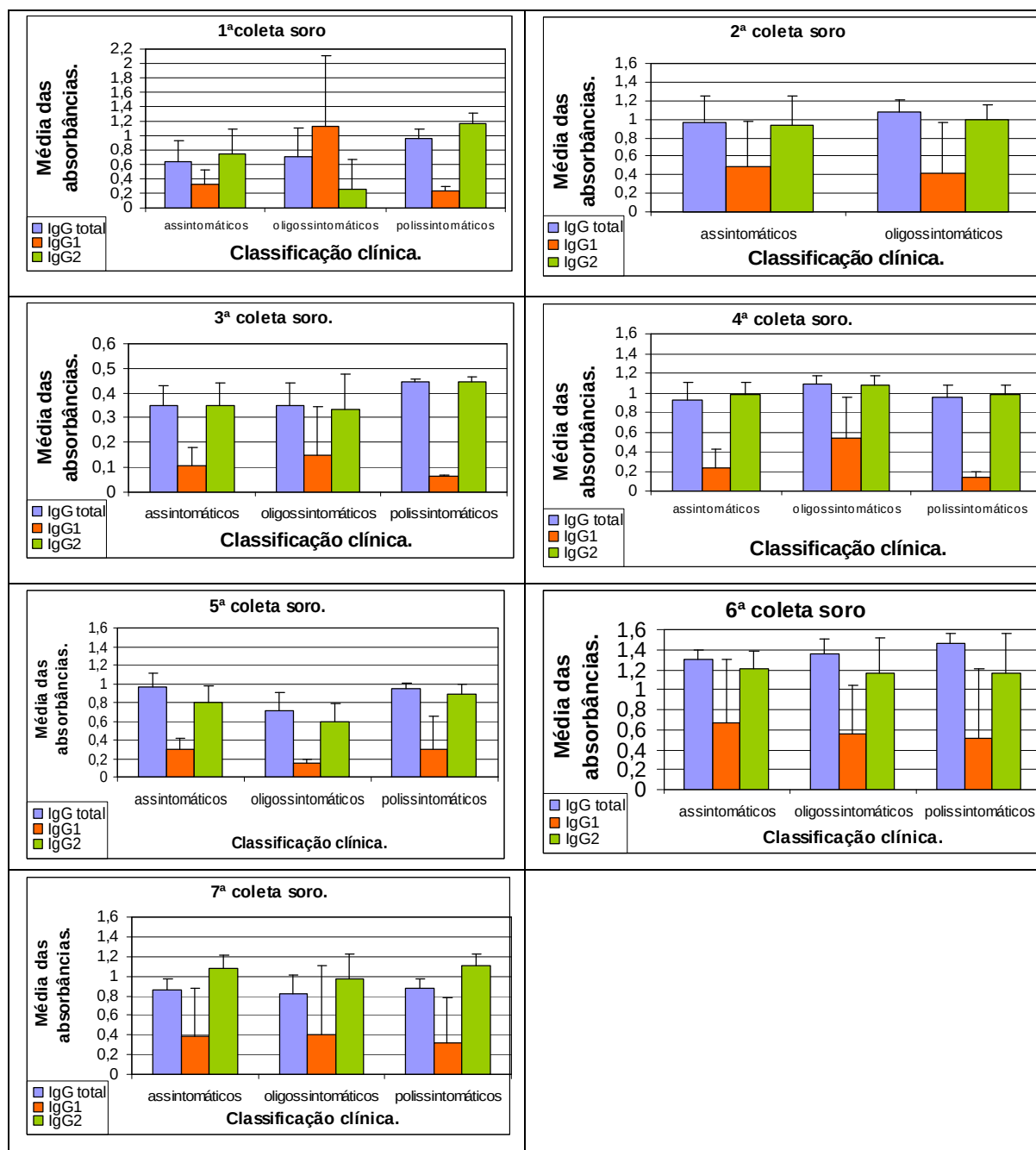


Figura 4: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em soros, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

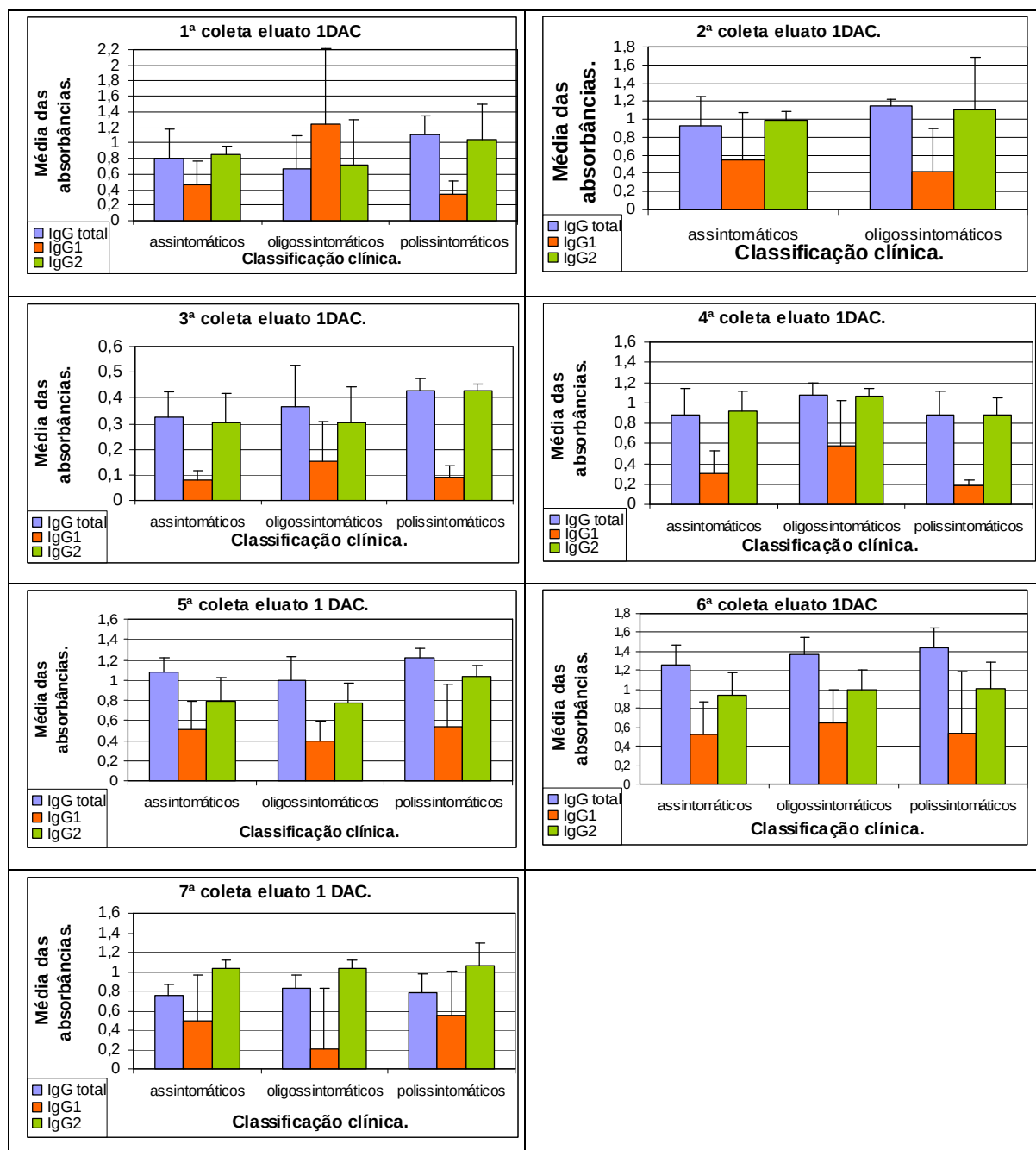


Figura 5: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, em eluatos no 1º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

