

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

Pós-graduação em Ciências da Saúde

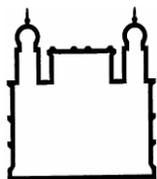
Doenças Infecciosas e Parasitárias

***“INOVAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”***

RENATA ALINE DE ANDRADE

Belo Horizonte - MG

Abril - 2008



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

***“INOVAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”***

RENATA ALINE DE ANDRADE

Tese apresentada com vista à obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde na área de
concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias
do CPqRR/FIOCRUZ.

Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Co-orientadores: Dr. Alexandre Barbosa Reis

Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Belo Horizonte - MG

Abril de 2008.

“Que ninguém se aproxime de mim sem que esteja melhor e mais feliz ao se afastar.”

Madre Tereza de Calcutá

Dedico este trabalho à minha filhinha Luísa e ao meu marido Edilberto.
Sentir o que vocês me proporcionam é um milagre que acontece todos os dias em minha
vida...

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CPqRR (Centro de Pesquisa René Rachou) e FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz).

Agradecimentos

Ao Olindo pela oportunidade, orientação, confiança, aprendizado e especialmente pelos momentos de convívio alegre em que compartilhamos reflexões, risadas e sonhos...

Ao Alexandre por me levar para o René Rachou e por estar sempre disponível em contribuir e ensinar. Sem sua participação essa conquista não aconteceria!!!

À Celinha, minha “mãezinha”. Muito obrigada pela orientação, carinho (nossa!!!) e receptividade. Você é meu exemplo de ponderação, educação e equilíbrio.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR e aos professores, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Wilson Mayrink, pela colaboração e apoio na realização deste projeto. E também pelo exemplo de amor ao trabalho .

À Alcina, Josi e Roberta Dias. A realização desse trabalho só foi possível porque vocês trabalharam antes e forneceram todas as ferramentas para que chegássemos até aqui. Essa conquista é nossa!!!

Ao Capitão Leonardo Rocha Vianna, veterinário responsável pelo canil da PMMG e aos auxiliares veterinários, sargentos: Kátia, Fonseca, Welles, Mangabeira e ao Fabrício, pelo imenso auxílio no manuseio com os animais e pelo tempo que tivemos oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Sidney, técnico do laboratório de leishmaniose, pela realização das Reações de imunofluorescência, sempre com boa vontade e responsabilidade.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa René Rachou, em especial aos motoristas Toninho, Cláudio e Abel, que gentilmente me acompanharam durante a coleta de material biológico.

Ao Márcio, pela amizade, companheirismo nos trabalhos desenvolvidos no canil e especialmente pelos momentos de alegria e descontração.

À Lidiane, pela grande participação nas etapas iniciais desse trabalho e principalmente pela amizade que surgiu entre nós. Muito obrigada por estar sempre por perto com suas palavras...

À Roberta Félix, pelo grande carinho, pela preocupação e eficiência em resolver os meus problemas. Sempre foi muito confortante saber que você estaria aí. Muito obrigada por tudo!!!

À Eliandra, pelo auxílio técnico sempre com tanta boa vontade e competência e também por tantos momentos alegres que compartilhamos. Senti muito a sua falta!!! Saudades...

Aos colegas Laboratório de Imunologia; em especial a Tiza, pela grande ajuda durante a leitura dos experimentos e também pelas conversas alegres e descontraídas.

Aos contemporâneos do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração: Ana Paula Marciano, Ana Paula Wedling, Paula, Júlia, Bia, Lidiane, Jordana, Izabelle, Vanessa, Dra. Silvana, Renato, Dani, Simone, Léia, Xênia, Marina, Luciana, Cristiane e Maria Luíza pelo aprendizado, inúmeros favores e convívio agradável. Essa conquista só foi possível porque pude contar com cada um de vocês!!!

À Simone, pela consideração e amizade. Você sabe o quanto foi importante para mim... Muito Obrigada!!!

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses, em especial a Paty, Tina, Dudu, Rafael, Luti e Cíntia. Agradeço pela grande disponibilidade em ajudar, convívio e receptividade. Agradeço também pelas inesquecíveis viagens. Ri muito com vocês!!!!

As grandes amigas Roberta Dias, Jordana, Ana Paula Marciano e Ana Paula W, pela amizade, carinho, inesquecíveis favores e conversas. Obrigada por vocês estarem sempre presentes na minha casa, na minha família, na minha vida, irreversivelmente. Essa foi uma grande conquista!!!

À Alessandrinha, Elaine, Reje, Paty e Renata: super amigas tornou-se uma denominação insuficiente para vocês. Obrigada pela presença insubstituível há tantos anos!!!

Ao Lohan, pois com você aprendi que o amor verdadeiro não acaba nem diminui, mesmo na ausência. Você sempre estará no meu coração e orações. Sempre!!!

Aos amigos da Fraternidade São Francisco de Assis. Obrigada pela amizade e convivência alegre e iluminada.

Aos meus queridos irmãos Beto e Júnior e cunhada Ariane. Vocês são os anjinhos que Deus me enviou!!! Muito obrigada por existirem!!!

Ao meu querido marido, Edilberto, pelo grande amor, dedicação, respeito, paciência e apoio constante. Obrigada por compartilhar comigo esses 15 anos, sempre me mostrando o que realmente tem importância nessa vida.

Aos meus pais, Alice e Lúcio. Agradeço por serem nosso “Porto Seguro”. Nada que possa acontecer será de fato muito ruim, afinal de contas papai e mamãe estão lá em casa...Quem tem isso, tem tudo!!!

Sumário

Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
<i>Introdução</i>	18
<i>Objetivos</i>	20
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
<i>Revisão da Literatura</i>	22
<i>Material e Métodos</i>	34
4.1. Animais Experimentais	35
4.2. Procedimento de Bioética.....	38
4.3. Pesquisa de <i>Leishmania</i> em Lâminas Coradas.....	39
4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	39
4.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	40
4.6. Kalazar Detect [®]	41
4.7. Cultivo das Formas Promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	41
4.8. Preparo das Formas Promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	42
4.9. Anticorpos Reveladores Utilizados para os Ensaios de Citometria de Fluxo	42
4.10. Pesquisa de Anticorpos Anti-promastigotas Fixadas de <i>Leishmania chagasi</i> (AAPF)	43
4.11. Ensaio de Adsorção de Imunoglobulina G	44
4.12. Análise dos Dados.....	44
4.13. Análise do Desempenho AAPF	46

4.13.1. Definição do ponto de corte	46
4.13.2. Receiver Operating Characteristic Curve – Curva ROC	47
4.13.3. Índices de desempenho	48
4.13.4. Intervalo de confiança – IC	51
4.13.5 Índice Kappa	51
Resultados	51
5.1. Estabelecimento de Procedimentos Metodológicos para a Pesquisa de Anticorpos IgM, IgA, IgG (IgG1, IgG2) e IgE, Anti-formas Promastigotas Fixadas de <i>Leishmania chagasi</i> (AAPF) por Citometria de Fluxo para Diagnóstico da LVC.....	52
5.1.1. Padronização da diluição dos anticorpos secundários, variável inerente à reação antígeno-anticorpo, a serem empregadas na pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> por citometria de fluxo	52
5.1.2. Caracterização do perfil de imunoglobulinas IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE detectados pelas AAPFs	56
5.1.3. Avaliação do desempenho das AAPFs no diagnóstico sorológico da LVC	58
5.1.4. Avaliação da aplicabilidade da AAPF-IgG para o diagnóstico sorológico diferencial da LVC.....	69
5.2. Avaliação do Desempenho da AAPF-IgG em Comparação com RIFI e ELISA (Técnicas Sorológicas Convencionais) e Kalazar Detect® (não Convencional) Aplicadas no Diagnóstico Diferencial da LVC	70
5.3. Avaliação do Desempenho da AAPF-IgG em Cães Imunizados Experimentalmente com Outros Imunobiológicos Candidatos à Imunoprofilaxia da LVC.....	73
5.4. Análise do Grau de Reatividade Cruzada da AAPF-IgG em Amostras de Cães Portadores de Outras Doenças Infecto-Parasitárias	74
5.5. Determinação da Sensibilidade e Especificidade da AAPF em uma População Inquérito Artificial Representativa do Panorama de Amostras Destinadas ao Diagnóstico Sorológico da LVC.....	77
Discussão	78
Evidências e Conclusão	89
Referências Bibliográficas	92

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	46
Figura 2: Curvas ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 – especificidade) dos testes avaliados.	48
Figura 3: Reatividade da AAPF-IgM e AAPF-IgA em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC.....	53
Figura 4: Reatividade da AAPF-IgG, IgG1 e IgG2 em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC.....	54
Figura 5: Reatividade da AAPF-IgG em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) sem pré-tratamento (A), submetidos a tratamento com <i>RF absorbent</i> por 15 minutos a 25 ⁰ C (B), submetidos a tratamento com proteína A por 1 hora a 37 ⁰ C (C), submetidos a tratamento com proteína G por 1 hora a 37 ⁰ C (D).	55
Figura 6: Reatividade da AAPF-IgE em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC.	56
Figura 7: Perfil de reatividade média da AAPF-IgM (●), IgA (○), IgG (●), IgG1 (●), IgG2 (●) e IgE (●) em soros individuais de cães não infectados (NI, n=15), infectados (INF, n=29) e vacinados com Leishmune [®] (VAC, n=21).....	57
Figura 8: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2, em amostras de soros de cães não infectados (NI=●) e cães infectados (INF=●).....	59
Figura 9: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães não infectados (NI=●, n=15) e infectados (INF=●, n=29).....	63
Figura 10: Reatividade das amostras individuais da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães infectados (INF=●, n=29) e cães vacinados com Leishmune [®] (VAC=●, n=21). ...	64
Figura 11: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães não infectados (NI=●, n=15), infectados (INF=●, n=29), vacinados com Leishmune [®] (VAC=●, n=21).	67
Figura 12: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=15), infectados (INF=●, n=29) e vacinados com Leishmune [®] (VAC=●, n=21).....	68

- Figura 13: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=25), infectados (INF=●, n=64) e vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=62). 69
- Figura 14: Desempenho da AAPF-IgG (diluição do soro 1:8.192) em paralelo com RIFI e ELISA para discriminar a reatividade de IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=15 - A, B, C), infectados (INF=●, n=29 - D, E, F) e vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=21- G, H, I). 71
- Figura 15: Frequência de resultados falso-negativos e verdadeiro-positivos detectados por AAPF-IgG (diluição 1:2.048), ELISA e kalazar Detect[®] em amostras de cães infectados com *L. chagasi* categorizados em assintomáticos (A=●, n=6) oligossintomáticos (O=●, n=9) e sintomáticos (S=●, n=14). 73
- Figura 16: Desempenho da AAPF-IgG para discriminar cães imunizados com diferentes imunobiológicos: *Leishmania braziliensis* (LB=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saponina (LB+SAP=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saliva (LB+SAL=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saponina + saliva (LB+SAP+SAL=●, n=5), *Leishmania amazonensis* + BCG (LA+BCG=●, n=12). 74
- Figura 17: Desempenho da AAPF-IgG para discriminar cães infectados com *L. chagasi* (Lc=●) de cães infectados com outros patógenos ((*E. canis*=●, *T. gondi*=●, *T. cruzi*=●, *L. braziliensis*=●). Os resultados foram expressos como PFP ao longo da curva de diluição da mistura de soros (1:256 a 1: 524.288). Os retângulos representam as diluições do soro 1:2.048 e 1:8.192 (gráfico superior). 76
- Figura 18: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães controles não infectados com *L. chagasi* (Controle=○, n=132) e infectados com *L. chagasi* (LVC=●, n=64). 77

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo	43
Tabela 2 - Categorias de resultados do teste diagnóstico em uma população que inclui cães não infectados e cães infectados com <i>L. chagasi</i>	49
Tabela 3 - Interpretação do índice <i>Kappa</i>	51
Tabela 4 - Parâmetros metodológicos e índices de desempenho da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 para avaliação do potencial diagnóstico da LVC com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.....	61
Tabela 5 - Valores preditivos negativo (VPNs) e positivo (VPPs) da análise da AAPF-IgA, IgG e IgG2 referentes a diferentes prevalências.....	62
Tabela 6 - Índices de desempenho da AAPF-IgM, IgG, IgG1, IgG2 e IgA para avaliação de reatividade diferencial entre infecção ativa e soroconversão pós-vacinal, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.....	66
Tabela 7 - Razões de verossimilhança para diagnóstico diferencial entre infecção ativa e vacinação com Leishmune [®]	69
Tabela 8 - Desempenho AAPF-IgG em paralelo com Kalazar Detect [®] aplicados no diagnóstico diferencial da LVC.....	72

Lista de Abreviaturas

µL	microlitro
°C	Graus Celsius
AAPF	Pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de <i>Leishmania chagasi</i>
Ac	Anticorpo
AcP	Anticorpo policlonal
Ag	Antígeno
AS	Cães infectados com <i>Leishmania chagasi</i> assintomáticos
ASC	Área sob a curva
AcP	Anticorpo Policlonal
BCG	<i>Bacilo de Clamette-Guérin</i>
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal.
DAT	Direct Agglutination Test
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorecence Acitivated Cell Sorter
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FL1	Fluorescência do tipo 1
FML	Fucose Manose Ligante
FSC	<i>Forward Angle Light Scatter</i> (Tamanho celular)
IC	Intervalo de confiança
ICB	Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2	Imunoglobulina da subclasse G2
IgM	Imunoglobulina M
INF	Cães infectados com <i>L. chagasi</i>
J de Youden	Índice J de Youden
LIT	Infusão de Fígado e Triptose
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MFF	Solução fixadora
mL	mililitro
MS	Ministério da Saúde
NI	Cães não infectados
NNN/LIT	<i>Nicole, Novy e Neal</i> / Meio de cultivo bifásico.
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial Hidrogênionico
PPFP	Percentual de parasitos fluorescentes positivos
Curva ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	rotações por minuto
RV	Razão de Verossimilhança
S	Cães infectados com <i>Leishmania chagasi</i> sintomáticos
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side Angle Light Scatter</i> (Granulosidade celular)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VAC	Cães vacinados com Leishmune [®]
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
VNeg	Verdadeiro negativo
VPos	Verdadeiro positivo
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WHO	Organização Mundial de Saúde

Resumo

A soropositividade para *Leishmania* tem sido considerada o padrão de referência para indicar a eutanásia de cães, como recomendado pelo programa de controle da leishmaniose visceral. Entretanto, as técnicas utilizadas atualmente, RIFI e ELISA, apresentam limitações, considerando principalmente a especificidade em detectar a leishmaniose visceral canina (LVC). Adicionalmente, após a disponibilização comercial da vacina Leishmune[®] muitas questões de ordem prática tem se tornado urgentes, devido à soroconversão imunomediada pós vacinal, que tem um impacto direto na interpretação da sorologia positiva anti-LVC.

Neste estudo, foram estabelecidos procedimentos metodológicos, baseados na citometria de fluxo, para pesquisa de anticorpos anti-formas fixadas de *L. chagasi* (AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE). Foi avaliado o desempenho das técnicas em amostras de soros de cães não infectados (NI, n=15), infectados com *L. chagasi* (INF, n=29) e vacinados com Leishmune[®] (VAC, n=21) para o diagnóstico diferencial da LVC. Utilizando PFP=20% como ponto de corte para segregar resultados negativos e positivos, a AAPF-IgG apresentou excelente desempenho quando aplicada nas diluições do soro 1:2.048 e 1:8.192, sendo portanto qualificada como técnica aplicável ao diagnóstico sorológico da LVC.

A AAPF-IgG foi validada para o diagnóstico sorológico da LVC quando aplicada em um maior número de amostras de cães NI (n=25), INF (n=62) e VAC (n=64). Além disso, foi avaliado o desempenho da AAPF-IgG em comparação com a RIFI e ELISA e Kalazar Detect[®] para discriminar a soro reatividade de NI, INF e VAC. Os dados demonstraram que AAPF-IgG e ELISA apresentaram desempenho semelhante para detectar soro negatividade em cães NI (especificidades=100%), enquanto a AAPF-IgG mostrou melhor desempenho para excluir soropositividade no grupo VAC (especificidade=100%). O elevado valor encontrado para o índice Kappa sugere similar desempenho para AAPF-IgG e ELISA quando o diagnóstico de diferentes formas clínicas torna-se um desafio. Em relação à AAPF-IgG e Kalazar Detect[®], ambos apresentaram capacidade semelhante para excluir o diagnóstico de LVC em todos os cães VAC (especificidades=100%), entretanto, a AAPF-IgG apresentou um menor número de resultados falso negativos em cães INF, representando uma ferramenta mais confiável para o diagnóstico da LVC.

Além disso, a AAPF-IgG, aplicada na diluição do soro 1:8.192, apresentou elevado desempenho para discriminar cães INF de cães vacinados experimentalmente com outros imunobiológicos candidatos a imunoprofilaxia contra LVC e cães infectados com *Trypanosoma cruzi* e *L. braziliensis* (86% e 84% de especificidade, respectivamente).

Em conjunto, os resultados gerados nesse trabalho sugerem que a pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. chagasi*, por citometria de fluxo, apresenta-se como potente metodologia complementar para o diagnóstico da LVC, podendo subsidiar os órgãos responsáveis pelo controle da LV no Brasil na implementação de medidas de controle ora vigentes, contribuindo para utilização segura de imunobiológicos em programas nacionais de imunoprofilaxia e controle da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: AAPF-IgG, citometria de fluxo, diagnóstico sorológico, *Leishmania chagasi*, leishmaniose visceral canina, vacina.

Abstract

Seropositivity to *Leishmania sp* has been considered the “gold standard” laboratorial criterion to sign in the euthanasia of dog as recommended by the visceral leishmaniasis control program. However, the currently available methods (IFAT - indirect fluorescence antibody title and ELISA – enzyme linked immunosorbent assay) have some specific flaws mainly regarding their specificity to detect canine visceral leishmaniasis (CVL). Additionally, as an anti-CVL vaccine has become commercially available (Leishmune[®]) many other practical issues have become urgent, mainly due to the immunomediated post-vaccination seroconversion which has a direct impact on the interpretation of anti-CVL positive serology.

In this study was described the establishment of a flow cytometry based new method to detect anti-fixed *L. chagasi* promastigotes antibodies (FC-AFPA-IgM, FC-AFPA-IgA, FC-AFPA-IgG, FC-AFPA-IgG1, FC-AFPA-IgG2 and FC-AFPA-IgE) in sera samples from non infected dogs (NI; n=15), *L. chagasi* infected dogs (INF; n=29) and Leishmune[®] vaccines (VAC; n=21). The performance and applicability to differential diagnosis of CVL was available. The use of PFP=20% as a cut-off edge to segregate negative and positive results at sera dilutions 1:2,048 and 1:8,192 elect FC-AFPA-IgG applicable to the serological diagnosis of CVL with excellent performance.

FC-AFPA-IgG was validate throughout a blind study applied into a broader range of coded sera samples that have an outstanding performance to discriminate the serological reactivity of NI (n=25), INF (n=64) and VAC (n=62). Moreover, the performance of FC-AFPA-IgG was evaluated in parallel with IFAT, ELISA and Kalazar Detect[®] to discriminate the seroreactivity of NI, INF and VAC. The data demonstrated that ELISA and FC-AFPA-IgG showed similar performance to detect the seronegativity in 100% of NI, whereas FC-AFPA-IgG displayed better performance to exclude seropositivity in 100% of VAC. The high kappa agreement indexes observed suggested similar performance between these two serological tests when distinct clinical forms of CVL become a challenge. Despite both, FC-AFPA-IgG and Kalazar Detect[®] display similar ability to exclude CVL diagnosis for all Leishmune[®] vaccines, FC-AFPA-IgG leads to lower false negative results in INF, representing a more reliable tool for the differential diagnosis of CVL.

Furthermore, the FC-AFPA-IgG applied at sera dilution 1:8,192 showed a remarkable performance to discriminate INF from vaccinated dogs with experimental immunobiologics and other co-endemic canine infections in dogs infected with *Trypanosoma cruzi* and *L. braziliensis* (86% and 84% of specificity, respectively).

In conclusion, emphasize the applicability of FC-AFPA-IgG as an innovative methodology able to discriminate post-infection immunomediated seroreactivity from that triggered by prophylactic immunization with minor cross-reactivity with other relevant canine pathogens, which may contribute as a supplementary device for the CVL immunodiagnosis.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, FC-AFPA-IgG, flow cytometry, *Leishmania chagasi*, serologic diagnosis, vaccine.

Introdução

A soropositividade para *Leishmania* tem sido considerada o fator determinante para indicar a eutanásia de cães, como recomendado pelo programa de controle da leishmaniose visceral. Entretanto, as técnicas utilizadas atualmente, RIFI e ELISA, apresentam limitações, considerando principalmente a especificidade em detectar a LVC (leishmaniose visceral canina). Adicionalmente, com a introdução da vacinação anti-LVC em clínicas veterinárias particulares como medida preventiva de transmissão da LV em áreas endêmicas no Brasil, uma série de questões de ordem prática vem sendo levantadas pelos órgãos de saúde pública nacional, a maioria delas focadas no fato de que a soroconversão pós-vacinal passou a representar um problema adicional na interpretação dos resultados de sorologia positiva encontrada em inquéritos soroepidemiológicos.

Atualmente, a soropositividade é empregada como critério para indicar a eutanásia dos cães, como medida de controle da leishmaniose visceral, segundo normas do Ministério da Saúde. Considerando a baixa eficiência dos métodos sorológicos convencionais em discriminar infecção ativa da soroconversão imunomediada pela intervenção vacinal, a eutanásia dos cães soropositivos tem sido motivo de questionamentos e indignação da sociedade. Uma vez que a LVC encontra-se em franca expansão no país, com incidência estimada de cerca de 25.000 novos casos por ano no Brasil, concomitante ao aumento no contingente de cães vacinados, estimado para cerca de 100.000 animais em todo país, agrava-se ainda mais a utilização das técnicas sorológicas convencionais, dentro do programa de controle da leishmaniose visceral. Portanto, torna-se extremamente importante o desenvolvimento e a disponibilização de técnicas alternativas com elevada especificidade e sensibilidade, capazes de fornecer um diagnóstico sorológico confiável, que possibilite discriminar cães infectados de animais não infectados, vacinados ou portadores de outras doenças infecto-parasitárias.

A iniciativa de introduzir a citometria de fluxo como método complementar para análise sorológica em doenças parasitárias pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de pesquisas René Rachou/FIOCRUZ abriu novas perspectivas para o estabelecimento de técnicas diagnósticas empregando parasitos fixados como suporte antigênico. Este método foi adaptado e avaliado como ferramenta promissora para o diagnóstico sorológico da LVC.

Acredita-se que a pesquisa de anticorpos caninos anti-*L. chagasi*, por citometria de fluxo, poderá contribuir fundamentalmente para que os órgãos responsáveis pelo controle da LV no Brasil tenham mais segurança na implementação das medidas preventivas. Além disso, acredita-se que a metodologia possua potencial de aplicabilidade em conjunto com grupos

voltados para a pesquisa e/ou assistência aos laboratórios de referência que participam do programa nacional de controle da leishmaniose visceral ora vigente no Brasil.

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer inovações metodológicas para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

2.2. Objetivos Específicos

1 - Estabelecer procedimentos metodológicos para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA, IgG (IgG1, IgG2) e IgE anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF) por citometria de fluxo para diagnóstico da LVC;

A - Padronizar as diluições dos anticorpos secundários anti-IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE, variável inerente à reação antígeno-anticorpo, a serem empregadas na pesquisa de anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF) por citometria de fluxo;

B - Caracterizar o perfil de imunoglobulinas detectado pelas AAPFs;

C - Avaliar o desempenho das AAPFs no diagnóstico sorológico da LVC;

D – Avaliar a aplicabilidade da AAPF de melhor desempenho para o diagnóstico sorológico da LVC;

2 - Avaliar a performance da AAPF de melhor desempenho em comparação com técnicas RIFI e ELISA (sorológicas convencionais) e Kalazar Detect[®] (não convencional) no diagnóstico diferencial da LVC;

3 - Averiguar a reatividade sorológica por meio da AAPF de melhor desempenho empregando amostras de soros de cães vacinados com outros imunobiológicos candidatos à imunoprofilaxia da LVC;

4 - Analisar o grau de reatividade cruzada da AAPF de melhor desempenho em amostras de soros de cães portadores de outras doenças infecto-parasitárias;

5 - Determinar a sensibilidade e especificidade da AAPF de melhor desempenho, diante de um panorama diversificado de amostras constituindo uma população inquérito artificial, representativa do panorama de amostras destinadas ao diagnóstico sorológico da LVC.

Revisão da Literatura

As Leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida. O gênero *Leishmania* compreende parasitos heteroxênicos de hospedeiros mamíferos, dentre eles homens, cães e roedores. Os insetos vetores são flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (LAINSON & SHAW, 1987).

As leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, estimando-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de *Leishmania* spp. A incidência anual de novos casos no mundo encontra-se em torno de dois milhões (1,5 milhões de leishmaniose tegumentar - LT e 500.000 de leishmaniose visceral - LV). Como em outras doenças tropicais, as leishmanioses estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e a mudanças ambientais humanas que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis aos insetos vetores infectados (WHO, 2003). Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representa um problema de saúde pública emergente (ASHFORD, 2000).

No ciclo biológico, os parasitos sob a forma de amastigotas internalizados em macrófagos na derme de hospedeiros vertebrados são ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sangüíneo e transformam-se em promastigotas que se multiplicam e passam por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, ocorrendo adesões ao tubo digestivo do inseto. O final deste processo, denominado de metaciclogênese culmina no aparecimento de formas promastigotas metacíclicas infectantes que migram para o tubo digestivo anterior. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado. Neste momento, os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos, onde, após transformarem em formas amastigotas, resistentes à ação das enzimas lisossomais, residem e se multiplicam no interior de fagolisossomos (CHANG, 1983). A intensa proliferação das amastigotas dentro do macrófago favorece o rompimento da membrana celular e a liberação de parasitos, os quais infectam rapidamente outros macrófagos, protegendo-se da ação do complemento e de anticorpos, podendo iniciar nova fase de multiplicação binária.

As leishmanioses podem apresentar um amplo espectro de formas clínicas, desde uma lesão cutânea localizada, com cura espontânea a uma doença sistêmica generalizada. As diferentes manifestações das leishmanioses clínicas dependem de vários fatores tais como: espécie dos vetores, *Leishmania* envolvida e sua virulência e aspectos relacionados ao perfil

nutricional, genético e imunológico do hospedeiro. As leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas denominadas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral, sendo que no Novo Mundo as três primeiras formas são agrupadas em uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA) (MARZOCHI, 1992). A LTA pode ser causada por várias espécies de *Leishmania* incluindo *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (HERWALDT, 1999). A forma clínica visceral é causada pelas espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No Novo Mundo, a *L. chagasi* é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV). Estudos demonstraram que a *L. infantum* e *L. chagasi* possuem características bioquímicas e moleculares muito semelhantes (MAURÍCIO *et al.*, 1999; MAURÍCIO *et al.*, 2000), o que sugere que estas espécies possam ser apenas uma. Em função desse fato, SHAW (2006) sugere a denominação *L. (L.) infantum chagasi* para o agente etiológico da LV no novo mundo. No presente estudo, optou-se por utilizar *L. chagasi*, uma vez que ainda não houve até o momento uma definição oficial do comitê internacional de taxonomia e sistemática de parasitos a respeito dessa questão.

A *L. chagasi* possui um tropismo tecidual, estabelecendo-se primariamente na pele e posteriormente em órgãos viscerais como o fígado e baço, bem como na medula óssea. A lesão primária na pele é raramente observada e uma porcentagem substancial de infecções parecem ser assintomáticas ou auto-resolutivas (JAFFE & GREENBLAT, 1991). Já a doença ativa, conhecida como LV clássica, quando não tratada, pode levar ao óbito. Em geral, pacientes portadores da LV clássica apresentam febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, linfadenopatia, anemia e leucopenia (DEANE e DEANE, 1964; GRIMALDI Jr., 1993; BADARO *et al.*, 1986).

