

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Glísia Mendes Tavares Gomes

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AMOSTRAS POSITIVAS
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Rio de Janeiro

2016

Glísia Mendes Tavares Gomes

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AMOSTRAS POSITIVAS
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Ana Cristina M. de A. Nogueira
Paula Mello De Luca

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Gomes, Glísia Mendes Tavares

Avaliação da estabilidade de amostras positivas para Leishmaniose visceral canina / Glísia Mendes Tavares Gomes.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

87 f. : il

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadoras: Ana Cristina M. de A. Nogueira; Paula Mello De Luca

1. Leishmaniose Visceral. 2. Testes Sorológicos. 3. Citometria de Fluxo. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Evaluation of positive sample stability for canine visceral leishmaniosis

Glísia Mendes Tavares Gomes

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AMOSTRAS POSITIVAS
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em 27 / 07 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - Fiocruz

Prof^a. Dr^a Jurandy Susana Patrícia Morales Ocampo
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp
Instituto Oswaldo Cruz/IOC - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Instituto Oswaldo Cruz/IOC – Fiocruz (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Paula Mello De Luca
Instituto Oswaldo Cruz/IOC – Fiocruz (Orientadora)

Este trabalho é dedicado aos profissionais que muitas vezes empenham sua vida, seus conhecimentos e sua pesquisa, tendo como foco principal, a melhoria da qualidade de vida das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela inspiração e auxílio nos momentos de desânimo e fraqueza.

À minha mãe Olani e meus irmãos Glauber e Gladston pelo amor, confiança e dedicação diários.

Ao meu pai Geraldo e minha Vó Alzira (*in memorian*), saudade!

Às minhas orientadoras Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira e Dr^a Paula Mello De Luca pela paciência, ajuda e esclarecimentos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (1^o Titular Interno e revisor), Dr^a Jurandy Susana Patrícia Morales Ocampo e Dr^a Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp, bem como os suplentes, Dr^a Dirlei Nico e Dr. Fábio Amendoeira.

Aos companheiros do Instituto Nacional de Infectologia – INI, Artur, Adilson, Dr. Fabiano Figueiredo e toda a equipe pela educação, atenção e disponibilidade no atendimento.

Ao responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Reativos – Lacore, Luiz Alberto Pereira, pela compreensão e apoio, bem como às chefias de seções do Lacore – Elinalva S. S. Nascimento pela colaboração e palavras de incentivo e Márcia M. Hashimoto pela cooperação.

À Dr^a Marta Santiago, pelo esmero e conhecimento técnico com relação à citometria de fluxo.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica/Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico – LATED/VDTEC, em especial, Eliane, Adenauer, Keila, Marcelle e Leila, bem como aos demais funcionários deste laboratório, no qual realizei os experimentos relacionados à citometria de fluxo, sem me esquecer das “várias solicitações” das chaves do freezer -80°C.

À Diana pelas sugestões sempre acertadas.

Ao Rafael Alexandrino pela gentileza e presteza no trato e na obtenção do antígeno recombinante, bem como ao Edimilson, Pedro Paulo, Hevandro e Marco.

A Chembio Diagnostic Systems, Inc., pela cessão do antígeno rK28.

A todos os colaboradores do Laboratório de Controle de Qualidade de Reativos – Lacore, de modo particular: Yone, Sérgio, Valquíria pela “mão na massa” na bancada, nas minhas férias, e também ao Gilberto e Nathielie por ajudar na separação das amostras. Neisângela pelo apoio com o transporte.

À Josiane, Adriana, Fernanda, Luciane e todo pessoal da Seção de esterilidade, Processos e Insumos - SEPIN/DEQUA - Bio Manguinhos.

À Érica, Daniel e demais funcionários da Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímica - SETBI/DEQUA, pela utilização da microcentrífuga.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, lembrados aqui na pessoa de seus coordenadores, professores, colegas de mestrado, as “meninas da secretaria” e todos os seus funcionários indistintamente.

Agradeço também a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

“O Ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo – numa espécie de ilusão de óptica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce da nossa segurança interior.”

Albert Einstein

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) denota grande importância no cenário da saúde pública e, por conseguinte, no âmbito da Vigilância Sanitária, visto que a infecção pode acometer tanto humanos quanto cães, sendo estes últimos os reservatórios do agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum*. Limitações diagnósticas relacionadas a investigações sorológicas caninas de “menor” especificidade e análises citopatológicas complexas, morosas e pouco sensíveis, podem comprometer um controle mais efetivo dessa doença. A qualidade dos kits empregados no apoio diagnóstico é bastante relevante, bem como compreender o comportamento das amostras sorológicas empregadas na avaliação desses métodos, quando sujeitas a condições diversas como diferentes temperaturas e ciclos de congelamento e descongelamento. O foco do presente trabalho foi a avaliação analítica de amostras de soro e plasma, positivas para leishmaniose visceral canina (LVC) pelo teste imunocromatográfico (TR DPP® LVC) e EIE® LVC, submetidas a mais de 12 ciclos de congelamento e descongelamento, e estocadas por várias semanas a diferentes temperaturas a fim de verificar uma possível queda do título desses espécimes, além da padronização de uma técnica por citometria de fluxo para análise dessas amostras. Nossos resultados demonstraram um comportamento diferenciado das amostras de acordo com a técnica utilizada. O teste de triagem para LVC (TR DPP LVC®) demonstrou baixa especificidade para amostras com baixos títulos de anticorpos quando submetidas a diferentes ciclos de congelamento e descongelamento. Já o teste confirmatório imunoenzimático para diagnóstico de LVC (EIE® LVC) evidenciou possuir maior sensibilidade na avaliação de amostras expostas a condições ambientais adversas, permanecendo positivas, apesar de em alguns casos ter sido observado um decaimento no título de anticorpos. O ensaio de citometria de fluxo por nós padronizado, utilizando microesferas carboxiladas adsorvidas com antígeno recombinante de *Leishmania* (rK28), demonstrou ser uma técnica bastante viável para a avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos presentes em amostras caninas positivas e negativas para LV e que sem dúvida merece uma maior atenção e aprimoramento.

Palavras-chave: Testes Sorológicos, Estabilidade, Controle de Qualidade, Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (LV) denotes a great importance in public health scene and therefore within the scope of the Sanitary Surveillance, since infection can affect both humans and dogs, the latter being reservoirs of the etiologic agent *Leishmania (Leishmania) infantum*. Diagnostic limitations related to canine serological investigations of “minor” specific and complex cytological analysis, time-consuming and not very sensitive, can compromise a more effective control of disease. The quality of kits used in supporting diagnostic is highly relevant as well as the understanding of the behavior of the serum samples used in the validation and evaluation of these methods, when exposure to variable conditions such as different temperatures and cycles of freezing and thawing. The focus of our study was the analytical evaluation of serum and plasma samples, positive for canine visceral leishmaniasis (CVL) by immunoassay (TR DPP® LVC) and EIE® LVC. Samples were submitted to more than 12 cycles of freezing and thawing, and stored for several weeks at different temperatures to assess a possible fall in the antibody titles of these specimens, as well as the standardization of a flow cytometry technique to analyze the samples. Our results showed a different behavior of the samples according to the technique used. The screening test for LVC (TR LVC® DPP) showed low specificity for samples with low antibody titers when submitted to different cycles of freezing and thawing. On the other hand, the immunoassay confirmatory test for diagnosing LVC (EIE® CVL) has demonstrated higher sensitivity in the evaluation of samples exposed to adverse environmental conditions, remaining positive, although in some cases it was observed a decay in the antibody titers. The flow cytometry test standardized by us using carboxylated microspheres adsorbed with recombinant *Leishmania* antigen (rK28) demonstrated to be a viable technique for the qualitative and quantitative evaluation of antibody titers present in positive and negative canine VL serum samples and certainly deserves greater attention and improvement.

Keywords: Serologic tests, Stability, Quality Control, Flow Cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia do Protozoário Leishmania.....	23
Figura 2	Classificação taxonômica Leishmania spp.....	23
Figura 3	Lutzomyia longipalpis engurgitada.....	24
Figura 4	Ciclo de transmissão Leishmaniose visceral.....	25
Figura 5	Ciclo de vida da Leishmania (Leishmania) infantum com indicação de rotas não flebotomíneas de transmissão comprovada e não comprovada para o cão.....	26
Figura 6	Casos leishmaniose visceral, segundo sub-região, Américas, 2001-2013.	30
Figura 7	Distribuição e casos de Leishmaniose Visceral por Município.....	31
Figura 8	Suportes e tampões de corrida TR DPP® LVC	45
Figura 9	Análise de amostras pelo teste imunocromatográfico e tabela para leitura	46
Figura 10	EIE/ELISA Teste confirmatório.....	49
Figura 11	Titulação amostras caninas para EIE	49
Figura 12	Etapas adsorção antigênica.....	52
Figura 13	Etapa titulação microesferas adsorvidas em diferentes concentrações....	54
Figura 14	Ensaio.....	56
Figura 15	Titulação de anticorpos anti-leishmania em amostras caninas de soro e plasma pelo TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos.....	59
Figura 16	Comparação da titulação de anticorpos anti-leishmania entre amostras de soro e plasma caninos pelo método TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos. Gráfico de box whiskers.....	59
Figura 17	Ensaio de estabilidade de anticorpos anti-Leishmania das amostras de soro armazenadas a -80°C seguido de 1, 6, 12 e 24 ciclos de congelamento e descongelamento. As análises foram realizadas pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC - Bio Manguinhos.....	61
Figura 18	Ensaio de estabilidade de anticorpos anti-Leishmania das amostras de soro armazenadas a -20°C seguido de 1, 6, 12 e 24 ciclos de congelamento e descongelamento. As análises foram realizadas pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos	62
Figura 19	Histograma com intensidade de fluorescência a diferentes temperaturas.	65

Figura 20	Intensidade média de fluorescência (MFI) para anticorpos IgG específicos para o antígeno rK28, obtidas com soros que apresentavam baixa (<1:16; n=2), média (\geq 1:256 e <1:1024; n=9) ou alta (\geq 1:1024; n=6) titulação de anticorpos específicos para o antígeno rK28 pelo método TR DPP® LVC.....	66
Figura 21	Correlação entre o título dos soros obtidos pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC e as intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas com os mesmos soros, estocados em diferentes temperaturas.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos para diagnóstico de LV em cães.	35
Tabela 2	Métodos para diagnóstico sorológicos para LV em cães.....	36
Tabela 3	Distribuição de amostras de soro e plasma segundo temperatura de armazenamento	43
Tabela 4	Títulos obtidos pelo TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos, antes da armazenagem das amostras, tempo de armazenamento (5°C e 37°C) e número de ciclos de descongelamento de amostras a -80°C e -20°C	44
Tabela 5	Contagem microesferas no equipamento TC20 Bio-RAD	53
Tabela 6	Titulação antígeno rK28, soro canino positivo e negativo LV e conjugado (antig-IgG canino + FITC).....	55
Tabela 7	Titulação para melhor adequar o binômio soro canino para LV e conjugado (anti-IgG canino+ FITC	55
Tabela 8	Titulação de anticorpos anti-Leishmania em amostras de soro canino pelo método EIE	63

LISTA DE SIGLAS

AC	Amostra Controle
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Aids	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BSA	Bovine Serum Albumine
cEIE	Ensaio Imunoenzimático antígeno bruto
CEUA	Comissão de Ética no uso animal
CF	Citometria de fluxo
CTA	Crude Total Antigen
Cit b	Citocromo b
DEQUA	Departamento da Qualidade
DNA	Deoxyribonucleic acid
D.O	Densidade óptica
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
EDAC	1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Ensaio Imunoenzimático
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IVS	Índice de Vulnerabilidade à Saúde
kDNA	DNA de cinetoplasto
LACORE	Laboratório Controle de Qualidade de Reativos
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
<i>LicTXNPx</i>	<i>Leishmania infantum</i> cytosolic trypanredoxin peroxidase
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana

LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LV	Leishmaniose Visceral
MAA	Methacrylic acid
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
µg	micrograma
µL	microlitros
µm	micrômetro
mg	miligrama
MIF	Intensidade média de fluorescência
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetro
NR	Não reagente
NR	Não realizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCN	Product Change Notifications
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polymerase em tempo real
rHSP	Proteína de choque térmico recombinante
RNA	Ribonucleic acid
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rK39	Cinesina recombinante 39
rk28	Cinesina recombinante 28
rpm	rotações por minuto
SEPIN	Seção de esterilidade, Processos e Insumos
SEPLA	Seção de Processamento de Plasma
SETBI	Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímica
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sinannet	Sistema de Informação de Agravos de Notificação <i>Network</i>
sp.	Espécie
spp.	Espécies