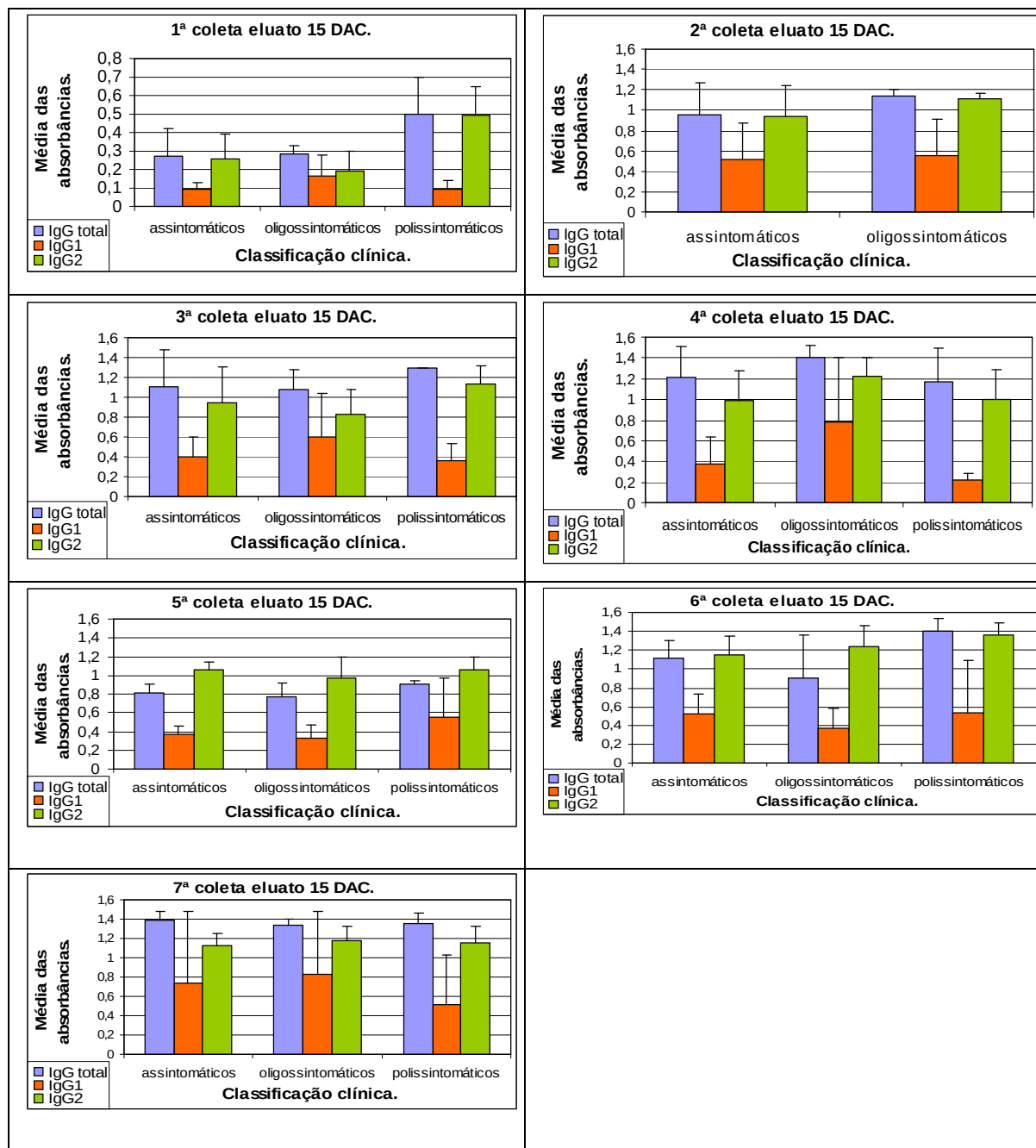


Figura 6: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, em eluatos no 15º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

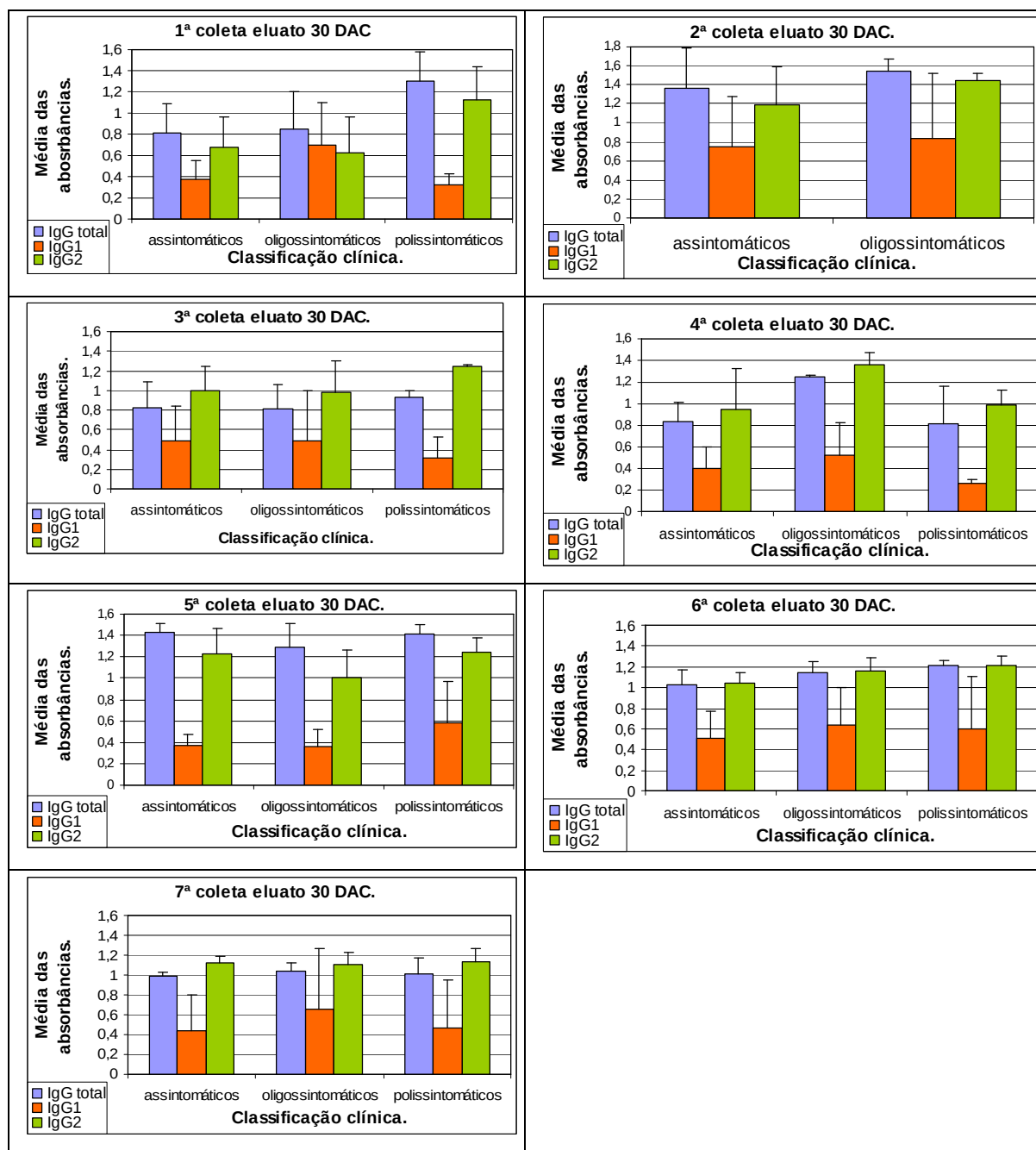


Figura 7: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, em eluatos no 30º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

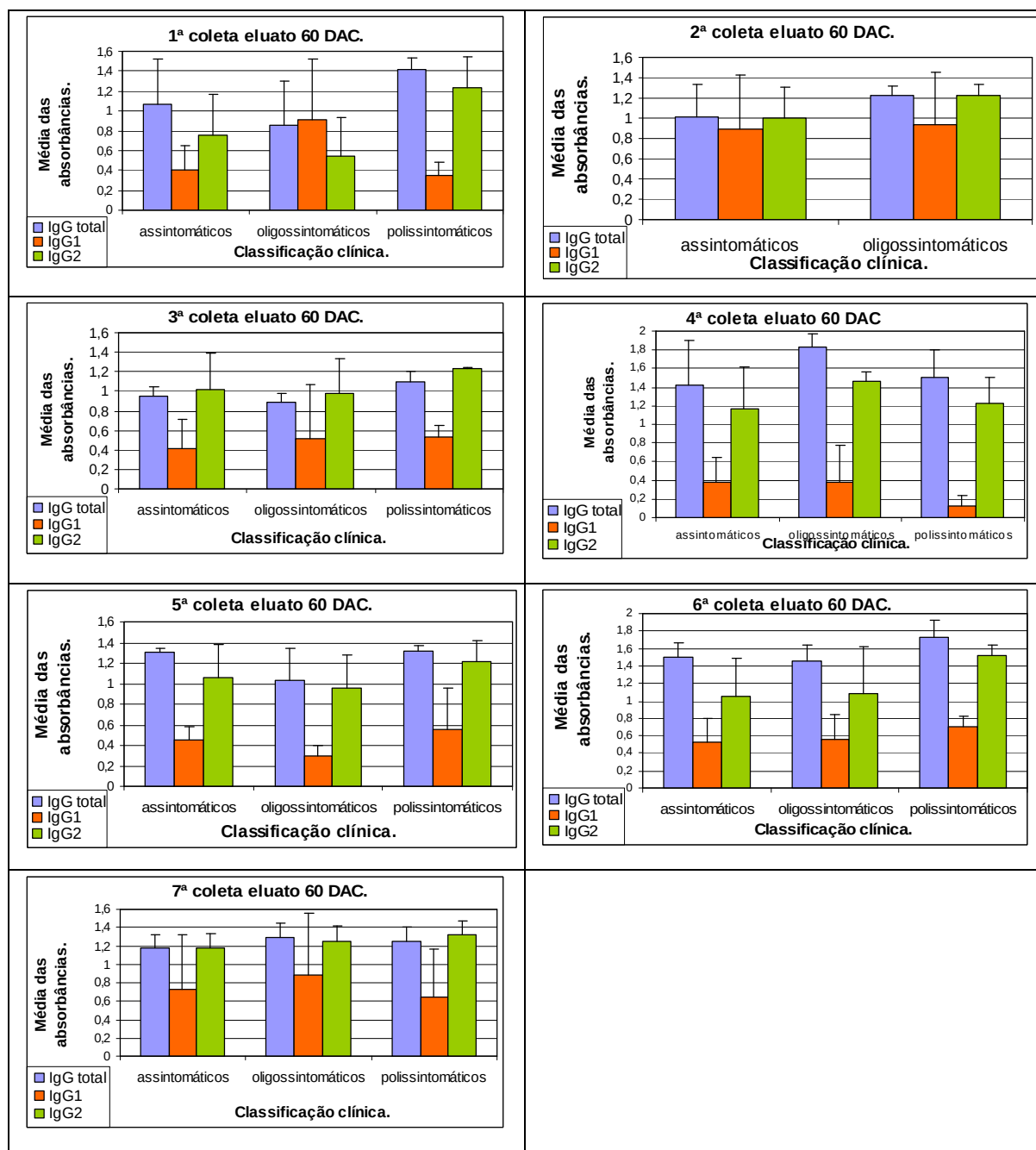


Figura 8: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, em eluatos no 60º D.A.C., para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada coleta. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