Em relação aos reservatórios da LV humana no velho mundo, vale a pena enfatizar a ocorrência de ciclo antropofílico na Índia, onde o homem é o hospedeiro mamífero encontrado infectado por *L. donovani*. A infecção parece ocorrer num ciclo entre os seres humanos sem a presença relevante de um animal reservatório para *L. donovani* (PALATNIK DE SOUZA *et al.*, 2001). No ciclo rural e urbano da *L. chagasi*, os hospedeiros vertebrados reconhecidos como reservatórios, à semelhança da *L. infantum*, estão limitados a mamíferos pertencentes à família Canidae (DEANE & DEANE, 1954; DA SILVA *et al.*, 2001). No ciclo silvestre da *L. chagasi*, as raposas *Dusicyon ventulus*, no nordeste do Brasil (DEANE & DEANE, 1962), e *Cercocyon thous*, na região norte do Brasil (LAINSON *et al.*, 1969) são,

até o momento, hospedeiros silvestres. No caso do ciclo urbano, o cão é o principal hospedeiro doméstico, reservatório para infecção humana (MOLANO *et al.*, 2003) e vem sendo apontado como o mais importante reservatório doméstico para a *L. chagasi*, considerando, principalmente o intenso parasitismo cutâneo que ocorre nestes animais e o grande número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (DEANE & DEANE, 1955; KEENAN *et al.*, 1984; ABRANCHES, 1991; COSTA *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006). Sendo assim, os cães infectados por *L. chagasi* representam uma abundante fonte de infecção para os hospedeiros invertebrados, demonstrando a sua importância como elo na manutenção da transmissão da infecção para o homem. O calazar canino tem sido considerado mais importante que a doença humana no âmbito epidemiológico, pois além de ser mais prevalente, as áreas endêmicas apresentam grande número de cães infectados que podem transmitir o parasito aos insetos vetores (ASHFORD, 1996).

Em relação aos mecanismos patológicos e imunológicos da LVC, a presença de *Leishmania* no interior das células do sistema fagocítico mononuclear determina a visceralização da doença resultando em uma hipertrofia e hiperplasia do sistema macrofágico das vísceras, o que caracteriza a hepatoesplenomegalia e alterações na medula óssea característicos da doença (KENAN *et al.*, 1984; GIUNCHETTI *et al.*, 2008a,b). As células reticulares e macrófagos aumentam consideravelmente em número e seu citoplasma se torna abundante, repleto de parasitos. O baço aumenta de volume, sua cápsula se torna mais espessa podendo ocorrer áreas de infarte (ALVAR *et al.*, 2004). Outros órgãos podem apresentar lesões decorrentes da deposição de imunocomplexos circulantes de IgM e IgA, como rins e pulmão, estabelecendo um quadro de glomerulonefrite e pneumonite (MARGARITO *et al.*, 1998; MANCIANTI *et al.*, 1989). Na medula óssea, os macrófagos parasitados substituem o tecido hematopoiético levando ao comprometimento dos linfonodos e imunodepressão severa. Assim, a anemia e leucopenia são achados freqüentes (BRANDONISIO *et al.*, 1986; BURILLO *et al.*, 1994).

A presença de lesões na pele constitui um aspecto patológico característico da LVC. Há presença de grandes quantidades de macrófagos parasitados além de hiperqueratose, infiltrados inflamatórios do tipo mononuclear e necrose de tecido conjuntivo (FERRER *et al.*, 1988; GIUNCHETTI *et al.*, 2006).

No âmbito da resposta imune humoral, a atividade exacerbada dos linfócitos B leva a formação de grandes quantidades de imunocomplexos circulantes, que consistem em antígenos de *leishmania*, imunoglobulinas G (IgG) e frações do complemento (LUCENA, *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2006).

MANCIANTI *et al.* (1988), baseado em exame clínico de cães naturalmente infectados com *L. infantum* na Ilha de Elba, Itália, classificaram estes animais em três formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*; nos oligossintomáticos ocorrem até três dos sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania*. Os cães sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos característicos da infecção, entre eles alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pêlo.

O percentual de cães assintomáticos em uma área endêmica tem importante implicação na saúde pública, pois mesmo assintomáticos são fonte de infecção para os flebotômíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de transmissão da doença (MOLINA *et al.*, 1994).

A infectividade da *L. chagasi* depende da virulência da cepa, da abundância de reservatórios do parasito na área de insetos vetores específicos, bem como a susceptibilidade de hospedeiros. A susceptibilidade a infecção por *L. chagasi* foi estudada em diversas linhagens de hamster, concluindo-se que a resistência ao parasitismo é geneticamente determinada (BRADLEY *et al.*, 1979). ALTET *et al.* (2002) descreveram um gene de resistência de macrófago denominado MRAMP 1 em cães portadores de LVC. Entretanto, os mecanismos de resistência ou susceptibilidade ainda não foram completamente esclarecidos, principalmente considerando o envolvimento de eventos imunológicos individuais.

Os trabalhos sobre a infecção canina por parasitos do gênero *Leishmania* abordam em sua maioria basicamente dois aspectos: o cão como modelo experimental para o estudo da LV e investigações inerentes ao cão como hospedeiro/reservatório visando o desenvolvimento de programas de controle da LV (ABRANCHES *et al.*, 1991; DEPLAZES *et al.*, 1995; HOMMEL *et al.*, 1995; SANTOS-GOMES *et al.*, 2000).

Os programas que buscam o desenvolvimento de medidas profiláticas e de controle para as doenças parasitárias baseiam-se, geralmente, nas condições epidemiológicas em que as mesmas se desenvolvem. O Brasil é o único país endêmico para LV que regularmente conduz um programa epidemiológico e profilático no combate à doença (PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001). O programa brasileiro de controle da LV é composto de três medidas: diagnóstico e tratamento dos casos humanos, borrifação com inseticidas para eliminação do vetor e identificação e eliminação dos cães infectados (MS, 2006). A recomendação de sacrifício dos cães está respaldada na consideração de que o cão é um importante reservatório da doença para o homem e na demonstração de que a doença canina precede a doença

humana, sendo a primeira um dos responsáveis pelo avanço tanto espacial como temporal da segunda (ALVES *et al.*, 2004). Na epidemia de LV, em Belo Horizonte, essa associação foi demonstrada por OLIVEIRA *et al.* (2001). Entretanto, o sacrifício dos animais soropositivos provoca profundo impacto e indignação dos proprietários, em face ao papel que o cão representa na sociedade atual, não só no valor afetivo como também zootécnico além da prática de segurança da população. Segundo COSTA *et al.* (2001) a eliminação dos cães domésticos apresenta o menos importante suporte técnico científico entre as três estratégias de controle devido: a falta de correlação espacial entre a incidência cumulativa de LV e a soroprevalência canina (MAGUIRE *et al.*, 1997), a pouca eficiência da eliminação de cães quando comparada às estratégias de controle vetorial e de suplementação alimentar na infância (DYE, 1996; NASCIMENTO, 1996), a velocidade de reposição da população canina (BRAGA *et al.*, 1998) e a baixa eficiência dos testes sorológicos utilizados em inquéritos caninos (DYE *et al.*, 1993).

Uma alternativa para evitar a eutanásia dos animais acometidos pela LVC seria a busca de medidas terapêuticas ou imunoproláticas (GENARO *et al.*, 1993; MARZOCHI *et al.*, 1985).

O emprego de medidas terapêuticas teria como finalidade a recuperação dos cães infectados o que poderia auxiliar no controle profilático da infecção humana (ALENCAR, 1959). O tratamento dos cães com LVC pode ser considerado em diferentes pontos de vista. Para os clínicos veterinários, o sucesso na terapia consiste em supressão dos sinais clínicos da doença. Para os parasitologistas, na cura do cão e na eliminação dos parasitos do organismo do animal (BANETH & SHAW, 2002). Por outro lado, segundo os imunologistas, o decréscimo dos títulos de anticorpos e o restabelecimento da imunidade celular específica significam uma boa resposta terapêutica (GUARGA *et al.*, 2002). Por fim devemos também considerar a visão dos epidemiologistas que pensam que o tratamento dos cães deveriam impedir a infecção para os insetos vetores (ALVAR *et al.*, 2004). Os protocolos terapêuticos comumente empregados no tratamento da LVC apresentam resultados controversos. Assim, MORENO *et al.* (1999) questionam se o tratamento canino leva a cura parasitológica ou apenas uma melhora do estado clínico e imunológico.

Diversos autores demonstraram que os tratamentos através de drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos, os antimoniais, apresentam baixa eficácia em produzir cura parasitológica no cão (DEPLAZES *et al.*, 1992; MORITZ *et al.*, 1999; RIEIRA *et al.*, 1999). Segundo MARZOCHI *et al.* (1985), esse fato poderia ser explicado em parte pela alta excreção renal do antimônio, por diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados. A associação do alopurinol ao

antimonial demonstrou uma potencialização da remissão dos sinais clínicos, mas não foi capaz de proporcionar cura parasitológica (MARTINEZ *et al.*, 1988; ALVAR *et al.*, 1994; FERRER *et al.*, 1995, BENETH & SHAW, 2002). Cabe ressaltar que a indução de tolerância, a toxicidade e o elevado custo dos fármacos também constituem limitações sérias para o tratamento da LVC (GRAMICCIA., 1992).

Sendo assim, o tratamento da LVC ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo.

Considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz a WHO não recomenda e atualmente o MS condena o uso de antimoniais e de outras drogas usadas na quimioterapia humana para o tratamento da LVC. Considerando ainda que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, a aplicação de medidas imunoproláticas apresenta-se como importante fator a ser considerado para controlar a infecção canina. Para MARZOCHI *et al.* (1985), a possibilidade de aplicação de uma vacina para o controle da LVC seria uma importante medida sanitária, economicamente viável, uma vez que tal vacina poderia ser aplicada juntamente com a vacina anti-rábica, cujo programa no Brasil tem sido bem sucedido. Segundo DUNAN *et al.* (1989), no caso da LVC, a imunoprolaxia apresenta como uma das únicas alternativas para o controle da infecção canina. Alguns estudos já foram realizados visando o desenvolvimento de vacinas anti-LVC, porém, estes apresentaram resultados controversos ou pouco conclusivos, o que tem incentivado a busca de novos imunógenos que possam proporcionar uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LVC.

Os imunobiológicos empregados em intervenções vacinais anti-LVC podem ser agrupados em três classes, que representam diferentes gerações de antígenos vacinais no que se refere ao processo de produção. A primeira geração, que se inicia com os primeiros estudos de vacinação contra a leishmaniose cutânea humana por SALLES-GOMES (1939) e PESSOA *et al.* (1940) e se estende até os dias atuais, baseia-se na utilização de preparações antigênicas tipicamente constituídas por antígenos brutos, obtidos por meio de técnicas de atenuação ou fixação dos agentes etiológicos de interesse. A partir dos anos 90, com o avanço das técnicas de biologia molecular começaram a surgir os primeiros candidatos constituídos por subunidades definidas, denominados antígenos recombinantes que marcariam a segunda geração de vacinas juntamente com antígenos purificados de subunidades protéicas ou glicoprotéicas. Segundo SANTOS *et al.* (2002), as vacinas de segunda geração incluíram ainda, bactérias ou vírus recombinantes que carregariam genes que codificariam antígenos de *Leishmania*, além de utilização de vacinas vivas, com *Leishmania* geneticamente modificada, e que causaria infecção abortiva no homem (CRUZ *et al.*, 1991). No final dos anos 90, com o

avanço dos estudos do genoma de diferentes agentes infecciosos, começaram a surgir vacinas de terceira geração (vacinas de DNA), constituídas de genes que codificariam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos que se apresentam com aplicação promissora no controle de diversas infecções (XU *et al.*, 1994; ULMER *et al.*, 1996; HANDMAN *et al.*, 2000).

Os estudos empregando candidatos à vacina para leishmaniose no âmbito dos imunobiológicos de primeira geração têm mostrado resultados importantes. Na Europa, foi desenvolvida uma vacina, constituída de uma preparação parcialmente purificada e liofilizada derivada de *L. infantum*, que quando aplicada em modelo experimental murino foi capaz de proteger os camundongos contra um desafio com *L. mexicana* e *L. major* (MONJOUR *et al.*, 1985; FROMMEL *et al.*, 1988), entretanto ao ser empregado em cães falhou no quesito proteção. Dentre inúmeros trabalhos que buscam o desenvolvimento de uma vacina de primeira geração contra a LVC, no Brasil MAYRINK *et al.* (1996). realizaram um estudo no qual os cães, mantidos em canil, foram imunizados com antígeno bruto sonicado de *L. braziliensis*, associado ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante. Os animais foram posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Ficou demonstrado neste estudo que os cães que receberam vacina constituída de *L. braziliensis* tornaram-se protegidos contra desafio com cepa heteróloga de *L. chagasi*. Estes resultados estimularam a realização de dois ensaios vacinais em população de cães no município de Montes Claros, MG, onde a LV é endêmica. No estudo de campo foi observado, através de ensaios de linfoproliferação *in vitro*, que o desenvolvimento da LVC estava associado à inabilidade de montar uma resposta linfoproliferativa *in vitro* a antígenos de *Leishmania*.

Recentemente o laboratório Fort Dodge[®] adquiriu a patente de uma vacina de segunda geração contra a LVC, denominada Leishmune[®]; sendo esta já licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, disponível para comercialização em clínicas veterinárias, com perspectiva de constituir ferramenta eficaz para o controle da LVC. A Leishmune[®] foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Dr^a. Clarissa Palatnik de Sousa, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esta vacina é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *L. donovani* e o adjuvante saponina. Em 1996 começaram os ensaios para avaliar a eficácia da vacina na área endêmica de São Gonçalo do Amarante-RN (estudos de fase III). Após dois anos, 33% dos animais controles desenvolveram sinais clínicos de leishmaniose visceral ou doença fatal, enquanto apenas 8% dos cães vacinados mostraram sinais moderados da enfermidade, sem nenhum registro de óbito neste grupo. Estes resultados mostraram 92% de proteção contra a LVC no grupo vacinado, o que correspondeu a 76% de eficácia vacinal (DA SILVA *et al.*,

2001). Os resultados obtidos e publicados, até o momento, colocam a Leishmune[®] como a primeira vacina mundial que promove longo e significativo efeito protetor em cães, contra a LVC. Essa vacina foi apresentada à comunidade médico veterinária e a sociedade em geral, durante o XXIV Congresso Brasileiro da Anclivepa, em Belo Horizonte, em agosto de 2003. Considerada atualmente como a grande esperança da comunidade de clínicos veterinários e proprietários de cães quanto ao uso desta nova ferramenta para a prevenção e controle da doença canina e humana. Embora os trabalhos tenham demonstrado eficácia vacinal da Leishmune[®], com altos índices de proteção, ainda são escassos os estudos que abordam os eventos imunológicos pós-vacinais importantes para o estabelecimento de critérios de identificação dos cães imunizados.

Nesse contexto, vários grupos de pesquisa têm se empenhado em desenvolver outros imunobiológicos anti-LVC. GIUNCHETTI *et al.* (2007) e GIUNCHETTI *et al.*, (2008) demonstraram forte resposta imunogênica de duas novas vacinas (LBSap e LBSapSal) a primeira composta por antígenos de proteínas provenientes de *L. braziliensis* associado a saponina e a segunda por proteínas de *L. braziliensis*, extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* e o adjuvante saponina. Embora outros estudos sejam necessários, os resultados desse trabalho apontam o potencial dessas vacinas como candidatas a imunoprofilaxia anti-LVC.

Uma vez que as ações profiláticas indicadas para o controle da LV no Brasil recomendam a detecção e eliminação de cães sorologicamente positivos, a soroconversão pós-vacinal traria um agravamento para a indicação da eutanásia de cães soropositivos, a qual vem sendo extremamente questionada por especialistas da área. Considerando a baixa eficiência dos métodos sorológicos convencionais em discriminar a infecção ativa da soroconversão pós-vacinal, a eutanásia dos cães soropositivos é motivo de grande indignação da sociedade. Nesse contexto, um resultado sorológico positivo pelos métodos convencionais não garantiria infecção por *L. chagasi*, tendo em vista que a soropositividade em métodos convencionais poderia ser inerente tanto de infecção ativa quanto da intervenção vacinal com a Leishmune[®] (ANDRADE *et al.*, 2007; 2008).

Para o diagnóstico da LVC, as suspeitas iniciais baseiam-se na presença de sinais e clínicos, muitas vezes inespecíficos, comuns a outras infecções caninas (FERRER, 1995). Além disso, grande número de animais infectados não apresenta qualquer alteração clínica (MANCIANTI *et al.*, 1986; BRANDONISIO *et al.*, 1992), o que compromete o diagnóstico clínico.

O diagnóstico conclusivo depende do achado do parasito, seja pela demonstração direta em lâminas fixadas, após cultivo em meios artificiais ou pela detecção do DNA do

parasito nos tecidos alvos do parasito, como fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pele. A imunohistoquímica para identificação específica de amastigotas do parasito (FERRER *et al.*, 1988; TAFURI *et al.*, 2004) e a reação da polimerase em cadeia para a detecção de DNA (HARRIS *et al.*, 1998) de *Leishmania* tem sido usados e considerados de alta sensibilidade.

O diagnóstico parasitológico, embora seja um método de certeza, apresenta várias desvantagens, pois a punção e/ou biópsia de órgãos é um método invasivo e traumático, podendo causar sérios danos para os animais (ALVAR *et al.*, 2004). Além disso, a observação de parasitos torna-se mais difícil quando a carga parasitária for baixa (ASHFORD *et al.*, 1995; REIS *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2006a).

Os métodos sorológicos têm seu uso mais facilitado, devido, entre outros motivos, a excessiva produção de anticorpos no decurso da doença (BRAY, 1980). Sendo assim, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* usando técnicas sorológicas constituem ferramentas essenciais no diagnóstico de doença canina (DEPLAZES *et al.*, 1995; GOSTTSTEIN *et al.*, 1988).

Várias técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico sorológico da LV, tais como a reação de fixação do complemento (HOCKMEYER *et al.*, 1984), hemaglutinação direta (HARITH *et al.*, 1986), hemaglutinação indireta (BRAY E LAINSON, 1967), teste de aglutinação direta (DAT) (ALLAIN E KAGAN, 1975; HARITH *et al.*, 1986), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (BADARÓ *et al.*, 1986), ensaio imunoenzimático (ELISA) (BADARÓ *et al.*, 1986), entre outras.

O DAT consiste em um teste simples que apresenta alto índice de concordância com a ELISA. Uma limitação dessa metodologia, entretanto, é o tempo para sua execução, uma vez que o tempo de incubação das amostras é de 18 horas (OSKAM *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 2007).

A reação de fixação do complemento foi amplamente utilizada para o diagnóstico da LVC durante muito tempo, mas posteriormente substituída por técnicas mais eficazes (COSTA *et al.*, 1991; MICHALICK *et al.*, 1992).

Estudos demonstraram que o western blot tem fornecido maior sensibilidade que outras técnicas sorológicas (AISA *et al.*, 1998), entretanto, essa técnica requer maior qualificação de profissionais e laboratórios mais sofisticados, o que limita sua utilização na rotina.

SCHALLING *et al.* (2004) descreveram o desenvolvimento de um teste rápido baseado em antígeno bruto de *L. infantum* que apresentou desempenho comparado ao DAT.

Atualmente, no Brasil, o diagnóstico sorológico para a LVC baseia-se na pesquisa de anticorpos IgG através de métodos convencionais (RIFI e ELISA-antígeno bruto). A RIFI tem

sido considerada rápida e prática, porém as variações de sensibilidade podem ocasionar uma baixa estimativa do número de casos devido a grande quantidade de falsos negativos (BERRAHAL *et al.*, 1996; ALVAR *et al.*, 2004) dificultando o diagnóstico de cães positivos em estágios iniciais da doença, subestimando a taxa de infecção por *Leishmania* na população canina de áreas endêmicas. Embora estudos tenham demonstrado que o ELISA seja uma técnica mais sensível, sua especificidade depende do antígeno empregado (BADARÓ *et al.*, 1986; MANCIANTI *et al.*, 1996). A utilização de antígenos recombinantes (K39 e K26) tem aumentado consideravelmente a especificidade dessa técnica (BURNS *et al.*, 1993; SCALONE *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; ROSÁRIO *et al.*, 2005), entretanto reações cruzadas ainda podem ocorrer (BADARÓ *et al.*, 1996).

Segundo LIRA *et al.* (2006) a RIFI (Biomanguinhos/FIOCRUZ) apresentou sensibilidade de 68% e especificidade de 87.5% e o ELISA (Biomanguinhos/FIOCRUZ) sensibilidade de 72% e especificidade de 75%, mas o desempenho de ambos os testes não apresentou diferença estatística. Esses autores sugerem que as técnicas deveriam ser utilizadas em conjunto para reduzir o número de resultados falso negativos.

Cabe ressaltar que o RIFI e ELISA, além de apresentarem limitações de eficiência na detecção de reatividade em cães que possuem baixos títulos de anticorpos, na maioria das vezes cães assintomáticos (BRITO *et al.*, 2000; CHIARI *et al.*, 1973a; CHIARI *et al.*, 1973b; GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 1990; MOLL *et al.*, 1996; VALLI *et al.*, 1999; WALTON *et al.*, 1972), também são incapazes de discriminar a reatividade sorológica de cães infectados daquela observada em animais vacinados com a Leishmune[®] (ANDRADE *et al.*, 2007).

Nesse panorama atual, torna-se extremamente importante o desenvolvimento e a disponibilização de técnicas alternativas com elevada especificidade e sensibilidade capazes de fornecer um diagnóstico diferencial mais confiável, que possibilite discriminar cães infectados de animais vacinados.

Um ponto importante consiste na avaliação correta de um novo teste diagnóstico, que constitui um tema de interesse da investigação clínica e epidemiológica. A validade de um teste refere-se a quanto, em termos individuais, um teste é útil para diagnosticar um evento. Para avaliar um novo teste muitos índices podem ser utilizados, tais como: sensibilidade, especificidade, valores preditivos do teste, acurácia, índice J de Youden, razões de verossimilhança entre outros. A análise desses índices é extremamente importante para avaliar a utilidade clínica do teste.

Portanto, considerando a abordagem acima, o objetivo desse trabalho foi propor inovações metodológicas para o diagnóstico sorológico da LVC. Acredita-se que essa

proposta além de pertinente, poderá representar importante instrumento para os órgãos responsáveis pelo controle da LV no Brasil.

Material e Métodos

4.1. Animais Experimentais

Neste trabalho foram utilizados soros de cães (*Canis familiaris*), não infectados, naturalmente infectados com *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas da doença, vacinados com Leishmune[®] e outros imunobiológicos candidatos a imunoprofilaxia contra LVC e infectados com outros patógenos caninos. A seguir estes grupos serão descritos detalhadamente.

Cães Não infectados (NI)

Foram utilizados 25 cães de ambos os sexos, adultos, com idade variando entre dois a seis anos, sem raça definida apresentando exames sorológicos (RIFI e ELISA) e parasitológico (pesquisa de amastigotas em esfregaços por aposição de tecidos em lâmina corada pelo Giemsa) negativos para LVC. Esses cães foram nascidos, criados e mantidos no canil do Laboratório de Leishmanioses do departamento de Parasitologia ICB-UFMG. Antes da chegada dos animais, as celas foram submetidas ao “vazio sanitário”, que consistiu na desinfecção das mesmas através de lavagens com solução de hipoclorito a 1%. Foi mantida inspeção periódica do ambiente externo e desinsetização trimestral com piretróide (k-otrine) para impossibilitar a presença de flebotomíneos. Os animais foram submetidos à coleta de fezes para o diagnóstico de infecções por protozooses ou helmintíases intestinais. Em seguida, receberam tratamento anti-helmíntico de largo espectro (Endal Plus[®]), composto de febantel, palmoato de pirantel e praziquantel, além de banho com inseticida de ação ectoparasitária (Butox[®], Químio). Posteriormente foram identificados em fichas, conforme suas características físicas (sexo, tamanho, cor, pelagem, etc.), numerados e mantidos em quarentena. Durante este período os cães foram vistoriados diariamente e examinados semanalmente e após 15 dias foi realizado novo exame coproparasitológico, para certificarmos da eficácia do tratamento anti-helmíntico, bem como análise ectoscópica, para avaliar a eficiência da ação do inseticida. Os animais foram mantidos no canil do ICB/UFMG, com água potável e ração balanceada (Kinus[®] - Braswey-SA), fornecida pela “*ad libitum*”. Estes animais fizeram parte da Tese de Doutorado do Prof. Alexandre Barbosa Reis (Reis, 2001) e de Mestrado de Alcina Vieira de Carvalho Neta e os soros fazem parte da soroteca de cães não infectados do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do CPqRR/FIOCRUZ.

Cães infectados (INF)

Foram selecionados 64 cães de ambos os sexos, adultos, com idade variando entre dois a seis anos, sem raça definida apresentando exames sorológicos (RIFI) e parasitológico (pesquisa de parasito em lâmina) positivos para LVC. Foram cedidos pelo Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – MG e mantidos no canil do Laboratório de Leishmanioses do departamento de Parasitologia ICB-UFMG. Foram submetidos aos mesmos protocolos de tratamento descrito anteriormente para os animais não infectados. Concluída a quarentena, os cães foram então classificados clinicamente de acordo com a ausência ou presença de sinais da infecção, em assintomáticos (n=17), oligossintomáticos (n=22) ou sintomáticos (n=25), segundo MANCIANTI *et al.*, 1989. Estes animais fizeram parte da Tese de Doutorado do Prof. Alexandre Barbosa Reis (Reis, 2001) e de Mestrado de Alcina Vieira de Carvalho Neta e os soros fazem parte da soroteca de cães infectados com *L. chagasi* do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do CPqRR/FIOCRUZ.

Cães vacinados com Leishmune[®] (VAC)

Foram utilizados 21 cães da raça Pastor Alemão de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 meses, apresentando exames sorológicos (RIFI e ELISA) negativos para LVC. Os animais pertencem ao plantel do canil da Polícia Militar de Minas Gerais – 4ª Companhia de Policiamento com cães de Belo Horizonte / MG.

Os cães foram mantidos em baias individuais com água potável e ração balanceada (Purina[®]) “*ad libitum*” e assepsia diária, sendo aplicada em todas as baias borrifação de solução de hipoclorito de sódio a 1%. Rotineiramente os animais receberam banhos com sabonete e xampu.

Os cães foram submetidos a exame coproparasitológico pelo método de sedimentação espontânea (HPJ) para o diagnóstico de protozooses ou helmintoses intestinais e, ainda, coleta de sangue para triagem sorológica (RIFI) para o diagnóstico de leishmaniose e babesiose. Os animais foram submetidos ao tratamento com anti-helmíntico de largo espectro composto de palmoato de pirantel e praziquantel. Para obter uma ação anti-ectoparasitária, os animais foram tratados com o piretróide cipermetrina. Todos os cães foram também vacinados contra parvovirose, cinomose, adenovirus, hepatite, adenovírus tipo 2, parainfluenza, coronavirose e leptospirose canina (Recombitek[®] - Merial, Inc - USA). Além disso, todos os animais

receberam vacina Pneumodog[®] (Merial, Inc - USA) contra tosse canina e vacina Rabisin-i (Merial, Inc - USA) anti-rábica.

Anterior à vacinação com Leishmune[®] foram realizados hemogramas e testes sorológicos através da RIFI e ELISA para leishmaniose, utilizando Kits produzidos por BioManguinhos-Fiocruz, sendo soro-negativos para LVC, todos os animais que participaram do estudo. Os cães foram submetidos à vacinação com a Leishmune[®], desenvolvida pela Dr^a. Clarissa Palatnik e colaboradores da UFRJ e atualmente comercializada pela Fort Dodge[®] (Campinas - SP / Brasil). Esta vacina é apresentada na forma de uma fração liofilizada e uma fração líquida que foram misturadas no momento do uso. Após homogeneização das frações o produto foi administrado em doses de 1mL via subcutânea, sendo aplicada em três doses com intervalo de 21 dias entre cada dose, como recomendado pelo fabricante.

Foram utilizados também 41 cães, sem raça e sexo definidos, provenientes de Campinas, São Paulo, submetidos ao mesmo protocolo vacinal Leishmune[®], descrito anteriormente gentilmente cedidos pela Dra Ingrid Menz da Fort Dodge[®].

Cães vacinados experimentalmente com vacinas não comercializadas

Foram utilizados 20 cães sem raça definida, com idade média de sete meses, de ambos os sexos, mantidos no canil da Universidade Federal de Ouro Preto submetidos aos mesmos protocolos de tratamento descrito anteriormente para os animais não infectados. Os cães foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (LB): formado por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg de antígeno/dose, diluído em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de trinta dias.

- Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina (LB+SAP): formado por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600µg de antígeno/dose associado ao adjuvante, 1mg saponina/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de trinta dias.

- Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao antígeno de saliva de *L. longipalpis* (LB+SAL): formado por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600µg de antígeno/dose associado ao antígeno composto por cinco ácidos de extrato de glândula salivar/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de trinta dias.

- Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina e ao co-adjuvante saliva de *L. longipalpis* (LB+SAP+SAL): formado por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600µg de antígeno/dose associado ao adjuvante, 1mg saponina/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de trinta dias.

Cabe ressaltar que a obtenção do antígeno vacinal bem como a preparação das vacinas descritas acima foram realizados por pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, descritos por (GIUNCHETTI *et al.*, 2007) sob supervisão do Prof. Alexandre Barbosa Reis.

Foram utilizados também 12 cães da raça Pastor Alemão de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 meses, apresentando exames sorológicos (RIFI e ELISA) negativos para LVC. Os animais pertencem ao plantel da Polícia Militar de Minas Gerais e foram submetidos aos mesmos tratamentos descritos anteriormente para os cães vacinados com Leishmune[®]. Esses animais foram vacinados com a vacina composta pela cepa *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) associada ao adjuvante o BCG (Bacilo Calmette-Guérin, cepa Moreau Rio de Janeiro (LA+BCG)). Essa vacina foi produzida pelo Laboratório de Leishmanioses da Universidade Federal de Minas Gerais e o protocolo vacinal consistiu no seguinte esquema: os cães receberam na 1^o dose 0,6mL da vacina (360µg de proteína) mais 400µg de BCG, na segunda dose, a mesma concentração da vacina mais 300µg BCG e na 3^o dose, novamente a mesma dose da vacina associada a 200µg de BCG. As doses foram aplicadas via subcutânea e tiveram intervalos de 21 dias entre elas.

Cães infectados com outros patógenos

Foram utilizados cães experimentalmente infectados, sem raça definida, idade variável, ambos os sexos, com *Erlichia. canis* (Ec=4) e *Toxoplasma. gondii* (Tg=5), provenientes do canil da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma. cruzi* (Tc=7), sem raça definida, idade variável, ambos os sexos provenientes do canil da Universidade Federal de Ouro Preto e cães naturalmente infectados com *Leishmania. braziliensis* (Lb=6), sem raça definida, idade variável, ambos os sexos provenientes do Rio de Janeiro.

4.2. Procedimento de Bioética

Conforme a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), com número de protocolo 08/02 (Anexo A), e em concordância com a Lei n.º. 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas práticas Didático-Científicas de conduta de pesquisa em animais, o material biológico foi coletado. O sangue periférico foi colhido da veia cefálica ou jugular. Todo procedimento foi realizado após desinfecção do local e assepsia com álcool iodado a 70%.

4.3. Pesquisa de *Leishmania* em Lâminas Coradas

Para a pesquisa dos parasitos em cães NI e INF foram confeccionados esfregaços de medula óssea em lâmina, sendo essas amostras fixadas por metanol e coradas pelo método de Giemsa, para posterior leitura em microscópio ótico de luz (aumento de 100X). A leitura das lâminas foi realizada por três observadores de forma independente os quais observaram os campos da lâmina até que fosse encontrada uma forma amastigota de *L. chagasi*. Independentemente da variabilidade encontrada entre os analistas, foram consideradas positivas as lâminas em que pelo menos um dos analistas observou a presença do parasito intra ou extracelular.

4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Na Reação de Imunofluorescência Indireta foi utilizado o kit comercial fornecido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ/RJ) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. As reações foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou FIOCRUZ, seguindo recomendações do fabricante conforme procedimentos descritos abaixo.

Para o procedimento da RIFI, lâminas foram preparadas, depositando-se 10µL de antígeno de *Leishmania* sobre as áreas demarcadas. Em seguida retirou-se todo o excesso de líquido deixando-se apenas uma película de antígeno recobrando a área. Procedeu-se à secagem em estufa à temperatura de 37°C e o material foi estocado à -20°C até o momento do uso. Foram realizadas diluições seriadas do soro (1:40 a 1:640) em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) e, em seguida 10µL de cada diluição foram transferidos para os respectivos compartimentos das lâminas. Em seguida, as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes, sendo submetidas à incubação de 10 minutos em PBS durante cada etapa de lavagem.

Após a secagem, as lâminas foram recobertas com conjugado anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:100 em PBS contendo azul de Evans, e

submetidas à nova incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes, sendo submetidas à incubação de 10 minutos em PBS durante cada etapa de lavagem. Em seguida, as lâminas foram lavadas uma vez, sendo submetidas à incubação de 10 minutos água destilada. Após a secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e cobertas com lamínula para observação ao microscópio de fluorescência com objetiva de 40X. Os resultados foram expressos como positivos até a última diluição em que se observou a fluorescência do parasito. Com base nas normas do Ministério da Saúde do Brasil, todos os cães que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:40 foram considerados positivos.

4.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado o kit comercial fornecido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ/RJ) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Este ensaio consistiu na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura “*in vitro*”, previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas (fase sólida). Para realização do teste, os soros controle, assim como as amostras a serem estudadas foram diluídos na concentração de 1:100. Em seguida foram adicionados os soros controle do teste, e as amostras aos seus respectivos orifícios da placa. A reação ocorreu a partir da ligação dos anticorpos específicos presentes no soro aos antígenos adsorvidos na placa. Foram realizadas seis lavagens consecutivas com o tampão de lavagem para retirada do excesso de anticorpos que não se ligaram à placa. Na etapa seguinte, foi adicionado um anticorpo anti-globulina de cão, marcado com peroxidase, para revelar a ligação dos anticorpos do soro teste aos antígenos adsorvidos à placa. Para a revelação da reação, utilizou-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina) que pela ação com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa. Ao adicionar o ácido sulfúrico, que tem a função de interromper a reação, as amostras testadas que se manifestaram positivas apresentaram coloração amarela. Nas cavidades em que os soros testados não apresentaram anticorpos específicos, não houve desenvolvimento de cor, o que caracterizou reação negativa. Os resultados dos ensaios de ELISA foram inicialmente expressos como absorbâncias das leituras realizadas em cada reação e ao final analisados como positivo ou negativo, em função do cálculo do ponto de corte e da faixa cinza preconizado pelo Kit comercial.

4.6. Kalazar Detect[®]

Foi utilizado o teste Kalazar Detect[®] (InBios International, USA), que consiste em uma imunocromatografia qualitativa para detecção de anticorpos contra parasitos do complexo *L. donovani* (anti-K39). Foi realizado conforme as instruções do fabricante e os resultados foram considerados positivos quando havia a presença de 2 faixas coloridas na fita do teste e negativo quando era detectada coloração apenas na região do controle interno do teste.

4.7. Cultivo das Formas Promastigotas de *Leishmania chagasi*

As formas promastigotas de *L. chagasi* criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e inoculadas em meio NNN/LIT. Foram feitos três repiques (renovações celulares) consecutivos, a cada 4 dias, sendo a curva de crescimento iniciada a partir do terceiro repique.

As formas promastigotas foram cultivadas em erlenmeyers contendo meio ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN* (NOVY & MACNEAL, 1903; NICOLLE, 1908), associado ao meio líquido complexo *liver infusion tryptose* – LIT* (CAMARGO, 1964), conhecido como meio NNN-LIT, sendo 5mL de NNN e 6mL de meio LIT. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D (modelo 347) à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, durante o período de quatro dias. A cada quatro dias as culturas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação e os parasitos foram re-inoculados pela transferência de 1×10^6 promastigotas/mL para um novo erlenmeyer contendo NNN-LIT, sendo 5mL de NNN e 6mL de meio LIT. Este procedimento foi repetido a cada quatro dias para manutenção de culturas em fase logarítmica. As culturas de quatro dias de cultivo em meio NNN-LIT foram também utilizadas para o inóculo de parasitos (1×10^6 promastigotas/mL) para um erlenmeyer contendo 10mL de meio LIT. Os parasitos foram incubados no meio contendo apenas LIT por um período de 8 dias de cultivo para serem utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. De uma cepa descongelada até sua inoculação final em meio LIT foram realizados pelo menos três repiques em meio NNN-LIT, a cada 4 dias. O inóculo proveniente de uma cultura em NNN-LIT na fase logarítmica (4 dias) de crescimento apresentava no máximo 10 passagens *in vitro*, para permitir a obtenção das formas promastigotas morfológicamente semelhantes, com um perfil de tamanho e granulosidade mais homogêneo, além de garantir a composição antigênica dos parasitos, considerando as possíveis alterações inerentes ao processo de cultivo

prolongado *in vitro*. Periodicamente, a cepa MHOM/BR/1972/BH46 foi inoculada em hamster para a obtenção de um novo isolado.

*Meio NNN: 14,0g/L de Ágar (Oxoid[®]), 6,0g/L NaCl (Synth[®]), 15% de sangue desfribinado de coelho.

*Meio LIT: 5,0g/L de infuso de fígado (Difco), 5,0g/L de triptose (Difco), 4,0g/L de NaCl (Synth[®]), 0,4g/L de KCl (Synth), 8,0g/L de Na₂HPO₄ (Synth[®]), 2,0g/L de glicose (Sigma[®]), 0,01g/L de hemina (Sigma[®]), 100mL de soro fetal bovino-SFB (Sigma[®]), sendo o pH do meio ajustado para 7,2 com HCl (Merck[®]).

4.8. Preparo das Formas Promastigotas de *Leishmania chagasi*

Os parasitos, em 8 dias de cultivo em LIT foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Diego), homogeneizados em vórtex a baixa rotação (rotação 3) para desfazer os grumos. Em seguida, a suspensão foi submetida a uma centrifugação diferencial (25°C, 200rpm por 10 minutos) para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitos no sedimento. Para recuperação dos parasitos no sobrenadante, estes foram deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS contendo 3% de SFB, por duas vezes, por centrifugação a 4°C, 2.200rpm por 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Ao final das etapas de lavagem, procedia-se a contagem do número de parasitos e a suspensão celular ajustada para aproximadamente 5×10^6 promastigotas/mL.

4.9. Anticorpos Reveladores Utilizados para os Ensaios de Citometria de Fluxo

Os anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram obtidos comercialmente da Bethyl[®] (Inc., Montgomery, Texas, EUA). Todos os anticorpos reveladores bem como as amostras de soros foram diluídos em PBS-3% SFB. A relação de anticorpos utilizados nos ensaios, sua especificidade e procedência estão detalhadas na Tabela 1. A diluição do anticorpo conjugado para uso constituiu um dos objetivos deste trabalho.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Anticorpo	Especificidade	Origem	Marcação
AcP. anti IgM	Fragmento Fc	Cabra	FITC
AcP. anti IgA	Fragmento Fc	Cabra	FITC
AcP. anti IgG	Fragmento Fc	Carneiro	FITC
AcP. anti IgG1	Fragmento Fc	Cabra	FITC
AcP. anti IgG2	Fragmento Fc	Carneiro	FITC
AcP. Anti IgE	Fragmento Fc	Cabra	FITC

AcP. = anticorpo policlonal. Fc = fração cristalizável de imunoglobulinas.
FITC = isotiocianato de fluoresceína.

4.10. Pesquisa de Anticorpos Anti-promastigotas Fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF)

No momento do uso, amostras de soros foram diluídas em PBS suplementado com 3% de SFB (Sigma[®], Chemical Corp., St. Louis, MO), centrifugadas a 4°C, 14.000rpm por 20 minutos e os sobrenadantes utilizados.

Os ensaios de citometria de fluxo para a pesquisa de AAPF de *L. chagasi* foram realizados segundo protocolo descrito MARTINS-FILHO *et al.* (1995), modificado por CORDEIRO *et al.* (2001) e ROCHA *et al.* (2002). Em placas de 96 poços, fundo em “U” (Linbro[®], ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio), alíquotas de 50µL da suspensão de parasitos (5×10^5 parasitos/poço) foram incubados a 37°C por 30 minutos na presença de 50µL do soro diluído em PBS-3% SFB (1:128 a 1:131.072 para AAPF-IgM e IgG1; 1:1:16 a 1:32.768 para AAPF-IgA e AAPF-IgE, 1:256 a 1:262.144 para AAPF-IgG e IgG2). Após incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 150µL de PBS-3% SFB (4°C, 2.200rpm, 10 min). Para revelação da ligação dos anticorpos na superfície do parasito, procedeu-se à incubação das formas promastigotas, na presença de 50µL de anticorpo anti-IgM, anti-IgA, anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2 ou anti-IgE canino (específico para a porção Fc) marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Bethyl[®], Inc., Montgomery, Texas, EUA) em três diluições diferentes (37°C por 30 minutos) sempre ao abrigo da luz. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com 150µL de PBS-3% SFB por centrifugação (4°C, 2.200rpm, 10 minutos) e o sobrenadante desprezado.

Após a incubação com os anticorpos reveladores, os parasitos foram lavados e fixados com 200µL de solução fixadora - MFF (10g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de

sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). As amostras foram mantidas pelo menos por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As leituras das amostras no citômetro de fluxo foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos.

Para cada bateria de ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo, foi realizado um controle interno da reação, no qual os parasitos foram incubados na ausência de soro canino, porém na presença de reagentes secundários, para monitorar ligações inespecíficas. Em todas as baterias de testes foram incluídas amostras de soros controle positivo e negativo para LVC.

4.11. Ensaio de Adsorção de Imunoglobulina G

Para adsorção de IgG em amostras de cães não infectados e infectados com *L. chagasi* foram utilizados três diferentes reagentes: *RF absorbent* (Dade Behring[®], Marburg, EUA), proteína A (Sigma[®], Chemical Corp., St. Louis, MO) e proteína G sepharose (Sigma[®], Chemical Corp., St. Louis, MO). No ensaio de adsorção de IgG utilizando o reagente *RF absorbent*, 200µL de mistura de soros provenientes do grupo de cães NI e INF foram incubados durante 15 minutos a 25°C com 200µL de *RF absorbent* solubilizado conforme orientações do fabricante. Nos ensaios de adsorção de IgG utilizando proteína A e proteína G sepharose, 200µL de misturas de soros provenientes do grupo de cães NI e INF, diluídos 1:16, foram incubados durante 1 hora a 37°C, com 200µL de proteína A ou proteína G sepharose empacotadas. As misturas de soros submetidas ao pré-tratamento foram centrifugadas a 14.000rpm, por 10 minutos a 4°C e posteriormente avaliadas por meio da AAPF-IgG .

4.12. Análise dos Dados

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema óptico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC-*Forward Scatter*), granulosidade ou complexidade interna (SSC-*Side Scatter*) e a emissão de fluorescência. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) empregando o software Cell-Quest. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitos. Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com

FITC que, quando excitados, emitiam sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1-fluorescência verde). A análise da reatividade de anticorpos anti-formas promastigotas de *L. chagasi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 1A). Resumidamente, por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7 μ m) e de pequena complexidade interna (tripanosomatídeos) os ganhos de voltagem para os parâmetros de tamanho e granulosidade foram ajustados para E00 e 300, ambos na escala logarítmica para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade). As formas promastigotas apresentavam distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho *versus* granulosidade, o que permitiu o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente (janela) à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado. O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (M1, Figura 1B). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais (Figuras 1C e D). Para cada conjunto de ensaios, um novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento. Esse tipo de parâmetro oferece algumas vantagens, como facilidade e rapidez para obtenção dos resultados e reprodutibilidade no que se refere a dados obtidos em análises inter-laboratoriais ou em análises realizadas repetidas vezes.

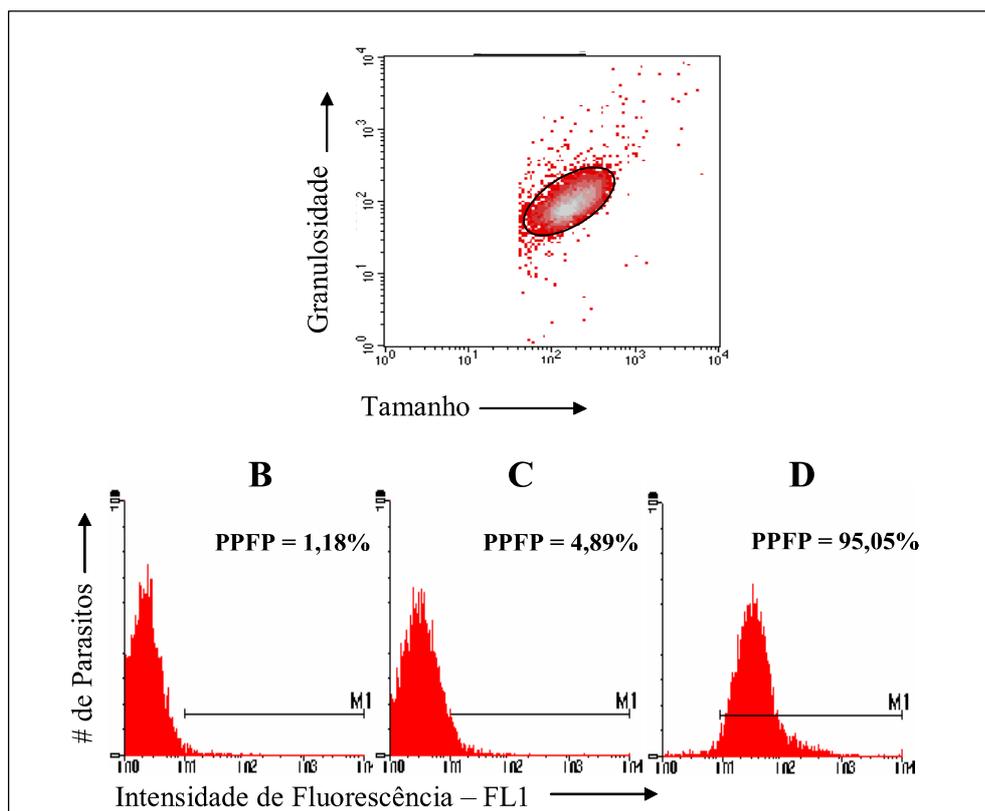


Figura 1: Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. (A) Seleção da população de formas promastigotas de *L. chagasi*, utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (B) Histograma individual representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com o controle interno da reação; (C) após a incubação com um soro de um cão NI e (D) após incubação com um soro de um cão INF. O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPF para o controle do conjugado.

4.13. Análise do Desempenho AAPF

4.13.1. Definição do ponto de corte

Para a obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade da AAPF foi necessária a definição de pontos de corte, para os referidos testes, ou seja, de um valor que permitisse classificar os resultados de cada teste como positivo ou negativo. Dentre os diversos critérios para se selecionar um ponto de corte, está sempre envolvido nesse processo um contra-balanço entre a sensibilidade e a especificidade. Tal seleção pode ser até mesmo arbitrária, mas é importante levar-se em consideração na definição deste "ponto" os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos (METZ, 1978; BROWNER *et al.*, 1988; FLETCHER *et al.*, 1989). No presente estudo o ponto de corte foi definido através da construção da *receiver operating characteristic curve* - curva ROC, abordados a seguir.

4.13.2. Receiver Operating Characteristic Curve – Curva ROC

Neste estudo, utilizou-se a *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para definição do melhor ponto de corte para o teste e avaliação da acurácia global da AAPF. As curvas foram obtidas utilizando-se o programa estatístico MedCalc Statistical.

A curva consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (taxa de falso-positivo) no eixo horizontal, para diferentes pontos de corte do teste diagnóstico avaliado (GRINER *et al.*, 1981; ZWEIG *et al.*, 1993; GREINER *et al.*, 2000). Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva - ASC. A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere SWETS (1988), em função do valor da ASC podemos classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ($ASC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < ASC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < ASC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < ASC < 1$) e como teste perfeito ($ASC=1$).

A curva ROC além de indicar a acurácia do teste, permitiu identificar com precisão, o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste. Segundo BROWNER *et al.* (1988) e SACKETT *et al.* (1991), quando a prevalência da doença no estudo é de aproximadamente 50%, o valor correspondente ao ponto situado o mais próximo do ângulo superior esquerdo da curva, trata-se do ponto de corte associado a um menor número de resultados falso-positivos e negativos.

A Figura 2 mostra uma curva ROC esquemática, representando dois testes diagnósticos. A avaliação da ASC permite concluir que aquela do teste 1 ($ASC=0,85$) é maior que a do teste 2 ($ASC=0,76$), o que significa dizer que o teste 1 apresenta melhor desempenho que o teste 2, ou seja, melhor capacidade em discriminar duas populações distintas (doente e não-doente). As setas fora do gráfico demonstram de forma esquemática o sentido que aumenta a sensibilidade e a especificidade. Cada ponto do gráfico representa os índices sensibilidade e $(100 - \text{especificidade})$ de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidade.

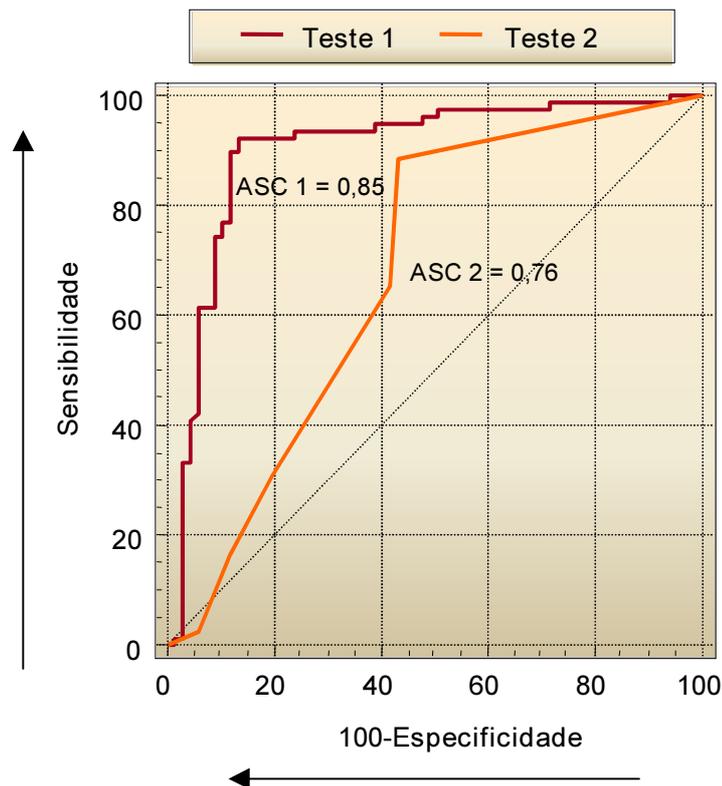


Figura 2: Curvas ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 – especificidade) dos testes avaliados.

Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76).



4.13.3. Índices de desempenho

Para avaliar o desempenho das técnicas foram utilizados índices de validade expressos em porcentagem e em chance, calculados a partir da classificação dos resultados em quatro categorias de acordo com a presença (INF) ou ausência de infecção (NI) (GRINER *et al.*, 1981; FLETCHER *et al.*, 1989; SACKETT *et al.*, 1991; JAESCHKE *et al.*, 1994a; JAESCHEKE *et al.*, 1994b). Tais categorias estão expressas na Tabela 2 e foram definidas da seguinte forma: “*verdadeiro-positivo*” (VPos) = presença de infecção e teste positivo; “*falso-positivo*” (FPos) = ausência de infecção e teste positivo; “*falso-negativo*” (FNeg) = presença de infecção e teste negativo e “*verdadeiro-negativo*” (VNeg) = ausência de infecção e teste negativo.

Tabela 2 - Categorias de resultados do teste diagnóstico em uma população que inclui cães não infectados e cães infectados com *L. chagasi*.

		LVC		Total
		(INF)	(NI)	
Resultado do teste	Positivo	<u>VPos (a)</u>	<u>FPos (b)</u>	(a+b)
	Negativo	<u>FNeg (c)</u>	<u>VNeg (d)</u>	(c+d)
Total		(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Com base nesses fundamentos, tabelas similares foram preenchidas de acordo com o modelo da Tabela 2 com o número de ocorrências de cada uma das categorias (a, b, c, e d). A partir dos resultados obtidos, o desempenho dos testes sorológico foi avaliado segundo diferentes índices, incluindo: sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo, acurácia e índice J de Youden. Os índices de desempenho foram obtidos utilizando-se o programa estatístico MedCalc Statistical.

A sensibilidade é calculada pela relação $a/(a+c)$ traduzindo, assim, a proporção de cães portadores de LVC, nos quais o teste foi positivo. Já, a especificidade diz respeito à proporção de cães sem infecção cujo teste é negativo sendo, portanto, determinada pela relação $d/(b+d)$. Cabe aqui ressaltar que estes índices são definidos a partir do eixo vertical da tabela, que representa o resultado do teste parasitológico e sorológico, RIFI e ELISA, concomitantemente, com o qual os testes em investigação foram comparados. Sendo assim, em decorrência de serem calculadas a partir do eixo vertical, a sensibilidade e a especificidade, não são afetadas pela variação da proporção entre cães não infectados e infectados, ou seja, com a prevalência da doença. Desta forma, são consideradas propriedades estáveis de um teste diagnóstico.

O valor preditivo de um resultado positivo - VPP e o valor preditivo de um resultado negativo - VPN denominados de forma simplificada, de valores preditivos positivo e negativo são fornecidos, respectivamente, pelas relações $a/(a+b)$ e $d/(c+d)$ traduzindo, assim, a proporção de cães com teste positivo que apresentam LVC e a proporção de cães com teste negativo que não apresentam LVC. Os valores preditivos, ao contrário da sensibilidade e especificidade, são definidos a partir do eixo horizontal da tabela, portanto, variam com a proporção entre cães não infectados e infectados, sendo então, consideradas propriedades instáveis de um teste diagnóstico.

Para se conhecer a contribuição dos testes investigados na confirmação ou exclusão do diagnóstico da LVC em diferentes situações de prevalência da doença, os valores preditivos

foram determinados considerando-se diversas prevalências hipotéticas da doença. Para o cálculo, empregou-se o Teorema de Bayes, que é definido pela seguinte fórmula: $VPP = \text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência} / (\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}) + (1 - \text{Especificidade}) \times (1 - \text{Prevalência})$; $VPN = \text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência}) / \text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência}) + (1 - \text{Sensibilidade}) \times \text{Prevalência}$ (VECCHIO, 1966).

A acurácia, determinada pela curva ROC, indica a proporção de todos os resultados corretos de um teste, ou seja, os “verdadeiro-positivos” e os “verdadeiro-negativos”. Assim, constitui-se em um indicador do valor global do teste que, entretanto, pode estar superestimado caso sejam elevados os valores das categorias a e d. Desta forma, optou-se também por calcular o índice J de Youden que dá pesos iguais aos resultados corretos (verdadeiros positivos e negativos) e incorretos do teste (falsos positivos e negativos), sendo definido pela razão $(a+d)-(b+c)/(a+b+c+d)$ (YOU DEN, 1950).

Uma outra forma de abordagem do desempenho de testes diagnósticos, particularmente daqueles cujos resultados são expressos em escala contínua, consiste na determinação das razões de verossimilhança (RVs) para diferentes resultados. A RV para um determinado resultado do teste diagnóstico é expressa em chance e é definida pela razão entre proporção de um referido resultado em cães portadores de LVC em relação à proporção do mesmo resultado em cães não infectados. A Razão de Verossimilhança Negativa é calculada pela relação $(1 - \text{Sensibilidade}) / \text{Especificidade}$ e a Razão de Verossimilhança Positiva pela relação $\text{Sensibilidade} / (1 - \text{Especificidade})$. Desta forma, as RVs expressam quantas vezes é mais provável (ou menos provável) se encontrar um determinado resultado do teste em um cão portador de LVC em relação a um cão não infectado.

Essa forma de abordagem permite ampliar o espectro de informações úteis em relação àquelas fornecidas pelos indicadores calculados a partir de resultado dicotômico (positivo/negativo), uma vez que permite também trabalhar diferentes faixas de valores de resultados, também definidas por pontos de corte.

Segundo a literatura, valores de RV negativa abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência de doença e valores de RV positiva acima de 10 praticamente confirmam a presença de doença (JAESCHKE *et al.*, 1994b).

Cabe ainda ressaltar, que as proporções empregadas no cálculo das razões de verossimilhança são definidas a partir do eixo vertical da tabela 2 ou de tabelas semelhantes, não apresentando, assim, variações em relação a mudanças na prevalência da doença em questão.