T. A.	Tampão de Acoplamento
T.L	Tampão de lavagem
TMB	Tetrametilbenzidina
TR	Teste rápido
VDTEC	Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
WHO	World Health Organization

LISTA DE ABREVIATURAS

Frag.	Fragmento
Inc.	Incorporation
Máx.	Máximo
Mín.	Mínimo
N°	Número

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
G	Gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE.....	20
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E TRANSMISSÃO	21
1.3 A LEISHMANIOSE EM CÃES	27
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	28
1.5 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO	32
1.6 LEISHMANIOSE VISCERAL E A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	37
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	42
3.1.1 Segregação em alíquotas e titulação de anticorpos anti-Leishmania pelo método imunocromatográfico (TR DPP LVC® - Bio Manguinhos).....	42
3.1.2 Etapa de avaliação da estabilidade de anticorpos anti-Leishmania pelo método imunocromatográfico	47
3.1.3 Titulação semi-quantitativa pelo método do EIE® Bio Manguinhos:	47
3.2 CITOMETRIA DE FLUXO	50
3.2.1 Etapa de acoplamento (adsorção) do antígeno rK28 às microesferas (<i>beads</i>).....	51
3.2.2 Etapa de titulação e definição das concentrações de microesferas acopladas e diluições de soros caninos para LV e conjugado	53
3.2.3 Ensaio com concentração antígeno rK28, diluição do soro canino para LV e conjugado padronizados.....	56
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4 RESULTADOS	58
4.1 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANA EM AMOSTRAS CANINAS DE SORO E PLASMA PELO MÉTODO TR DPP LVC®.....	58
4.2 ENSAIO DE ESTABILIDADE	60
4.2.1 Avaliação da estabilidade de amostras após diferentes ciclos de	

descongelamento pelo método imunocromatográfico – TR DPP® LVC	60
4.2.2 Avaliação da estabilidade de amostras estocadas a diferentes temperaturas pelo método de ensaio imunoenzimático - EIE LVC®.	62
4.3 CITOMETRIA DE FLUXO	64
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A - LICENÇA DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)..	86
ANEXO B – PLANILHA TITULAÇÃO DE AMOSTRAS PELO MÉTODO IMUNOCROMATOGRÁFICO.....	87
ANEXO C – RESULTADO PARASITOLÓGICO CANINO EM VÁRIOS TECIDOS – INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI.....	88

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose em crescente expansão no Brasil, causada por um protozoário, *Leishmania (Leishmania) infantum*, tendo o cão como principal reservatório em ambiente urbano, mantendo-se assim o ciclo de transmissão nesses locais (SOUZA et al., 2010a; SOUZA et al., 2013a; CARDIM et al., 2013).

Os serviços de saúde pública têm enfrentado problemas de uma maneira geral com relação ao diagnóstico para LVC. O que pode ser evidenciado principalmente por três fatores: 1- variedade de sinais clínicos semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas; 2- alterações histopatológicas inespecíficas e 3 – inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL, 2014).

Diante da grande variedade de métodos diagnósticos é imprescindível a compreensão do comportamento do material biológico analisado. A forma de armazenamento é um fator importante a ser investigado. A reavaliação analítica de amostras após um longo período de estocagem torna-se uma tarefa complexa. Quando os resultados não são reproduzidos, não se pode atestar ao certo se a degradação ocorrida é intrínseca à amostra ou se a diferença se deve ao uso de testes laboratoriais mais sensíveis, desenvolvidos ao longo do tempo (CASTEJON et al., 2014).

Embora não existam maiores estudos, ciclos de congelamento/descongelamento, ao menos teoricamente, podem danificar estruturalmente as proteínas. Se considerarmos o meio aquoso, onde a estrutura proteica se enovela espontaneamente devido ao fato de um somatório de interações fracas (pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas), em diferentes regiões da proteína, o ato do congelamento altera a estrutura quaternária desta. Tal circunstância estabelece outras ligações moleculares levando à desnaturação e, por conseguinte, perda da atividade. A formação de gelo com concentração de soluto, causada pela cristalização de água, e consequente mudança de pH podem influenciar na estabilidade de uma molécula proteica biologicamente ativa (DE SOUZA et al., 2012; CASTEJON et al., 2012, CASTRO & HEATHER, 2013, DEMIR et al., 2014).

Os anticorpos possuem um papel crucial no sorodiagnóstico, constituindo os mais difundidos biomarcadores empregados na detecção e confirmação de diversas doenças. O sangue é um dos melhores tecidos para investigação destas moléculas. Para que seja realizado um adequado imunodiagnóstico, os anticorpos devem preservar a integridade de sua estrutura tridimensional, imprescindível para a interação com seu antígeno correspondente (DE SOUZA et al, 2012).

Sendo assim, estudos de estabilidade são essenciais para qualquer padrão biológico, e desejável nos demais produtos biológicos. Fatores como condições adequadas de preparo e armazenamento da amostra biológica favorecem a estabilidade e a obtenção de resultados analíticos mais fidedignos (CASTEJON et al., 2012).

São escassos os dados disponíveis sobre o efeito adverso que os ciclos de congelamento e descongelamento podem causar na configuração e nos constituintes dos anticorpos, esta investigação é particularmente expressiva na execução de ensaios sensíveis como os imunoenzimáticos (EIE), que são capazes de detectar estruturas proteicas propensas à desnaturação (CASTEJON et al., 2012).

No presente trabalho foi realizada uma investigação da estabilidade de amostras caninas positivas para *Leishmania* sp., no intuito de estudar possibilidades de melhoria nas análises de tais amostras. No atual capítulo desta dissertação de mestrado profissional intenciona-se esclarecer pontos importantes para a compreensão do trabalho desempenhado.

1.1 HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835 e em seguida na Índia em 1869. Um aspecto curioso desta doença deve-se ao fato de um aumento da pigmentação da pele e da febre, que originou um termo, muitas vezes comumente utilizado de Kala-jwar ou Kala-azar, que significa febre negra (MARZOCHI et al.,1981).

William Leishman, em 1900, identificou um protozoário no baço de um soldado, que havia vindo a óbito na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como “febre Dum Dum” ou “Kala-azar”. Os achados de Leishman só

foram corroborados quando em 1903, Donovan, encontrou o mesmo parasita em outro paciente. Ainda no mesmo ano, Laveran e Mesnil descreveram tal protozoário com o nome de *Piroplasma donovani* (COSTA, 2011).

Em 1905, Pianese, identificou em crianças afetadas por “anemia esplênica” em Nápoles, um parasito similar ao descrito por Leishman e Donovan. No verão de 1912, Pittaluga, diagnosticou na comarca de Tortosa, o primeiro caso espanhol de calazar, a partir de uma amostra de punção esplênica de um enfermo suspeito (FREGOLA & VINYETA, 1993).

Na África, o primeiro caso de leishmaniose visceral foi identificado no sudoeste da Etiópia em tropas acampadas ao norte do lago Turkana, em 1940. Um sério surto de leishmaniose visceral foi registrado também no Continente Africano em 1952 no distrito de Kitui com 303 casos, atingindo um pico de 2.142 casos no ano de seguinte (NGURE et al., 2009).

No Brasil, o primeiro caso foi descrito por Migone em 1913. Um paciente italiano que havia vivido algum tempo em Santos, São Paulo, após viajar para o Mato Grosso, adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai. Em 1934, Henrique Penna, um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, foi o responsável pelo início dos estudos sobre a distribuição da leishmaniose visceral nas Américas. Ele comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil (CABRERA, 1999).

Em 1937, o pesquisador Evandro Chagas empreendeu estudos sobre a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), com relação à morfologia do parasito e a ação patogênica, para algumas espécies animais, realizando estudos sobre processos patogênicos na infecção experimental e, por meio de provas de aglutinação e de outras reações de imunidade, foram verificadas as características antigênicas da *Leishmania* spp. (CHAGAS et al., 1938).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E TRANSMISSÃO

Os agentes etiológicos da leishmaniose viscerotrópica foram classificados em 4 espécies: (*Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania archibaldi*). Há também o argumento que a *Leishmania (Leishmania) chagasi* deve ser considerada uma subespécie da

Leishmania (Leishmania) infantum e que apesar de algumas diferenças fenotípicas e genotípicas, estas não sugerem representar clados distintos (LAINSON & RANGEL, 2005). A diferença entre estes parasitos pode ser devido à recente adaptação *Leishmania (Leishmania) chagasi* a uma nova espécie de vetor (SHAW, 2006; FRAGA et al., 2010).

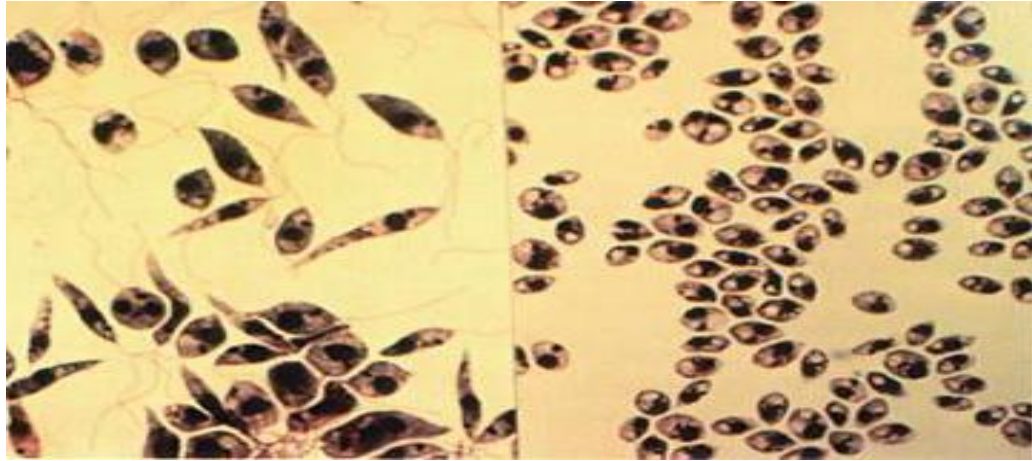
Estes parasitos são flagelados digenéticos, ou seja, parasitos com alternância de evolução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012), sendo as formas extracelulares promastigotas alongadas e flageladas (cerca de 5-15 μm), encontradas no vetor e as amastigotas intracelulares não flageladas ovóides (com cerca de 3-5 μm), em macrófagos de hospedeiros mamíferos (BATES, 2008, McCALL et al., 2013). Apresentam apenas uma mitocôndria e o ácido desoxirribonucleico - DNA mitocondrial aparece condensado numa região próxima dos corpúsculos basais do flagelo – nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central – sendo denominado cinetoplasto, onde fica armazenado o DNA de cinetoplasto - kDNA (Figura 1, Protozoário) (CASTELLANO, 2005).

Atualmente são conhecidas 22 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem. Durante a década de 80, principalmente nas Américas, estudos sobre leishmaniose conduziram ao isolamento de um grande número de amostras oriundas de animais silvestres, domésticos e do homem. A aplicação de um número maior de critérios, até então não utilizados para a identificação destes parasitos, passou a ser exigida com a intenção de evitar erros taxonômicos. Sendo assim, a base para a classificação destes protozoários voltou-se a caracteres intrínsecos, entre eles os biológicos, como a morfologia do parasito e características de seu desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados e, em meios de cultura; imunológicos como o reconhecimento por anticorpos mono e policlonais; os bioquímicos como o estudo do RNA e DNA; caracterização de isoenzimas e estudos de composição da membrana através de lecitinas (SHAW, 1985; LUKES et al., 2007 LAURENTI, 2010, COELHO, 2011).

Segundo Ashford (2000), os parasitos de todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente similares. Contudo, nem a análise do DNA ou sondas monoclonais, tem atingido confiabilidade suficiente para substituir a identificação das espécies pela análise de isoenzimas (ASHFORD, 2000). Todavia, Barrio, (2012), destaca o registro de um caso autóctone de leishmaniose visceral humana, em Salta, (Argentina), creditado ao sequenciamento do gene do citocromo b (cit b), que

tem sido validado pela precisa caracterização da *Leishmania* spp.

Figura 1- Morfologia do Protozoário *Leishmania*



Forma Promastigota

Forma Amastigota

Fonte: <http://slideplayer.es/slide/4619935/>

Segundo proposta de Levine et al., 1980, este protozoário ocupa uma posição sistemática conforme descrito na figura 2.

Figura 2 - Classificação taxonômica *Leishmania* spp.

Reino Protista (HAECKEL, 1866)
 Sub-Reino Protozoa (GOLDFUSS, 1817)
 Filo Sarcomastigophora (HONIGBERG E BALAMUTH, 1963)
 Sub-Filo Mastigophora (DEISING, 1866)
 Classe Zoomastigophorea (CALKINS, 1909)
 Ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963)
 Sub-Ordem Trypanosomatina (KENT, 1880)
 Família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901)
 Gênero, *Leishmania* ROSS, (1903)
 Sub-Gêneros:
Leishmania Saf' Janova, (1982)
Viannia Lainson e Shaw (1987)

Fonte: Poubel et al., 2010.