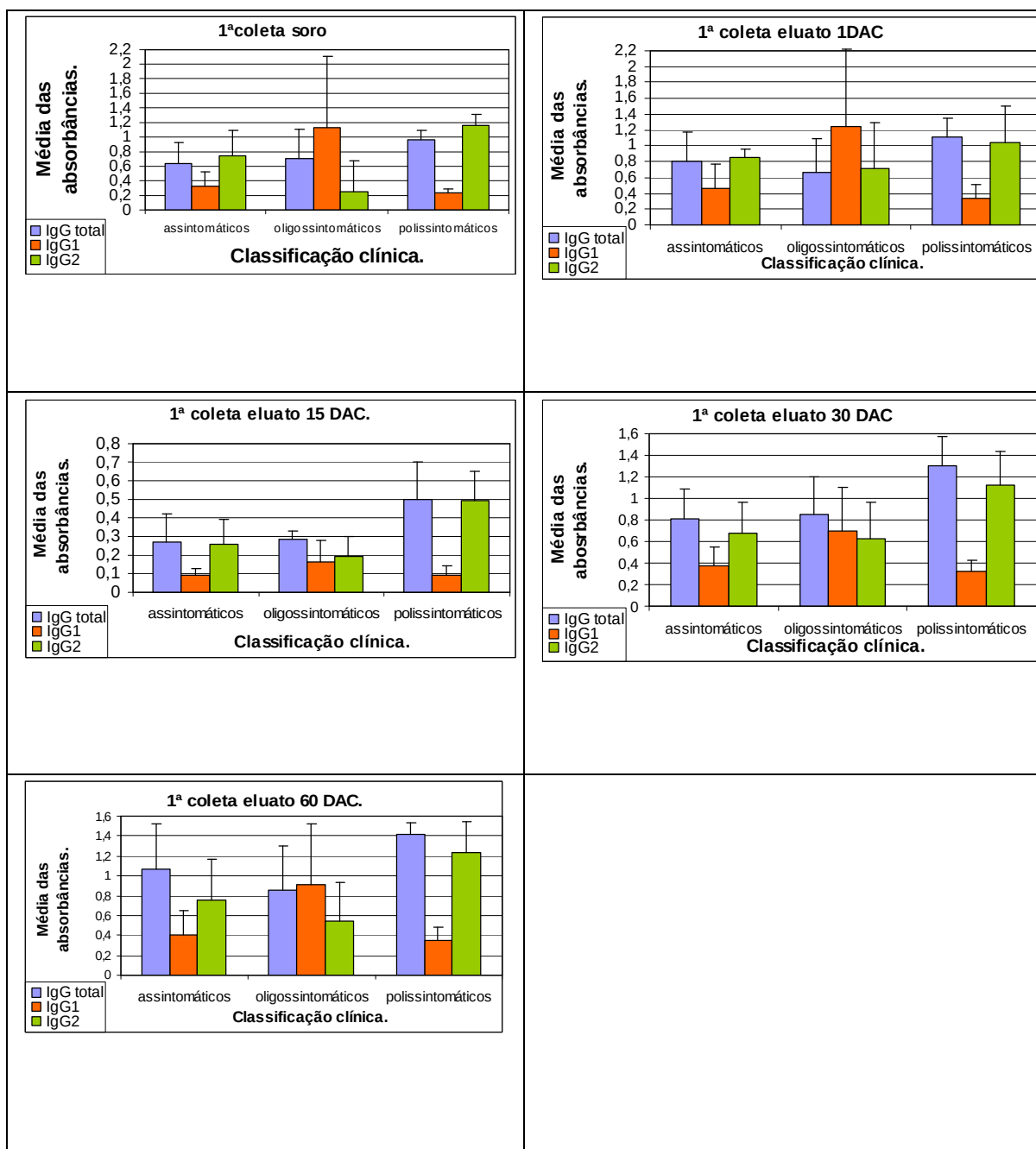


Figura 9: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, para a 1ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

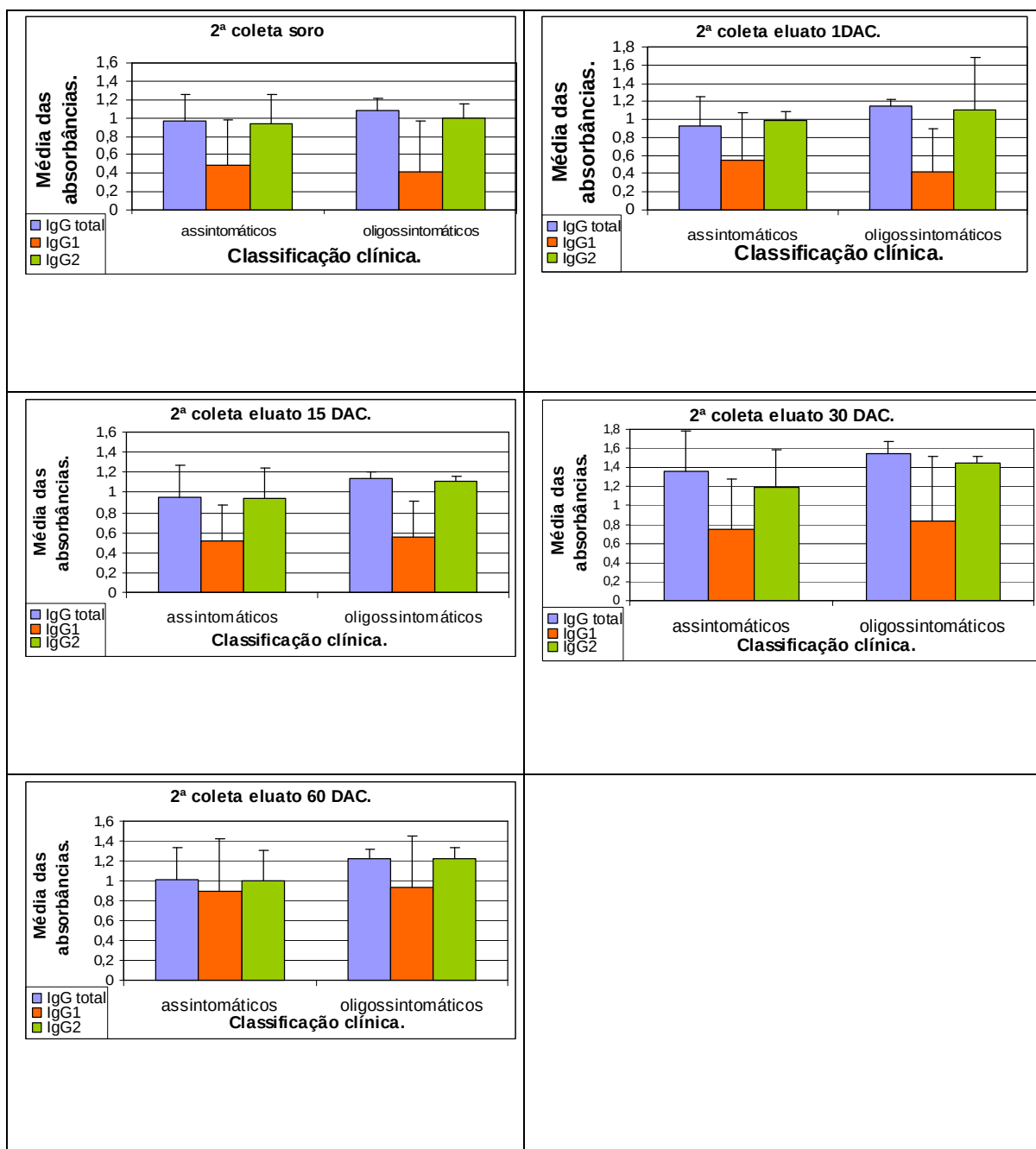


Figura 10: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 2ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