4.13.4. Intervalo de confiança – IC

Os índices avaliados neste estudo foram expressos com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC_{95%}) calculados pelo método do Fleiss Quadratic (FLEISS, 1981). Embora os valores calculados para os diferentes indicadores representem a melhor estimativa do valor real do índice, este pode corresponder (obviamente com uma probabilidade de 95%) a qualquer outro valor situado entre os extremos definidos pelo intervalo de confiança a 95%. Além de permitir a inferência do valor do índice, o intervalo de confiança a 95% também fornece informação a respeito da precisão do valor estimado, que está relacionado com a amplitude do referido intervalo, sendo que intervalos mais estreitos correspondem a estimativas mais precisas.

4.13.5 Índice Kappa

Para estimar a concordância entre a positividade e a negatividade dos testes sorológicos utilizou-se o Índice *Kappa*, que pode ser interpretado segundo faixa de valores, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Interpretação do índice *Kappa*

<i>Kappa</i>	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

Resultados

5.1. Estabelecimento de Procedimentos Metodológicos para a Pesquisa de Anticorpos IgM, IgA, IgG (IgG1, IgG2) e IgE, Anti-formas Promastigotas Fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF) por Citometria de Fluxo para Diagnóstico da LVC

A iniciativa de introduzir a pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo como método complementar para análise sorológica em doenças parasitárias abriu novas perspectivas para o estabelecimento de técnicas diagnósticas empregando parasitos fixados como suporte antigênico (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 2002). O elevado desempenho da citometria de fluxo no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina foi demonstrado com o estabelecimento da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* (AAPF-IgG) CARVALHO-NETA *et al.* (2006).

No estabelecimento desse método, GOMES *et al.* (2006) realizaram a avaliação da influência do tempo de cultura na reação antígeno-anticorpo no contexto específico da *L. chagasi*. Segundo estes autores, formas promastigotas de *L. chagasi* de fase estacionária inicial (8º dia de cultura) são mais apropriadas para uso na AAPF-IgG, ponderando suas características intrínsecas de aspectos morfométricos e de antigenicidade. Outras variáveis metodológicas para a realização do presente trabalho, como o número de parasitos em suspensão ($5,0 \times 10^6$ promastigotas/mL) e a temperatura e tempo de reação (37°C por 30 minutos), basearam-se nas condições descritas por ROCHA *et al.* (2002) para pesquisa de anticorpos humanos anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Considerando a influência da concentração do anticorpo secundário anti-imunoglobulina canina nos resultados a serem obtidos pela AAPF, o primeiro passo do presente estudo consistiu no estabelecimento da diluição ideal do anticorpo secundário para a pesquisa de IgM, IgA, IgG (IgG1, IgG2) e IgE anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* por citometria de fluxo aplicada ao diagnóstico da LVC, como descrito no tópico abaixo.

5.1.1. Padronização da diluição dos anticorpos secundários, variável inerente à reação antígeno-anticorpo, a serem empregadas na pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* por citometria de fluxo

Diferentes concentrações dos anticorpos secundários anti-imunoglobulinas caninos foram empregadas, a fim de definir a concentração ideal, capaz de segregar as amostras de

cães não infectados (NI) e infectados (INF). Os resultados da AAPF-IgM e IgA, bem como AAPF-IgG e subclasses foram obtidos após incubação das misturas de soros caninos submetidos a diluições seriadas (1:16 a 1:2.048 para AAPF-IgA; 1:128 a 1:16.384 para AAPF-IgM e 1:256 a 1:32.768 para AAPF-IgG, IgG1 e IgG2) com formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, 8 dias de cultivo, nas condições previamente padronizadas por ROCHA *et al.* (2002), CARVALHO-NETA *et al.* (2006) e GOMES *et al.* (2006). A revelação da ligação dos anticorpos a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) em três diferentes diluições para cada anticorpo avaliado (1:250, 1:500 e 1:1.000 para anti-IgM, anti-IgA e anti-IgG1 e 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 para anti-IgG e anti-IgG2). Como demonstrado na Figura 3, tanto na AAPF-IgM quanto na AAPF-IgA, na diluição do anticorpo conjugado 1:500 foi possível observar maior amplitude de segregação entre os grupos, portanto, foi a diluição utilizada nas análises subsequentes. Utilizando este mesmo critério, foram escolhidas as diluições 1:1.000 para anti-IgG e anti-IgG2 e 1:500 para anti-IgG1 (Figura 4).

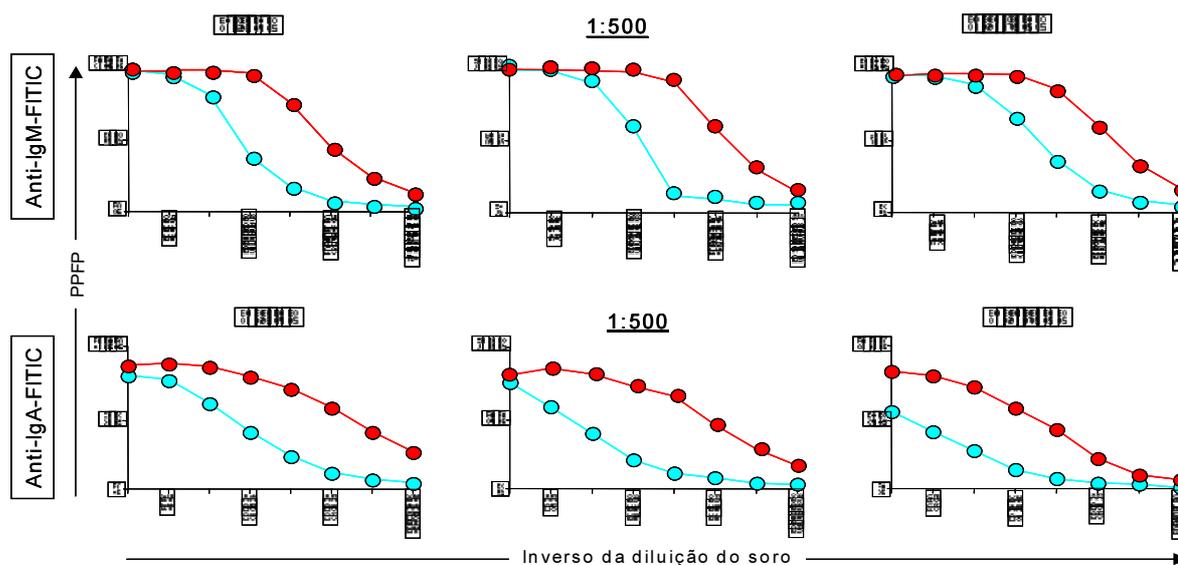


Figura 3: Reatividade da AAPF-IgM e AAPF-IgA em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC. Os resultados foram expressos como PPFP para cada mistura de soros.

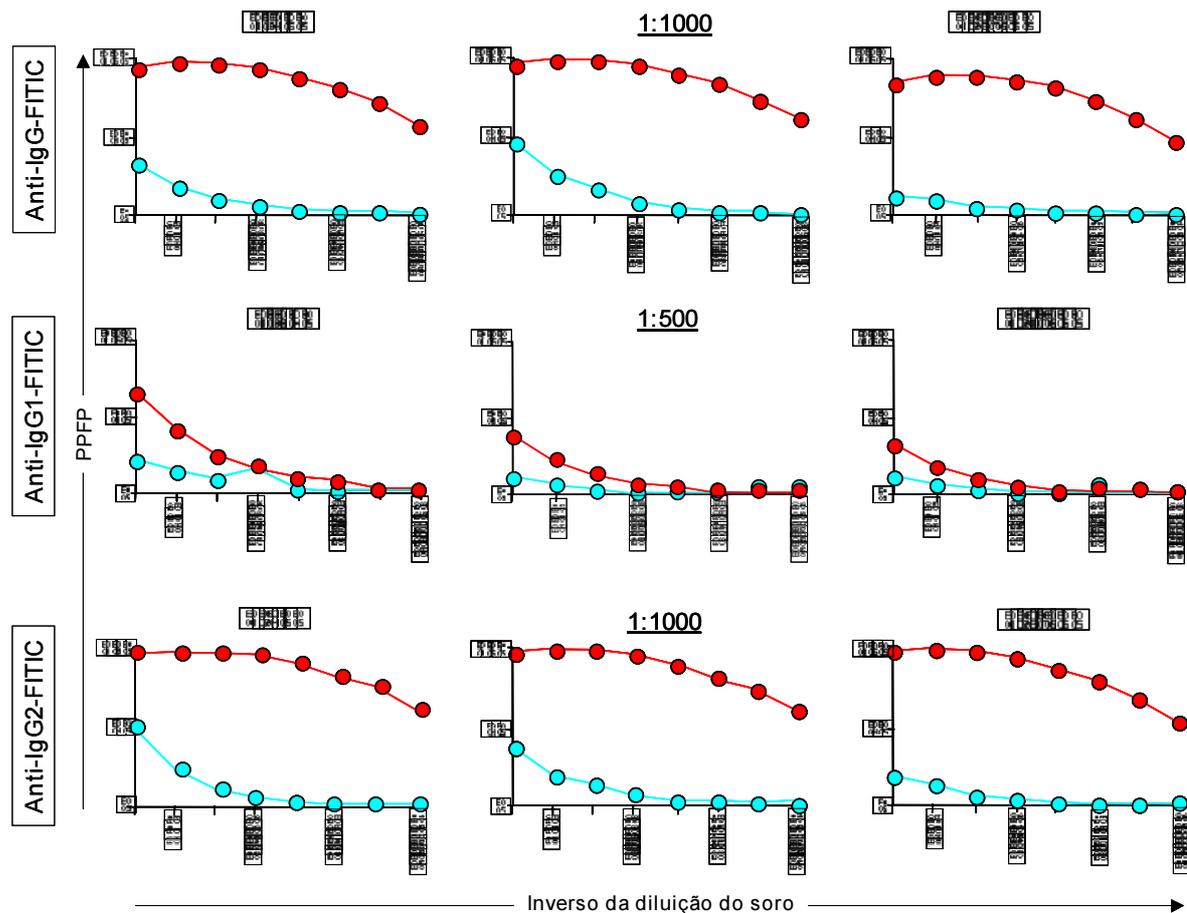


Figura 4: Reatividade da AAPF-IgG, IgG1 e IgG2 em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC. Os resultados foram expressos como PFPF para cada mistura de soros.

Na padronização da AAPF-IgE, primeiramente foi proposto um pré-tratamento da mistura de soros de cães não infectados e infectados com o regente RF absorbent, Proteína A e Proteína G, como descrito em Material e métodos. Esse pré-tratamento teve como objetivo retirar IgG do soro para não interferir na avaliação da reatividade de IgE. Foi observado que RF absorbent não foi capaz de adsorver IgG da mistura soro de cães NI e INF (Figura 5B). No pré-tratamento com Proteína A foi possível observar diminuição considerável da reatividade de IgG ao longo da curva de titulação do soro. Já o pré-tratamento com proteína G foi a condição capaz de abolir completamente a reatividade de IgG anti-*Leishmania* ao longo da curva de titulação (Figura 5D). Dessa forma, essa condição foi escolhida como pré-tratamento das misturas de soros para os experimentos subsequentes de titulação do anticorpo secundário anti-IgE canino.

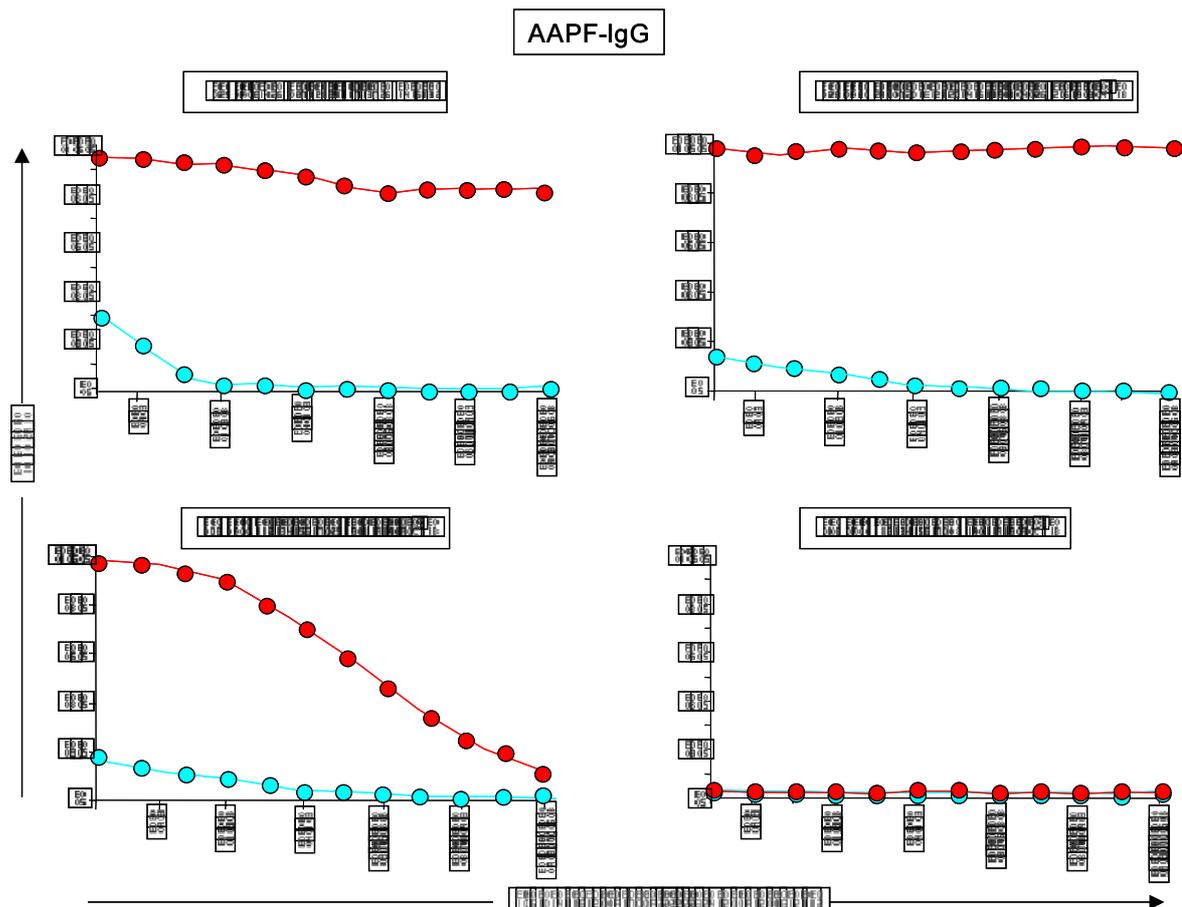


Figura 5: Reatividade da AAPF-IgG em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) sem pré-tratamento (A), submetidos a tratamento com *RF absorbent* por 15 minutos a 25⁰C (B), submetidos a tratamento com proteína A por 1 hora a 37⁰C (C), submetidos a tratamento com proteína G por 1 hora a 37⁰C (D).

Os resultados foram expressos como PFP para cada mistura de soros.

A seguir, as amostras submetidas ao pré-tratamento com proteína G foram utilizadas para estabelecimento da diluição ideal do anticorpo conjugado anti-IgE canino, sendo testadas três diluições: 1:100, 1:250 e 1:500. A análise dos dados demonstrou que nenhuma das diluições testadas foi capaz de detectar reatividade de IgE anti-*Leishmania* na mistura de soros provenientes de cães NI ou INF ao longo da curva de titulação (Figura 6). Sendo assim, a diluição 1:100 foi escolhida para as análises subsequentes a fim de garantir maior sensibilidade da AAPF-IgE aplicada em testes de amostras individuais.

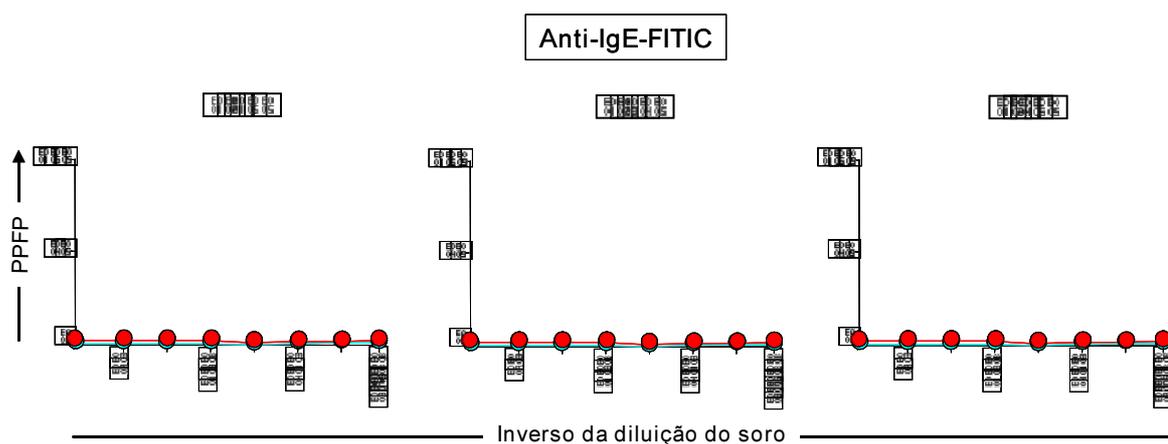


Figura 6: Reatividade da AAPF-IgE em misturas de soros de cães não infectados (NI=●) e infectados (INF=●) incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC. Os resultados foram expressos como PFPF para cada mistura de soros.

Uma vez padronizadas as diluições dos anticorpos secundários a serem empregados na AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE o próximo passo consistiu em caracterizar o perfil de imunoglobulinas presentes em soros de cães não infectados, infectados e vacinados com Leishmune[®].

5.1.2. Caracterização do perfil de imunoglobulinas IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE detectados pelas AAPFs

A finalidade da caracterização do perfil sorológico em soros de cães não infectados (NI), cães portadores de LVC (INF) e cães vacinados com Leishmune[®] (VAC) foi buscar evidências de reatividade diferencial entre as imunoglobulinas presentes em soros destes cães. Como demonstrado na Figura 7, os três grupos de cães apresentaram perfis distintos de reatividade sorológica média utilizando amostras individuais. Enquanto o grupo NI apresentou maior reatividade média de IgM, seguida de IgG, IgG2 igual a IgG1 e IgA com ausência de IgE (IgM>IgG>IgG2=IgG1>IgA>IgE), cães INF apresentaram maior reatividade média de IgG, seguido de IgG2, IgM, IgG1 igual a IgA com ausência de IgE (IgG>IgG2>IgM>IgG1=IgA>IgE). Por outro lado, cães vacinados apresentaram um perfil diferente, com maior reatividade para IgM, seguida de IgG2, IgG, IgG1 e IgA com ausência de IgE (IgM>IgG2>IgG>IgG1>IgA>IgE). Estes resultados sugeriram a possibilidade de utilização da AAPF para o diagnóstico sorológico da LVC bem como uma abordagem adicional de reatividade diferencial entre infecção e vacinação.

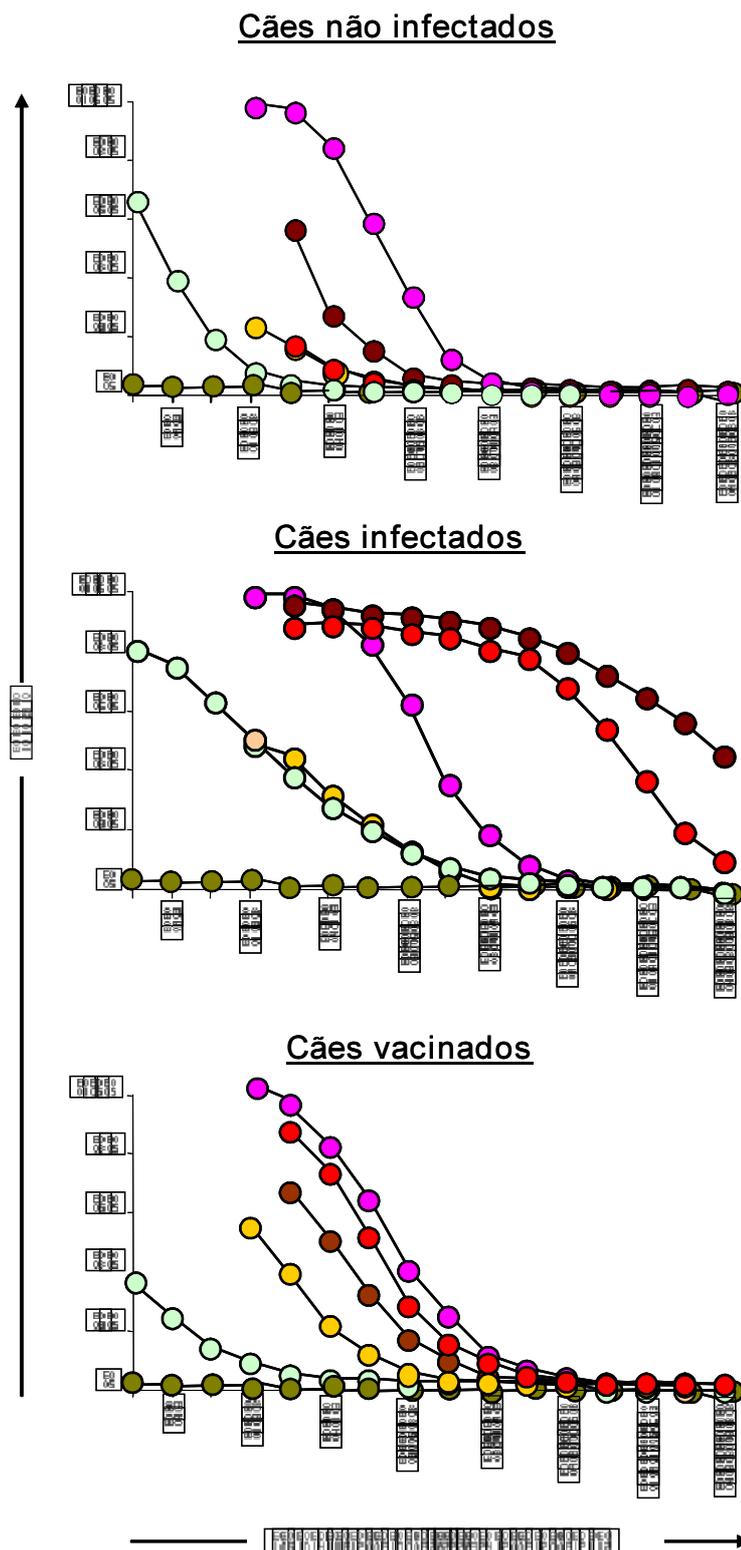


Figura 7: Perfil de reatividade média da AAPF-IgM (●), IgA (○), IgG (●), IgG1 (●), IgG2 (●) e IgE (●) em soros individuais de cães não infectados (NI, n=15), infectados (INF, n=29) e vacinados com Leishmune[®] (VAC, n=21).

Considerando os perfis de reatividade sorológica demonstrados na Figura 7, com ausência de detecção de IgE por meio do AAPF, a etapa seguinte desse trabalho consistiu em

avaliar o desempenho das técnicas AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 e verificar suas aplicações no diagnóstico sorológico da LVC, através de várias ferramentas estatísticas.

5.1.3. Avaliação do desempenho das AAPFs no diagnóstico sorológico da LVC

Para avaliar o desempenho da AAPF no diagnóstico sorológico da LVC seguiram-se os princípios da epidemiologia clínica. Inicialmente, foi realizado um estudo detalhado da reatividade das imunoglobulinas IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em soros de cães NI e INF. As curvas de reatividade foram avaliadas como média de PFP e valores individuais obtidos após incubação dos soros caninos (submetido a diluições seriadas) com formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*. A reatividade da AAPF foi revelada pela utilização de anticorpos anti-imunoglobulinas caninas marcados com FITC nas diluições previamente padronizadas (Figuras 3 e 4).

Os valores médios de PFP observados nas curvas de titulação da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 para cada amostra de soro (NI e INF) estão apresentados na Figura 8 (gráficos à esquerda). Foi possível observar reatividade diferencial média entre NI e INF para todas as imunoglobulinas avaliadas, principalmente nas diluições que apresentaram maior amplitude de segregação entre os grupos, destacadas na figura como retângulo tracejado. A avaliação de amostras individuais através da análise visual da reatividade não permitiu definir de forma clara o perfil sorológico de cães NI e INF na avaliação de todas as imunoglobulinas (Figura 8 – gráficos à direita).

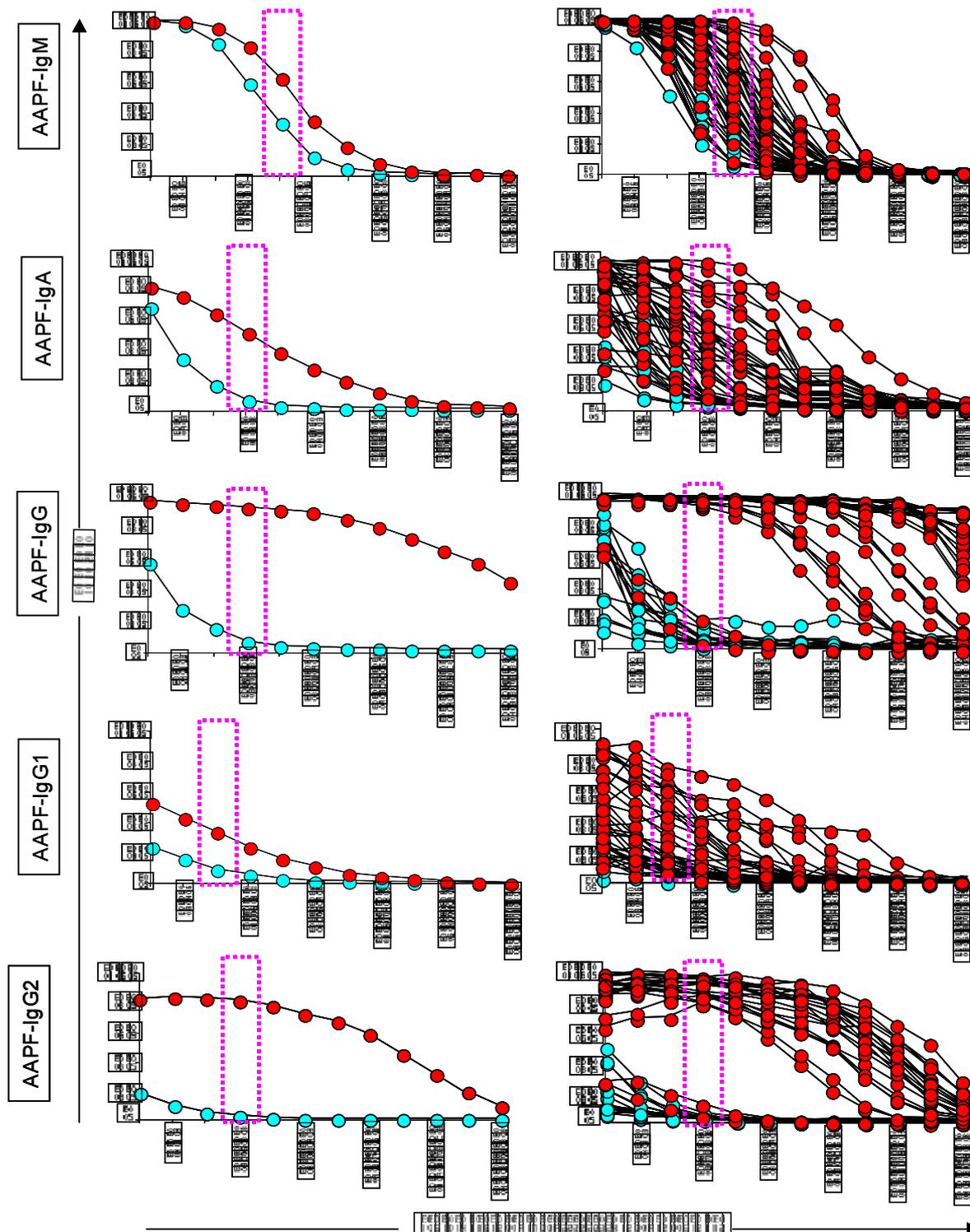


Figura 8: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2, em amostras de soros de cães não infectados (NI=●) e cães infectados (INF=●).

Os resultados foram expressos como média de PFP (gráficos à esquerda) e valores individuais (gráficos à direita). Os retângulos pontilhados em rosa representam diluições que apresentaram maior amplitude de segregação entre os grupos.