A transmissão do protozoário se dá através da picada por fêmeas de flebotomíneos infectados, *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3) e *Lutzomyia cruzi*, vulgarmente conhecidos como “mosquitos-palha”. Sendo assim, este invertebrado é descrito como agente disseminador e mantém os ciclos endêmicos desta doença (ENGWERDA et al., 2004; CARNEIRO & TOCANTIS, 2011).

Figura 3 - *Lutzomyia longipalpis* engurgitada



Fonte: <http://umanimalvivo.blogspot.com.br/p/leishmaniose.html>

São dípteros hematófagos, pertencentes à subordem Nematocera e da família Psychodidae, holometábolos, tendo seu desenvolvimento, a partir do ovo, passando por quatro estádios larvais, pupa e adulto (FREITAS, 2010). O gênero *Lutzomyia*, dos flebotomíneos do Novo Mundo, é o maior e de mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Dentre as 927 espécies de flebotomíneos mundiais, 500 são conhecidos nas Américas, um pouco mais de 400 são do gênero *Lutzomyia* (YOUNG & DUNCAN, 1994; SHIMABUKURO & GALATI, 2011).

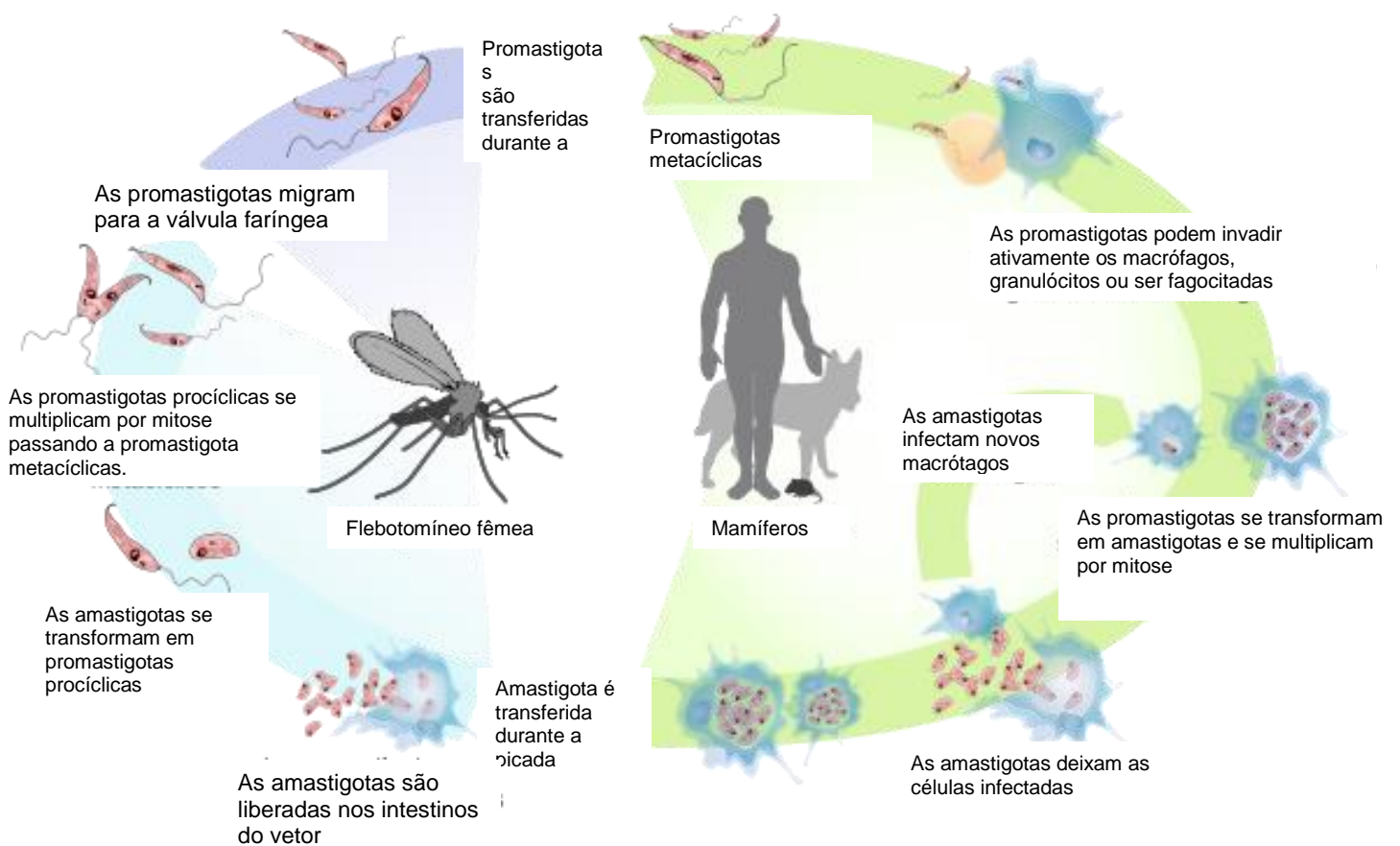
No Brasil, tem-se conhecimento, até o momento, de 260 espécies de flebotomíneos, representando 28,6% do total e 47,7% dos que ocorrem na região Neotropical (REBÊLO et al., 1999, AGUIAR & MEDEIROS, 2003, GIL et al., 2003; SHIMABUKURO & GALATI, 2011).

Embora os resultados estatísticos encontrados por Soares et al., 2010, não sejam significativos, acredita-se que relações ecológicas como habitat, comportamento intra-específico, ciclo de dieta e população de reservatórios de cada região, possam influenciar as taxas de infecção do vetor e conseqüentemente na transmissão e disseminação da doença, tanto em caninos quanto em humanos.

Os vetores flebotomíneos são muito ativos à noite, por isso a possibilidade de se contrair a infecção através da picada do inseto carreador deste parasito, acentua-se durante o período entre o anoitecer e o amanhecer (PÉTERFI et al., 2011).

O ciclo da *Leishmania* no vetor envolve um complicado sistema de interações em diferentes fases. Em suma, este tem início com a transmissão da LV para animais ou o homem, a qual ocorre diretamente por meio do vetor infectado, sendo que este flebótomo foi infectado anteriormente durante a hematofagia em um animal ou humano parasitado (Figura 4). O vetor ingere as formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* através da derme e, após 24 a 48 horas, o parasita passa ao estágio de promastigoto, no lúmen do intestino do inseto. Por sua vez, na forma promastigota o parasito se reproduz e migra para o esôfago e faringe do inseto, quando durante um novo repasto sanguíneo serão então inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado (Figura 4) (DE OLIVEIRA et al., 2015).

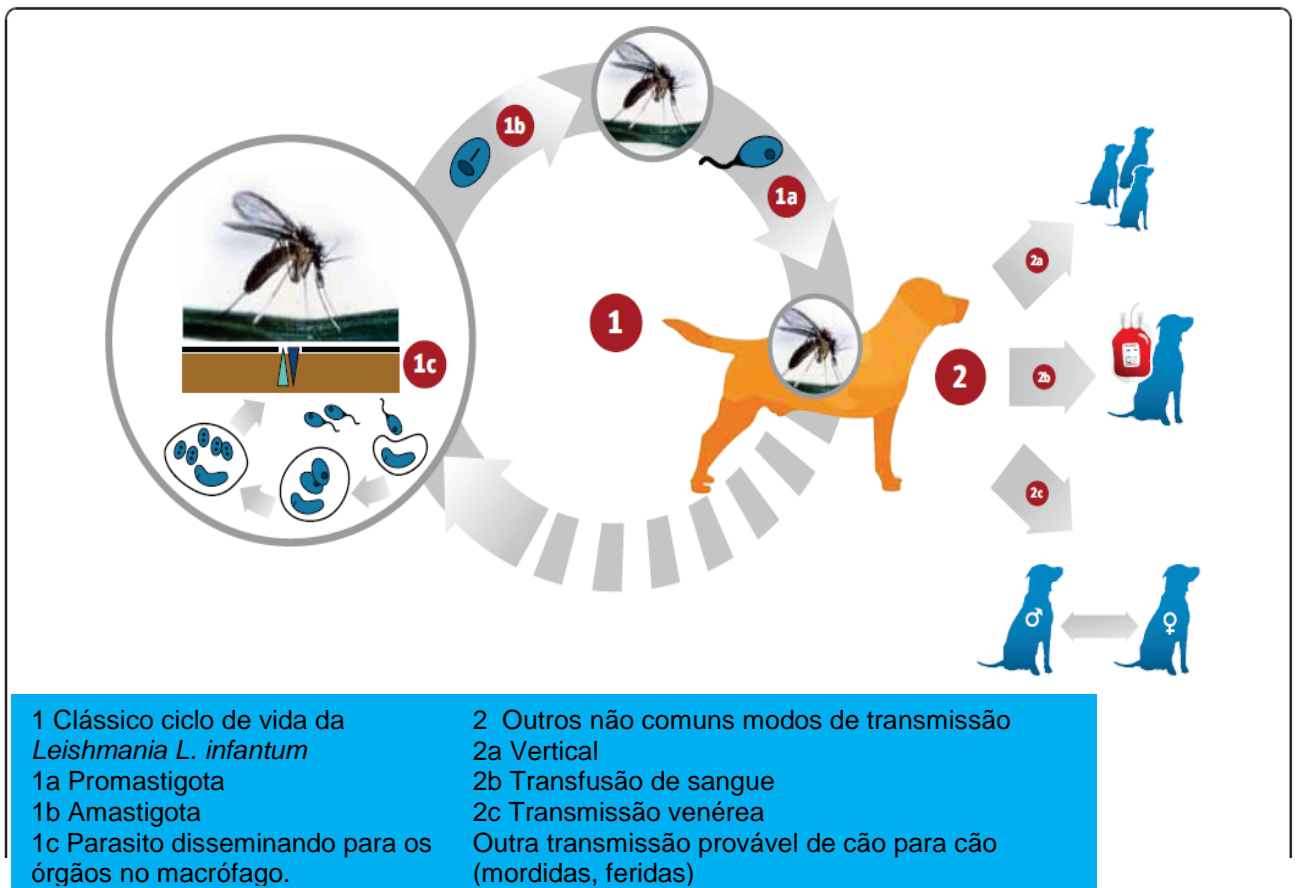
Figura 4- Ciclo de transmissão Leishmaniose visceral



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>

Apesar de ser usualmente transmitida pela atividade hematófaga de flebotomíneos fêmea, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), rotas alternativas de transmissão têm sido descritas em cães e em humanos. Em cães existem registros de transmissão sexual, vertical e por transfusão sanguínea (Figura 5) (SOLANO-GALLEG0 et al., 2011; NAUCKE & LORENTZ, 2012) e outros vetores tais como pulgas e carrapatos também podem estar envolvidos na epidemiologia da doença (MORAIS et al., 2013; DE OLIVEIRA et al, 2015).

Figura 5- Ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) infantum* com indicação de rotas não flebotomíneas de transmissão comprovada e não comprovada para o cão



Fonte: Solano-Gallego et al.,2011.

A ocorrência de um animal infectado não significa necessariamente a de um reservatório, este é um hospedeiro do parasito, mas sua importância na manutenção do ciclo de transmissão numa dada área deve ser avaliada e dependerá das peculiaridades da interação parasito-hospedeiro, isto determinará a competência da espécie animal em questão na manutenção e/ou transmissão do

parasito, definindo, portanto, seu papel ou não como reservatório (ROQUE & JANSEN, 2014).

A relevância do papel dos animais sinantrópicos (ex.: gambás, roedores, entre outros), na possível transmissão desta infecção para outras espécies domésticas, bem como a manutenção de seu ciclo endêmico também deve ser considerada. Figueiredo et al., 2008 registraram a ocorrência de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em um cachorro-vinagre, mantido em cativeiro, reforçando a importância destes, no decurso da transmissão em ambiente silvestre e do próprio cativeiro. Garcia et al., 2014 observaram que coelhos apresentavam infecção assintomática por *Leishmania (Leishmania) infantum*, podendo estes animais serem reservatórios deste parasito.

Em um estudo realizado em Portugal, por Helhazar et al., 2013, foi relatada pela primeira vez, uma infecção natural em *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, sugerindo que estas espécies tenham uma função de possível reservatório, contribuindo para o ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) infantum*. A expressão do calazar em humanos pode sofrer influência da característica própria da cadeia epidemiológica de cada espécie. O calazar africano, causado pela *Leishmania (Leishmania) donovani*, afeta jovens e adultos na região oriental da África, onde os ratos são reservatórios do parasito (BASTOS et al., 2015).