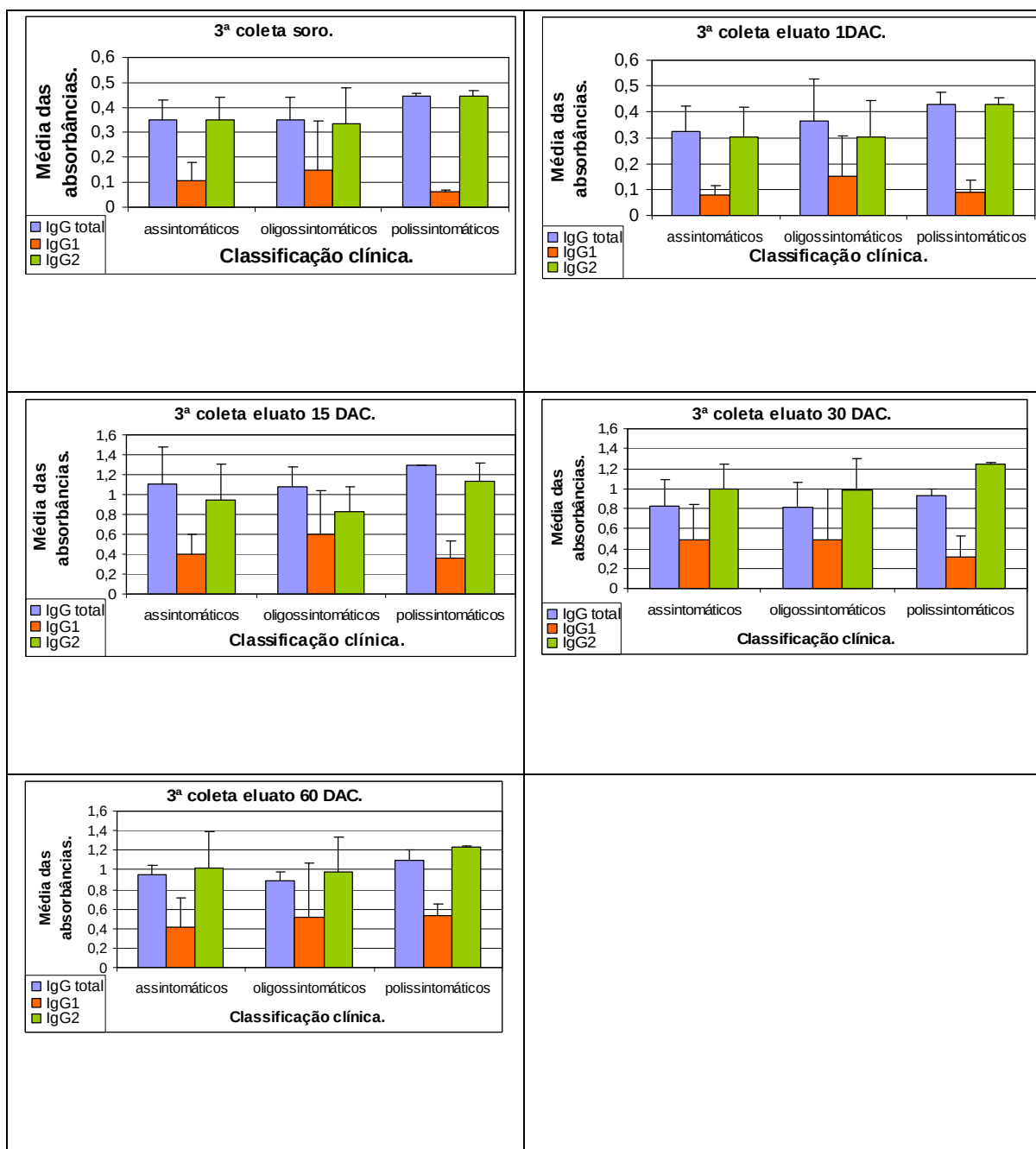


Figura 11: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, para a 3ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

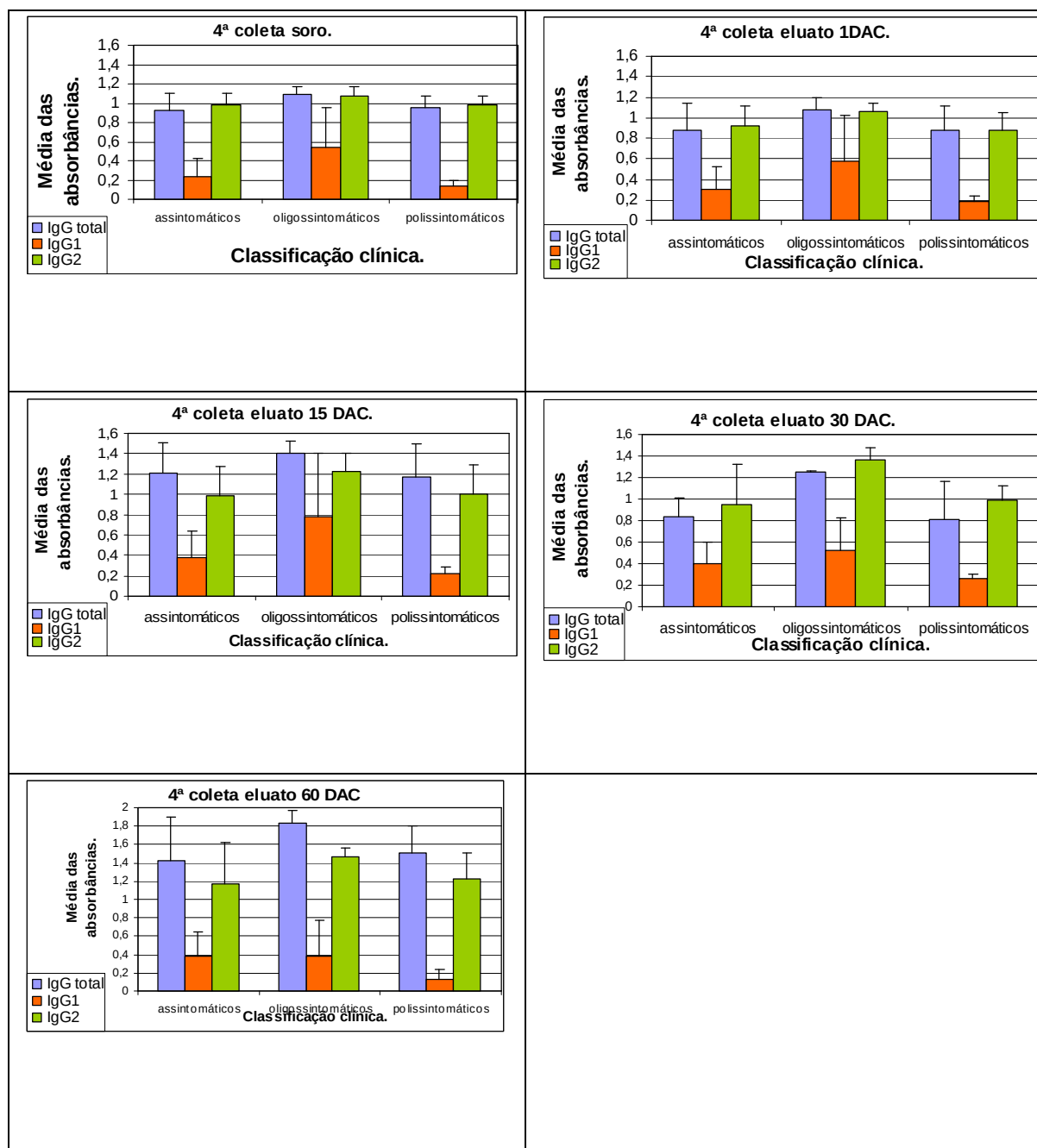


Figura 12: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorbâncias, para a 4ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

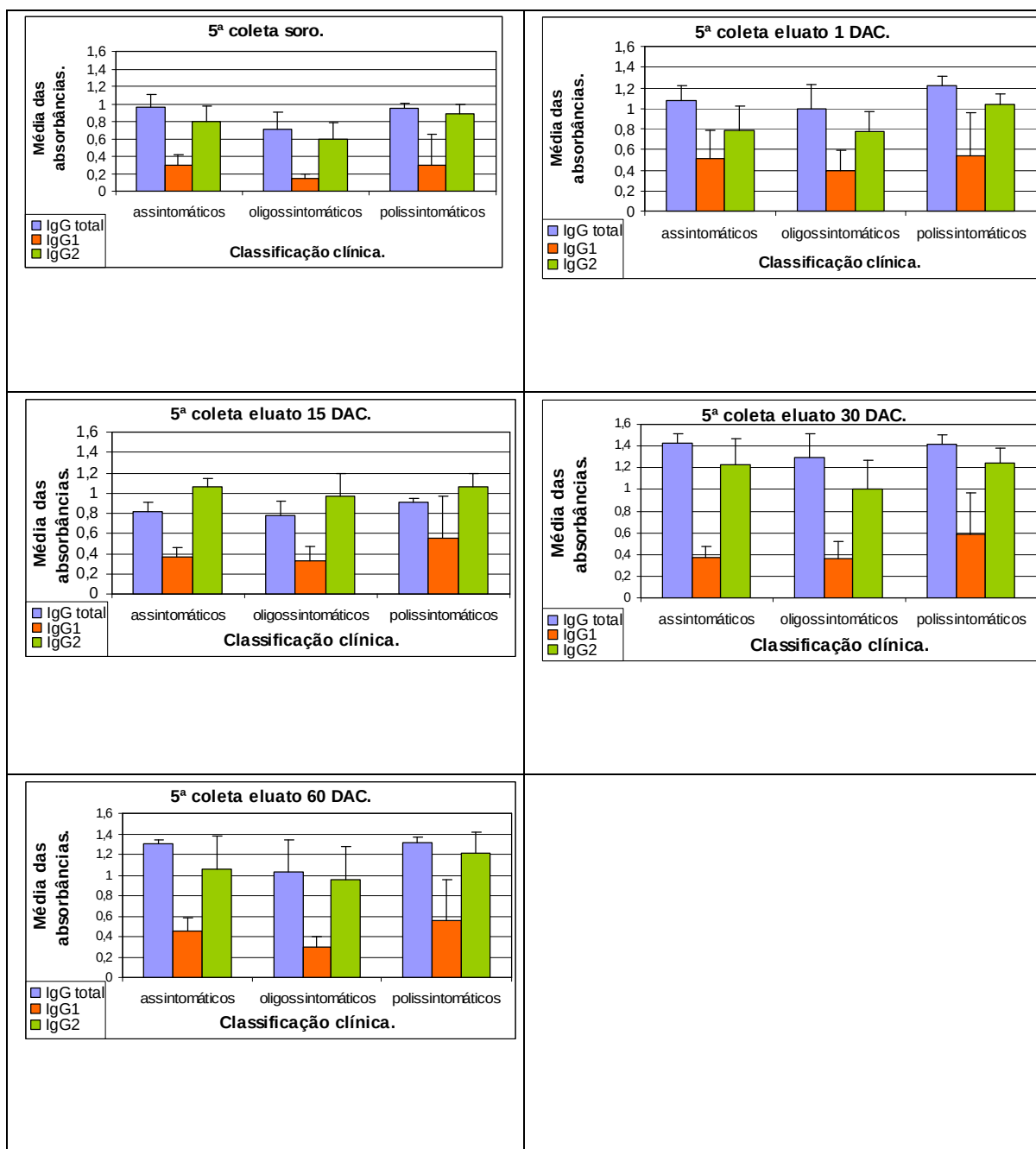


Figura 13: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, para a 5ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