Com intuito de dar continuidade a avaliação do desempenho das técnicas, subseqüentemente foram construídas as curvas ROC e calculados os índices de desempenho (sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, acurácia, índice J de Youden e razões de verossimilhança) para cada diluição do soro, a fim de se estabelecer critérios metodológicos de interpretação dos resultados (diluição do soro e ponto de corte) para cada método. A diluição do soro escolhida para cada técnica foi aquela que apresentou, em conjunto, os maiores valores dos índices de desempenho calculados segundo o ponto de corte sugerido pela curva ROC. Na tabela 4, pode-se observar o ponto de corte, a diluição selecionada e os valores dos índices estatísticos para cada método.

A análise dos resultados demonstrou elevado desempenho para a AAPF-IgA, IgG e IgG2, uma vez que apresentaram valores altos para todos os índices expressos em porcentagem avaliados, especialmente sensibilidade (93%, 97% e 90%, respectivamente) e especificidade (93%, 100% e 100%, respectivamente), que são priorizados em uma análise metodológica uma vez que não sofrem alteração com a variação da prevalência da doença (Tabela 4).

Segundo a curva ROC, AAPF-IgM e IgG1 apresentaram acurácia moderada (79% e 81%, respectivamente) e a AAPF-IgA, IgG, IgG2 acurácia elevada (97%, 98% e 100%, respectivamente). Para garantir uma avaliação rigorosa dos dados, foi calculado o índice J de Youden, que dá pesos iguais aos resultados corretos e não corretos do teste. Como demonstrado na Tabela 4, foram encontrados valores baixos para a AAPF-IgM e IgG1 (57% e 59%, respectivamente) e altos para a AAPF-IgA, IgG e IgG2 (83%, 97%, 93%, respectivamente).

Para complementação da avaliação do desempenho das metodologias foram calculadas as razões de verossimilhança (RVs) para faixas de valores de PFP (Tabela 4). As análises das RVs da AAPF-IgG, IgG2 e IgA, confirmaram o elevado desempenho dos métodos, demonstrando que valores de PFP > 20% praticamente confirmam o diagnóstico de LVC e que valores de PFP ≤ 20% praticamente excluem o diagnóstico de LVC. Esses dados contribuem fundamentalmente para validação das metodologias em laboratório clínico.

para AAPF-IgG2), sem alteração nos elevados valores preditivos positivos descritos para ambas as metodologias (100%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores preditivos negativo (VPNs) e positivo (VPPs) da análise da AAPF-IgA, IgG e IgG2 referentes a diferentes prevalências

Probabilidade Pré-Teste	AAPF-IgA		AAPF-IgG		AAPF-IgG2	
	VP	VPP	VP	VPP	VP	VPP
100%	100	100	100	100	100	100
50%	99	100	100	100	99	100
10%	99	59	100	100	99	100
5%	99	40	100	100	100	100

A Figura 9 ilustra, por meio de gráficos de dispersão, a reatividade das amostras de soros individuais de cães NI e INF utilizando os pontos de corte e as diluições estabelecidas para avaliação do potencial diagnóstico de cada pesquisa de imunoglobulina (Tabela 4). Foi possível observar que na AAPF-IgA, IgG, IgG1 e IgG2 um percentual elevado de cães NI apresentaram valores de PFPF abaixo do ponto de corte (93%, 100%, 100% e 100%, respectivamente). Foi observada também frequência elevada de positividade (PFPF > ponto de corte) para cães INF na AAPF-IgM (90%), AAPF-IgA (90%), AAPF-IgG (97%) e AAPF-IgG2 (93%). Na avaliação da AAPF-IgM foi encontrado frequência de negatividade igual a 60% (PFPF ≤ 30%) para o grupo NI e na AAPF-IgG1 frequência de positividade de 59% (PFPF > 20%) para o grupo INF, o que sugere baixa especificidade e sensibilidade destas duas técnicas, respectivamente.

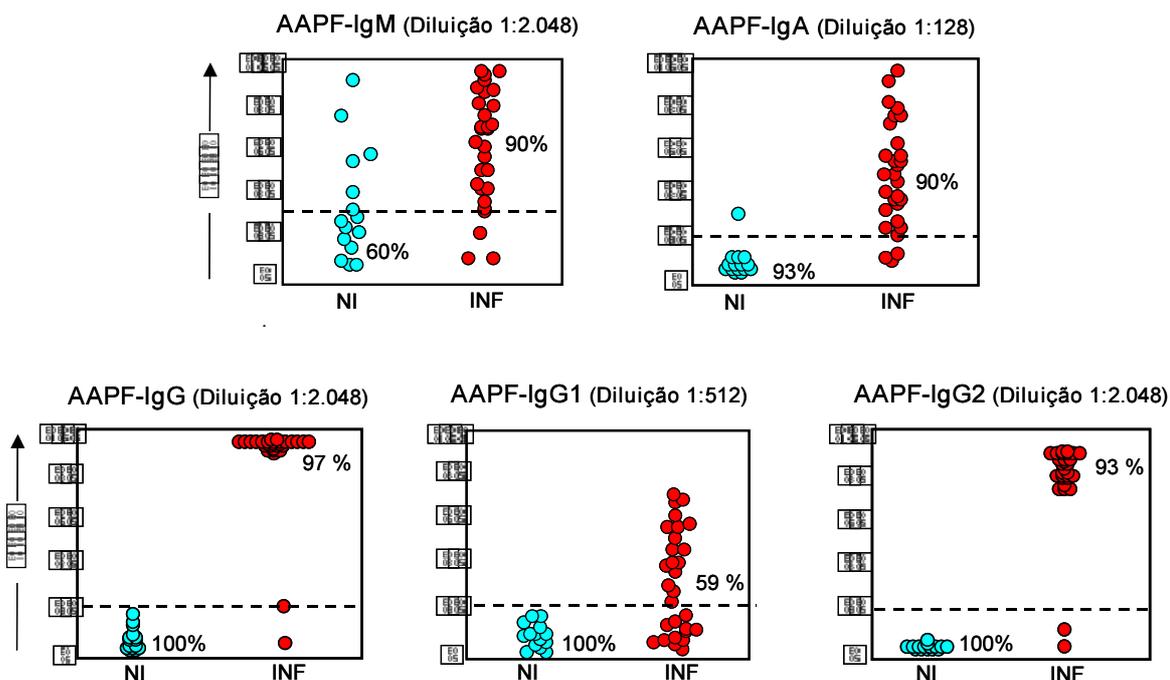


Figura 9: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães não infectados (NI=●, n=15) e infectados (INF=●, n=29).

Os resultados foram expressos como PFP para amostras individuais, nas diluições do soro previamente estabelecidas (Tabela 4). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os valores de sensibilidade e especificidade foram expressos nos gráficos.

Além da baixa eficiência de detecção da infecção em cães que possuem baixos títulos de anticorpos (BRITO *et al.*, 2000; CHIARI *et al.*, 1973b; CHIARI *et al.*, 1973a; GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 1990; MOLL *et al.*, 1996; VALLI *et al.*, 1999; WALTON *et al.*, 1972) uma outra limitação apresentada pelas metodologias sorológicas convencionais, RIFI e ELISA, consiste na incapacidade de discriminar a reatividade sorológica de cães infectados daquela observada em animais vacinados com Leishmune[®], o que constitui sério problema de saúde pública atualmente. Considerando que cães infectados apresentaram perfil de reatividade diferente daquele apresentado por cães vacinados através das AAPFs (Figura 7), a seguir foi avaliado o desempenho das metodologias aplicadas em uma população canina que incluísse cães vacinados com Leishmune[®].

Utilizando os mesmos parâmetros estabelecidos para avaliação diagnóstica da AAPF (pontos de corte e diluições do soro – Tabela 4) foram avaliadas as curvas de reatividade das imunoglobulinas em valores médios e em amostras individuais de cães INF e VAC. Como demonstrado na Figura 10, a avaliação dos testes por meio da análise visual da reatividade de amostras individuais não permitiu identificar de forma clara a reatividade diferencial entre INF e VAC quando analisada pela sobreposição das curvas (gráficos à direita), entretanto,

observou-se uma perspectiva de diferenciação quando foi avaliada a reatividade média entre cães INF e VAC na AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 (gráficos à esquerda).

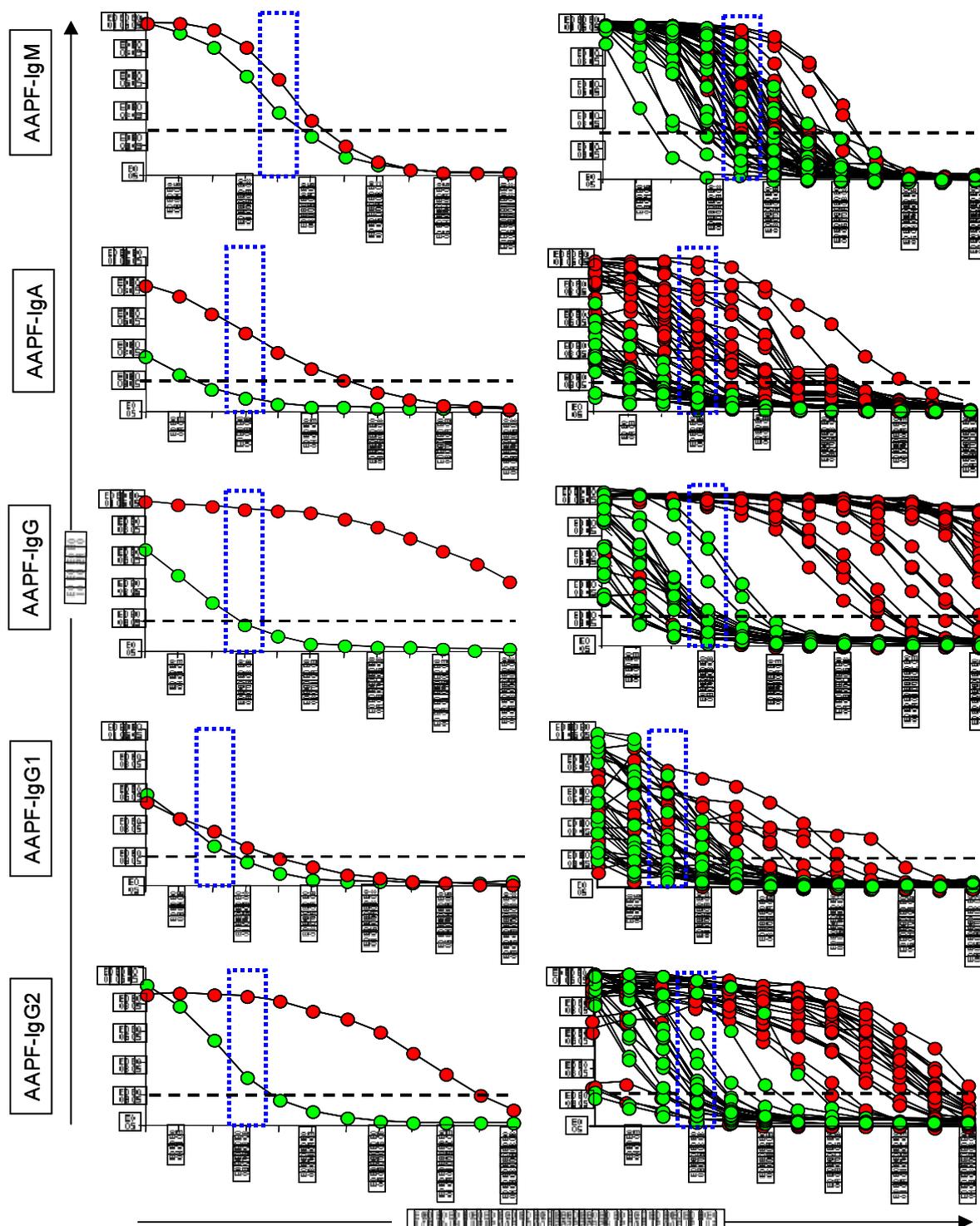


Figura 10: Reatividade das amostras individuais da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães infectados (INF=●, n=29) e cães vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=21).

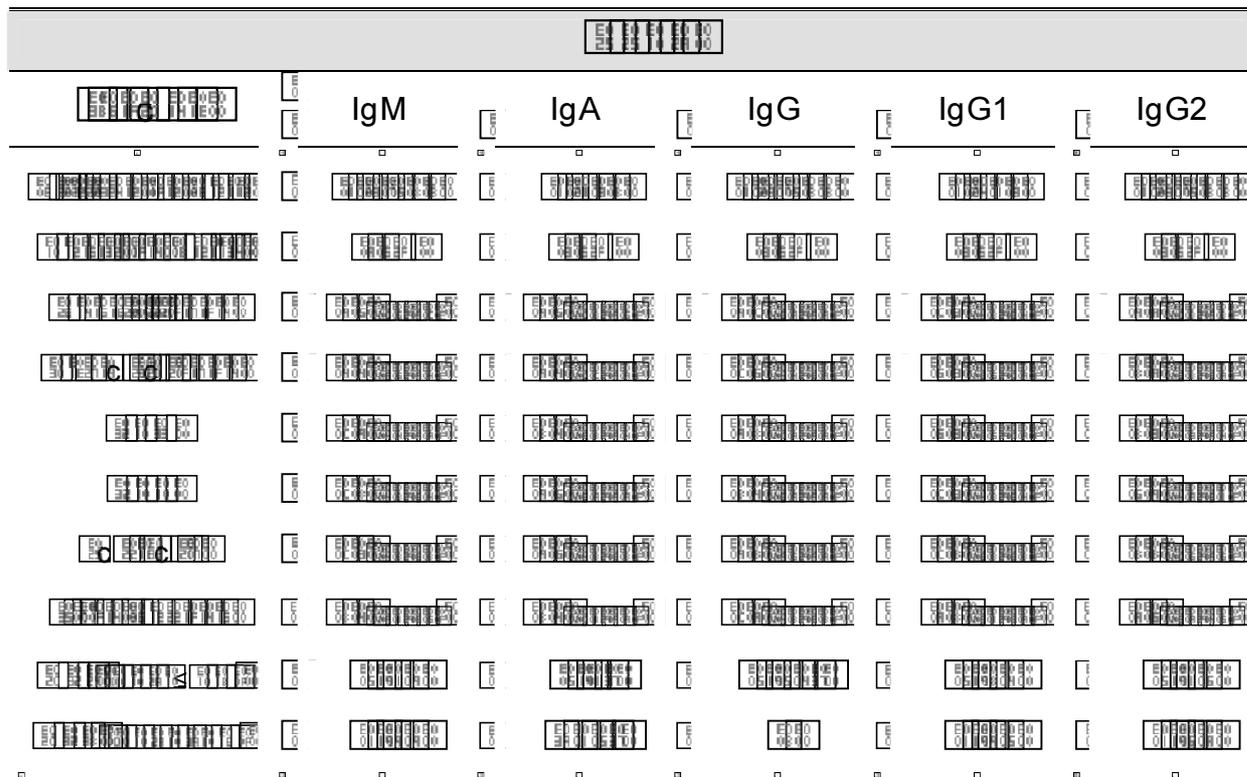
Os resultados foram expressos como PFPF. A linha pontilhada e o retângulo tracejado em azul representam os critérios estabelecidos para o diagnóstico da LVC (ponto de corte e diluições do soro, respectivamente).

Em seguida, foram calculados índices de desempenho para avaliar o potencial das técnicas para aplicação na identificação de reatividade diferencial entre infecção ativa e soroconversão pós-vacinal. Para tal, foram empregados os critérios de interpretação dos resultados estabelecidos anteriormente (Tabela 4). Cabe ressaltar que na descrição dos resultados subsequentes os termos sensibilidade e especificidade deveriam ser substituídos por co-positividade e co-negatividade, respectivamente. Tal substituição justifica-se porque as próximas análises não dizem respeito à capacidade do teste em detectar os verdadeiros positivos ou negativos do teste e sim a capacidade do teste em distinguir reatividade sorológica diferencial entre cães infectados e vacinados com Leishmune[®]. Entretanto, no presente trabalho os termos sensibilidade e especificidade serão mantidos devido à popularidade do termo, para melhor compreensão do leitor.

Como observado na Tabela 6, AAPF-IgM, IgG1 e IgG2 apresentaram baixo desempenho, especialmente devidos aos valores encontrados para especificidade (55%, 62% e 43%, respectivamente) e índice J de Youden (45%, 34% e 36%, respectivamente). A AAPF-IgA e IgG, entretanto, apresentaram valores elevados para todos os índices calculados.

Para complementação dos resultados obtidos foram calculadas as razões de verossimilhança. As RVs encontradas para valores de PFP menores ou iguais aos pontos de corte estabelecidos na AAPF-IgM ($PPFP \leq 30\%$), AAPF-IgG1 ($PPFP \leq 20\%$) e AAPF-IgG2 ($PPFP \leq 20\%$) foram desprovidos de valor diagnóstico, bem como os valores de PFP acima dos pontos de corte estabelecidos nas metodologias citadas acima e também na AAPF-IgG ($PPFP > 20\%$). Os resultados demonstraram, entretanto, que na AAPF-IgA, valores de $PPFP \leq 20\%$ contribuem para exclusão do diagnóstico de LVC e valores de $PPFP > 20\%$ praticamente confirmam este diagnóstico. Em relação à AAPF-IgG, um resultado negativo ($PPFP \leq 20\%$) praticamente exclui o diagnóstico de LVC (Tabela 6).

Tabela 6 - Índices de desempenho da AAPF-IgM, IgG, IgG1, IgG2 e IgA para avaliação de reatividade diferencial entre infecção ativa e soroconversão pós-vacinal, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%



Prevalência de 58%. *Resultados de RVs que apresentaram valor clínico. VPN-valor preditivo negativo; VPP-valor preditivo positivo; PFP- Percentual de Parasitos Fluorescentes Positivos; PC-ponto de corte.

A Figura 11 ilustra, através de gráficos de dispersão, a reatividade de amostras individuais de cães NI, INF e VAC utilizando os pontos de corte e diluições estabelecidas previamente para avaliação do potencial diagnóstico de cada imunoglobulina (Tabela 4). AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 apresentaram os seguintes valores de especificidade para o grupo VAC: 55%, 95%, 76%, 62% e 43%, respectivamente (Figura 11).

Em conjunto, os resultados encontrados demonstram que AAPF-IgA e IgG apresentaram maior potencial para identificação de reatividade diferencial entre os grupos NI, INF e VAC. Embora a AAPF-IgA tenha sido capaz de excluir o diagnóstico de LVC em 95% dos animais do grupo VAC, a menor sensibilidade na identificação do grupo INF e o grande número de resultados próximos ao ponto de corte representaram limitações para o uso dessa técnica nos estudos subsequentes (Figura 11).

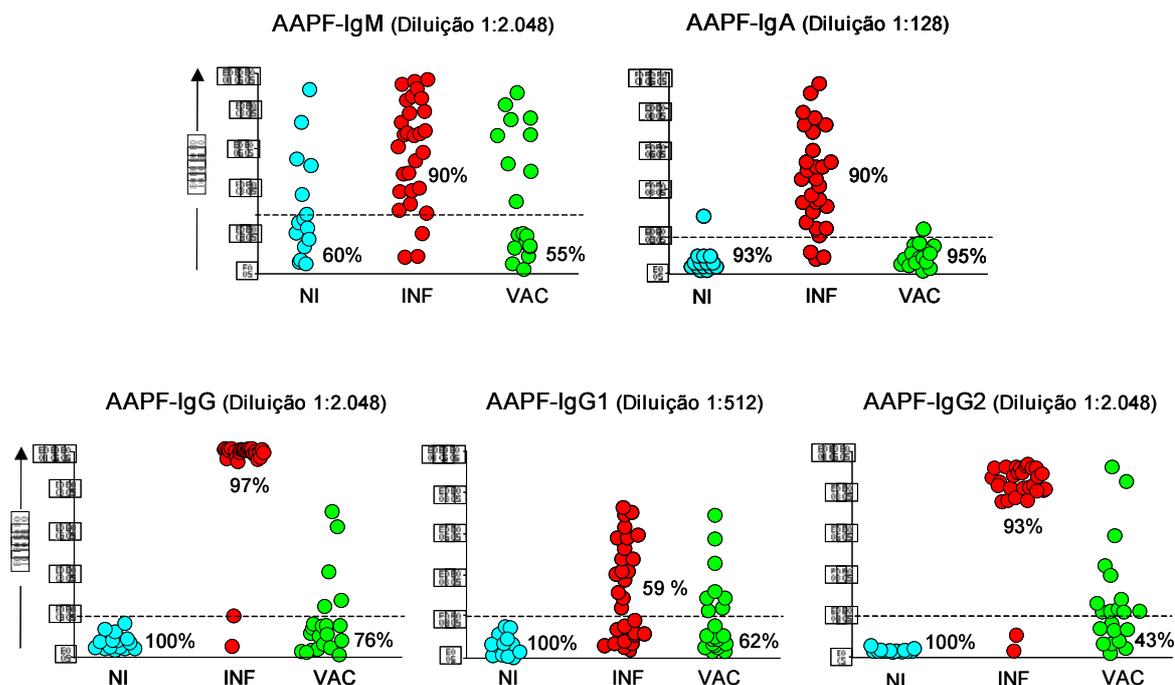


Figura 11: Reatividade da AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2 em cães não infectados (NI=●, n=15), infectados (INF=●, n=29), vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=21).

Os resultados foram expressos como PFP para amostras individuais, nas diluições do soro previamente estabelecidas (Tabela 3). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os valores especificidade e sensibilidade foram expressos nos gráficos.

A fim de aprimorar a avaliação do desempenho da AAPF-IgG para a análise da reatividade diferencial entre cães infectados e vacinados com Leishmune[®], os parâmetros metodológicos pré-determinados para a interpretação dos resultados do método aplicado ao diagnóstico sorológico da LVC foram reavaliados. Analisando visualmente a reatividade média obtida para INF e VAC, ao longo da curva de titulação da AAPF-IgG, verificou-se grande amplitude de segregação entre estes grupos em outras diluições do soro, especialmente a diluição 1:8.192 (Figura 10 - gráfico à esquerda). Neste contexto, os dados foram reavaliados utilizando este novo parâmetro metodológico.

Como demonstrado na Figura 12, utilizando o ponto de corte de 20% de PFP, a análise da AAPF-IgG na diluição do soro 1:8.192 confirmou a especificidade de 100% para o grupo NI (15/15) e um melhor desempenho para o grupo VAC, com aumento da especificidade de 76% para 100%. É extremamente importante mencionar que os cães VAC apresentaram sorologia negativa por RIFI, ELISA, AAPF-IgG, IgG1 e IgG2 anteriormente ao processo vacinal. Trinta dias após a vacinação, entretanto, todos eles apresentaram soroconversão detectada por RIFI (dados não mostrados).

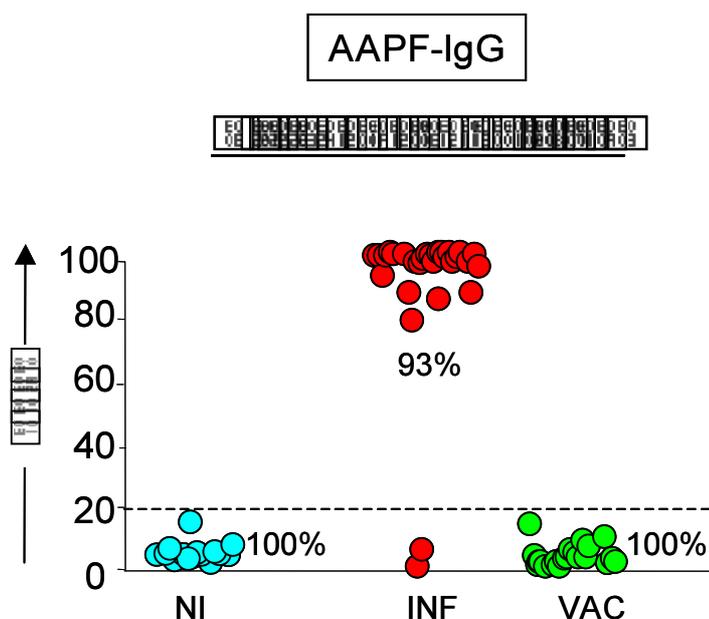


Figura 12: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=15), infectados (INF=●, n=29) e vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=21). Os resultados foram expressos como PFP para amostras individuais na diluição do soro 1:8.192. A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os índices de especificidade e sensibilidade foram apresentados na figura.

Para complementar a análise da AAPF-IgG foram calculados os valores de RVs para diferentes faixas de valores de PFP. A Tabela 7 demonstra que na diluição do soro 1:2.048, um valor de PFP ≤ 20% praticamente exclui o diagnóstico de LVC para uma determinada amostra enquanto um valor de PFP > 80% praticamente confirma este diagnóstico, excluindo a possibilidade de um resultado semelhante ser proveniente de cães vacinados. Adicionalmente, a análise da AAPF-IgG na diluição do soro 1:8.192 confirmou o elevado desempenho da técnica. Somado a capacidade de um valor de PFP ≤ 20% excluir o diagnóstico de LVC, resultados confinados em uma faixa de reatividade acima de 20% podem ser utilizados como uma ferramenta complementar para confirmar o diagnóstico. Além disso, quando encontrado um valor de PFP > 80%, a amostra apresenta uma chance mínima de pertencer a um cão não infectado ou vacinado com Leishmune[®]. Em conjunto, os resultados sugerem que a AAPF-IgG, aplicada na diluição do soro 1:8.192 apresentou melhor desempenho no âmbito da reatividade diferencial entre cães NI, INF e VAC.

Tabela 7 - Razões de verossimilhança para diagnóstico diferencial entre infecção ativa e vacinação com Leishmune[®]

RVs	AAPF-IgG	
	Diluição do soro	
	1:2.048	1:8.192

*Resultados que apresentaram valor clínico.

5.1.4. Avaliação da aplicabilidade da AAPF-IgG para o diagnóstico sorológico diferencial da LVC.[®]

Para avaliar a aplicabilidade da AAPF-IgG foi utilizada uma amostragem populacional constituída por um maior número de cães NI (n=25), INF (n=64) e VAC (n=62). A AAPF-IgG apresentou sensibilidade de 97% para o grupo INF (62/64) e especificidade de 100% e 86% para NI (25/25) e VAC (8/62), respectivamente, na diluição do soro 1:2.048 (Figura 13 – gráfico à esquerda). A análise dos resultados na diluição do soro 1:8.192 confirmou a elevada sensibilidade e especificidade da técnica para discriminar INF de NI e VAC (Figura 13 – gráfico à direita), aprimorando o desempenho da técnica para excluir o diagnóstico de LVC em cães vacinados com Leishmune[®]. Em conjunto, esses resultados confirmam a hipótese inicial, em que a AAPF-IgG, na diluição do soro 1:8.192, apresentou excelente desempenho para discriminar reatividade sorológica entre NI, INF e VAC, apresentando 100% de especificidade.

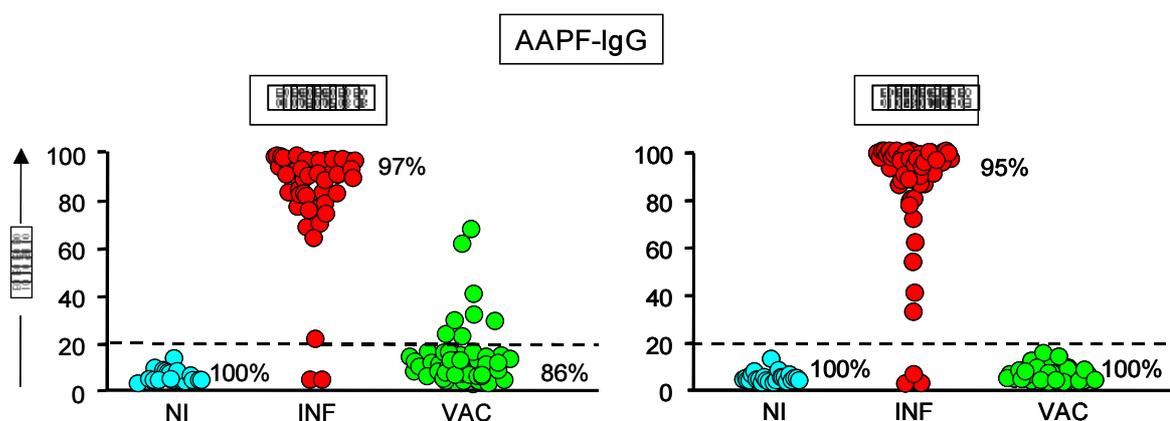


Figura 13: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=25), infectados (INF=●, n=64) e vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=62).