1.3 A LEISHMANIOSE EM CÃES

A leishmaniose em cães é uma doença antiga, entretanto, pouco estudada. Considerados o principal reservatório doméstico, o parasitismo presente na pele desses animais tem sido associado à transmissão a humanos, através do vetor flebotomíneo, do agente etiológico, *Leishmania (Leishmania) infantum* (MOLINA et al., 1994; GUINCHETTI 2006; QUEIROZ et al., 2011). Portanto, a eutanásia canina é uma medida de combate à leishmaniose visceral humana, adotada pelo governo brasileiro em áreas endêmicas (COURTENAY et al., 2002).

A importância do cão na epidemiologia da doença não se restringe ao fato deste apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, o elevado número de animais assintomáticos, em torno de 60 a 80% da população infectada, também é outro fator agravante. Devido à ausência de

sintomas ou resultados falso-negativos em exames sorológicos, estes animais podem servir de fonte de infecção para o *Lutzomyia longipalpis* (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; FARIA & DE ANDRADE, 2012; MARCONDES & ROSSI, 2013; BARATI et al., 2015). À vista disso, a eutanásia canina é considerada uma medida controversial, uma ação de pequeno impacto na redução de casos caninos e humanos. Além disso, falhas têm sido atribuídas a atrasos na detecção e eliminação de cães infectados, tendência de substituição de animais infectados por filhotes susceptíveis, bem como a baixa sensibilidade dos métodos sorológicos empregados (VERAS et al., 2014; WERNECK, et al, 2014).

Entende-se de grande relevância, um estudo recente que relata a heterogeneidade da carga parasitária em cães, relacionando-a a diferentes tecidos e o decurso da doença (COURTENAY et al., 2014). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que dos 42 cães infectados, 7 foram responsáveis por >80% dos flebotomíneos infectados. Estes dados levam a refletir sobre o atual programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil, relacionada a eutanásia de cães. A infecciosidade canina em relação à infectividade do vetor é sabido aumentada com a severidade da doença e o aumento de anticorpos anti-parasitários, mas a sensibilidade e marcadores específicos de infecciosidade não foram identificados (COURTENAY et al., 2014; RODAS, 2014).

Os sinais clínicos comuns em cães com LVC são: pelame seco, prurido, alopecia, áreas de hiperqueratose, nódulos intradérmicos, hepatoesplenomegalia, apatia, linfadenomegalia, onicogribose, emaciação, além de sinais oculares, dificuldade locomotora, polidipsia, apatia, vômito, diarreia, polifagia, epistaxe e melena. Quanto aos sintomas estes são caracterizados por febre, hipergamaglobulinemia e anemia (FEITOSA et al, 2000; DE LIMA et al, 2005; SCHIMMING & PINTO E SILVA, 2012).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose visceral (LV) ocorre em 69 países, distribuídos entre todos os continentes, com exceção da Oceania, sendo notificados anualmente, cerca de 500 mil novos casos, dos quais 90%, concentram-se na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Etiópia e Brasil. Contudo, os números mencionados são estimativas

pois, a notificação da enfermidade é compulsória em pouco menos da metade das nações afetadas (ALVAR et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013).

De grande destaque por sua considerável distribuição geográfica mundial, a leishmaniose visceral humana, desde a década de 80, tem se destacado por apresentar uma coinfeção preocupante pelo o HIV, associada à imunossupressão desses pacientes (MARQUES et al., 2007).

Enquanto infecções causadas por *Leishmania (Leishmania) infantum* em lugares onde protocolos de controle tenham sido instituídos têm declinado, as infecções causadas por *Leishmania (Leishmania) donovani* no subcontinente indiano e no leste da África têm vitimado milhares de pessoas (READY, 2014, VERAS et al., 2014).

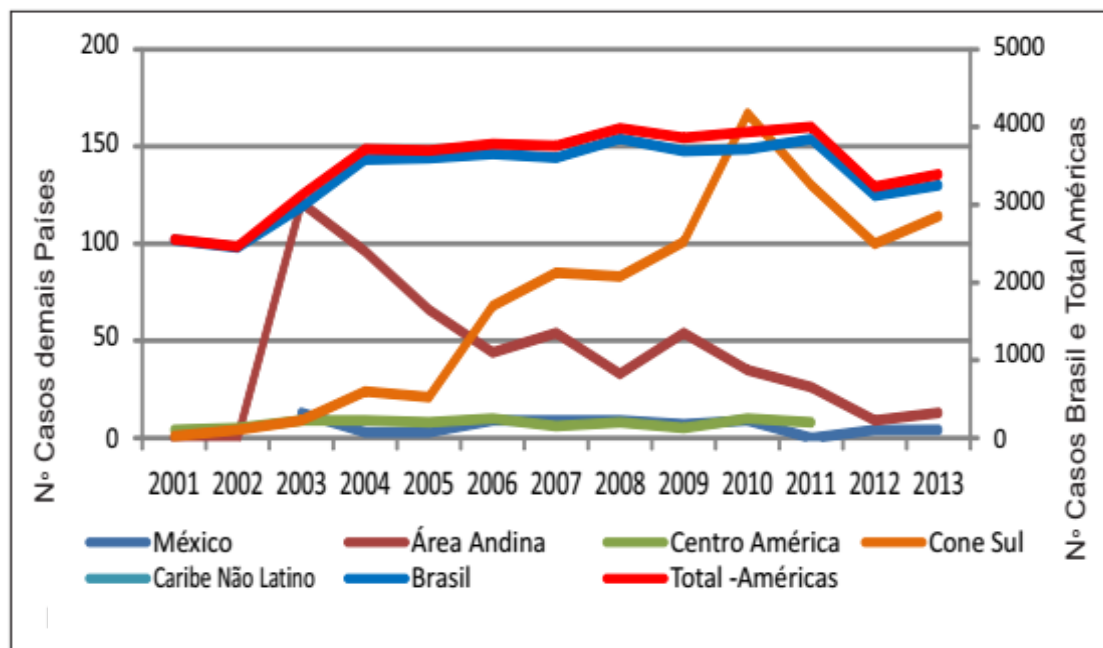
Na Europa a doença é considerada rara, embora a incidência tenha aumentado significativamente na região durante os anos 90, cerca de 700 casos autóctones anuais são registrados nos países do sul da Europa (PÉTERFI et al., 2011, DI MUCCIO et al., 2015). Geralmente associada a regiões tropicais, como às quentes e úmidas, com regular índice pluviométrico, bem como países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, ambas, leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea humanas seguem também a distribuição geográfica do vetor, globalmente encontrado entre os trópicos, mas que também tem sido detectado em algumas regiões com invernos relativamente rigorosos, tais como: França, Portugal, Rússia e China (AVERSI-FERREIRA, et al, 2015).

Doenças designadas como negligenciadas, das quais: Leishmaniose visceral (calazar) e tegumentar, dengue, leptospirose, malária, doença de Chagas, oncocercose, filariose, hanseníase, entre outras, quando subdiagnosticadas clínica ou analiticamente, ou subnotificadas, podem resultar em sérios problemas de caráter epidemiológico, tais como surtos, epidemias e endemias (WHO, 2010; FUJI et al., 2014). Originalmente proposto, o adjetivo “negligenciada”, embasou-se no desinteresse das grandes indústrias farmacêuticas multinacionais, na produção de medicamentos voltados a consumidores considerados “não potenciais”. Ademais do restrito financiamento dispensado pelas agências de fomento para área de pesquisa relacionada (BISUGO et al., 2007; SOUZA et al., 2010b; WERNECK, 2011; COURAVITAL et al., 2014).

Nas últimas décadas, doenças infecciosas e parasitárias vêm emergindo ou reemergindo no Brasil. Entre as parasitárias, merecem destaque a expansão geográfica das leishmanioses tanto tegumentar quanto o calazar e a esquistossomose (BOULOS, 2001; LUNA, 2002; PAZ & BERCINI, 2009). O “calazar”, conforme denominada a doença popularmente, tem sido considerado um importante problema de saúde pública, afetando aproximadamente 3.379 indivíduos por ano, como uma taxa de incidência anual de 1,9 casos por 100.000 habitantes (COURA-VITAL et al., 2014) (Figura 5). A leishmaniose visceral é considerada um grande problema de saúde pública no Brasil devido a sua alta morbi-mortalidade em casos não tratados. Além disso, modificações ambientais provocadas pelo homem como desmatamentos, crescimento desordenado das cidades, condições precárias de habitação, concomitantemente com a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* e animais domésticos como possíveis reservatórios, levaram à expansão geográfica e à urbanização da LV no país (DINIZ et al., 2008; BARATA et al., 2013; CARDIM et al., 2013; ALMEIDA & WERNECK, 2014a, SANGENIS et al., 2014).

Nas Américas, a leishmaniose visceral é autóctone em 12 países, sendo registrado no período de 2001 a 2013 o total de 45.490 casos, com média anual de 3.499 casos (Figura 6) (OPAS, 2015).

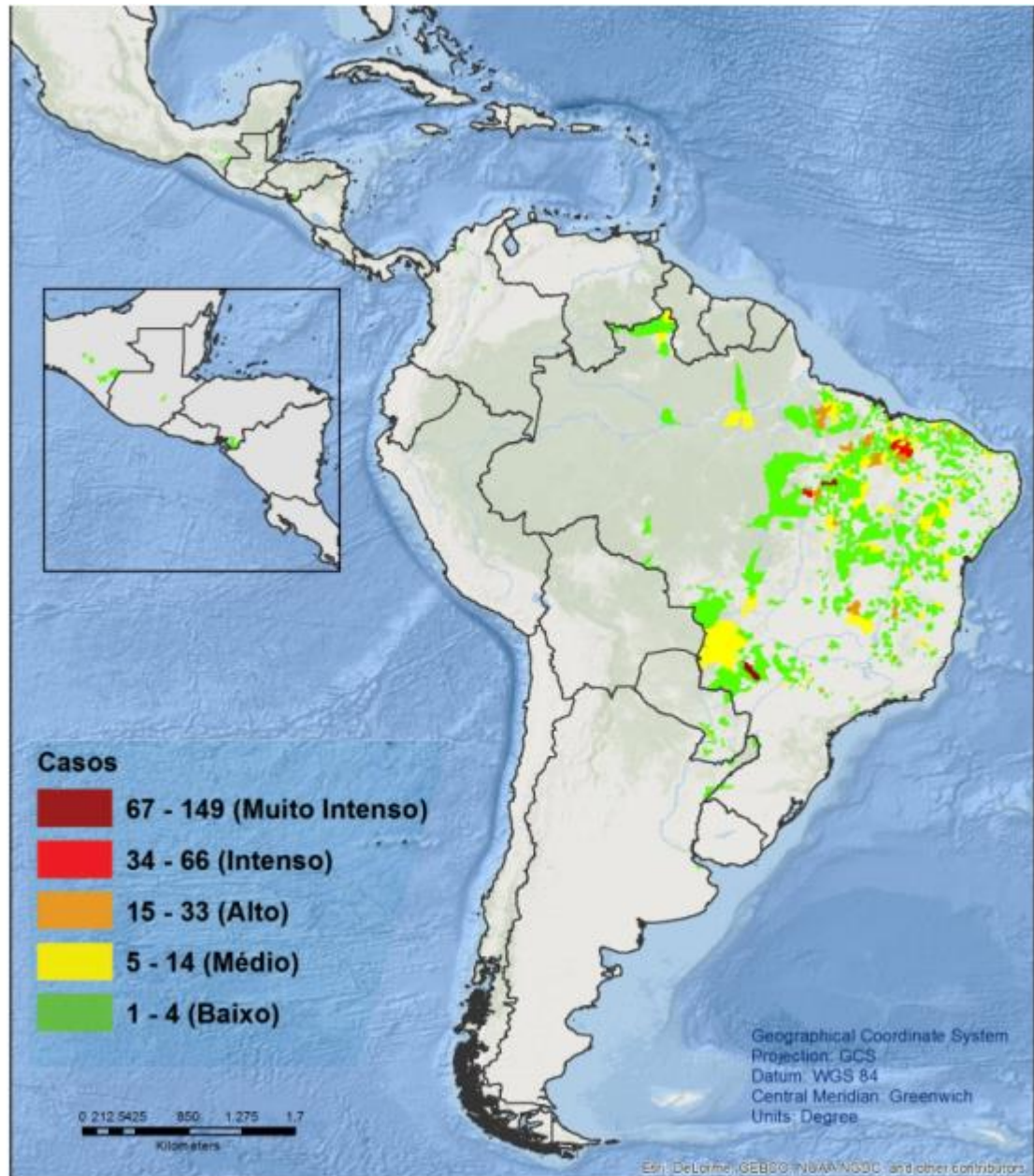
Figura 6- Casos leishmaniose visceral, segundo sub-região, Américas, 2001-2013



Fonte: OPAS – Informe Leishmanioses, Julho 2015.