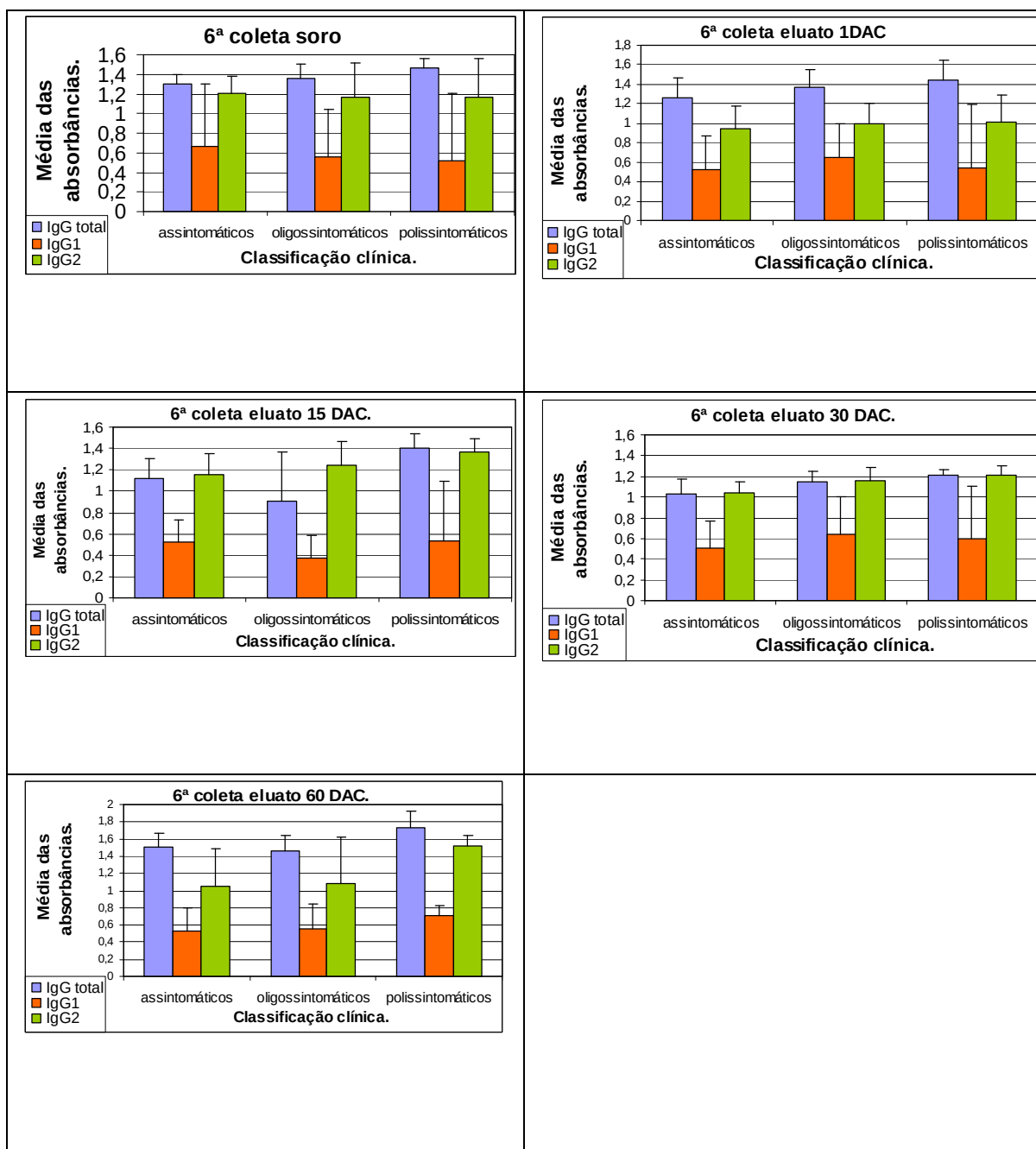


Figura 14: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, para a 6ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

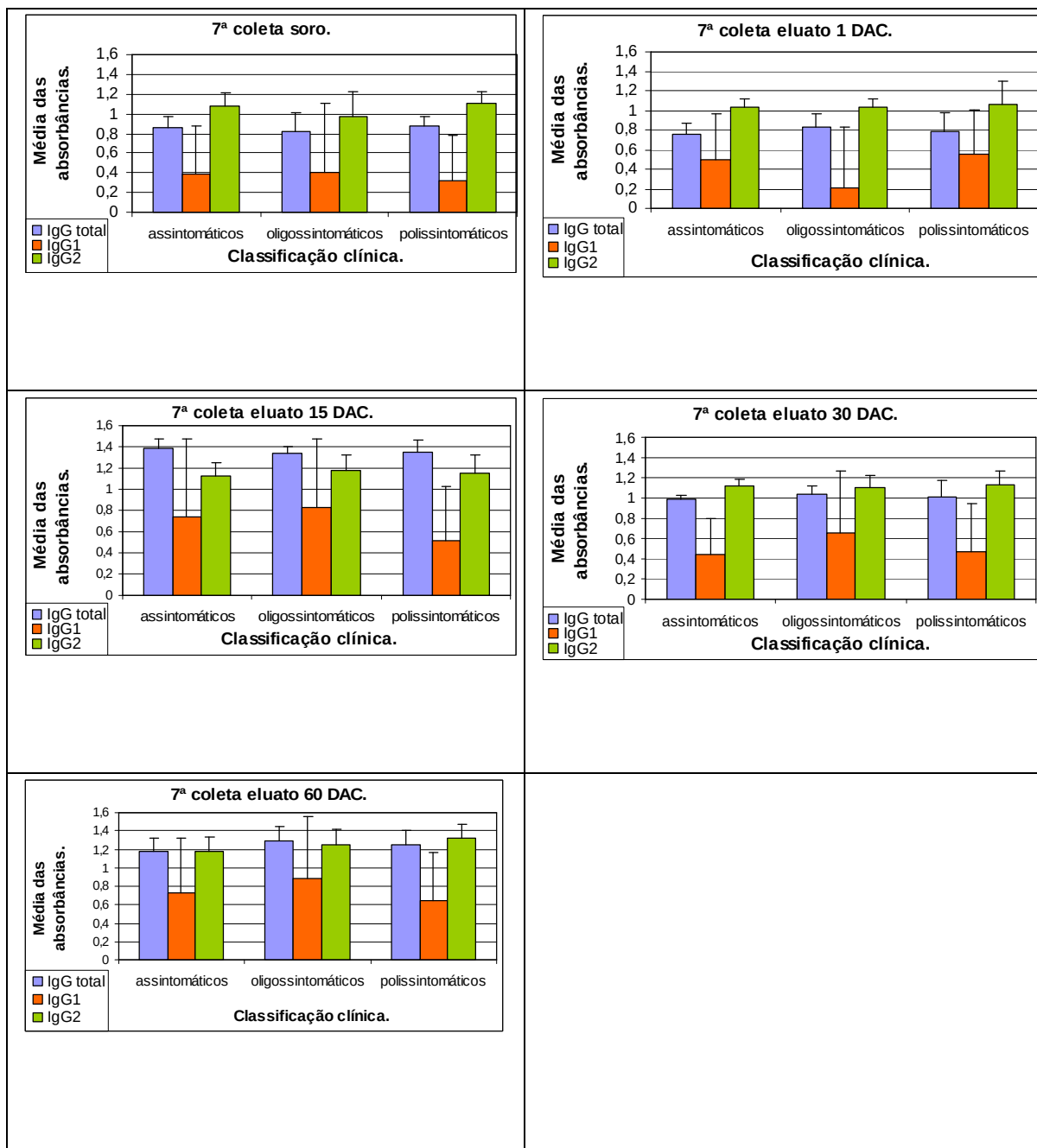


Figura 15: Medida dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 através da média das absorvâncias, para a 7ª coleta, em soros e eluatos, para as diferentes formas clínicas da infecção canina por *L. chagasi*. Os dados estão apresentados para cada D.A.C. As amostras de cada coleta foram ensaiadas em uma mesma placa de ELISA, no 1º, 15º, 30º e 60º D.A.C..

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, P.; Santos-Gomes, G.; Rachamin, N.; Campino, L.; Schnur, L.F. & Jaffe, C.L. (1991a). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 13:537-550.

Abranches, P.; Silva-Pereira, M.C.D.; Conceição-Silva, F.M.; Santos-Gomes, G.M. & Janz, J.G. (1991b). Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.*, 77:557-561.

Adler, S. & Theodor, O. (1931a). Investigations on Mediterranean Kala-Azar. I. Introduction and Epidemiology. *Proct. Roy. Soc.*, London, 108: 447-453.

Alencar, J.E., Cantídio, W.M. & Cavalcante, D.N. (1956). Calazar em Fortaleza. *XIII Congr. Bras. Hyg.* Fortaleza, Ceará, Brasil.

Alencar, J.E. & Coelho-Neto, B. (1956) Leishmaniose canina no Ceará. *XIII Congr. Bras. Hyg.*, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Alencar, J.E. (1959). Calazar Canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do Calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342p.

Alencar, J.E. (1961). Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 3(4):175-180.

Alencar, J.E. & Cunha, R.V. (1963). Inquérito sobre calazar no Ceará – Novos resultados. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 15:391-403.