Os resultados foram expressos como PFP para amostras individuais na diluição do soro 1:2.048 (gráfico à esquerda) e 1:8.192 (gráfico à direita). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os índices especificidade e sensibilidade foram apresentados na figura.

5.2. Avaliação do Desempenho da AAPF-IgG em Comparação com RIFI e ELISA (Técnicas Sorológicas Convencionais) e Kalazar Detect[®] (não Convencional) Aplicadas no Diagnóstico Diferencial da LVC

Uma vez avaliada a aplicabilidade da AAPF-IgG para o diagnóstico diferencial da LVC, o próximo passo consistiu em verificar o seu desempenho, utilizando a diluição do soro 1:8.192, em discriminar cães NI, INF e VAC comparado com as técnicas convencionais utilizadas na rotina laboratorial, RIFI e ELISA. Como demonstrado na Figura 14, todos os cães NI apresentaram resultados negativos por ELISA e AAPF-IgG, confirmando os resultados negativos encontrados na RIFI, utilizada como teste de referência neste estudo (Figura 14 – A, B e C). A técnica ELISA demonstrou resultados positivos em 90% dos cães INF (Figura 14 – D e F), enquanto a AAPF-IgG foi capaz de confirmar a soropositividade em 93% neste mesmo grupo (Figura 14 – E e F). Os dados demonstraram que todos os cães VAC apresentaram sorologia positiva por RIFI (Figura 14 – G e H) e 19% pela técnica ELISA (Figura 14 – G e I). A AAPF-IgG foi a técnica que apresentou melhor desempenho para excluir soropositividade em cães vacinados (Figura 14 – H e I).

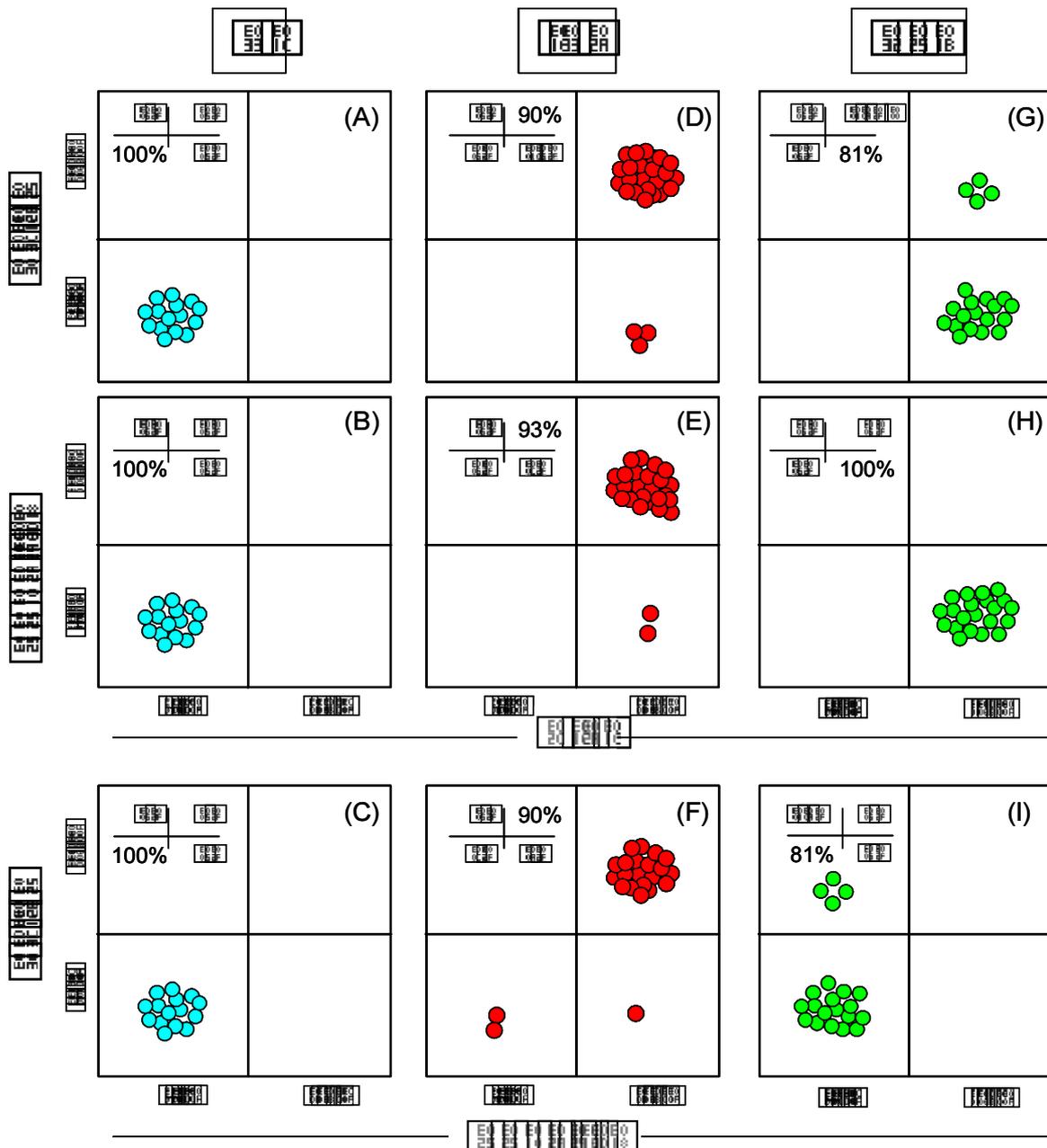
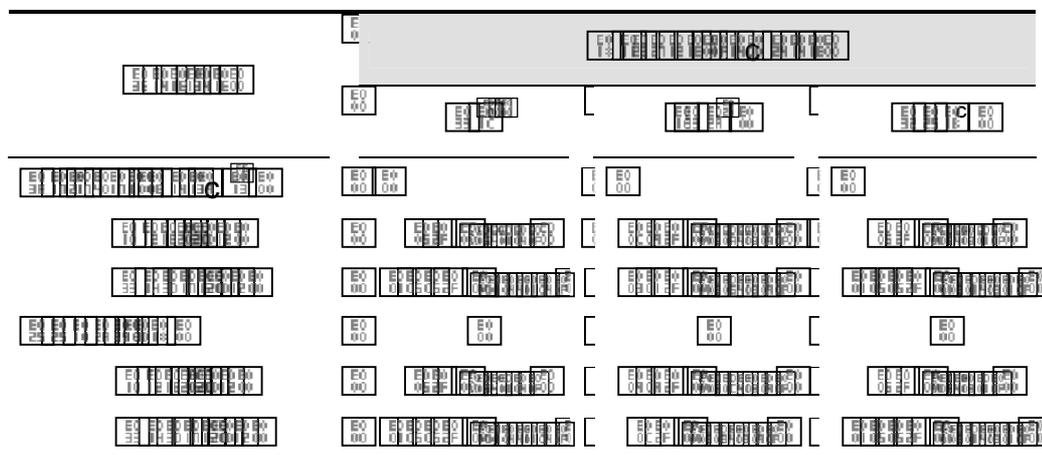


Figura 14: Desempenho da AAPF-IgG (diluição do soro 1:8.192) em paralelo com RIFI e ELISA para discriminar a reatividade de IgG em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI=●, n=15 - A, B, C), infectados (INF=●, n=29 - D, E, F) e vacinados com Leishmune[®] (VAC=●, n=21- G, H, I). Os dados foram representados em quadrantes por combinações de resultados negativos e positivos para cada par de testes sorológicos classificados como quadrantes -/- (inferior esquerdo), -/+ (superior esquerdo), +/- (inferior direito) e +/+ (superior direito). Os percentuais encontrados para cada combinação foram expostos no lado superior esquerdo de cada quadrante.

Foi proposto também comparar o desempenho da AAPF-IgG (diluição do soro: 1:8192) com um teste rápido, não convencional, aplicado no diagnóstico da LVC, o Kalazar Detect[®]. Os resultados demonstraram que tanto o Kalazar Detect[®] quanto a AAPF-IgG foram capazes de discriminar INF de NI e VAC, ambos apresentando especificidade de 100% (Tabela 8). Por outro lado, os resultados demonstraram que a AAPF-IgG apresentou sensibilidade de 93% enquanto o teste rápido Kalazar Detect[®] resultou numa sensibilidade de 79%. Esses

índices demonstraram que a AAPF-IgG apresentou melhor desempenho para identificar cães infectados quando comparado ao Kalazar Detect[®] (Tabela 8).

Tabela 8 - Desempenho AAPF-IgG em paralelo com Kalazar Detect[®] aplicados no diagnóstico diferencial da LVC



- a - Cães não infectados (diagnóstico parasitológico e sorológico negativo para LVC, n=15).
 b - Cães infectados (diagnóstico parasitológico positivo para LVC, n=29).
 c - Cães vacinados com Leishmune[®] (RIFI positiva 30 dias após a vacinação, n=21).

Numa abordagem adicional, a fim de investigar os resultados falso negativos detectados pela AAPF-IgG, ELISA e Kalazar Detect[®], cães infectados foram segregados em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S) como descrito em Material e métodos. Os resultados, expressos em gráficos de barras, demonstraram que a técnica ELISA apresentou resultado falso negativo distribuído entre cães O (22%) e S (3%) e nenhum resultado falso negativo para cães A (Figura 15). O teste Kalazar Detect[®] apresentou os maiores índices de resultados falso negativos, distribuídos nos três grupos de cães: A (25%), O (33%) e S (14%).

Cabe ressaltar que a análise da AAPF-IgG foi realizada utilizando a diluição do soro 1:2.048, com intuito de favorecer a sensibilidade da metodologia em detrimento da especificidade. Pode-se observar resultados falso negativos restritos ao grupo O (22%) e nenhum resultado negativo para cães A e S. Foi encontrado um alto índice de concordância entre ELISA e AAPF-IgG para identificar cães A e S, interpretado como ótimo (Tabela 3, Material e métodos) ($\kappa=0,99$).

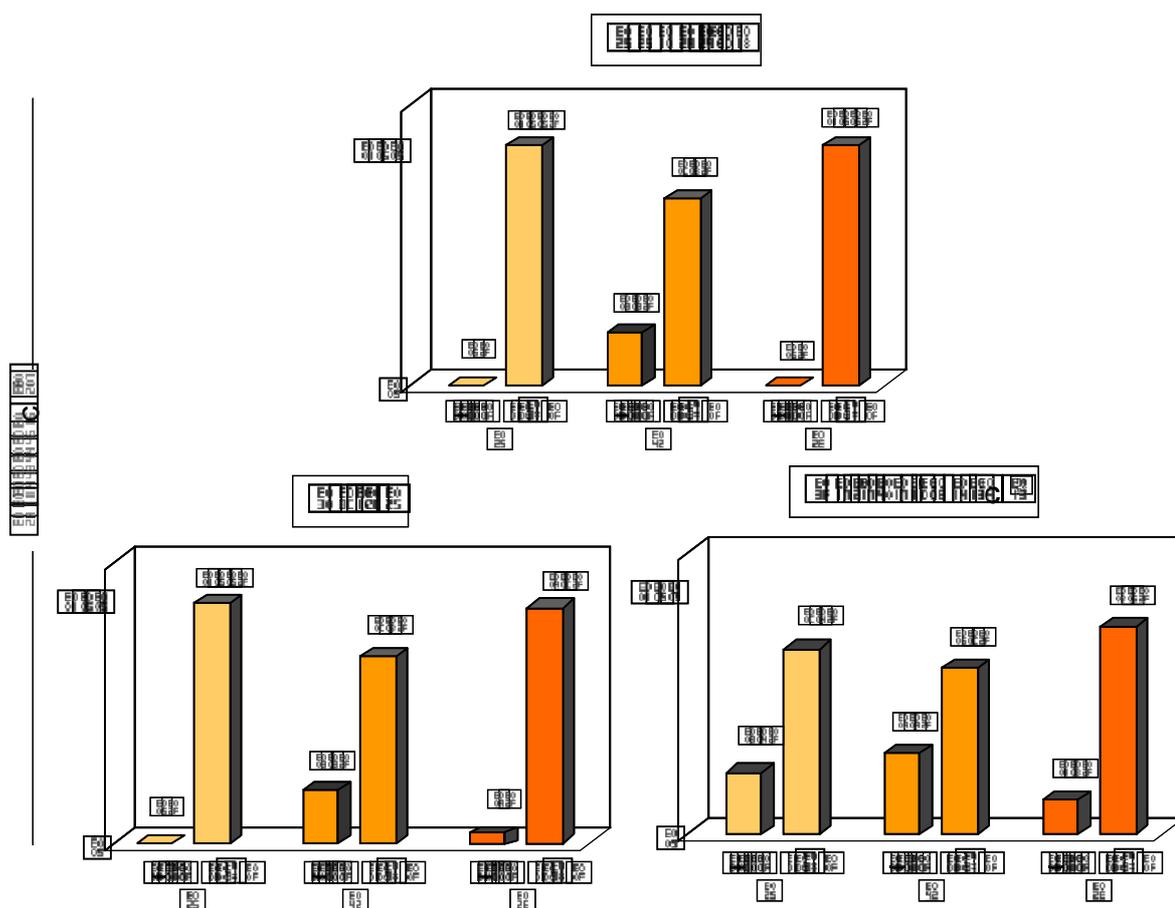


Figura 15: Frequência de resultados falso-negativos e verdadeiro-positivos detectados por AAPF-IgG (diluição 1:2.048), ELISA e Kalazar Detect[®] em amostras de cães infectados com *L. chagasi* categorizados em assintomáticos (A=○, n=6) oligossintomáticos (O=●, n=9) e sintomáticos (S=●, n=14). Os resultados foram expressos como percentual de resultados falso-negativos (-) ou verdadeiro positivos (+). A análise estatística foi realizada pelo índice Kappa (Kappa=0,99).

5.3. Avaliação do Desempenho da AAPF-IgG em Cães Imunizados Experimentalmente com Outros Imunobiológicos Candidatos à Imunoprofilaxia da LVC

Embora a Leishmune[®] seja o único imunobiológico comercialmente disponível atualmente para a profilaxia da LVC, sabe-se que grupos de pesquisa têm investido seus esforços em desenvolver e testar outras vacinas, com objetivo de obter um custo produtivo mais baixo em relação à Leishmune[®], entre outros motivos. Considerando este fato, foi proposto também avaliar o desempenho da técnica em cães vacinados experimentalmente com outros imunobiológicos de primeira geração constituídos por antígenos brutos, candidatos à imunoprofilaxia contra a LVC.

Como exposto na Figura 16, a AAPF-IgG, na diluição do soro 1:2.048, excluiu o diagnóstico de LVC em todos os cães vacinados com os imunobiológicos LB e LB+SAL. Por outro lado, cães vacinados com as vacinas LB+SAP (80%), LB+SAP+SAL (100%) e em

menor percentual LA+BCG (32%) apresentaram soroconversão pós-vacinal detectada pela AAPF-IgG. Quando os resultados foram avaliados na diluição do soro 1:8.192 foi observado redução significativa na taxa de resultados falso positivos. Apenas quatro cães apresentaram valores de PFP acima do ponto de corte, sendo dois deles vacinados com LB+SAP e outros dois vacinados com LB+SAP+SAL e LA+BCG, respectivamente. Esses dados apontam a possibilidade de utilização da AAPF-IgG para diagnóstico confiável da LVC quando outros imunobiológicos também estiverem disponíveis no mercado.

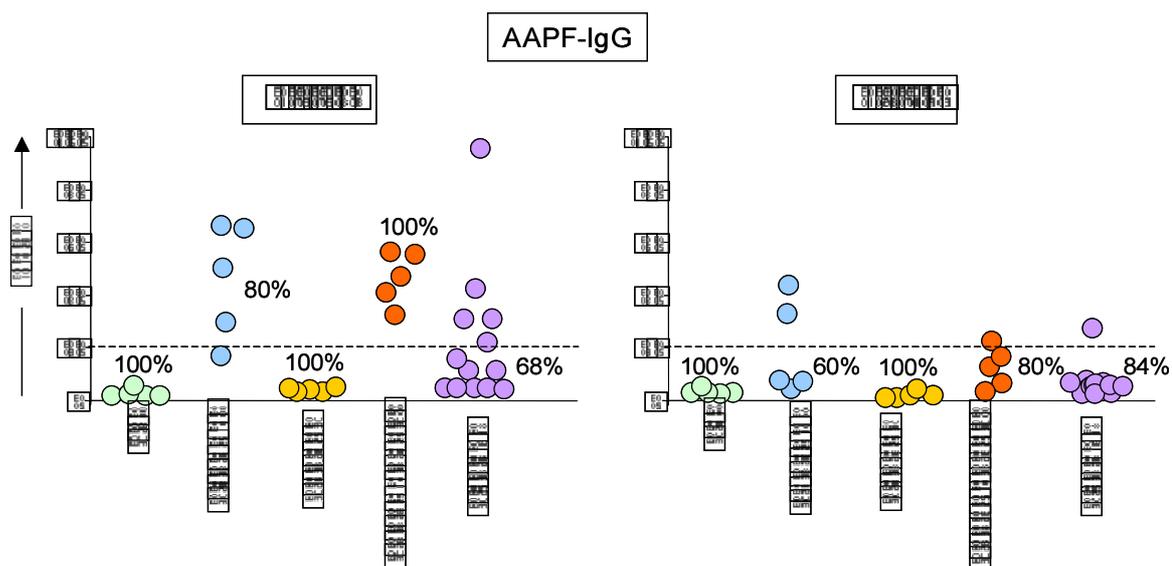


Figura 16: Desempenho da AAPF-IgG para discriminar cães imunizados com diferentes imunobiológicos: *Leishmania braziliensis* (LB=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saponina (LB+SAP=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saliva (LB+SAL=●, n=5), *Leishmania braziliensis* + saponina + saliva (LB+SAP+SAL=●, n=5), *Leishmania amazonensis* + BCG (LA+BCG=●, n=12).

Os gráficos representam a reatividade da AAPF-IgG em amostras individuais de cães vacinados expressos como PFP na diluição do soro 1:2.048 (gráfico à esquerda) e 1:8.192 (gráfico à direita). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os índices de especificidade e sensibilidade foram apresentados na figura.

5.4. Análise do Grau de Reatividade Cruzada da AAPF-IgG em Amostras de Cães Portadores de Outras Doenças Infecto-Parasitárias

Outra etapa importante na caracterização do desempenho e validação de testes sorológicos para diagnóstico consiste na avaliação da reatividade cruzada da técnica. Para cumprir este propósito a AAPF-IgG foi aplicada em amostras de cães infectados experimentalmente com os patógenos caninos *Ehrlichia. canis* (Ec=4), *Toxoplasma. gondii* (Tg=5), *Trypanosoma. cruzi* (Tc=7) e infectados naturalmente com *Leishmania. braziliensis* (Lb=6) em paralelo com cães infectados com *L. chagasi* (Lc=6).

Inicialmente as amostras foram testadas por RIFI e ELISA específicos para LVC. Como demonstrado na Tabela 9, 50% (2/4) e 25% (1/4) de cães infectados por *E. canis* foram identificados na RIFI e ELISA, respectivamente. Surpreendentemente, 100% dos cães infectados com *T. cruzi* foram positivos na RIFI e 57% (4/7) pela técnica ELISA. Em relação aos cães infectados por *L. braziliensis*, foi observado que 56% (4/7) e 43% (3/7) foram identificados por RIFI e ELISA, respectivamente. Nenhum cão portador de toxoplasmose foi identificado como infectado por *L. chagasi* em ambos os métodos. Para avaliar o grau de reação cruzada na AAPF-IgG, primeiramente a reatividade de IgG foi avaliada em mistura de soros de cães apresentando diferentes doenças infecto-parasitárias. Como ilustrado na Figura 17 (gráfico superior), a AAPF-IgG excluiu o diagnóstico de LVC em cães infectados com *E. canis* e *T. gondii*, mas apresentou resultado falso positivo quando misturas de soros de cães infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis* foram testados, nas diluições do soro 1:2.048 e 1:8.192. Adicionalmente, com a finalidade de identificar a contribuição de cada doença para o resultado falso-positivo encontrado na mistura de soros, foram avaliadas amostras individuais. Quando a AAPF-IgG foi aplicada na diluição 1:2.048, foram observados resultados falso positivos em 43% (3/7) e 50% (3/6) de cães infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis*, respectivamente, comparado a 100% de resultados verdadeiros positivos em cães infectados com *L. chagasi* (Figura 17 – gráfico inferior à esquerda). Na diluição 1:8.192, entretanto, foi observado uma elevada especificidade da técnica quando amostras de cães infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis* (86% e 84%, respectivamente) foram testadas, com sensibilidade inalterada (100%) (Figura 17 – gráfico inferior à direita).

Diante dos resultados obtidos, a AAPF-IgG foi qualificada como técnica aplicável ao diagnóstico sorológico da LVC frente a possibilidade de doenças que podem co-existir em uma mesma área endêmica.

Tabela 9 – Reação cruzada na RIFI e ELISA em cães portadores de diferentes patologias caninas.

Patologia	RIFI					ELISA				
	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
Ec	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ec – cães infectados com *Erlichia canis*.
 Tg – cães infectados com *Toxoplasma gondii*.
 Tc – cães infectados com *Trypanosoma cruzi*.
 Lb – cães infectados com *Leishmania braziliensis*.

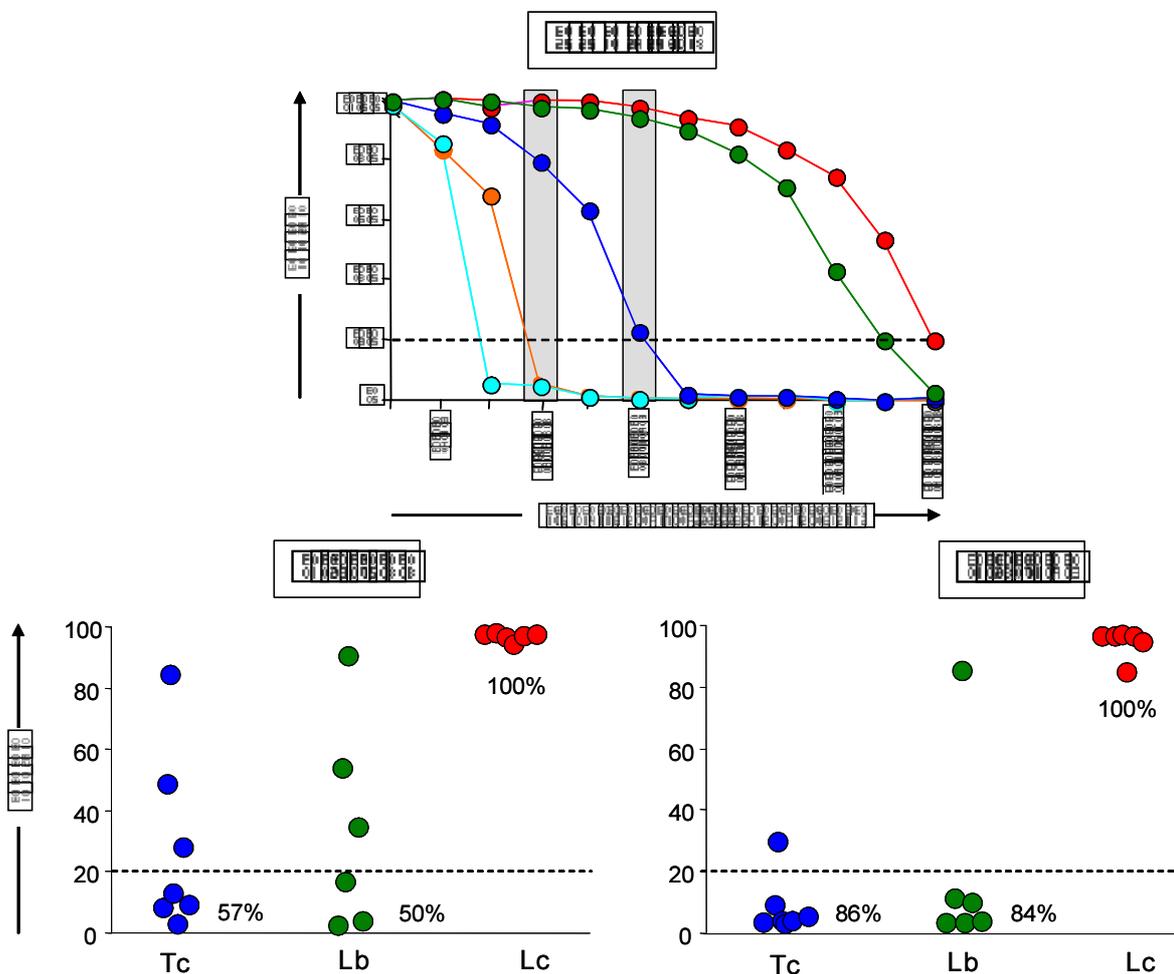


Figura 17: Desempenho da AAPF-IgG para discriminar cães infectados com *L. chagasi* (Lc=●) de cães infectados com outros patógenos (*E. canis*=●, *T. gondii*=●, *T. cruzi*=●, *L. braziliensis*=●). Os resultados foram expressos como PFP ao longo da curva de diluição da mistura de soros (1:256 a 1: 524.288). Os retângulos representam as diluições do soro 1:2.048 e 1:8.192 (gráfico superior). Os gráficos inferiores representam a reatividade da AAPF-IgG em amostras individuais de cães infectados com *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* expressos como PFP na diluição do soro 1:2.048 (gráfico à esquerda) e 1:8.192 (gráfico à direita). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os índices especificidade e sensibilidade foram apresentados na figura.

5.5. Determinação da Sensibilidade e Especificidade da AAPF em uma População Inquérito Artificial Representativa do Panorama de Amostras Destinadas ao Diagnóstico Sorológico da LVC

Para finalizar esse estudo foi proposto determinar os índices sensibilidade e especificidade da AAPF-IgG em um contexto populacional que incluísse cães representando as diversas situações que caracterizam o possível panorama de amostras para o diagnóstico da LVC. Para tal, cães não-infectados (NI), cães vacinados com diferentes imunobiológicos (VAC, LB, LB+SAP, LB+SAP+SAL, LA+BCG) e cães infectados com outros tripanosomatídeos (Tc e Lb) foram agrupados para constituir uma população inquérito artificial denominada grupo controle. Por outro lado, cães infectados com *L. chagasi* (A, O e S) foram agrupados para constituir uma população inquérito artificial denominada portadores de LVC. Como ilustrado na Figura 18, a AAPF-IgG, apresentou 97% de sensibilidade e 79% de especificidade quando os resultados foram avaliados na diluição do soro 1:2.048. Adicionalmente, na diluição do soro 1:8.192 foi observado aumento considerável na especificidade (95%) e sensibilidade de 95%.

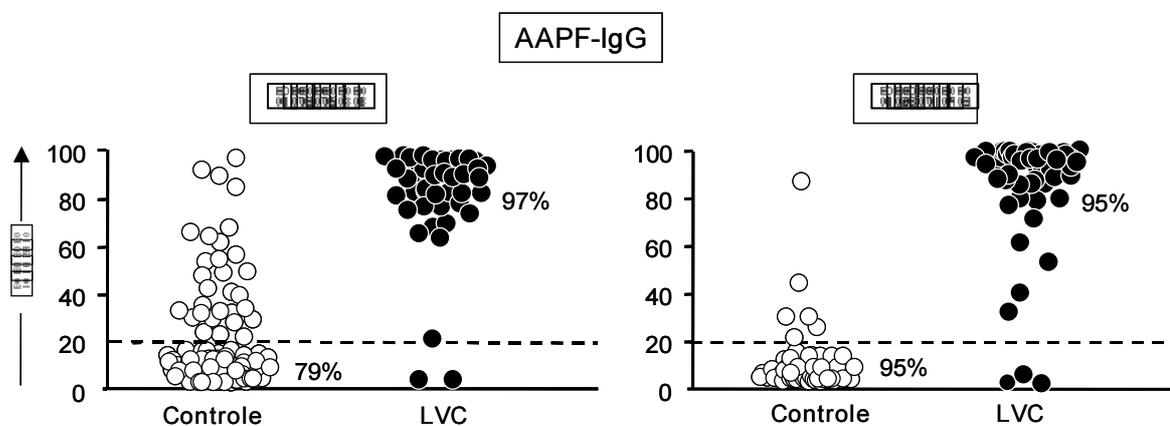


Figura 18: Reatividade da AAPF-IgG em amostras de soros individuais de cães controles não infectados com *L. chagasi* (Controle=○, n=132) e infectados com *L. chagasi* (LVC=●, n=64). Os resultados foram expressos como PPF para amostras individuais na diluição do soro 1:2.048 (gráfico à esquerda) e 1:8.192 (gráfico à direita). A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados negativos e positivos. Os índices especificidade e sensibilidade foram apresentados na figura.