Em 2013, um total de 3.389 casos foram registrados em oito países, distribuídos entre 798 municípios (Figura 7). Os países que concentram o maior número de casos são: Brasil 96% (3.253), seguido do Paraguai, 3,2 % (107) e Colômbia 0,4% (13) (OPAS, 2015).

Figura 7- Distribuição e casos de Leishmaniose Visceral por Município



Fonte: OPAS – Informe Leishmanioses, Julho 2015.

1.5 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO

Nos últimos anos, enormes têm sido os esforços na busca por um diagnóstico mais acurado para a leishmaniose visceral canina (LVC), por ser o canídeo doméstico o principal reservatório e provável mantenedor do ciclo endêmico da doença em humanos.

O diagnóstico da leishmaniose canina é embasado em dois pontos principais: o primeiro em casos onde o cão apresenta os sintomas da doença e a análise é realizada para confirmação do quadro clínico. O segundo motivo seria seu emprego em investigações de uma possível infecção, porém direcionada a cães assintomáticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009, 2011).

Métodos sorológicos são utilizados em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e subsequente eutanásia de cães soropositivos. Estes testes são considerados sensíveis e específicos, contudo, eles têm limitações para detecção de baixos níveis de anticorpos e reações cruzadas com leishmaniose tegumentar canina (ABRANTES et al, 2016).

Novas técnicas para coleta de amostras ou o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos foram cogitadas por diversos autores (ALMEIDA et al., 2013; VERAS et al., 2014). Entretanto, o foco da maioria dos estudos concentra-se na busca de novos antígenos de *Leishmania* (FARIA & ANDRADE, 2012; SOUZA et al., 2012).

Alguns estudos estimam que a Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI apresenta uma sensibilidade em torno de 68% a 100% e especificidade em torno de 52% a 100%, enquanto o Ensaio Imunoenzimático - EIE possui uma sensibilidade de 91% a 97% e especificidade com taxas de 83% a 98% (BRAGA et al., 1998; ROMERO & BOELAERT, 2010; COURA-VITAL et al., 2014, DA SILVA et al., 2014). Entretanto, apesar da grande variedade atualmente de métodos para diagnóstico canino, que empregam diversos antígenos, ainda não existe um antígeno altamente específico e que seja empregado como um método de fácil execução (MAIA & CAMPINO, 2008). Diante desse panorama, ausência de um método padrão-ouro é um dos obstáculos para um diagnóstico mais efetivo da leishmaniose visceral (CHARGUI et al, 2009; RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2010 et al., FARIA & ANDRADE, 2012).

Garcez et al., 2010, ratificam em seu estudo a importância do antígeno utilizado nos ensaios imunoenzimáticos (EIE), na identificação de cães sintomáticos e assintomáticos. No referido estudo, entre dois antígenos recombinantes utilizados, rHsp83 e rK39, o antígeno rK39 apresentou maior poder discriminatório.

Entretanto, segundo Romero & Boelaert, 2010, é preciso ser mais prudente e optar por incluir métodos diferenciais para a constatação de um resultado positivo, que poderá resultar na eliminação de um cão doméstico. Assis et al., 2010, realizaram um estudo comparativo, como amostras para análises parasitológicas (imunohistoquímica e histoquímica) e sorológicas (RIFI e EIE) nos tecidos do baço, linfonodo e fígado caninos. Em conjunto com essas análises, os autores também empregaram a reação em cadeia da polimerase (do inglês PCR). Embora tenha ocorrido uma boa correlação entre os testes parasitológicos e sorológicos, o mesmo não aconteceu com relação à PCR e os demais testes, mesmo tendo a PCR apresentado uma sensibilidade de 100%. Chargui et al., 2009, realizaram um estudo em uma área de baixa endemicidade para leishmaniose visceral canina na Tunísia, utilizando métodos como a reação em cadeia da polimerase - PCR, reação de imunofluorescência indireta - RIFI e cultura *in vitro*, detectou-se que dentre os casos positivos, 50% eram assintomáticos e que em detrimento às demais técnicas, novamente a PCR apresentou alta sensibilidade. Os citados autores enfatizam que ensaios parasitológicos e sorológicos, não apresentam o mesmo grau de eficiência, quando realizados de forma isolada e que a PCR deve ser utilizada com cautela em campanhas epidemiológicas, pois esta detecta o DNA do parasita e não necessariamente a doença no animal (ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; DA SILVA et al., 2014).

Uma metanálise sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina no Brasil, realizada por Peixoto et al., 2015, aponta para uma grande heterogeneidade de prevalência da LVC, o que ocasiona um grande desafio no que diz respeito ao controle dessa doença em áreas de baixa prevalência. Haja vista as medidas sintetizadas que identificaram uma baixa acurácia nos testes disponibilizados e que, em circunstâncias de baixa prevalência, apresentaram um desempenho menos adequado, com baixos valores preditivos positivos (FIGUEIREDO et al., 2010; ARRUDA, 2014, TRAVI, 2014; SCHWANKE et al., 2014, D'ANDREA et al., 2015). No referido trabalho, foi possível observar que os estudos

avaliados buscaram formar subgrupos de cães de acordo com o “status” clínico e a disponibilidade de kits comerciais, ensaio imunoenzimático de antígeno bruto (cEIE) e RIFI. Todavia, este procedimento demonstrou influenciar a escolha dos métodos utilizados na pré-triagem dos subgrupos de animais estudados. A estratégia de recrutamento superestima a especificidade do cEIE e da RIFI em amostras de cães saudáveis de áreas não endêmicas. Evidencia-se também a influência do status clínico com a piora da sensibilidade estimada do ensaio imunoenzimático em cães assintomáticos. Entre os problemas metodológicos identificados no estudo, fica evidente que os cães foram pré-triados com relação ao estado de infectado ou não, por meio de outros testes sorológicos, afetando a acurácia dos testes, os quais poderiam ser superestimados, bem como o fato de que em alguns estudos, não foram adotados os mesmos padrões de referência para todos os cães (PEIXOTO et al., 2015).

A sensibilidade e especificidade de um método diagnóstico dependem de aspectos multifatoriais, como tipo, fonte e pureza do antígeno empregado, bem como o sistema de detecção intrínseco de uma determinada tecnologia (KAR et al., 1995; TAVARES et al., 2003, SCHWANKE et al., 2014; DA SILVA et al., 2014). Métodos sorológicos podem ser mais sensíveis, porém menos específicos. Além disso, a escolha do valor do *cut-off*, pode não ser óbvia (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010, FIGUEIREDO et al., 2010; SCHWANKE et al., 2014, CHAZTIS et al., 2014).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi por muito tempo o método diagnóstico confirmatório em inquéritos caninos. Todavia, apesar de reunir as características de valores elevados de sensibilidade e valores menores de especificidade, reações cruzadas com outras importantes zoonoses (Leishmaniose tegumentar americana - LTA e doença de Chagas), limitavam a fidedignidade do teste (GONTIJO & MELLO, 2004; ALVES & BEVILAQUA, 2004, OLIVEIRA et al., 2008; ZANETTE et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2014, COURA-VITAL et al., 2014; MATOS et al., 2015).

A despeito da grande variedade de métodos diagnósticos, no Brasil, os testes sorológicos Imunoenzimáticos (EIE) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (disponibilizados em kits específicos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA), eram recomendados e distribuídos pelo

Ministério da Saúde para a avaliação de soro prevalência em inquéritos caninos. Entretanto, a partir de 2011, através da Nota Técnica Conjunta 01/2011, a RIFI, foi substituída pela técnica do EIE como teste confirmatório e o teste imunocromatográfico – teste rápido “*dual path platform*”, passou a ser utilizado como teste de triagem para leishmaniose visceral canina (TR DPP® LVC) (FARIA & DE ANDRADE, 2012).

Em comparação a outros métodos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e EIE com antígeno total bruto (cEIE), os testes rápidos - TR DPP®, são mais baratos e práticos, quando executados em larga escala, sendo sua utilização de crucial importância em áreas endêmicas (LIMA et al., 2010). Nas Tabelas 1 e 2, listamos os métodos correntes para a detecção da LV em cães.

Tabela 1: Métodos para diagnóstico de LV em cães.

Método diagnóstico	Princípio da técnica	Vantagem	Desvantagem
Parasitológico	Punção de órgãos e pesquisa direta do parasito	Especificidade de 100%	Sensibilidade variável, Distribuição tecidual heterogênea, Método moroso
Imuno-histoquímica	Baseia-se na detecção direta do parasito em secções coradas de tecidos	Reprodutibilidade e resultados consistentes	Utilização de anticorpos monoclonais como anticorpos primários
Diagnóstico molecular PCR	Amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasita	Método não invasivo	Sensibilidade variável. Normalmente método mais sensível em cães com doença em fase aguda. Custo elevado.
Diagnóstico molecular PCR em tempo real qPCR	Quantificação do número de moléculas (oligonucleotídeos) produzidas a cada ciclo.	Monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito. Alta sensibilidade	Custo elevado

Tabela 2: Métodos para diagnóstico sorológicos para LV em cães

Método diagnóstico	Princípio da técnica	Vantagem	Desvantagem
Reação de fixação de complemento	Ativação do sistema complemento por ligação antígeno-anticorpo, geração de complexos de ataque à membrana. Destruição da membrana celular pela ligação de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> às hemácias, ocorrendo hemólise	Realização de eluatos de sangue colhidos em papel de filtro	Em desuso (1940 e 1950) Reação cruzada com Tripanomastídeos em títulos baixos Técnica complexa e trabalhosa
Teste de aglutinação Direta - DAT	Utilização de promastigotas íntegras testadas contra o sangue de cães suspeitos de LV	Fácil execução Baixo custo Alta sensibilidade e especificidade	Padronização da técnica e controle de qualidade dos antígenos bastante complexa
Elisa/EIE	Adsorção do antígeno de em fase sólida (placa de Elisa) revelação reação antígeno-anticorpo pela ação da peroxidase	Aplicação para um grande número de amostras em um pequeno espaço de tempo.	Desempenho relacionado não só como o tipo de antígeno utilizado, mas também com estado clínico do cão em teste
Reação de Imunofluorescência Indireta	Antígenos fixados à lâmina de microscopia reagem contra Ac de interesse e são revelados por anti-Ac marcados com fluorocromos	Elevada sensibilidade	Presença de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, malária, doença de Chagas, erliquiose, babesiose
Teste Rápido <i>Dual Path Platform</i> DPP®	Antígenos recombinantes adsorvidos a uma membrana de nitrocelulose (fase sólida)	Fácil execução Resultado rápido	Resultados em certos casos limitados por alguns antígenos, quando utilizados isoladamente e correlacionados ao “status” clínico do cão

1.6 LEISHMANIOSE VISCERAL E A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Tendo em vista a gravidade dentro da saúde pública de doenças ditas “negligenciadas” e pensadas restritas a certas camadas sociais, mas nem por isso menos relevantes, considera-se de suma importância dentro do âmbito da Vigilância Sanitária, o aprimoramento e melhorias contínuas de variáveis que possam influir na redução ou até na quebra desse ciclo vicioso. Sendo assim, Camargo (2008), apontou como “fatalismo tropical” a incidência de várias doenças que não necessariamente tem como região endêmica apenas zonas tropicais, entretanto, têm uma maior prevalência por questões sócio econômicas. Desta forma, o autor descreve também que esse panorama poderia ser revertido, significativamente, pelo desenvolvimento econômico e sanitário em geral ou pelo aporte pontual de recursos específicos, tais como, melhorias no diagnóstico (CAMARGO, 2008).

Através da Lei Federal nº 6259, de 1975, que cria o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica e sua regulamentação no ano posterior, pelo Decreto nº 78.231, tornaram-se de notificação compulsória de casos e/ou óbitos, para todo território nacional, as 14 doenças, a posteriori referidas, instituída pela Portaria Bsb 314, de 27/08/1976. Sendo estas: Peste, Cólera, Varíola, Febre Amarela, Pólio, Tétano, Sarampo (casos internados), Febre Tifóide, Leishmaniose cutâneo-mucosa, Leishmaniose visceral, Hanseníase, Tuberculose, Raiva Humana, Doença Meningocócica e outras Meningites (BARBOSA et al., 2010, ALMEIDA et al., 2013).

Segundo à Organização Mundial de Saúde, às leishmanioses são a segunda causa de infecção de maior relevância entre as protozooses tropicais, sendo a leishmaniose visceral responsável por 59.000 óbitos no mundo (BRASIL, 1994; DA SILVA, et al., 2010; BASTOS, et al., 2015), tendo sua letalidade aumentado de 3,4% para 5,5% no período de 1994 a 2008 (BRASIL, 2010).