Alvar, J.; Molina, R.; Andrés, M.S.; Tesouro, M.; Nieto, J.; Vitutia, M.; Gonçalves, F.; Boggio, J.; Rodrigues, F.; Sainz, A. & Escacena, J. (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *An. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 88, n4, 371-374.

Alvar, J.; Beatriz-Gutierrez, S. *et al.* (1996). AIDS and *Leishmania infantum*. *Clin. Dermatol.*, 14:541-546.

Alvar J.; Cañavate, C. & Gutiérrez-Solar, B. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Rev. Clin. Microbiol.*, 10: 298-319.

Araújo, F.G. & Mayrink, W. (1968). Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II Studies on the specificity of the test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10:41-45.

Ashford, D; Badaró, R; Eulálio, C; Freire, M; Miranda, C; Zalis, M.G. & David, Jr. (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(1):1-8.

Ashford, D.; Bozza, M.; Freire, M.; Miranda, J.C.; Sherlock, I.; Eulálio, C.; Lopes, U.; Fernandes, O.; Degraeve, W.; Barker, R.H.; Badaró, R. & David, Jr. (1995). Comparison of Polymerase Chain Reaction and Serology for the detection of canine leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(3):251-255.

Ashford, D; David, Jr.; Freire, M.; David, I.; Sherlock, I.; Eulálio, M.C.; Sampaio, D.P. & Badaró, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brasil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(1):53-57.

Badaró, R.; Reed, S.G. & Carvalho, E.M. (1983). Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(3):480-484.

Badaró, R.; Reed, S.G.; Barral, A.; Orge, G. & Jones, T.C. (1986). Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:72-78.

Badaró, R.; Benson, D.; Eulálio, M.C.; Freire, M.; Cunha, S.; Netto, E.M.; Pedral, S.D.; Madureira, C.; Burns, J.M.; Houghton, R.L.; David, Jr. & Reed, S.G. (1996). Rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173:758-761.

Bahia, M.T.; Vitor, R.W.A.; Machado-Coelho, G.L.L.; Caldas, R.; Antunes, C.M.F. & Chiari, C.A. (1995). Utilização do papel de filtro no diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina. *Braz. J. Vet. Res. and Animal Sci.*, 32:83-88.

Barbosa-De-Deus, R.; Dos-Mares-Guia, M.L.; Nunes, A.Z.; Costa, K.M.; Junqueira, R.G.; Mayrink, W.; Genaro, O. & Tavares, C.A. (2002). *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9(6):1361-6.

Bastien, P.; Blaineau, C. & Pages, M. (1992). Leishmaniasis: Sex, Lies and Karyotype. *Parasitol. Today*, 8:174-176.

Bhatia, A.; Daiffalla, N.S.; Jen, S.; Badaró, R.; Reed, S.G. & Skeiky, Y.A.W. (1999). Cloning, characterization and serological evaluation of K39 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102:249-261.

Boelaert, M.; El Safi, E.; Mousa, H.; Githure, J.; Mbatia, P. Gurubacharya, V.L.; Shrestha, J.; Jacquet, D.; Muynck, A.; Lê Lay, D. & Van der Stuyft, P. (1999). Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, vol. 4, nº 1, 31-37.

Borja-Cabrera, G.P.; Da Silva, V.O.; Costa, R.T.; Reis, A.B.; Mayrink, W.; Genaro, O. & Palatinik-de-Sousa, C.B. (1999). The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(2):296-301.

Borja-Cabrera, G.P.; Correia-Pontes, N.N.; Da Silva, V.O.; Paraguai-de-Souza, E.; Santos, W.R. & Gomes, E.M. (2002). Long-lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). *Vaccine*, 20: 3277-3284.

Braga, M.D.M.; Coelho, I.C.B.; Pompeu, M.L.; Evans, T.G.; MacAullife, I.T.; Teixeira, M.J. & Lima, J.W.O. (1998). Controle do Calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31(5):419-424.

Brahmachari, U.N. (1917). On the presence of a easily precipitable anticomplementary globulin-like substance in human serum and its importance in the diagnosis of Kala-Azar. *Indian Med. Gaz.* 52:429-430.

Bray, R.S. (1976). Immunodiagnosis of leishmaniasis. In *Immunology of Parasitic Infections*. (Cohen, S & Sadun, E.H., eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.70-76.

Bray, R.S. (1980). Leishmaniasis. *In* Immunological Investigations of Tropical Parasitic Diseases, (Houba V., ed.) Churchill Livingstone, Edinburgh, p.65-83.

Bray, R.S. & Lainson, R. (1967). Studies on the immunology and serology of leishmaniasis V. The use of particles as vehicles in passive agglutination tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61:490.

Brener, Z. (1957). Calazar canino em Minas Gerais. Tese (Fac. Méd. Univ. Minas Gerais), Belo Horizonte, 90p.

Brener, Z. & Pelegrino, J. (1958). Reações cruzadas em cães com doença de Chagas e leishmaniose visceral, naturalmente infectados. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 10:45-50.

Buck, A.A. & Gart, J.J. (1966). Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Am. J. Epidemiol.*, v 83, n. 3, p. 586-592.

Cabrera, M.A.A.; Paula, A.A.; Camacho, L.A.B.; Marzochi, M.C.A.; Xavier, S.C.; Silva, A.V.M. & Jansen, A.M. (2003). Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 45(2):79-83.

Camargo, M.E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8:224-227.

Camargo, M.E. & Rebonato, C. (1969). Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:500-505.

Camargo, M.E., Segura, E.L.; Kagan, I.G. *et al.* (1987). Normalización Del diagnostic serologic de la enfermida de Chagas en las Américas. *Bol. Sanit. Panam.*, v.2, nº 5, p.441-463.

Campino, L.; Cortes, S.; Pires, R.; Oskam, L. & Abranches, P. (2000). Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients us peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19(5):396-8.

Cardoso, L.; Rodrigues, M.; Santos, H.; Schoone, G.J.; Carreta, P.; Varejão, E.; Benthem, B.; Afonso, M.O.; Alves-Pires, C.; Semião-Santos, S.J.; Rodrigues, J.& Schallig, H.D.F.H. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.*, 121:21-32.

Cerf, B.J.; Jones T.C.; Badaró, R.; Sampaio, D.; Teixeira, R. & Johnson Jr., W.D. (1987). Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 56(6):1030-1033.

Chagas, E.; Cunha, A.M.; Castro, G.O.; Ferreira, L.C. & Romana, C. (1937). Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 32:321-385.

Chagas, E.; Cunha, A.M.; Ferreira, L.C.; Deane, L.M.; Deane, G.; Guimarães, F.N.; Paumgarten, M.J.Von & Sá, B. (1938). Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 33:89-229.

Chin, J.; Schmidt, N.J.; Lennette, E.H. & Hanahoe, M. (1966). Filter paper disc method of collecting whole blood for serologic studies in children. *Am. J. Epidemiol.*, vol. 84, nº 1, 74-80.

Cisalpino, E.O.; Mayrink, W. & Batista, S. M. (1962). Antígeno metílico em calazar. *O hospital*, 61:155-160.

Corredor, A.; Gallego, J.F.; Tesh, R.B.; Peláez, D.; Dias, A.; Montilla, M. & Paláu, M.T. (1989). *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:195.

Corredor-Arjona, A.; Alvarez-Moreno, C.A.; Agudelo, C.A.; Bueno, M.; López, M.C.; Cáceres, E.; Reyes, P.; Duque-Beltra, S.; Güaldron, L.E. & Santacruz, M.M. (1999). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a colombian indigenous populaton. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 41(4):229-234.

Costa, C.A.; Genaro, O.; Lana, M.; Magalhães, P.A.; Dias M., Michalick, M.S.M.; Melo, M.N.; Costa, R.T; Magalhães-Rocha, N.M. & Mayrink, W. (1991). Leishmaniose Visceral Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24:21-25.

Costa, C.H.N. & Vieira, J.B.F. (2001). Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(2):223-228.

Coutinho, S.G.; Nunes, M.P.; Marzochi, M.C.A. & Tramontano, N. (1985). A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil), where the human disease occur. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80:17-22.

Cunha, R.V.; Alencar, J.E.; & Andrade, F.B. (1963). Uso da reação de fixação do complemento para diagnóstico do Calazar canino em inquérito de massa. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 15:405-410.

Cunha, A.M. & Chagas, E. (1937) Estudos sobre o parasito. *In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 32:329-337.

Dardo, H.; Alecrim, W.; Rodrigues, Jr.; Genaro, O; Moraes-Souza, H.; Silva-Vergara, M.L. & Prata, A. (2001). Falsas reações positivas com malária, leishmaniose tegumentar e doença de Chagas, no diagnóstico da Leishmaniose visceral humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(1):213.

David, J.R.; Stamm, L.M.; Bezerra, H.S.; Souza, R.N.; Killick-Kendrick, Robert & Oliveira-Lima, J.W. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia Migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(6):839-847.

Deane, L.M. (1956). Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese, (Fac. Med. Univ. S. Paulo), Brasil, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162p.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1954). Encontro de Leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital*, 45:419-421.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1954a). Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar no Ceará. *O Hospital*, 45:697-701.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1955). Leishmaniose visceral urbana (no homem e no cão) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, 47:75-87.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1955a). 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*, 48:61-76.

Deane, L.M.; Deane, M.P. & Alencar, J.E. (1955). Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela dedetização domiciliária, em área endêmica de calazar, no Ceará. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 7:131-141.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1962). Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4:149-212.

Deplazes, P.; Smith, N.C.; Arnold, P.; Lutz, H. & Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and others parasites. *Parasite Immunol.*, 17: 451-458.

Desjeux, P. (1991). Information on the epidemiology and control of Leishmaniasis by country or territory. *WHO/LEIS/91.30*, 47p.