Discussão

O diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública e representa um desafio para a comunidade científica.

Os métodos parasitológicos, incluindo demonstração direta do parasito por microscopia e isolamento do parasito em cultura de aspirado de material biológico constituem métodos diagnósticos de certeza. Entretanto, o emprego dessas técnicas na rotina de laboratórios clínicos apresenta limitações, principalmente devido à variabilidade e baixa sensibilidade de tais procedimentos (OSMAN *et al.*, 1997; REALE *et al.*, 1999), somado ao alto custo e necessidade de profissionais qualificados (METTLER *et al.*, 2005). Na última década, a introdução de métodos moleculares, baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR) contribuiu para o aumento da sensibilidade com especificidade confirmada para detectar DNA de *Leishmania* em amostras biológicas (PIRMEZ *et al.*, 1999), mas também apresentam limitações principalmente relacionadas ao custo operacional.

O diagnóstico sorológico, baseado na detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, portanto, representa uma ferramenta importante, uma vez que sua utilização é facilitada por ser menos invasiva e assim possibilitar maior praticidade.

Os estudos que abordam a resposta imune humoral na LVC apresentam um consenso geral que os elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* desencadeados pela infecção não apresentam efeito protetor para o hospedeiro infectado, uma vez que maiores títulos de anticorpos estão geralmente associados com maior morbidade da infecção, ou seja, de um modo geral, níveis maiores de anticorpos parecem ter elevado valor preditivo e correlação significativa com o número de sinais apresentados pelos cães avaliados. (ABRANCHES *et al.*, 1991; GENARO *et al.*, 1992; PINELLI *et al.*, 1994; FERRER *et al.*, 1995; SLAPPENDEL & FERRER, 1998; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). A presença de altos títulos de anticorpos, característicos da LVC, facilita consideravelmente o diagnóstico por testes sorológicos (BRAY, 1980).

Na prática, entretanto, os veterinários usualmente confrontam com resultados de sorologia positiva duvidosos, muitas vezes incompatíveis com sinais da LVC (FRANCINO *et al.*, 2006). As técnicas RIFI e ELISA constituem os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde e utilizados em inquéritos soro epidemiológicos em ações de monitoramento e vigilância da LV no Brasil (MS, 2006). Entretanto, estas técnicas apresentam limitações como variabilidade de sensibilidade e especificidade (ALVAR *et al.*, 2004). Além disso, a imunoprofilaxia mediada pela utilização da vacina Leishmune[®], em clínicas veterinárias de áreas endêmicas, reforçou o questionamento em relação a um resultado positivo, uma vez que a RIFI e ELISA são incapazes de discriminar infecção por

Leishmania e soroconversão pós-vacinal induzida pela Leishmune[®], causando sérios problemas de domínio público. Em relação a métodos sorológicos alternativos, como o teste de aglutinação direta (DAT) (CARDOSO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006) e o ELISA-rK39 (BURNS *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 2006b), a capacidade de distinguir cães infectados daqueles vacinados ainda não foi esclarecida.

Diante do exposto, o desenvolvimento de uma nova técnica sorológica apresentando alta sensibilidade e especificidade, que seja também capaz de discriminar reatividade sorológica pós-vacinal, em nível individual, representa uma importante inovação metodológica para o diagnóstico sorológico da LVC (ANDRADE *et al.*, 2007).

A introdução da citometria de fluxo como método para análise sorológica trouxe uma nova perspectiva para os estudos da resposta imune humoral na leishmaniose. Esse método apresentou grande versatilidade, uma vez que permitiu o desenvolvimento de uma técnica diagnóstica que emprega parasitos vivos ou fixados como suporte antigênico, tornando possível a análise da reatividade de anticorpos em misturas de soros ou soros individuais (ROCHA *et al.*, 2002, 2003, 2006; CARVALHO NETA *et al.*, 2006, GOMES *et al.*, 2006; LEMOS *et al.*, 2007).

A fim de contribuir nesse campo de pesquisa, esse trabalho propôs estabelecer e avaliar detalhadamente, segundo os critérios da epidemiologia clínica, um novo teste diagnóstico, baseado na citometria de fluxo, utilizando promastigotas fixadas de *L. chagasi* como ferramenta para detecção de imunoglobulinas em soros caninos. A população de estudo foi constituída por uma população canina que incluiu cães não infectados, cães infectados com *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas, cães imunizados por Leishmune[®], outros imunobiológicos candidatos à imunoprofilaxia contra LVC e cães infectados com outros patógenos.

Nesse estudo, inicialmente foram padronizados as concentrações dos anticorpos secundários a serem utilizados na AAPF e avaliados os perfis de reatividade sorológica encontrados para as imunoglobulinas (IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2 e IgE) de cães não infectados, portadores de LVC e vacinados com Leishmune[®]. Os resultados encontrados sugeriram a possibilidade de utilização da técnica para discriminar sorologicamente estes cães.

Na padronização da AAPF-IgE optou-se por realizar um pré-tratamento das amostras de soro para retirada de IgG uma vez que não foi observada reatividade na AAPF-IgE (dado não mostrado). SOUZA-ATTA *et al.* (1999) demonstraram que a depleção de IgG com *RF absorbent* permitiu a detecção de IgE em soros de pacientes com doenças parasitárias. Diante desse achado foi suposto que a alta concentração de IgG no soro de cães infectados,

característico da LVC, poderia competir com IgE pela ligação aos receptores e por esse motivo essa imunoglobulina não havia sido detectada por meio da AAPF.

Dessa forma, foi proposto um protocolo de adsorção de IgG das misturas de soros caninos por meio de pré-tratamento com *RF absorbent* e também proteína A ou proteína G, conforme descrito por alguns autores (JOHANSSON *et al.*, 1978; PENG *et al.*, 1993; NILSON *et al.*, 1986). No presente estudo optou-se pelo pré-tratamento utilizando proteína G, conforme condições descritas em Material e métodos, uma vez que possibilitou eliminação completa da reatividade de IgG da mistura de soros de cães pertencentes aos grupos NI e INF (Figura 5). A escolha pela utilização da proteína G foi baseada também no trabalho de PENG *et al.* (1991) que demonstrou a capacidade da proteína A em adsorver 87% de IgE presente em soro canino, além de IgG, diferentemente da proteína G, ao qual adsorveu a IgG, mas não adsorveu a IgE.

Embora tenha sido padronizado o protocolo para adsorção de IgG do soro de cães dos grupos NI e INF, os resultados da AAPF-IgE demonstraram que não foi possível detectar IgE anti-*Leishmania* por meio da AAPF, mesmo em soros pré-tratados. É possível que os receptores específicos para IgE tenham sido degradados no processo de preparação do suporte antigênico utilizado no teste.

Alguns trabalhos têm demonstrado a presença de IgE em cães portadores de LVC, sobretudo apresentando a forma sintomática (INIESTA *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006b), o que demonstra a importância dessa imunoglobulina no contexto da doença. Portanto, a padronização da detecção dessa imunoglobulina por meio da citometria de fluxo utilizando parasitos vivos como antígenos, conforme o estudo de ROCHA *et al.* (2004), constitui perspectiva do presente trabalho.

A avaliação do desempenho dos testes (AAPF-IgM, IgA, IgG, IgG1 e IgG2) por meio de vários índices estatísticos permitiu qualificar a AAPF-IgA, IgG e IgG2 como técnicas aplicáveis para o diagnóstico sorológico da LVC. Embora tenha sido observada sensibilidade elevada na AAPF-IgM (90%), a especificidade foi baixa (60%). É possível que o baixo valor de especificidade encontrado deva-se à presença de moléculas de IgM polirreativas presentes nos soros dos cães NI, que poderiam ligar-se a carboidratos da superfície da *Leishmania*, como por exemplo o LPG, e assim gerando resultados falso positivos.

Embora não esteja bem definida na literatura a associação entre um padrão de resposta humoral anti-*Leishmania* associada à resistência ou susceptibilidade na LVC, pesquisadores relatam menores títulos de anticorpos circulantes em cães assintomáticos, com presença predominante de IgG1 associada a uma menor carga parasitária em diversos tecidos. Por outro lado, cães sintomáticos apresentam elevada produção de imunoglobulinas tais como IgM,

IgA, IgG2 e IgE (REIS *et al.*, 2006a, b). A presença de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática poderia indicar associação dessa forma clínica com a resposta imune do tipo 2 (REIS *et al.*, 2006b). Estes resultados refletem diretamente no diagnóstico sorológico das diferentes formas clínicas da LVC.

Foi encontrada baixa sensibilidade para AAPF-IgG1 (59%). A análise dos dados demonstrou que tanto cães assintomáticos (3/6) como oligossintomáticos (2/9) e sintomáticos (3/14) apresentaram valores de PFP abaixo do ponto de corte na avaliação de IgG1 (dados não mostrados). Esses achados corroboram com estudos que demonstraram níveis extremamente variáveis de IgG1 encontrados em cães infectados com *L. chagasi*, incluindo assintomáticos e oligossintomáticos (DEPLAZES *et al.*, 1995; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006a). IgG1 foi detectada somente em uma pequena proporção de cães apresentando infecção recente ou assintomática (QUINNELL *et al.*, 2003).

As análises da AAPF-IgA, IgG e IgG2 demonstraram que essas técnicas apresentaram elevado desempenho para o diagnóstico sorológico da LVC (Tabela 4), com valores positivos de PFP (PFP>20%) confinados em uma região de alta reatividade sorológica na AAPF-IgG e IgG2, o que permite segurança na análise dos resultados (Figura 9).

Os valores preditivos são indicadores utilizados para complementar a interpretação do resultado de um teste diagnóstico. Constituem variáveis dependentes da sensibilidade e especificidade da técnica e também da prevalência da doença ou infecção numa determinada região. A prevalência atual da LVC no Brasil oscila, em regiões endêmicas, entre 5 e 10% (ALVES *et al.*, 2004). Nessa faixa de prevalência foi possível observar que a AAPF-IgA, IgG e IgG2 apresentaram ganho nos valores preditivos negativos, gerando assim, minimização de resultados falso negativos (Tabela 5).

No âmbito da reatividade diferencial entre cães infectados e vacinados, estudos demonstraram que a reatividade média de IgG, especificamente a razão anti-FML IgG1/IgG2, foi capaz de discriminar grupos de animais infectados por *L. chagasi* e animais vacinados com Leishmune[®] (DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2003). Estes autores demonstraram uma razão IgG1/IgG2 diferencial entre cães infectados e vacinados, por FML-ELISA e sugeriram que uma maior detecção do isotipo IgG1 foi associado com infecção natural enquanto uma maior detecção do isotipo IgG2 foi relacionado com proteção vacinal. Embora esta técnica tenha demonstrado aplicabilidade em distinguir reatividade entre grupos de animais, esse tipo de abordagem possui utilização restrita em laboratório clínico, uma vez que a análise de determinado resultado sorológico deve ser considerada em nível individual, para liberação de um resultado conclusivo.

Assim, foi proposta a avaliação das AAPFs para análise de reatividade diferencial entre cães dos grupos INF e VAC, inicialmente aplicada na diluição do soro 1:2.048, para distinguir infecção e soroconversão pós-vacinal, em nível individual. Enquanto a maioria dos cães pertencentes ao grupo VAC apresentou resultado negativo (76%) pela AAPF-IgG (diluição do soro 1:2.048), uma frequência bem menor de resultados negativos foi observada na AAPF-IgG2 (43%). Foi demonstrado que a AAPF-IgG apresentou elevado desempenho para o diagnóstico diferencial da LVC (Figura 11). Cabe ressaltar que diferenças inerentes a imunofluorescência encontrada na avaliação de cada imunoglobulina, tal como a diluição do anticorpo secundário (1:1.000 para IgG1 e 1:500 para IgG2) pode ser responsável por este fato. É importante comentar que a reatividade expressa sob a forma de PFP reflete a quantidade de anticorpos caninos ligados à superfície do parasito, mas também a quantidade de moléculas de fluorocromo (FITC) presente em cada anticorpo secundário (informação não disponibilizada pelo fabricante). Portanto, a razão fluorocromo/anticorpo conjugado deve ser considerada juntamente com a estequiometria da ligação antígeno-anticorpo quando se deseja comparar as AAPFs, o que não constitui foco do presente trabalho. Segundo QUINNEL *et al.* (2003) a controvérsia dos estudos relacionados a subclasses de IgG pode ser devido a natureza policlonal dos anticorpos utilizados comercialmente. Outro aspecto é a natureza do antígeno utilizado e o princípio de cada metodologia.

A AAPF-IgA apresentou bom desempenho para o diagnóstico diferencial da LVC (Tabela 6). Entretanto, foi observado um número de resultados muito próximos ao ponto de corte para o grupo INF (Figura 11), o que representa uma limitação para o uso dessa técnica no diagnóstico da LVC. A dispersão observada nos valores de PFP na AAPF-IgA para cães INF pode ser um reflexo das diferenças sorológicas inerentes as formas clínicas que compuseram este grupo. REIS *et al.* (2006b) demonstraram que cães assintomáticos apresentaram títulos significativamente mais baixos de IgA que cães sintomáticos. Adicionalmente, estudos demonstraram que plasmócitos produtores de IgA fazem uma rota de circulação entre as mucosas e a medula óssea (CYSTER, 2003). Na LVC, o intenso parasitismo medular fornece intensa estimulação antigênica para plasmócitos de cães que apresentam maior carga parasitária nestes órgãos. Sendo assim, cães sintomáticos, que apresentam maior carga parasitária na medula (REIS *et al.*, 2006a), poderiam apresentar maior produção de IgA e conseqüentemente maiores valores de PFP, comparado aos cães assintomáticos. Nesse contexto, acredita-se que a AAPF-IgA poderia contribuir no prognóstico e acompanhamento de protocolos terapêuticos de cães portadores de LVC.

A diluição do soro também representa fator importante em metodologias sorológicas semi-quantitativas. Foi observado que, na diluição do soro 1:8.192, a AAPF-IgG apresentou

melhor performance comparado a diluição 1:2.048 (Figura 12). Adicionalmente, a análise descritiva da razão de verossimilhança permitiu a interpretação dos dados em diferentes faixas de PFP, confirmando aplicabilidade da AAPF-IgG para distinguir os cães pertencentes aos grupos INF e VAC, quando aplicadas na diluição do soro 1:8.192. Quando encontrados valores de PFP > 80%, na AAPF-IgG, na diluição do soro 1:2.048, significa que estes resultados praticamente confirmam o resultado de LVC. Adicionalmente, a análise da AAPF-IgG na diluição 1:8.192 contribui consideravelmente para confirmação do resultado, pois associado a capacidade de um valor de PFP ≤ 20% excluir o diagnóstico de LVC, valores de PFP acima de 20%, apresentam uma chance mínima de vir de um cão VAC.

Um ponto importante, entretanto, é que embora a análise dos dados na diluição 1:8.192 tenha apresentado melhor desempenho, a avaliação dos resultados na diluição do soro 1:2.048 pode favorecer a sensibilidade do teste, o que seria essencial na detecção de amostras apresentando baixa quantidade de anticorpos IgG, como por exemplo cães em uma fase precoce da infecção ou cães assintomáticos. Pesquisadores sugerem que métodos que apresentam alta sensibilidade são imprescindíveis para utilização em programas de vigilância e controle ou para diagnóstico de cães originários de áreas endêmicas ou assintomáticos (DEPLAZES *et al.*, 2005). Por outro lado, a análise de resultados em diluições maiores poderia resguardar a especificidade da técnica. Dessa forma, uma boa estratégia seria a avaliação dos resultados nas duas diluições do soro (1:2.048 e 1:8.192) para fornecer interpretação dos resultados individuais com maior segurança, minimizando resultados falso negativos e falso positivos. A análise da AAPF-IgG na diluição do soro 1:2.048 poderia assegurar inclusão de todos os cães infectados, inclusive cães apresentando infecção recente e assintomáticos. Por outro lado, um resultado positivo (PFP > 20%), na diluição do soro 1:8.192, apresentaria uma chance mínima de vir de um cão não infectado, excluindo, assim, o diagnóstico de LVC em casos onde a reatividade de IgG devido a soroconversão pós-vacinal representa um problema.

A avaliação da aplicabilidade de um teste refere-se a quanto, em termos quantitativos, o teste é útil para diagnosticar um evento. Com objetivo de avaliar a aplicabilidade da AAPF-IgG, foi usado um maior número de soros de cães NI, INF e VAC. Pode-se confirmar a alta sensibilidade (95%) e especificidade (100%) da técnica (diluição do soro 1:8.192) para distinguir os três grupos de cães em nível individual (Figura 13). Assim, esse resultado reafirmou o elevado desempenho da AAPF-IgG.

No Brasil, sabe-se que a RIFI tem sido a metodologia mais utilizada para diagnóstico da LVC. Embora as vantagens dessa técnica sejam reconhecidas, como facilidade na execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo, autores demonstraram que a RIFI

apresenta problemas em relação a sua precisão, tal como baixa sensibilidade para detectar cães assintomáticos e especificidade variável (VALLI *et al.*, 1999), além da reatividade cruzada com outras doenças (CAMARGO E REBONATO, 1969; BADARÓ *et al.*, 1986). Assim, a utilização da RIFI na rotina laboratorial pode comprometer a efetividade do programa de controle do calazar por estar deixando de detectar cães infectados e, por outro lado, indicando o sacrifício de cães não infectados. Essas incertezas geram atitudes como a não indicação de eutanásia de animais positivos e, inclusive, a recomendação de tratamento desses animais.

A comparação entre técnicas convencionais e novas técnicas propostas como inovações torna-se imprescindível para justificar a implementação dessas últimas. Considerando o desempenho da AAPF-IgG em paralelo com os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde (RIFI e ELISA) como ferramentas para discriminar cães NI, INF e VAC, os resultados demonstraram que todos os cães VAC apresentaram sorologia negativa por AAPF-IgG (diluição do soro 1:8.192) enquanto 100% mostraram resultados positivos quando avaliados por RIFI e 19% quando avaliados por ELISA (Figura 14). Estas descobertas corroboram com os estudos de DE OLIVEIRA MENDES *et al.* (2003) que demonstraram elevada soropositividade pela RIFI após completa vacinação com Leishmune[®]. Esses dados retomam a discussão frente à situação de sacrifício de animais saudáveis apresentando resultados falso positivos, demonstrando a necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas. Assim, embora a RIFI represente o teste de referência para o diagnóstico da LVC, sua avaliação deveria ser revisada. Além da baixa especificidade já mencionada anteriormente, sua aplicação tem sido considerada limitada devido à interpretação subjetiva dos resultados e a baixa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios (GRADONI, 1999). Cabe ressaltar também que outros trabalhos já constataram a ausência ou baixa correlação entre RIFI e ELISA, mesmo quando o mesmo antígeno foi utilizado em ambas as técnicas (RACHAMIM *et al.*, 1991; GOTTSTEIN *et al.*, 1988). A razão pela discordância entre testes sorológicos não é totalmente compreendida, embora alguns fatores sejam conhecidos, mas de difícil controle. Estão vinculados em parte à estabilidade e especificidade do antígeno utilizado, a estabilidade dos reagentes utilizados no teste e a possibilidade de uma leitura visual dependente da qualificação e experiência dos técnicos responsáveis (MS, 1999).

Uma vez que a AAPF-IgG demonstrou melhor capacidade para excluir o diagnóstico de LVC em cães vacinados (Figura 14), deve ser recomendada como método complementar para confirmação de diagnóstico. Adicionalmente, a AAPF-IgG apresentou menor percentual

de resultados falso negativos em cães infectados com *L. chagasi*, representando uma ferramenta mais confiável para o diagnóstico de LVC.

Estudos têm demonstrado que a incidência da LV no Brasil ainda não atingiu níveis aceitáveis diante dos esforços do Ministério da Saúde no controle da doença (VIEIRA *et al.*, 1998; PALATNIK DE SOUZA *et al.*, 2001). Dentre os fatores responsáveis por esse fato encontram-se as limitações das técnicas convencionais (RIFI e ELISA) já mencionadas anteriormente somado a demora na liberação dos resultados desses testes, que poderiam contribuir de forma significativa para o fracasso dos programas de controle. Nesse contexto, pesquisadores sugerem que a aplicação de um teste rápido seria importante para a retirada imediata dos cães infectados, além de ser um método não invasivo e que não requerer técnicos especializados e equipamentos para sua execução (DELGADO *et al.*, 2001; MOHEBALI *et al.*, 2004). Baseado nessas informações, esse trabalho propôs avaliar o desempenho da AAPF-IgG em paralelo com o teste rápido Kalazar Detect[®] para diagnóstico da LVC em uma população que incluiu cães vacinados com Leishmune[®]. Os resultados demonstraram que tanto o teste rápido quanto a AAPF-IgG excluíram o diagnóstico de LVC em cães não infectados e cães vacinados com Leishmune[®], entretanto, o Kalazar Detect[®] apresentou sensibilidade inferior a AAPF-IgG para diagnosticar cães infectados (Tabela 8). Esses achados foram condizentes com estudos que encontraram uma sensibilidade de 70,9% (MOHEBALI *et al.*, 2004) e especificidade de 100% (MOHEBALI *et al.*, 2004, OTRANTO *et al.*, 2004) para o Kalazar Detect[®]. Assim, embora a reatividade ao antígeno rK39 seja um indicador de doença causada por *L. chagasi* (BADARÓ *et al.*, 1996), os testes baseados em sua detecção poderiam fornecer resultados falsos negativos.

Uma vez avaliados os desempenhos das técnicas sorológicas, tornou-se pertinente averiguar o desempenho dos testes segregando os animais nas diferentes formas clínicas da doença. Surpreendentemente, ELISA e AAPF-IgG foram capazes de identificar todos os cães assintomáticos (Figura 15). Esse dado foi interessante uma vez que os cães assintomáticos representam aproximadamente 50% da população canina soropositiva, contribuindo fundamentalmente na epidemiologia da doença (POZIO *et al.*, 1981; ABRANCHES *et al.*, 1991). Além disso, essa forma clínica tem sido relacionada à baixa sensibilidade apresentada pelos testes sorológicos (LEONTIDES *et al.*, 2002).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os dois testes, AAPF-IgG e ELISA, apresentaram resultados negativos em dois cães oligossintomáticos (22%) (Figura 15). Na avaliação da carga parasitária dos mesmos foi observada ausência de parasitos na medula óssea e baixa carga parasitária na pele (dados não mostrados). Sendo assim, acredita-

se que tais cães representem casos de infecção recente, considerando que autores sugeriram que a sensibilidade de detecção do anticorpo é geralmente baixa em infecções recentes (METTLER *et al.*, 2005). Segundo DYE *et al.* (1993), mesmo utilizando-se métodos sorológicos eficientes, 20% dos animais em fase inicial da doença podem estar em período de incubação ou soro conversão, o que auxilia na compreensão dos resultados falso negativos encontrados nos testes sorológicos.

Segundo ABRANCHES *et al.* (1991) os níveis de anticorpos específicos aparecem a partir de 1,5-3 meses após a infecção experimental com *L. infantum*. Por outro lado, segundo HOMMEL *et al.* (1995) os níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* estão frequentemente elevados, muito antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos em cães infectados com *L. infantum*, mas começam a cair quatro meses após a intervenção terapêutica (ALVAR *et al.*; 1994). Embora ABRANCHES *et al.* (1991) não encontraram correlação entre gravidade da doença e títulos de IgG total enquanto OLIVEIRA *et al.* (1993) encontraram altos títulos em cães assintomáticos ou subclínicos. Em área endêmica é muito comum o encontro de numerosos cães assintomáticos soropositivos. Por outro lado, também se observam nas mesmas condições inúmeros cães assintomáticos soronegativos e PCR positivos (SOLANO-GALEGO *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado que 62% de cães com diagnóstico sorológico e parasitológico negativo apresentavam reação de PCR positiva para *L. chagasi* (ANDRADE *et al.*, 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de que os métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados. Na verdade, um número considerável de cães positivos não são detectados na sorologia convencional e permanecem como reservatórios, possivelmente interferindo no controle da LV. Estudos sugerem que 90% dos cães assintomáticos de área endêmica desenvolvem a infecção e evoluem para a forma sintomática em um período que pode ser longo (ALENCAR, 1959; LANOTTE *et al.*, 1979).

O Kalazar Detect[®] apresentou resultados falso negativos em amostras de cães apresentando as três formas clínicas da doença (Figura 15). Entre essas amostras soronegativas, 72% (5/7) apresentavam títulos inferiores à 1:320 avaliadas pela RIFI (dado não mostrado). Esse resultado é concordante com o trabalho de GENARO *et al.* (1997) que demonstrou diminuição da sensibilidade do método cromatográfico utilizando o antígeno rk39 quando testado em soros de cães com títulos na RIFI entre 1:40 até 1:320.

Considerando o desempenho da AAPF-IgG em amostras de cães imunizados com outros imunobiológicos, os resultados apontam que a metodologia apresentará elevado desempenho quando amostras destes cães também forem avaliadas quanto ao diagnóstico da LVC. Dentre os imunobiológicos avaliados, aqueles que induziram soroconversão pós-vacinal

em um maior número de cães detectada pela AAPF-IgG (diluição 1:2.048) foi LB+SAP, LB+SAP+SAL e LA+BCG (Figura 16 – gráfico à esquerda). Acredita-se que estes cães tenham produzido maior quantidade de anticorpos IgG devido à natureza do adjuvante utilizado na preparação vacinal.

A função dos adjuvantes é aumentar e direcionar a resposta imune específica a antígenos vacinais, eles podem seletivamente aumentar diferentes componentes da resposta imune, tais como um particular isotipo de imunoglobulina. Sabe-se que a saponina, o adjuvante empregado nas vacinas LB+SAP, LB+SAP+SAL, bem como na Leishmune[®], faz parte de um grupo heterogêneo de esteróis glicosídeos e triterpenóides glicosídeos que estão presentes em uma ampla variedade de plantas, distribuída pela casca, folhas, caule, raízes e flores e que induz um perfil imunológico misto (Tipo 1 e 2), mas preferencialmente do tipo 1, o que favoreceria menor resposta humoral (MILGARTE e ROBERTS, 1995). Já o BCG utilizado como adjuvante na vacina LA+BCG é derivado do *Mycobacterium bovis*, utilizado mundialmente na prevenção da tuberculose (BARBOSA *et al.*, 2003). O BCG tem sido estudado amplamente nas últimas décadas, tendo sido demonstrado o seu importante papel na potencialização da resposta imune humoral de longa duração (WARREN *et al.*, 1988). Sabe-se que o BCG induz um perfil de resposta imunológica misto o que poderia favorecer a resposta humoral (SINGH e O'HAGAN, 2002; SCHIJNS, 2002; SINGH e O'HAGAN, 2003; LIMA *et al.*, 2004).

Apesar do fator inerente a resposta imunológica induzida pelo adjuvante utilizado na composição vacinal, a AAPF-IgG, aplicada na diluição do soro 1:8.192, apresentou bom desempenho para excluir o diagnóstico de LVC em cães submetidos a protocolos vacinais com a maioria dos imunobiológicos, candidatos à imunoprofilaxia contra LVC.

Uma importante limitação das técnicas sorológicas empregadas na rotina para o diagnóstico da LVC consiste na reação cruzada entre infecções, o que pode gerar dados epidemiológicos equivocados e diagnóstico individual falho da LVC (COSTA *et al.*, 1991; LIRA *et al.*, 2006; PALATNIK DE SOUZA *et al.*, 2001; MANCIANTI *et al.*, 1995; DYE *et al.*, 1993). Uma das principais limitações da RIFI é justamente a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas, o que dificulta a interpretação de dados epidemiológicos, uma vez que no Brasil existe sobreposição destas três doenças em certas regiões (GONTIJO e MELO, 2004). Essa informação corrobora com estudos que demonstraram reatividade cruzada em amostras de soro de cães infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis* analisadas por RIFI e ELISA (FERREIRA *et al.*, 2007). COSTA *et al.* (1991) também demonstraram 75% de reatividade cruzada entre LVC e leishmaniose cutânea e 83% com doença de Chagas, quando as amostras foram avaliadas por RIFI. O teste ELISA

apresentou resultados falso positivos em soro de cães portadores de doenças bacterianas e parasitárias, particularmente doença de Chagas (ROFFI *et al.*, 1980; BADORÓ *et al.*, 1986; MANCIANTI *et al.*, 1996).