Embora a doença seja de notificação compulsória, a disponibilidade de dados é baseada na detecção de casos passivos. Em algumas áreas o número de pessoas expostas à uma possível infecção ou assintomáticas, é maior que o número de casos detectados (CAMARGO & LANGONI, 2006).

Muitas falhas são atribuídas à elevação global do número de casos de leishmaniose visceral em áreas endêmicas nos últimos anos. Entre estas podemos destacar: controle inadequado dos vetores e reservatórios, ao aumento do número

de casos da doença em pacientes imunodeprimidos (ex.: coinfeção pela Aids), como citado anteriormente, resistência do agente ao tratamento, o impacto causado pelas alterações climáticas globais, que tem refletido de maneira positiva no aumento da transmissão de diversas outras doenças vetoriais (MONTALVO, et al., 2012).

Isso é corroborado pelos achados de Poepl et al., 2013, que citam que uma possível causa do aumento considerável no número de flebotomíneos, antes considerados inexistentes na Áustria, pode estar relacionado aos moderados eventos climáticos, favorecidos pelo aquecimento global. Este aumento tem se mostrado significativo, com a expansão desses insetos em extensas áreas do país. Flebotomíneos são típicos da fauna Mediterrânea, contudo são amplamente distribuídos, principalmente, por partes do Sul da Europa, mas também extra Mediterrâneo, onde podemos citar as Europas oriental e ocidental (ASPÖCK, 2008). A captura de espécies como o *Phlebotomus mascittii*, correlacionada com prováveis áreas de leishmaniose autóctone humana e animal em regiões da Alemanha é um detalhe a ser ressaltado (NAUCKE et al., 2008).

No Brasil, De Oliveira et al., 2013, corroboram as observações de Aspöck, 2008 e Fischer et al., 2011, quanto a possível inter-relação entre a abundância da população desses vetores e a sazonalidade climática. Vale ressaltar que o conhecimento da relação e da influência dos fatores ambientais como a flutuação sazonal na população de flebotomíneos, faz-se necessário devido à alta incidência de leishmaniose visceral (LV) no Brasil, podendo estes dados subsidiar estratégias de controle da leishmaniose (MACEDO et al., 2008).

Goncalves et al., 2013, reiteram que à leishmaniose visceral é um desafio às políticas de saúde pública brasileiras devido a inúmeros fatores: o número de indivíduos assintomáticos ser bem mais expressivo que os sintomáticos, limitações diagnósticas, a necessidade de ações integradas que englobem o tratamento de humanos infectados, a eliminação de cães doentes, combate ao vetor, manejo ambiental e a vigilância epidemiológica.

A proibição através da Portaria Interministerial N^o1.426, de 11 de julho de 2008, do tratamento de cães doentes com produto de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), deve ser salientada.

Por conseguinte, a utilização de quimioterápicos como o antimoniato pentavalente, comumente utilizado em tratamento de humanos, na maioria dos casos, não obteve sucesso quando utilizado em cães, causando até mesmo a exacerbação da doença.

A Organização Mundial de Saúde – OMS, também desaprova a utilização da droga para tratamento de humanos, em animais, o que seria justificado por um provável aumento da resistência do parasito ao fármaco preconizado (PALATNIK-SOUZA et al., 2001, IKEDA- GARCIA et al., 2010, AIT-OU DHIA et al., 2012, TRAVI, 2014).

Reportando-nos novamente à realidade brasileira, a correlação entre a renda, educação e o número de cães infectados por habitante e o risco do acometimento pela leishmaniose visceral humana, por exemplo, em Belo Horizonte, foi endossado por um estudo realizado por Araújo et al., 2013. Indicadores como renda e educação, do Índice de Vulnerabilidade à Saúde (IVS), foram significativamente associados com o aparente risco do desenvolvimento da LV, sugerindo assim a utilização desse índice no planejamento e priorização de ações de controle. Neste contexto, a ineficácia dessas ações, quando aplicadas de forma isolada é corroborada pelo grau de complexidade envolvido no ciclo biológico de propagação desse protozoário. Necessidade de ações de educação em saúde, no que tange o controle de leishmaniose visceral em áreas endêmicas, também é outra variável a ser considerada (ALEMU et al., 2013). O agravamento da insuficiência de recursos humanos, materiais e financeiros, para as ações das vigilâncias concernentes reforça o quadro de debilidade no enfrentamento desta parasitose (GONÇALVES et al., 2013; TRAVI, 2014).

Gusmão et al., 2014, relatam que no período de 2007 a 2011, no Brasil, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação *Network* (Sinannet), foram notificados 19.016 casos de leishmaniose visceral humana. Ceará (2.948), Minas Gerais (2.803), Maranhão (2.357), Tocantins (2.177), Pará (1.738), Bahia (1.589), São Paulo (1.201), Mato Grosso do Sul (1.165), e Piauí (1.068). Nas últimas décadas tem se observado uma maior expansão da doença, principalmente nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste do país (SANGENIS et al., 2014).

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), anualmente notificam-se, por exemplo, no estado de Minas Gerais, média de 445 casos confirmados de LV, num levantamento entre o período de 2001 a 2010.

Em um estudo realizado em Paracatu, Minas Gerais, evidenciou-se uma maior frequência de acometimento de indivíduos do gênero masculino e também em menores de 14 anos. Outro dado relevante, foi a observação de uma maior notificação de crianças entre 1 e quatro anos de idade, o que correspondeu a 31,2% da amostra, tendo este fato também sido evidenciado no estado no período de 2001 a 2010, com 43,2% dos casos confirmados, o que pode estar relacionado a uma possível maior carência nutricional e o estado imunológico ainda em formação (OLIVEIRA & PIMENTA, 2014).

Marinho et al., 2015, traçam um perfil dos estudos realizados com relação a leishmaniose visceral no contexto da avaliação econômica do tratamento. Relatam que a origem dos 14 estudos selecionados, concentram-se nos mesmos cinco países responsáveis por 90% dos casos de LV. A Índia respondeu por quase 7 (50%) artigos avaliados. Todos os artigos publicados de 1996 a 2012, basearam-se em dados de 1988 a 2011. Como era de se esperar, a maior parte refere-se a medicamentos, ainda que um pequeno número de trabalhos avaliasse os medicamentos mais recentes disponíveis. Na avaliação de métodos diagnósticos manteve-se o mesmo padrão, somente dois artigos avaliando os novos testes rápidos para detecção da LV (MARINHO et al, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade de amostras sorológicas para LVC, visando a sua implementação no controle da qualidade de reativos de Bio-Manguinhos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a titulação das amostras sorológicas de acordo com os métodos disponíveis e segundo a rotina de kits avaliados pelo controle de qualidade do LACORE.
- b) Avaliar uma possível degradação dos anticorpos durante os ciclos de congelamento e descongelamento desses soros, através do método imunocromatográfico - TR DPP® LVC - Bio Manguinhos, pela análise dos resultados reagentes e não reagentes, bem como pelo método de EIE® LVC – Bio Manguinhos.
- c) Padronizar a citometria de fluxo como ensaio auxiliar no controle de qualidade de amostras sorológicas para LVC, no intuito de crescer como método analítico na avaliação da qualidade das amostras empregadas na rotina dos ensaios e avaliar a estabilidade destas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras sanguíneas utilizadas no estudo foram obtidas através de uma colaboração com o Laboratório de Pesquisa Clínica de Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI, oriundas de um estudo relacionado à leishmaniose visceral canina (LVC) realizado por esta unidade. Portanto os espécimes obtidos tinham o aval do comitê de ética no uso de animais deste Instituto, segundo anexo A.

Em consonância com a disponibilidade do recolhimento dos cães a serem necropsiados, na coleta realizada pelo INI, foram obtidas 17 amostras caninas positivas para leishmaniose visceral, segundo exames parasitológicos realizados pelo Instituto doador (Anexo C). Estes espécimes de sangue total com anticoagulante e sem anticoagulante foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos no próprio Laboratório de Pesquisa Clínica de Dermatozoonoses em Animais Domésticos. Em seguida, foram encaminhadas ao Laboratório de Controle de Reativos – Lacore (Bio Manguinhos – Fiocruz) para realização da segregação em alíquotas e titulação.

Devido ao longo período de diferença entre a coleta das primeiras 5 amostras em relação as demais, estas foram divididas em dois grupos. Grupo 1 amostras: A, B, C, D, E e F e grupo 2: G, H, I, J, K, L, M, N, O, P e Q, existindo uma lacuna de 18 semanas entre o término da coleta das amostras do Grupo 1 para o início da coleta das amostras do Grupo 2.

3.1.1 Segregação em alíquotas e titulação de anticorpos anti-Leishmania pelo método imunocromatográfico (TR DPP LVC® - Bio Manguinhos)

Com a finalidade de uma melhor compreensão do comportamento das amostras quando submetidas a distintas circunstâncias de acondicionamento, bem como a ciclos de descongelamento e congelamento, o material obtido foi segregado em alíquotas e distribuídos conforme a Tabela 3:

Alíquotas que foram descongeladas apenas uma vez foram denominadas “amostra controle” e foram avaliadas em conjunto com as amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento (à temperatura ambiente) designadas “reutilizáveis”.

Tabela 3: Distribuição de amostras de soro e plasma segundo temperatura de armazenamento

Amostras caninas positivas: 17		Distribuição das alíquotas por amostra	
Temperaturas	Amostras analisadas	Amostras reutilizáveis	Amostras controle
-80°C (± 5) Soro	17	1 microtubo 2,0 mL cada amostra	30 <i>eppendorfs</i> cada amostra
-20°C (± 2) Soro	17	1 microtubo 2,0 mL cada amostra	30 <i>eppendorfs</i> cada amostra
-20°C (± 2) Plasma	14	1 microtubo 1,0 mL cada amostra	30 <i>eppendorfs</i> amostra A a F 20 <i>eppendorfs</i> amostras G a Q
5° C (± 3)	17	1 microtubo 2,0 mL cada amostra	
37°C (± 2)	13	1 microtubo 1,0 mL cada amostra	

No Grupo 1, as amostras A, B, C, D, E e F foram estocadas por um período total de 37 semanas, sendo o número de ciclos de descongelamento para o soro de 24 e de 22 para o plasma no Grupo 1 (Tabela 4) Algumas condições de armazenamento não puderam ser verificadas nas amostras do Grupo 1: as amostras A, B, E e F não puderam ser avaliadas a 37°C. No caso da amostra A também não foi possível obter espécime plasmático.

Com relação ao Grupo 2 (Tabela 4) todas as condições experimentais foram realizadas e as amostras foram acompanhadas por um período de 12 ciclos, entretanto, não puderam ser segregadas alíquotas plasmáticas das amostras G e L.

Tabela 4: Títulos obtidos pelo TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos, antes da armazenagem das amostras, tempo de armazenamento (5°C e 37°C) e número de ciclos de descongelamento de amostras a -80°C e -20°C

Amostra	Título (TR DPP® LVC)	Temperatura de estocagem (°C)				
		Número de ciclos de descongelamento			Tempo de armazenamento (semanas)	
		-80°C	-20°C		5°C	37°C
			Soro	Plasma		
A	1:1024	24	24	NR	NR	NR
B	1:4096	24	24	23	NR	NR
C	1:512	24	24	22	24*	8
D	1:512	24	24	22	24	24
E	1:4	6	6	1	NR	NR
F	1:256	24	24	20	NR	NR
G	1:512	18	19	NR	19	19
<u>H</u>	1:2048	18	19	18	19	19
I	1:512	18	19	18	19	19
J	1:4	1	1	1	1	1
K	1:512	18	19	18	19	19
L	1:256	16	17	NR	17	17
M	1:512	16	17	17	17	17
<u>N</u>	1:2048	16	17	16	17	17
O	1:2048	16	17	16	17	17
<u>P</u>	1:512	15	16	14	14	14
Q	1:2048	15	16	14	14	14

NR – Não realizado

*A amostra C a temperatura de 5°C já estava armazenada há 37 semanas durante a realização da 24ª análise e há 21 semanas, a 37°C, durante a 8ª análise. Com relação a amostra D, o período total de armazenamento foi de 37 semanas durante a realização da 24ª análise nas duas temperaturas. Amostra E, apenas nos seis primeiros ciclos nas temperaturas - 80°C e - 20°C, em plasma, apenas um ciclo. Amostra J, primeiro ciclo nas temperaturas de congelamento e após uma semana de estocagem.