Dietze, R.; Barros, G.B.; Teixeira, J.H.; Michelson, K.; Falqueto, A. & Corey, R. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 25:1240-1242.

Duxbury, R.E. & Sadun, E.H. (1964). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13:525-529.

Dye, C. *et al.* (1992). Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross – seccional serological survey on the Island of gozo. *Parasitol.*, 105:35-41.

- Dye, C. (1996). The logic visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:125-130.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.*, 8: 871-874.
- Estambale, B.B.A. & Knight, R. (1992). Protozoan infections and HIV-I infection – a review. *East African Med. Jour.*, 69(7): 373-377.
- Evans, T.G.; Vasconcelos, I.A.B.; Lima, J.W.; Teixeira, J.M.; McUllife, I.T.; Lopes, U.G.; Pearson, R.D. & Vasconcelos, A.W. (1990). Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42:118-123.
- Evengard, B.; Linder, E. & Lundbergh, P. (1988). Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. *An. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 82, nº 3, 295-303.
- Ferreira, E.C.; Paes, D.V.; Lima, A.C.V.M.R.; Carneiro, M.; Silva, E.S.; Lana, M. & Gontijo, C.M.F. (2004). Comparação das técnicas de RIFI e ELISA, utilizando soro e sangue coletado em papel de filtro, no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). In: *Anais da XX reunião anual de pesquisa aplicada em Doença de Chagas e VIII em Leishmanioses*, Uberaba – MG, p.22.
- Fleiss, J.L. (1973). Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons, 223p.
- Fletcher, R.H.; Fletcher, S.W. & Wagner, E.H. (1989). Epidemiologia Clínica. Porto Alegre – RS, Artes Médicas, 312p.

Fox, E.C.R. & Mackie, F.P. (1921). The formol-gel test in kala-azar. *Indian Med. Gaz.*, 56:374-375.

França-Silva, J.C. (1997). Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 133p.

França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Siqueira, A.M.; Machado-Coelho, G.L.L.; Costa, C.A.; Mayrink, W.; Vieira, E.P.; Da-Costa, J.C.; Genaro, O. & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 111:161-173.

Galati, E.A.B.; Nunes, V.B.L.; Rego Jr, F.A.; Oshiro, E.T. & Chang, M.R. (1997). Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. S. Públ.* 31(4):378-390.

Genaro, O.; Mayrink, W.; Michalick, M.S.M.; Dias, M.; Costa, C.A. & Melo M.N. (1988). Naturally occoring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83:43.

Genaro, O.; Costa, C.A.; Williams, P.; Silva, J.E.; Rocha, N.M.; Lima, S.L. & Mayrink, W. (1990). Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 23:121.

Genaro, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental. Tese de Doutorado (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 202p.

Genaro, O.; Costa, R.T.; França-Silva, J.C.; Reis, A.B.; Vieira, E.P.; Arias, J.R.; Monteiro, P.S.; Reed, S.G.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Netto, E.M. & Badaró, R. (1997). Evaluation

of an immunocromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brazil. *Acta Parasitol. Turc.*, 21(1).

Giraud, P. & Cabassu, H. (1932). La Leishmaniose canine dans la region de Marseille. *Bull. Soc. Path. Exot.* 25:1040-1043.

Giraud, P. & Cabassu, H. (1933). Le chien est-il lê réservoir de vírus de la leishmaniose interne? *Arch. Méd. Gen. Colon.*, 2:23-27.

Giraud, P. & Cabassu, H. (1936). Le diagnostic de la leishmaniose canine par la ponction ganglionnaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* 29:958-963.

Gomes, H.R.; Rodrigues, M.S.; Silva, M.P.; Nascimento, E.G.; Moreira, E.D.; Pontes-de-Carvalho, L.C. & Dos Santos, W.L.C. (2001). Comparação entre ELISA de soro e de eluato de sangue para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34(Suppl. I):197-198.

Grimaldi, Jr.G.; Tesh, R.B. & Mc Mahon-Pratt, D.A. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the world. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41(6):687-725.

Grimaldi, Jr.G. & Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev. Clin. Microbiol.*, 6: 230-250.

Guimarães, M.C.S.; Camargo, M.E.; Ferreira, A.W.; Castilho, E.A. & Nakahara, O.S. (1978). Comparison of IgG and IgM contents in serum and filter paper blood eluates. *The Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 27, nº 2., 350-353.

Guimarães, M.C.S. (1983). Inquéritos soroepidemiológicos, coleta, transporte e armazenamento de amostras. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 25(2):93-96.

Guimarães, M.C.S. (1985). Long-term storage of IgG and IgM on filter paper for use in parasitic disease seroepidemiology surveys. *Bull. Pan. Am. Health Organ*, 19(1):16-28.

Harith, A.E.; Kolk, A.H.J.; Leeuwenburg, J.; Mugai, R.; Kiugu, S. & Laarman, J.J. (1986). A Simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80:583-586.

Harith, A.E.; Kolk, A.H.J.; Kager, P.A.; Leeuwenburg, J.; Faber, F.J.; Muigai, R.; Kiugu, S. & Laarman, J. (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81:603-606.

Harrison, L.H.; Talapada, G.N.; Drew, J.S.; Alencar, J.E. & Pearson, R.D. (1986). Hypothesis – Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev. Infect Dis. Chicago* 8(3):447-453.

Ho, E.A.; Hsu, T. & Soong, T. (1947). Canine visceral leishmaniasis in villages west of Lanchow, China. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 40:889-894.

Hoare, C.A. & Wallace, F.C. (1966). Developmental stage of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature* 212:1358-1386.

Hommel, M. (1976). Enzymaimmunoassay in leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70:15-16.

Hommel, M. (1978). The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. *Bull Inst Pasteur* 75:5-102.

Hommel, M.; Peters, W.; Ranque, J.; Quilici, M. & Lanotte, G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *An. Trop. Med. Parasitol.*, 72:213-218.

Hommel, M.; Jaffe, C.L.; Travi, B. & Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *An. Trop. Med. Parasitol.* 89(1):55-73.

Hou, T.C.; Ts'ao, W.C.; Chung, H.L.; Wu, C.Y. & Liu, W.T. (1960). Human and canine leishmaniasis in Sian, with special reference to significance of Kala-Azar complement fixation test. *Chinese Med. J.*, 80:340-346.

Iverson, L.B.; Camargo, M.E.; Villanova, A.; Reichmann, M.L.A.B.; Andrade, E.A. & Tolezano, J.E. (1983). Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo – Brasil (1979-1982). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 25:310-317.

Jerônimo, S.M.B.; Oliveira, R.M.; Mackay, S.; Costa, R.M.; Sweet, J.; Nascimento, E.T.; Luz, K.G.; Fernandes, M.Z., Jemigan, J. & Pearson, R.D. (1994). An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 386-388.

Kagan, I.G. (1972). Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiological technique for malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21(5):683-689.

Kar, K. (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(2):123-152.

Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M.; Focheux, M.C.; Dereure, J.; Puech, M.P. & Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of Phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Mem. Vet. Entomol.*, 11:105-111.

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

Lainson, R. & Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters & Killick-Kendrick. The leishmaniasis in Biology and Medicine; London, Academic Press, v.1, p.1-20.

Lépine, P. & Bilfinger, F. (1936). Recherche de la leishmaniose viscerale chez les chiens defourrière d'Athenes. *Bull Soc. Path. Exot.*, 29:131-135.

Lira, R.A.; Paiva-Cavalcanti, M.; Silva, E.D.; Abath, F.G.C.; Alves, L.C. & Gomes, Y.M. (2004). Avaliação do desempenho do “kit” EIE-Leishmaniose-Canina-Bio-Manguinhos e comparação com o teste de Imunofluorescência Indireta (Resultados preliminares). In: *Anais da XX reunião anual de pesquisa aplicada em Doença de Chagas e VIII em Leishmanioses*, Uberaba – MG, p.18.

Longstaffe, J.A.; Jefferies, A.R.; Kelly, D.F.; Bedford, P.G.C.; Herrtage, M.E. & Darke, P.G.G. (1983). Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *J. Small Anim. Pract.*, 24:23-40.

Lowry, O; Rosebrough, N.J.; Farr, A. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Machado, J.G.; Moraes, J.R.C.; Costa, R.T.; Nascimento, E. & Moreira, E.C. (2004). Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003-2004. *In: Anais da XX reunião anual de pesquisa aplicada em Doença de Chagas e VIII em Leishmanioses*, Uberaba – MG, p.17.

Machado-Coelho, G.L.L.; Vitor, R.W.A.; Chiari, C.A. & Antunes, C.M.F. (1995). Validity of serological for American trypanosomiasis with eluates from filter paper. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 90(1): 59-64.

Magalhães, P.A.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Melo, N.M.; Dias, M.; Batista, S.M.; Michalick, M.S.M. & Williams, P. (1980). Calazar na zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22:197-202.

Mancianti, F. & Meciani, N. (1988). Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.*, 49(8):1409-1411.

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

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

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

Mansueto, S.; Migneco, G. & Didato, A. (1975). Confronto tra reazione di fissazione Del complemento com BCG e immunofluorescenza nella diagnostica della leishmaniosi. *An. Sclavo*, 17:275-282.

Margonari, C.S.; Freitas, C.R.; Ribeiro, R.C.; Moura, A.C.M.; Timbó, A.M.; Gripp, A.H.; Pessanha, J.E. & Dias, E.S. (2004). Epidemiologia das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, utilizando análises espaciais. *In: Anais da XX reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e VIII de leishmanioses, Uberaba-MG*, p.26.

Marinkelle, C.J.; Sanchez, N.; Grogl, Y. & Guhl, F. (1978). Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 20(2):112-114.