Na avaliação da reatividade cruzada da AAPF-IgG (diluição do soro 1:8.192) foi excluído diagnóstico de LVC na maioria dos cães portadores de outras infecções e observado sorologia positiva em apenas dois cães (Figura 17). Cabe salientar que a presença de infecção por *L. chagasi* não pode ser descartada nestes dois animais, uma vez que estas infecções podem co-existir em uma mesma região. Os resultados encontrados pela AAPF-IgG reforçam o excelente desempenho da técnica, uma vez que apresentou baixo índice de reatividade cruzada com outros patógenos caninos relevantes.

O desenvolvimento de um teste diagnóstico requer, além do estabelecimento da metodologia, a análise do seu desempenho utilizando um grupo de amostras comprovadamente positivo (casos clínicos) e um grupo de amostras comprovadamente negativo para a doença em questão (grupo controle). Em relação ao grupo controle é importante que esse seja composto também por amostras que representem outras situações clínicas que possam ser confundidas com a doença em questão. Nesse contexto, foi proposto avaliar qual seria o desempenho da AAPF-IgG diante de um panorama complexo de amostras, representativo de todas as situações clínicas que poderiam concorrer a resultados falso positivos do teste: cães não infectados, cães vacinados com diversos imunobiológicos contra LVC e cães portadores de outras doenças infecto-parasitárias. Em conjunto, a análise dos resultados da AAPF-IgG demonstrou que diante de um panorama diversificado de amostras o desempenho do método continuou elevado. A análise dos dados nas duas diluições (1:2.048 e 1:8.192), como sugerido anteriormente para obtenção de um resultado mais confiável, demonstrou pequena redução na sensibilidade (97%→95%) quando os soros foram menos diluídos (1:2.048), com ganho considerável na especificidade (78%→95%) quando os soros foram mais diluídos (1:8.192) (Figura 18).

Baseado nas informações geradas neste estudo acredita-se que o elevado desempenho da imunofluorescência por citometria de fluxo demonstrado nesse estudo pode ser devido a fotomultiplicadores presentes no sistema, que amplificam a fluorescência do anticorpo secundário e possibilitam a análise em altas diluições do soro e detecção de baixos títulos de anticorpos, em comparação com as técnicas sorológicas convencionais, o que favorece tanto a sensibilidade como a especificidade do método. Além disso, a capacidade do citômetro de fluxo em contar 5.000 parasitos por ensaio contribui para a confiabilidade desta metodologia em relação a outras técnicas. Um outro ponto importante consiste na eliminação da influência

do manipulador na leitura do resultado, além da possibilidade de avaliar grande número de amostras em um mesmo ensaio.

Acredita-se que a utilização da citometria de fluxo em ensaios sorológicos na rotina de um laboratório clínico apresenta-se viável para complementar o diagnóstico conclusivo de LVC, considerando que diversos laboratórios clínicos têm investido na aquisição de um citômetro de fluxo para avaliações fenotípicas. Além disso, a possibilidade de se trabalhar com micro técnicas, permite que a metodologia seja desenvolvida minimizando o uso de grandes volumes de reagentes, conseqüentemente favorecendo um menor custo final do teste.

Diante do exposto, acredita-se que a utilização da AAPF-IgG, em laboratórios de referência para o diagnóstico da LV, contribuirá fundamentalmente no esclarecimento diagnóstico da soropositividade observada pelas técnicas convencionais, fornecendo uma inovação metodológica concreta no âmbito do diagnóstico sorológico da LVC.

Evidências e Conclusão

As evidências que embasam a conclusão geral desse trabalho estão listadas abaixo:

1- Nesse estudo foram estabelecidos procedimentos metodológicos para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* por citometria de fluxo designados AAPF-IgM, AAPF-IgA, AAPF-IgG, AAPF-IgG1, AAPF-IgG2 e AAPF-IgE.

A - Foram padronizadas as diluições dos anticorpos secundários anti-IgM (1:500), IgA (1:500), IgG (1:1.000), IgG1 (1:500), IgG2 (1:1.000) e IgE (1:100) a serem empregadas na pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF) por citometria de fluxo;

B - Foram identificados perfis sorológicos distintos de imunoglobulinas detectadas por meio das AAPFs para cães não infectados (IgM>IgG>IgG2=IgG1>IgA>IgE), cães portadores de LVC (IgG>IgG2>IgM>IgG1=IgA>IgE) e animais vacinados com Leishmune[®], (IgM>IgG2>IgG>IgG1>IgA>IgE);

C - A análise dos índices expressos em percentual e em chance qualificou a AAPF-IgA e AAPF-IgG como técnicas de elevado desempenho, apresentando alta sensibilidade e maior especificidade com potencial de exclusão de diagnóstico de LVC em cães vacinados com Leishmune[®]. A análise adicional dos resultados da AAPF-IgG, aplicada na diluição do soro 1:8.192, elegeu a pesquisa de IgG pela AAPF como o método de melhor desempenho para o diagnóstico sorológico diferencial da LVC.

D - AAPF-IgG foi aplicável ao diagnóstico sorológico da LVC quando empregada em um maior número de amostras;

2- A AAPF-IgG apresentou desempenho superior comparado a técnicas convencionais (RIFI e ELISA) e não convencional (Kalazar Detect[®]) aplicadas ao diagnóstico diferencial da LVC;

3 - A AAPF-IgG possui potencial para exclusão de diagnóstico de LVC em cães vacinados com outros imunobiológicos candidados à imunoprofilaxia da LVC, compostos por antígeno bruto de *Leishmania* associados a diferentes adjuvantes;

4 - A AAPF-IgG possibilitou excluir o diagnóstico de LVC em amostras de cães portadores de toxoplasmose e erlichiose, com baixo índice de reação cruzada em amostras de cães portadores de leishmaniose tegumentar e doença de Chagas.

5 - Diante de um panorama diversificado de amostras caninas, a AAPF-IgG demonstrou desempenho excelente para o diagnóstico sorológico diferencial da LVC.

Os resultados gerados nesse estudo sugerem que a pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. chagasi*, por citometria de fluxo, apresenta-se como potente metodologia complementar no diagnóstico diferencial da LVC, podendo subsidiar os órgãos responsáveis pelo controle da LV no Brasil na implementação de medidas de controle ora vigentes, contribuindo para utilização segura de imunobiológicos em programas nacionais de imunoprofilaxia da leishmaniose visceral.

Referências Bibliográficas

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G. M.; RACHAMIN, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F. & JAFFE, C.L.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 13, 537-550, 1991.
- AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, M. C.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58, 154-159, 1998.
- ALENCAR, J. E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342, 1959.
- ALLAIN, D. S. E KAGAN, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 24, 232-236, 1975.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 151-158, 2005.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SAINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88, 371-8, 1994.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57.1 – 87, 2004.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SÁNCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, 70, 2763-2771, 2002.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública*. 20, 259-265, 2004.
- ANDRADE, R. A.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M.; BRAGA, L. B.; ROCHA, R. D.; ARAÚJO, M. S.; VIANNA, L. R.; MARTINS-FILHO, O. A. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 116, 85-97, 2007.
- ASHFORD, D. A; BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J. C., SHERLOCK, I., EULÁDIO, C., LOPES, U., FERNADES, O. , DEGRAVE, W., BARKER Jr., R. H., BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of The Polymerase Chain Reaction and Serology for the Detection of Canine Leishmaniasis. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58, 251-255, 1995.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.*, 14, 523-532, 1996.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281, 2000.

BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JONHNSON, W. D. Jr. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 166, 1124-1132, 1986.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, MC.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 173, 758-761, 1996.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 106, 315-324, 2002.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; FERNANDES, B. D.; CARVALHO, L. P.; CARDOS, S.; BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; RODRIGUES, L. C.; BARRAL-NETO, M. BCG (Bacille of Calmette Guerin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensibilization in Brazilian school-age children. *Vaccine*, 21, 2.152-2.160, 2003.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55, 273-277, 1996.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALTNIK DE SOUZA, C.B. Long lasting protection against canine Kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in area endemic of Brazil (São Gonzalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20, 3277-3284, 2002.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. 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 filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 419-424, 1998.

BRANDONISIO, O.; CECI, L., CEDOLA, M. C.; CARETTO, G.; ANTONACI, S. & JIRILLO, E. Phagocytosis of *Leishmania infantum* promastigotes by monocytes isolated from *Leishmania* infected dogs. *Microbiologica*, 9,173-178, 1986.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur. J. Epidemiol.*, 8, 273-276, 1992.

BRADLEY, D. J.; TAYLOR, B. A.; BLACKWELL, J.; EVANS, E. P.; FREEMAN, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, 37, 7-14, 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle, Diagnóstico e Tratamento da leishmaniose visceral. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 1999.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.
- BRAY, R. S. E LAINSON, R. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V. the use of particles as vehicles in passive agglutination tests. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 61, 490-505, 1967.
- BRAY, R. S. Leishmaniasis. In *Immunological investigations of Tropical Parasitic Diseases* (Houba V., ed) Churchie Linvinstone, Edinburg, 65-83, 1980.
- BRITO M. E.; MENDONCA M. G.; GOMES Y. M.; JARDIM M. L. & ABATH F. G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 7, 318-321, 2000.
- BROWNER W. S.; NEWMAN, T. B.; CUMMINGS, S.R. Designing a new study. III. Diagnostic Tests. In: Hulley SB, Cumings SR. *Designing clinical research*. Baltimore: Williams & Wilkins; p.139-50, 1988.
- BURILLO, F. L.; PÉREZ, F. M. G.; LIESA, J. P.; FABIÁN, M. C.A. Iron status and anemia in canine leishmaniasis. *Revue Méd. Vét.*, 145, 171-176, 1994.
- BURNS, J. M.; SHREFFER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARÓ, R. E REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90, 775-779, 1993.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12, 93-100, 1964.
- CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18, 500-505, 1969.
- CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D.; NETO, F.; KROON, N.; RODRIGUES, M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.* 91, 95-100, 2004.
- CARVALHO, S. F.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Med. Hyg.*, 68, 321 – 324, 2003.
- CARVALHO-NETA, A.V.; ROCHA, R. D. R; GONTIJO, C. M. F; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 480-488, 2006.
- CHANG, K. P. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *International Review of Cytology Supplement*, 14, 267-305, 1983.

- CHIARI C. A.; MAGALHÃES P.A. & MAYRINK W. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 15, 304-309, 1973a.
- CHIARI C. A.; MAYRINK W. & MAGALHÃES P. A. Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 15, 298-303, 1973b.
- CORDEIRO F. D.; MARTINS-FILHO, O. A.; ROCHA, M. O. C.; ADAD, S. J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A.J. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 112-118, 2001.
- COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALIK, M. S. M.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Ver. Soc. Bras. Méd. Trop.*, 24, 21-25, 1991.
- COSTA, S. R.; D'OLIVEIRA J. R. A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 94, 367-370, 1999.
- COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34, 223-228, 2001.
- CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, A. S. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A, 88, 7171-7174, 1991.
- CYSTER, J. G. Homing of antibody secreting cells. *Immunol. Rev. Review*, 194, 48-60, 2003.
- DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATINIK DE SOUZA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 19, 1082-1092, 2001.
- DA SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M.; SCHALLIG, H. D.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* 30, 637-643, 2006
- DE ANDRADE HM, REIS AB, DOS SANTOS SL, VOLPINI AC, MARQUES MJ, ROMANHA AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.* 140, 231-238, 2006.
- DE OLIVEIRA MENDES, C.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G. P.; MARIA MELO BATISTA, L.; APARECIDA DOS SANTOS, M.; ELLNER PARRA, L.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*. 21, 2589-2597, 2003.

- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 45, 419-421, 1954.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar no Ceará. *O Hospital*, 48, 61-76, 1955.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 4, 149-212, 1962.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral na América do Sul e Central. *Arq. Hig. Saúde Publ.* 29, 89-94, 1964.
- DELGADO, O.; FELICIANGELI, M. D.; CORASPE, V.; SILVA, S.; PEREZ, A.; ARIAS, J. Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite*. 8, 355-357, 2001.
- DEPLAZES, P.; ARNOLD, P.; SKAGGS, J.; GESSLER, M. Parasitological and immunological progress control during and after chemotherapy of canine leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 134, 85-93, 1992.
- DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *P. Immunol.*, 17, 451-458, 1995.
- DYE, C., VIDOR, E., DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.* 110, 647-656, 1993.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55, 125-130, 1996.
- DUNAN, S.; FROMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B. W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. & THE PHOCEAN VETERINARY STUDY GROUP ON VISCERAL LEISHMANIASIS. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 11, 397-492, 1989.
- FERREIRA, E. DE C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235-241, 2007.
- FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381-388, 1988.
- FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* 136, 514-516, 1995.

FLEISS, J. L. An introduction to applied probability. In: Fleiss J. L. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons, 1-18, 1981.

FLETCHER, R. H.; FLETER, S. W.; WAGNER, E. H. Diagnóstico. In: Fleter RH, Fleter SW, Wagner EH. Epidemiologia Clínica: bases científicas de conduta médica. 2º ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 68-108, 1989.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 137, 214-21, 2006.

FROMMEL, D.; OGUNKOLADE, B. W.; VOULDOUKIS, I.; MONJOUR, L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice. *Infection and Immunity*, 56, 843, 1988.

GARCIA-GONZALEZ, R.; SANZ, I.; SAUS, C. & CALLEJA, J. L. Localized lymphadenitis due to *Leishmania*. Diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Postgrad. Med J.*, 66, 326 1990.

GENARO, O.; COSTA, R.T.; FRANÇA SILVA, J.C.; REIS, AB.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E. P.; ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; REED, S.G.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; NETTO, E. M. & BADARO, R. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brasil. *Acta Parasitologica Turcica*, 1997.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Tese doutorado. 202 f. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; DE SOUZA, J. V.; DAS DORES MOREIRA, N.; MALAQUIAS, L. C.; MOTA E CASTRO, L. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, 25, 7674-7686, 2007a.

GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M. ;AGUIAR-SOARES, R. D.; COURA-VITAL, W.; ABREU, R. T.; MALAQUIAS, L. C.; GONTIJO, N. F.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C. I.; COSTA, D. J., DE LANA, M.; REIS, A. B. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, 26, 623-638, 2008b.

GOMES, I. T. Desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, por citometria de fluxo, na monitoração de cura na leishmaniose visceral humana. Dissertação de mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2006.

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 7, 338-349, 2004.

- GOTTSTEIN, B.; DEPLAZES, P.; ARNOLD, P.; MEHLITZ, D.; REITER, I.; ECKERT, J. Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 130, 249-262, 1988.
- GRADONI, L. Epizootiology of canine leishmaniosis in Southern Europe. In Killick-Kendrick, R (ed) *Canine Leishmaniasis; an update*. Hoechst Roussel *Vet. Wiesbaden*. 339-342, 1999.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86, 613-20, 1992.
- GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*, 45, 23-41, 2000.
- GRIMALDI, Jr. G.; TESH, R. B. Leishmanioses of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6, 230-250, 1993.
- GRINER, P. F.; MAYWSKI, R. J.; MUSHLIN, A. I.; GREENLAND, P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. *Ann. Intern. Med.*, 94, 557-92, 1981.
- GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBÁÑEZ, M. A.; CASTILLO, J. A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 88, 13-20.
- HANDMAN, E.; NOORMOHAMMADI, A. H.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T., SJOLANDER, A. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*, 18, 3011-3017, 2000.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 229-243, 2001.
- HARITH, A. E.; KOLK, A. H.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; MUGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. A simple and economical direct agglutination test for serodagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80, 583-586, 1986.
- HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1989-1995, 1998.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*, 354, 1191-1199, 1999.
- HOCKMEYER, W. T.; WELLED, B. T.; SABWA, C. L.; SMITH, D. H.; REES, P. H.; KAGER, P. A. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 78, 489-493, 1984.
- HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86, 55-73, 1995.

- INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 77-81, 2005.
- JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; SACKETT, D. L. User's guides to the medical literature. III: How to use an article about a diagnosis test. A. Are the results of the study valid? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*, 271, 389-391, 1994a.
- JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; SACKETT, D. L. User's guides to the medical literature. III: How to use an article about a diagnosis test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*, 271, 703-707, 1994b.
- JAFFFE, C. L.; GREENBLAT. Vaccine development against the intracellular parasite *Leishmania*. In: Cryz, S. J. *Vaccines and Immunotherapy*. Pergamon Pres, 1991.
- JOHANSSON, S. G.; INGANÄS, M. Interaction of polyclonal human IgE with protein-A from *Staphylococcus aureus*. *Immunol.*, 41, 248-60, 1978.
- KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog-II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 21, 80-86, 1984.
- LAISON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil. Iv. The fox, *Cerdocyons thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, 63, 741-745, 1969.
- LAISON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, KILLICK-DENDRICK. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, *Academic Press*, 1, 1-20, 1987.
- LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les forms évolutives de la leishmanioses viscérale canine. Elaboration d'unetypologie bio-clinique à finalité é epidemiémologique. *Ann. Parasitologie.* 54, 277-295, 1979.
- LEMOES, E. M.; GOMES, I. T.; CARVALHO, S. F.; ROCHA, R. D.; PISSINATE, J. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; DIETZE, R. Detection of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine. Immunol.* 14, 569-76, 2007.
- LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19-27, 2002.
- LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; RODRIGUES, J. M.; SILVA, C. L. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, 22, 2.374-2.379, 2004.
- LIRA, R. A.O.; CAVALCANTI, M. P.O.; NAKAZAWA, M.O.; FERREIRA, A. G. O.; SILVA, E. D. O.; ABATH, F. G. O.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-

- Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.*, 137, 11-16, 2006.
- LUCENA, R.; MOLLEDA, J. M.; GINEL, P. J.; NOVALES, M.; MARTIN, E.; LOPEZ, R. Third component of complement serum levels in dogs with leishmaniasis. *J. Vet. Med. A.*, 41, 48-52, 1994.
- MAGUIRE, J. H.; COSTA, C. H.; LAMOUNIER, D.; BECK, L. R.; LOBITZ, B.; DISTER, D.; WOOD, B. Remote sensing and geographic information systems technology applied to infections disease transmission of *Leishmania chagasi* in Terezina, Piauí, Brasil. In: Annual meeting niaid international centers for tropical disease research, us department of helth and humam services, national institutes of health, 6. 1997, Bethesda – MD. Proceedings... Bethesda-MD: National Institutes of Health, 1997.
- MANCIANTI, F.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PIERI, S.; MARCONCINI, A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasitol.*, 37, 110-112, 1986.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonisl treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82, 566-567, 1988.
- MANCIANTI, F.; POLI, A. & BIONDA, A. – Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitol.*, 31, 213-230, 1989.
- MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 59, 13-21, 1995.
- MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, 65, 1-9, 1996.
- MARGARITO, J. M.; LUCENA, R.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J. M.; MARTIN, E.; GINEL, P. J. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. *Zent. Vet.* 45, 263-267, 1998.
- MARTINEZ, S.; LOOKER, D. L.; BERENS, R. L.; MARR, J.J. The synergistic action of pyrazolopyrimidines and pentavalent antimony against *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39, 250-255, 1988.
- MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S.; CARVALHO, J. F.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy treatment in human Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2, 569-573, 1995.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD, Jr.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, Jr. F. B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro,

Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80, 349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses Tegumentares. *J. Bras. Méd.*, 63, 82-104, 1992.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; TAFURI, W. L.; ROTONDO, A.; SILVA, A. B.; REIS, A. B.; WILLIAMS, P.; COSTA, C. A. Phase I and II Open Clinical Trials of a Vaccine Against *Leishmania chagasi* Infections in Dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80, 695-697, 1996.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119, 237-246, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, 16, 188-189, 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P.; METZ, C. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.*, 8, 283-98, 1978.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5515-5519, 2005.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O.; CHAVES, K. M.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W. Expansão da leishmaniose visceral em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Rev. Soc. Med. Trop.*, 25, 89, 1992.

MILGATE, J.; ROBERTS, D. C. K.. The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr. Res.*, 15, 1.223-1.248, 1995.

MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol.* 121, 239-245, 2004.

MOLANO, I.; GARCIA-ALONSO, M.; MIRON, C.; REDONDO, E.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; GOMEZ-NIETO, C.; ALONSO, C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic proteins mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 92, 1-13, 2003.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania*

infantum to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88, 491-493, 1994.

MOLL, H.; RITTER, U.; FLOHE, S.; ERB, K.; BAUER, C.; BLANK C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.*, 184, 163-168, 1996.

MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, W.; POINTET, P.; VOULDOUKIS, I. Efficacité de la vaccination de la souris C57Bl/6 contre l'infection par différences espèces de *Leishmania*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 301, 803-806, 1985.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71, 181-195, 1999.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniosis. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 23, 279-283, 1999.

NASCIMENTO, M. D. S. B., Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil: análise da dinâmica de transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença. Tese doutorado – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisition sur le Kala-azar culture; inoculation auchien; etiologie – C. R. Hedd. *Sciences et Acad Sci*; 146, 498-9, 1908.

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infections. *Vet. Parasitol.*, 45, 33-47, 1992.

NILSON, B.; BJÖRCK, L.; AKERSTRÖM, B. Detection and purification of rat and goat immunoglobulin G antibodies using protein G-based solid-phase radioimmunoassays. *J. Immunol. Methods.*, 91, 275-81, 1986.

NOVY, F. G.; MCNEAL, W. J. The cultivation of *Trypanosoma brucei*; a preliminary note. *J. American Med. Assoc.*, 41, 266-268, 1903.

OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 88, 243-248, 1993.

OLIVEIRA, C. D.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública.* 17, 1231-1239, 2001.

OSKAM, L.; SLAPPENDEL, R. J.; BEIJER, E. G.; KROON, N. C.; VAN INGEN, C. W.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; TERPSTRA, W. J. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunol. Méd. Microbiol.*, 16, 235-239, 1996.

OSMAN, O. F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E. E.; KROON, N. C.; SCHOONE, G. J.; KHALIL, E. T.; EL-HASSAN, A. M.; KAGER, P. A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2454-2457, 1997.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2769-2770, 2004.

PALATNIK DE SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNICK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 510-517, 2001.

PENG, Z. K.; SIMONS, F. E.; BECKER, A. B. Differential binding properties of protein A and protein G for dog. *J. Immunol. Methods.*, 145, 255-258, 1991.

PENG, Z.; ARTHUR, G.; KIEREK-JASZCZUK, D.; THOMAS, E.; SEHON, A. H.; RECTOR, E. S.; SIMONS, F. E.; BECKER, A. B. Purification and identification of polyclonal IgE antibodies from ragweed-sensitized dog sera. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 102, 176-184, 1993.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. *Rev. Biol. Hig.*, 10, 112-118, 1940.

PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G. & RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infec. Imm.*, 62, 229-235, 1994.

PIRMEZ, C.; DA SILVA TRAJANO, V.; PAES-OLIVEIRA NETO, M.; DA-CRUZ, A. M.; GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1819-1823, 1999.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 38, 383-393, 1981.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 161-168, 2003.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann. Trop. Méd. Parasitol.*, 8, 503-508, 1991.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Clin. Microbiol.*, 37, 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 103, 173-85, 2005.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68-75, 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, M.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, A. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. Isotype patterns of immunoglobulins: Halmarks for clinical status and tissue parasite density in brasilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 112, 102-116, 2006b.

RIERA, C.; VALLADARES, J. .E; GÁLLEGO, M.; AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; FISA, R.; RIBAS, N.; CARRIÓ, J.; ALBEROLA, J.; ARBOIX, M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33-47, 1999.

ROCHA, R. D.; GONTIJO, C. M.; ELOI-SANTOS, S. M.; CARVALHO, A. T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARQUES, M. J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINS FILHO, O. A. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, 35, 551-562, 2002.

ROCHA, R. D.; GONTIJO, C. M.; SANTOS, S. M.; CARVALHO, A. T.; FERRARI, T. C.; OLIVEIRA, R. C.; MARQUES, M. J.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Performance analysis of the research of IgG antibodies alive promastigote anti-forms of *Leishmania (V.) braziliensis* (AAPV-IgG), for flow cytometry in the diagnosis of the leishmaniasis american tegumentar. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, 2, 15-8, 2003.

ROCHA, R. D.; GONTIJO, C. M.; ELÓI-SANTOS, S. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FERRARI, T. C.; MARQUES, M.J.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med. Int. Health.*, 11, 156-66, 2006.

ROFFI, J.; DEDET, J. P.; DESJEUX, P.; GARRÉ, M. T. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 183-189, 1980.

- ROSÁRIO EY, GENARO O, FRANCA-SILVA JC, DA COSTA RT, MAYRINK W, REIS AB, CARNEIRO M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 100, 197-203, 2005.
- ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan (2) Further notes on leishman's bodies. *Brit. Med. J.*, 2, 1261-1401, 1903.
- SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B.; GUYATT, G. H.; TUGWELL, P. Diagnosis. In: Sackett, D. L.; Haynes, R. B.; Guyatt, G. H.; Tugwell, P. Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine. Boston: Little, Brown and Company; 3-170, 1991.
- SALLES-GOMES, L. Intradermo-reação de Monte Negro na Leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-Medico.* 49, 5-15, 1939.
- SANTOS, W. R.; DE LIMA, V. M. F.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BERNARDO, R. R.; PALATINIK, M.; PALATINIK DE SOUZA, C. D. Saponis, IL-12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21, 30-42, 2002.
- SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ARRANCHES, P. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95, 193-198, 2000.
- SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTI, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, 104, 275-285, 2002.
- SCHALLIG, H. D.; CARDOSO, L.; HOMMERS, M.; KROON, N.; BELLING, G.; RODRIGUES, M.; SEMIÃO-SANTOS, S. J.; VETTER, H. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 193-197, 2004.
- SCHINJS, V. E. J. C. Antigens delivery systems and immunoestimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 195-198, 2002.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101, 577-579, 2006.
- SINGH, M.; O'HAGAN, D. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, 9, 715-728, 2002.
- SINGH, M.; O'HAGAN, D. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International J. for Parasitology*, 33, 469-478, 2003.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L., Leishmaniasis. In: Saunders, W.b. (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, pp. 450-458, 1998.

- SOLANO-GALLENO, L.; MOPREL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living an Area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissue and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560-563, 2001.
- SOUZA-ATTA, M. L.; ARAÚJO, MI.; D'OLIVEIRA JÚNIOR, A.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; ATTA, A. M.; CARVALHO, E. M. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*;32, 1101-1105, 1999.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral leishmaniasis. *Recent Advances in Canine Infectious Disease*, 4, sp, 2001.
- SWETS, J. A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240, 1285-93, 1988.
- TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol Methods.*, 292, 17-23, 2004.
- ULMER, J. B.; SADOFF, J. C.; LIU, M. A. DNA Vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*, 8, 531-536, 1996.
- VALLI, L. C.; PASSOS, V. M.; DIETZE, R.; CALLAHAN, H. L.; BERMAN, J. D.; GROGL, M. Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.*, 85, 1076-1083, 1999.
- VECCHIO, T. J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *N. Engl. J. Med.*, 274, 1171-3, 1966.
- VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Bras. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 85-92, 1998.
- WALTON, B. C.; BROOKS, W. H.; ARJONA, I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 296-299, 1972.
- WARREN H. S; CHEDID L. A. Future prospects for vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Immunol.* 8, 83-101, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Communicable Disease Profile. Division of Communicable Disease Control. (WHO/CDS/2003.17), 2003.
- XU, D.; LIEW, F. Y. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine*, 12, 1534-1536, 1994.
-  YOU DEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3, 32-5, 1950.
- ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine [Review]. *Clin. Chem.*, 39, 561-77, 1993.

Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 08/02 relativo ao projeto intitulado "Avaliação da resposta imune celular e humoral de vacinas recombinantes e de antígeno bruto contra a Leishmaniose Visceral Canina" que tem como responsável Dr. Wilson Mayrink, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **24.04.2002**.

Este certificado expira-se em 24.04.2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 08/02 related to the project entitled "Evaluation of the Immunological and humoral responses induced by recombinant vaccines and crude antigen against canine visceral leishmaniasis", under the supervision of Dr. Wilson Mayrink, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **4/24/2002**.

This certificate expires in **4/24/2007**.

Belo Horizonte, 10 de junho de 2002


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE

Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitoria – Campus Pampulha

Avenida Antônio Carlos 6627

CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG

Brasil