H (Título plasma = 1:1024); N (Título plasma = 1:4096); P (Título plasma = 1:128)

A titulação foi realizada, conforme anexo B, diluindo-se os espécimes de soro e plasma, em soro canino negativo para LV (obtidos na Seção de Processamento de Plasma - SEPLA/Bio-Manguinhos). As diluições foram analisadas pelo método imunocromatográfico - TR DPP® LVC - Bio Manguinhos. Nas amostras que apresentaram resultado reagente até a diluição 1:4096, as diluições foram estendidas até 1:6826, onde não foi observada reatividade.

Os ensaios foram realizados com suportes e tampões de corrida (TR DPP® LVC - Bio Manguinhos) pré-avaliados pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Reativos - Lacore (Bio Manguinhos/Fiocruz) (Figura 8), tendo apresentado resultados satisfatórios.

Durante o estudo, tanto na etapa de titulação, como da avaliação da estabilidade, a cada substituição de um dos componentes do TR DPP® LVC, uma amostra padrão controle positiva era avaliada. Realizou-se uma diluição seriada desse controle positivo, para avaliar a similaridade do perfil de reatividade preconizado na rotina analítica dos kits diagnósticos (Figura 8).

O mesmo procedimento era efetuado quando ao término de um soro negativo para diluição das amostras, uma nova amostra negativa fosse inserida nos ensaios.

Figura 8 - Suportes e tampões de corrida TR DPP® LVC



Fonte: Laboratório de Controle de Reativos – Lacore

Perfil de reatividade amostra padrão controle positiva preconizada na diluição seriada:

1:4, 1:16 = reagente;

1:64, 1:256 e 1:1024 = reagente ou não reagente;

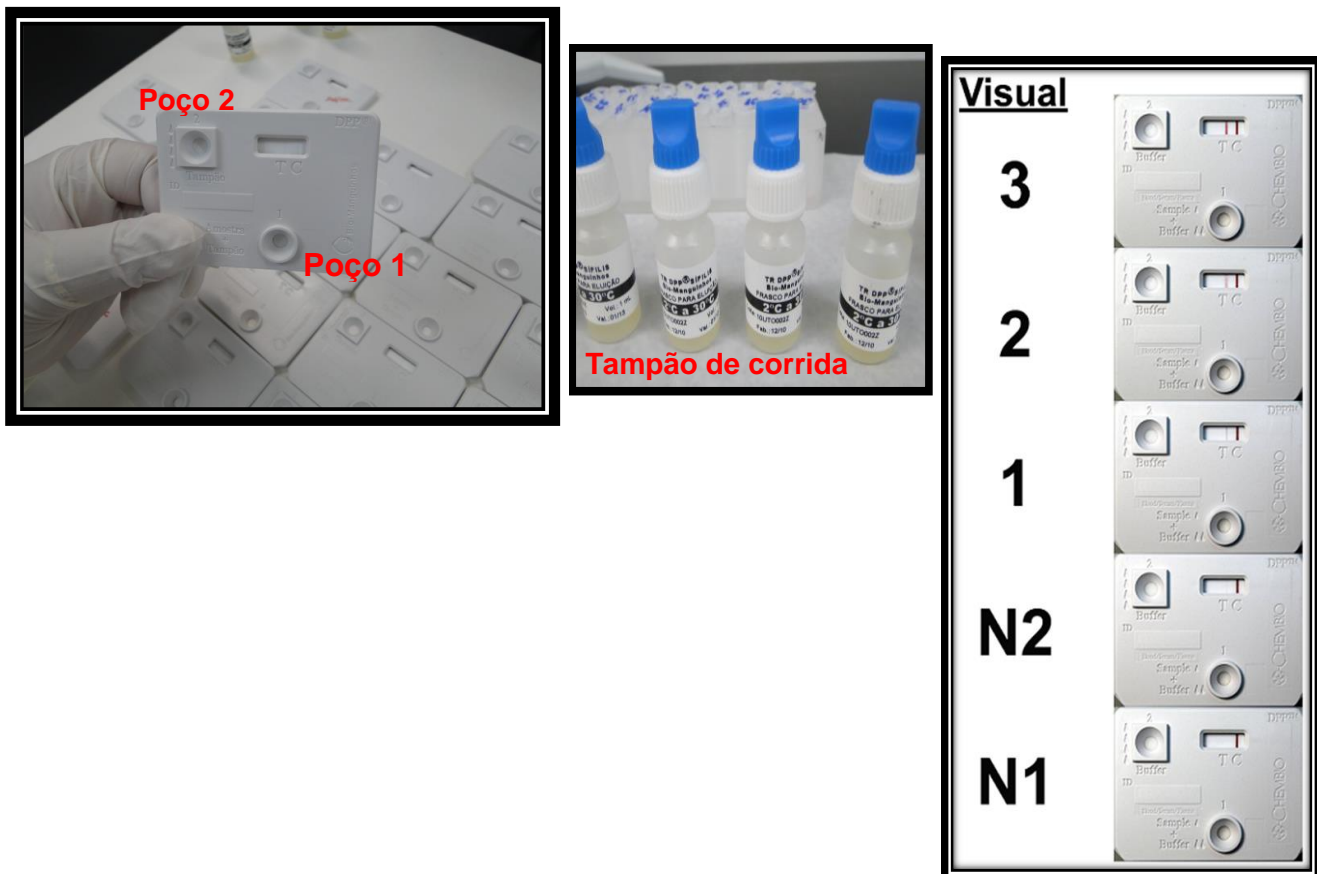
1:4096 = não reagente.

Na etapa de titulação, 5 μ L de cada diluição, por suporte, foi adicionada ao poço 1, seguida de duas gotas do tampão de corrida (etapa de distribuição da amostra por capilaridade, ligação do antígeno ao anticorpo). Após aguardar 5 minutos, adicionou-se 4 gotas do tampão de corrida no poço 2 (etapa de revelação), onde o conjugado de proteína A, mais partículas de ouro coloidal ligaram-se então aos anticorpos específicos para *Leishmania*. A leitura dos suportes foi efetuada 10 minutos após a adição do tampão de corrida no poço 2 (Figura 9).

Os resultados reagentes são definidos pela intensidade de cor visualizada no suporte, na área da linha teste, tendo sido utilizado um escore de 3, 2 e 1. Amostras não reagentes não apresentam nenhuma coloração na região da linha teste, apenas na região da linha controle, onde o escore da intensidade de cor da linha visualizada deve ser ≥ 2 (Figura 9).

Neste caso, por se tratar de amostras positivas, formou-se uma linha roxa/rosa, na área teste (relativa a positividade da amostra) e outra linha roxa/rosa na área controle, que comprova a funcionalidade do suporte.

Figura 9 - Análise de amostras pelo teste imunocromatográfico e tabela para leitura



3.1.2 Etapa de avaliação da estabilidade de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método imunocromatográfico

Condicionou-se a avaliação das amostras do estudo de estabilidade a diluição 1:16, por ser o título preconizado como obrigatoriamente reagente para a amostra padrão controle positiva, utilizada na avaliação do kit diagnóstico TR DPP® - LCV – Bio-Manguinhos.

As amostras estocadas em diferentes condições, foram testadas semanalmente na diluição 1:16 (5 µL da amostra reativa para LVC + 75 µL de soro canino não reagente), e os resultados registrados na planilha de avaliação semanal de amostras, objetivando avaliar uma possível queda na positividade destas.

3.1.3 Titulação semi-quantitativa pelo método do EIE Bio-Manguinhos:

Não foi possível realizar uma análise semanal do título de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método do ensaio imunoenzimático, como também não foi efetuada a titulação das amostras coincidentemente com o início do armazenamento do material. Deste modo, foi realizada uma avaliação semi-quantitativa inicial, ou seja, 10 alíquotas homólogas àquelas utilizadas nas análises pelo TR DPP® LVC (amostras controle estocadas a -20°C) foram analisadas em um mesmo ensaio. Contudo, estas apresentavam distintos períodos de estocagem na data da análise. As amostras G, H, I, J e K foram analisadas na 7ª semana pós-início da estocagem, os espécimes L, M, N, O, P, na 5ª semana e a amostra P, na 2ª semana, sendo após esse período novamente avaliadas a pós vários ciclos de congelamento/descongelamento e várias semanas de armazenamento a 5°C e 37°C.

As amostras foram diluídas: 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096 e 1:8192 (Figura 11) (amostras reagentes até 1:8192, as diluições foram estendidas até 1:13653) em diluente de amostra. Os controles, positivo e negativo, foram diluídos 1:100, também em diluente de amostra, além dos poços apenas com a adição de diluente (controle do conjugado), para avaliação de reação inespecífica. As diluições foram então distribuídas na placa do EIE, sendo após isso incubados à 37°C durante 30 minutos (Estufa Nova Ética). O passo seguinte foi executar, 6 ciclos de lavagem das placas (tampão de lavagem), em lavadora de microplacas (Tecan hydro Flex). Acrescentou-se então 100 µL de uma solução de diluente de amostra

mais conjugado + anticorpo anti-IgG canino conjugado à peroxidase em cada poço, sendo realizada nova incubação por mais 30 minutos a 37°C.

Um novo ciclo de 6 lavagens das placas foi realizado. Preparou-se uma solução reagente, com diluente de substrato, cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB) e substrato (peróxido de hidrogênio - H₂O₂). Colocou-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa. Aguardou-se 30 minutos à temperatura ambiente. Acrescentou-se, após essa etapa, 50 µL de “solução de parada” (ácido sulfúrico), a cada poço da placa, interrompendo-se a reação. Realizou-se a leitura em leitora de microplacas (Tecan Sunrise - RCHISTO) utilizando-se um filtro de 450 nm (Figura 10).

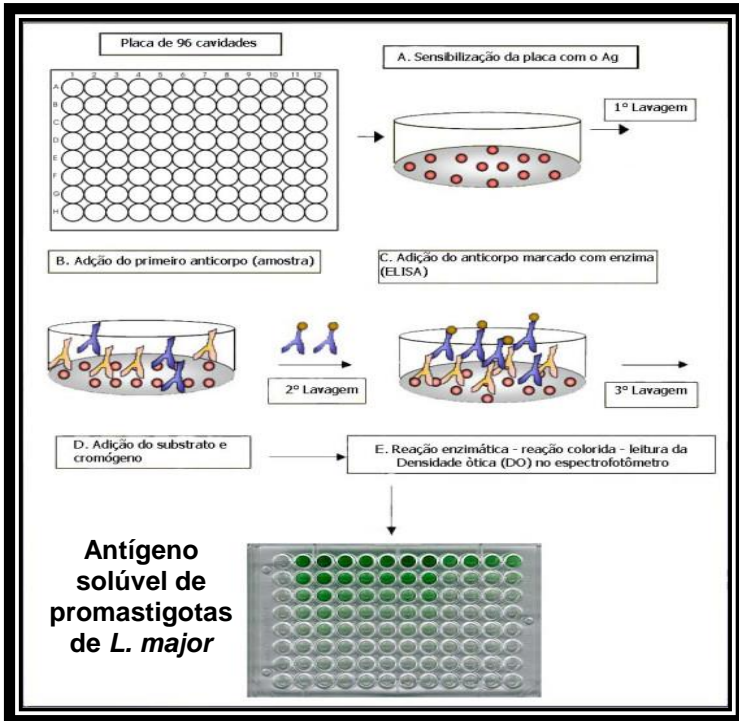
Os resultados encontrados foram avaliados segundo os seguintes parâmetros:

Controle Positivo: D.O. $\geq 0,500$;

Controle Negativo: D.O. 0,050 - 0,120;

Sem soro: não poderá ser superior a 1,5 x D.O. obtida no controle negativo.

Figura 10 - EIE/ELISA Teste confirmatório



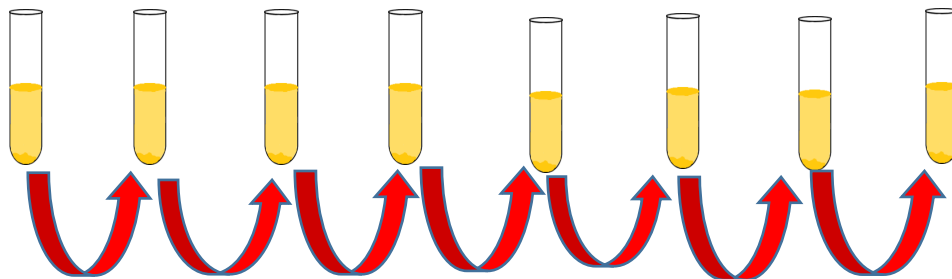
Fonte: Lacore

<http://imunologiahematologia.wordpress.com/2010/01/26/elisa>

Figura 11- Titulação amostras caninas para EIE

Titulação das amostras de soro de 10 cães com LVC

1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096 1:8192



3.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica onde partículas ou células em suspensão passam uma a uma por um feixe de luz (em geral um ou mais lasers). Estando estas partículas marcadas com um anticorpo conjugado a um fluorófilo, esse, ao ser excitado pela luz, emite fótons que são captados por detectores e transformados em sinal eletrônico. Com auxílio de softwares específicos podem ser determinados tanto a positividade de um dado anticorpo de forma quantitativa em uma população celular (porcentagem) ou até em uma única célula ou partícula (intensidade de fluorescência).