Martins, A.V.; Willians, P. & Falcão, A.L. (1978). American Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro, *Academia Brasileira de Ciências*, 195p..

Marzochi, M.C.A.; Toledo, L.M.; Marzochi, K.B.F.; Coutinho, S.G. & Tramontano, N.C. (1983). Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Aspectos epidemiológicos humanos. *In* Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, Anais, p.60.

Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Souza, W.J.S.; Toledo, L.M.; Grimaldi Jr., G.; Momen, H.; Pacheco, R.S.; Sabroza, P.C.; Souza, M.A.; Rangel Jr., F.B. & Tramontano, N. (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80:349-357.

- Marzochi, M.C.A.; Barbosa-Santos, E.G.O. *et al.* (1987). Epidemiological survey of canine cutaneous leishmaniasis by intradermal reaction in na endemic área of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(1):163.
- Marzochi, M.C.A. (1992). Curso – Doenças Infecto-Parasitárias (DIP): Aula 39 – Leishmanioses no Brasil. *In J. Bras. Med.*, 63(5/6):82-104.
- Mathews, H.M. (1981). Parasitic Disease: Testing With Filter-Paper Blood Spots. *Laboratory Management*, vol 19, nº 2, 55-62.
- Mathis, A. & Deplazes, P. (1995). PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania spp* diagnostic samples from humans and dogs. *L. Clin. Microbiol.*, 33(5):1145-9.
- Mayrink, W.; Araújo, F.G. & Magalhães, P.A. (1967). Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9(3):172-174.
- Mayrink, W. (1967). Contribuição ao diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral. Tese, Belo Horizonte, 112p.
- Mendes, C. O.; Souza, E.P.; Borja-Cabrera, G.P.; Batista, L.M.M.; Santos, M.A.; Parra, L.E.; Menz, I.; Palatinik, M. & Palatinik-de-Sousa, C.B. (2003). IgG1/IgG2 antibody dichotomy in será of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21:2589-2597.
- Migone, L.E. (1913). Um caso de kala-azar a Assuncion (Paraguay). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 6:118-120.
- Ministério da Saúde – Informações epidemiológicas da SUCAM. (1984). Expansão e urbanização do calazar no Brasil. *Ministério da Saúde*, ano III, n. 25.

Ministério da Saúde (2003). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. *Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*, Brasília – DF, 120p.

Ministério da Saúde (2004). Nota Técnica – 16/09/2004, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. In: *saude.gov.br/svs (destaques)*.

Monteiro, S. (2002). Leishmaniose visceral no Brasil: perspectivas de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35(1):335.

Monteiro, S.; Lacerda, M.M. & Arias, Jr. (1994). Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27(3):67-72.

Montijin, D.J. & Harith, A.E. (1987). A comparison of ELISA and Direct Agglutination Test (DAT) in the serodiagnosis of New World (muco) cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:159.

Morales, G.; Carrilo, G.; Requena, J.M.; Guzman, F.; Gómez, L.C.; Patarroyo, M.E. & Alonso, C. (1997). Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 114:507-516.

Nicolle, C. (1908b). Reproduction expérimentale du kala-azar chez le chien. Origine canine probable de cette affection. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1:188-190.

Nussenzweig, V. (1957). Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento na leishmaniose visceral com antígeno extraído de bacilos da tuberculose. Tese. Fac. Med. Univ. São Paulo, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 119p.

Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.S. & Alencar, J.E. (1957a). Leishmaniose visceral canina: reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. *O Hospital*, 51:325-332.

Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.S. & Alencar, J.E. (1957b). Leishmaniose visceral canina: reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. XIII Congresso Brasileiro de Higiene, fortaleza, Ceará. *O Hospital*, 52:11-129.

Okong'o-odera, E.A.; Kurtzhals, J.A. & Het, A.S. (1993). Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. *APMIS*, 101:642-646.

Oliveira, C.L.; Assunção, R.M.; Reis, I.A. & Proietti, F.A. (2001). Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad. S. Públ.* 17(5):1231-1239.

Oliveira-Lima, J.W.; Fiuza, I.R. & Dias-Branco, F.J. (1996). Correlação entre prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas do Estado do Ceará. In: *Resumos do XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia*, p.146.

Osman, O.F.; Oskam, L.; Zijlstra, E.E.; Kroon, N.C.M.; Shoone, G.J.; Khalil, T.A.G.; El-Hassan, A.M. & Kager, P.A. (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 35(10):2454-2457.

Palatinik-de-Sousa, C.B.; Santos, W.R.; França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Reis, A.B.; Palatinik, M.; Mayrink, W. & Genaro, O. (2001). Impact of canine control on the

epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(5):510-517.

Paranhos-Silva, M.; Freitas, L.A.R.; Santos, W.C.; Grimaldi, G.; Pontes-de-Carvalho, L.C. & Oliveira-dos-Santos, A.J. (1996). A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(1):39-44.

Pelegriño, J. & Brener, Z. (1958). Reação de fixação do complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 10:39-44.

Pozio, E. *et al.* (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, 38:383-393.

Prata, A. (1957). Quadro clínico e laboratorial do Calazar. Tese (Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia), Salvador – BA, 260p.

Prata, A.; Mayrink, W.; Sodré, A.G. & Almeida, J.O.de (1975). Discrepâncias relativas entre resultados de reação de Guerreiro-Machado entre diferentes laboratórios. *Rev. Patol. Trop.*, 4:35-38.

Profeta-Da-Luz, Z.M.; Pimenta, D.N.; Cabral, A.L.L.V.; Fiúza, V.O.P. & Rabello, A. (2001). A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34(3):249-254.

Quinnell, R.J.; Courtenay, O.; Garcez, L.M.; Kaye, P.M.; Shaw, M.A.; Dye, C. & Day, M.J. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 91:161-168.

- Reed, S.G. (1996). Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 14(5):471-478.
- Rodgers, M.R.; Popper, S.J. & Wirth, D.F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, 71:267-275.
- Rodrigues, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B.R. & Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and Hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 32(9):2246-2252.
- Roura, X.; Sanchez, A. & Ferrer, L. (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain react technique. *Vet. Record*, 144(10):262-4.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Schoone, G.J.; Hailu, A.; Kroon, N.C.M.; Nieuwenhuijs, J.L.; Schallig, H.D.F.H. & Oskam, L. (2001). A Fast Agglutination Screening Test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95:400-401.
- Sen Gupta, P.C. & Adhikari, S.L. (1952). Observations on the complement fixation test for kala-azar. *J. Indian Med. Ass.*, 22:89-93.
- Shaw, J.J. & Voller, A. (1964). The detection of circulant antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58:349-352.
- Sherlock, I.A. & Almeida, S.P. (1970). Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. Resultados das medidas profiláticas. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 22: 175-182.

Siddig, M.; Ghalib, H.; Shillington, D.C. & Petersen, E.A. (1988). Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82:66-68.

Sideris, V.; Karagouni, E.; Papadopoulou, G.; Garifallou, A. & Dotsika, E. (1996). Canine visceral leishmaniasis in the greater Athens area, Greece. *Parasite*, 3:125-130.

Silva, A.R. *et al.* (1997). Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 30(5):359-368.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.S.; Fiúza, V.O.P. & Brazil, R.P. (2001). Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96(3):285-291.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.; Pirmez, C.; Fernandes, O. & Brazil, R.P. (2001a). Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(6):896-8.

Simplício, A.C.R.; Furtado, J.B.V.; Monteiro, P.S. & Garrett, D. (2002). Leishmaniose visceral no Brasil: análise epidemiológica nos últimos 16 anos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35(1):298.

Stapp, C. & Berks, R. (1948). Über Weitere Antroknangsuprsuche mit Seren gegen Kartoffelviren. *Phytopathologische Zeitschrift*, 25:47-53.

Tanner, C.E. (1996). Short Analitical Review: Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 78(2):105-111.

Tavares, L.M.S.A. (2000). Avaliação do processo de urbanização da leishmaniose visceral no município de Aracajú – Sergipe. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33(1):37.

Tebourski, F.; El Gaied, A.; Louzir, H.; Bem Ismail, R.; Kammoun, R. & Dellagi, K. (1994). Identification of an immunodominant 32-kilo Dalton membrane protein of *Leishmania donovani infantum* promastigotas suitable for specific diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2474-2480.

Toledo, L.M.; Marzochi, M.C.A. & Coutinho, S.G. (1983). Detection of subclinic forms of visceral leishmaniasis in na endemic área in Rio de Janeiro. In: *Anais da X Reunião de Pesquisa Básica em Doença de Chagas*, Caxambú – MG, 1-25.

Travi, B.L.; Montoya, J.; Gallego, J.; Jaramillo, C.; Llano, R. & Vélez, I.D. (1996). Binomics of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J. Med. Entomol.* 33(3):278-785.

Vannier-Santos, M.A.; Martiny, A. & Souza, W. (2002). Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Cur. Pharmac. Des.*, 8:297-318.

Vecchio, T.J. (1966). Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *New England J. Med.*, v. 274, nº 21, 1171-1173.

Vieira, J.B.F. & Coelho, G.E. (1998). Leishmaniose visceral ou Calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31(2):85-92.

Voller, A.; Draper, C.; Bidwell, D.E.; *et al.* (1976). Enzyme linked immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO*, 53:55-65.

Walters L.L. (1993). *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. *J Euk Microbiol* 40:196-206.

World Health Organization (1986). Epidemiological statistical sample size determination – A user's manual methodology unit. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (1990). Control of the leishmaniasis. *WHO Tech. Rep. Ser.* 793: 1-158. World Health Organization Expert Committee, Geneva, Switzerland.

Youden, W.J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3: 32-35.