A padronização de uma técnica de citometria de fluxo para detecção de anticorpos específicos para leishmaniose visceral canina, com o objetivo de futuramente ser inserida na rotina do controle de qualidade de amostras do Lacore, foi realizada utilizando-se microesferas carboxiladas, não magnéticas de 6.06 µm (Bangs Laboratories Inc.), acopladas ao antígeno recombinante rK28 (Chembio Diagnostic Systems Inc.) e anticorpos anti-IgG canino conjugados com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC – SIGMA/ALDRICH – *whole molecule*)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – LATED/VDTEC (Bio-Manguinhos).

A primeira etapa da padronização consistiu na adsorção do antígeno recombinante, em diferentes concentrações, às microesferas carboxiladas (etapa do acoplamento antigênico).

Posteriormente seguiu-se uma etapa de titulação, em que foram utilizadas diferentes diluições de conjugados, soros e concentrações de antígenos acoplados a microesfera, partindo-se da análise de soros previamente avaliados pela técnica imunocromatográfica (TR DPP® LVC – Bio-Manguinhos) com titulações alta, média e baixa. Nesta etapa foi definida qual seria a melhor concentração de microesferas acopladas ao antígeno e a diluição mais adequada do conjugado e da amostra.

3.2.1 Etapa de acoplamento (adsorção) do antígeno rK28 às microesferas (*beads*)

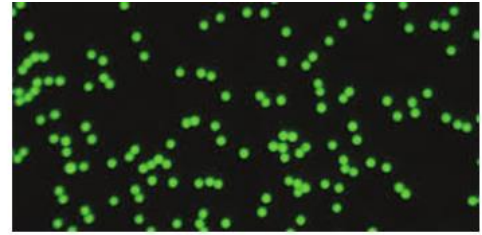
Foram pipetados 25 μL (12,5 mg/ microesferas carboxiladas não magnéticas) (PCN06N S/5,5% Divinylbenzene/5% MAA) em 4 tubos de microcentrífuga, cônicos, tipo *ependorf* de 1,5 – 2,0 mL, sendo estes submetidos então a dois processos de lavagem com 400 μL de tampão de acoplamento (T.A) (PolyLink Coupling Buffer 50mM, pH 5,2; 0.05% Proclin® 300) intercalados com uma centrifugação a 1000G por 10 minutos (Centrífuga Mini Spin Plus), ressuspensos em 170 μL T.A. No momento do uso, foi preparada uma solução com 100 μL tampão de acoplamento com 20 mg de EDAC - PolyLink EDAC (*carbodiimide*) e 20 μL desta solução foram adicionados por *ependorf* contendo as microesferas. Os tubos foram então incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Esta etapa visou a ativação dos grupos carboxílicos das microesferas pela carboxiimida (EDAC), preparando-os para o posterior acoplamento às aminas primárias presentes no antígeno empregado.

Para o preparo das soluções do antígeno rK28, foram pipetados os volumes de 41 μL , 81 μL e 122 μL do antígeno recombinante em 3 *ependorfs*, onde foram adicionados e completado o volume final de 550 μL do tampão de acoplamento, originando às concentrações de 100, 200 e 300 μg de antígeno, respectivamente. As preparações foram então armazenadas de 2°C a 8 °C, durante a realização do ensaio. Após o período de incubação dos *ependorfs* contendo a solução de EDAC, mais microesferas, estas foram centrifugadas (10min./1000G), sendo então retirado o sobrenadante. Acrescentou-se, 500 μL soluções de antígenos rK28 previamente preparadas, segundo às concentrações definidas, aos três tubos de *ependorf* contendo as microesferas, sendo um quarto tubo mantido sem a adição do referido antígeno (rK28). Os tubos foram então incubados, 60 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Após esse tempo foi realizada nova centrifugação (10min./1000G) para retirada do sobrenadante. Duas novas etapas de adição de 400 μL de tampão de lavagem/estocagem, intercaladas com centrifugações (10min./1000G) foram realizadas. Após a retirada do último sobrenadante, foi adicionado 400 μL do tampão de lavagem/estocagem. Em todas as etapas, após a adição de algum componente e anteriormente à centrifugação, as microesferas sempre eram homogeneizadas no *vortex* (Figura 12).

Figura 12 - Etapas adsorção antigênica

Citometria de Fluxo

Etapa adsorção antigênica



Adição EDAC (carbodiimida) - Exposição grupos carboxila (15 min. $\pm 25^{\circ}\text{C}$ sob agitação)

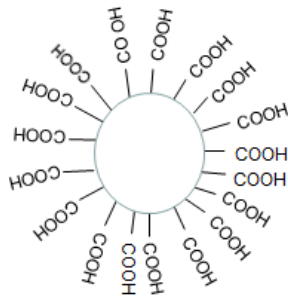
Microesfera carboxilada (*bead*) não magnética



Centrifugação/Lavagem em tampão de acoplamento (T.A)



Adição Ag rK28 (NH₂ - amina primária) em diferentes concentrações (60 min. sob Agitação ($\pm 25^{\circ}\text{C}$))



Duas lavagens em tampão lavagem/estocagem



Armazenamento 2 a 8°C
 Microesferas + Ag
 Microesferas sem Ag

Para avaliar a recuperação das microesferas, após os vários processos de centrifugação e lavagem, a que foram sujeitas, utilizou-se o equipamento TC20 Bio-RAD para contagem do conteúdo final (Tabela 5). Foi necessária a realização de dois acoplamentos antigênicos na concentração 300 µg. As microesferas acopladas ao antígeno rK28 foram então estocadas de 2° a 8°C. Este antígeno, rK28, é um gene recombinante sintético da região da cinesina, que consiste em várias sequências repetidas tandem dos genes da cinesina do heat shock protein beta 1 - hspb1 da *Leishmania (Leishmania) donovani*.

Tabela 5: Contagem microesferas no equipamento TC20 Bio-RAD

Concentração antigênica rK28	Contagem microesferas/mL	
100 µg	6,9 x 10 ⁶	
200 µg	8,28 x 10 ⁶	
	1º acoplamento	2º acoplamento
300 µg	7,35 x 10 ⁶	2,06 x 10 ⁷
Tubo sem proteína	1,05 x 10 ⁷	

3.2.2 Etapa de titulação e definição das concentrações de microesferas acopladas e diluições de soros caninos para LV e conjugado

Com as microesferas já adsorvidas ao antígeno, foram pipetados os referidos volumes 4,3 µL, 3,6 µL e 4,1 µL, das respectivas concentrações antigênicas, 100, 200 e 300 µg em 9 tubos, por concentração de antígeno para análise, em *eppendorfs* cônicos de 1,5 – 2.0 mL (Tabela 6). Como foram analisadas 3 amostras sorológicas por concentração antigênica, avaliou-se um total de 27 tubos, sempre homogeneizados no *vortex*, após adição das amostras e pré centrifugação. Adicionou-se 500 µL tampão de lavagem (Tampão de lavagem PBS 1X + 1% BSA + 0,02% de Tween 20 + 10% de ázida sódica) produzido “*in house*” pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – LATED. Depois de homogeneizados, os *eppendorfs* foram centrifugados a 1200G durante 5 minutos (Centrifuga *Eppendorf* 5415 R).

Retirou-se então o sobrenadante adicionando-se 50 μ L do tampão de lavagem (T.L.) + 50 μ L dos soros nas diluições 1:200, 1:400 e 1:800 (diluição final: 1:400, 1:800 e 1:1600, respectivamente). As amostras foram incubadas 15 minutos a 37°C, sob agitação de 600 rpm (Thermo Shaker PST – 60 HL Plus). Acrescentou-se 400 μ L de T.L., homogeneizou-se no *vortex*. Centrifugou-se as amostras a 1200G por 5 minutos, retirando-se logo após o sobrenadante. Após adicionar 500 μ L de T.L., foi efetuada nova centrifugação, sendo retirado o sobrenadante. Foram então acrescentados 100 μ L do conjugado nas diluições 1:100, 1:200 e 1:400 (anticorpo anti-IgG canino FITC/SIGMA ALDRICH) (Tabela 6). Os tubos foram novamente incubados a 37°C durante 15 minutos, sob a agitação de 600 rpm. Pós-incubação, foram acrescentados 400 μ L de T.L, sendo os frascos homogeneizados no *vortex* e centrifugados a 1200G por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e as amostras ressuspensas com 200 μ L de Isogen (*sheat fluid*), sendo transferidas para tubos próprios para a realização da leitura no citômetro (Figura 13)

Figura 13 Etapa titulação microesferas adsorvidas em diferentes concentrações

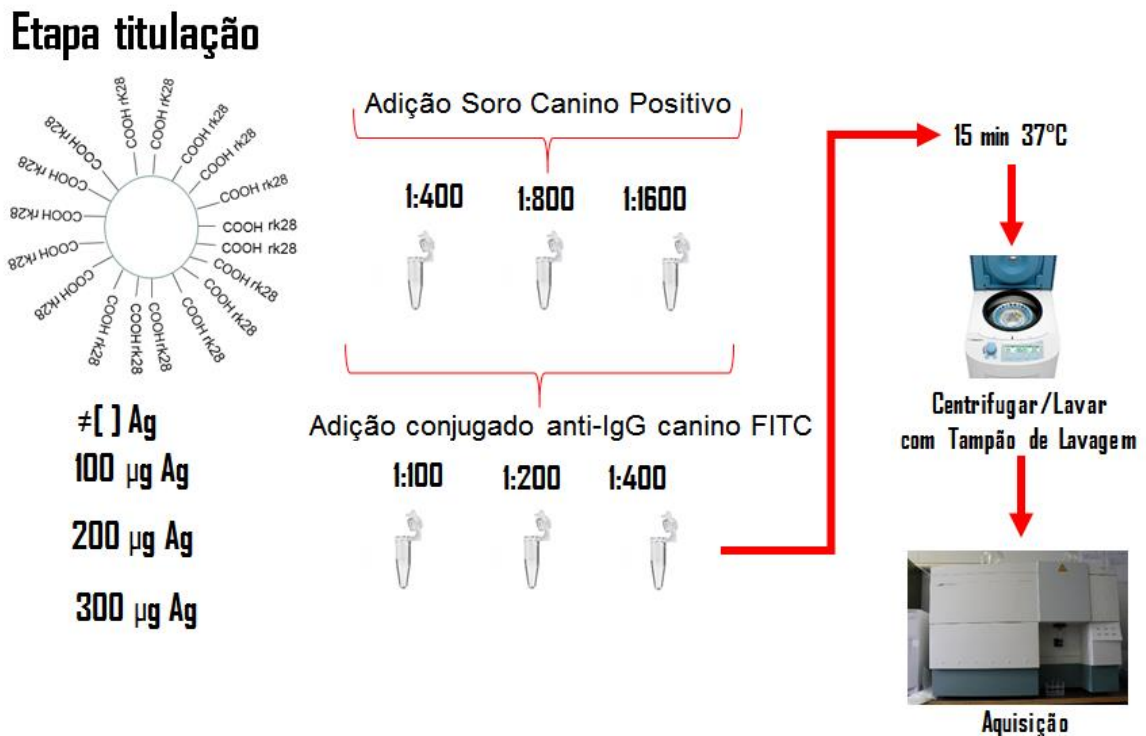


Tabela 6: Titulação antígeno rK28, soro canino positivo e negativo LV e conjugado (antig-IgG canino + FITC)

Microesfera + conc. Ag rK28	Soros dil. final	Conjugado
100 µg	1:400	1:100
		1:200
		1:400
200 µg	1:800	1:100
		1:200
		1:400
300 µg	1:1600	1:100
		1:200
		1:400

Posteriormente à definição da concentração de 300 µg do antígeno rK28 adsorvida a microesfera, uma segunda titulação foi realizada dessa vez utilizando-se diluições de soro de 1:800 e 1:1600 e de conjugado nas diluições de 1:200 e 1:400 para ajustar a melhor diluição soro/conjugado, que foram testadas em 4 amostras distintas (Tabela 7):

Tabela 7: Titulação para melhor adequar o binômio soro canino para LV e conjugado (anti-IgG canino+ FITC)

Microesfera + Ag rK28	Soros	Conjugado
300 µg	1:800	1:200
		1:400
	1:1600	1:200
		1:400

A diluição do soro a 1:800 e do conjugado 1:400 foram definidas como as mais adequadas.

3.2.3 Ensaio com concentração antígeno rK28, diluição do soro canino para LV e conjugado padronizados

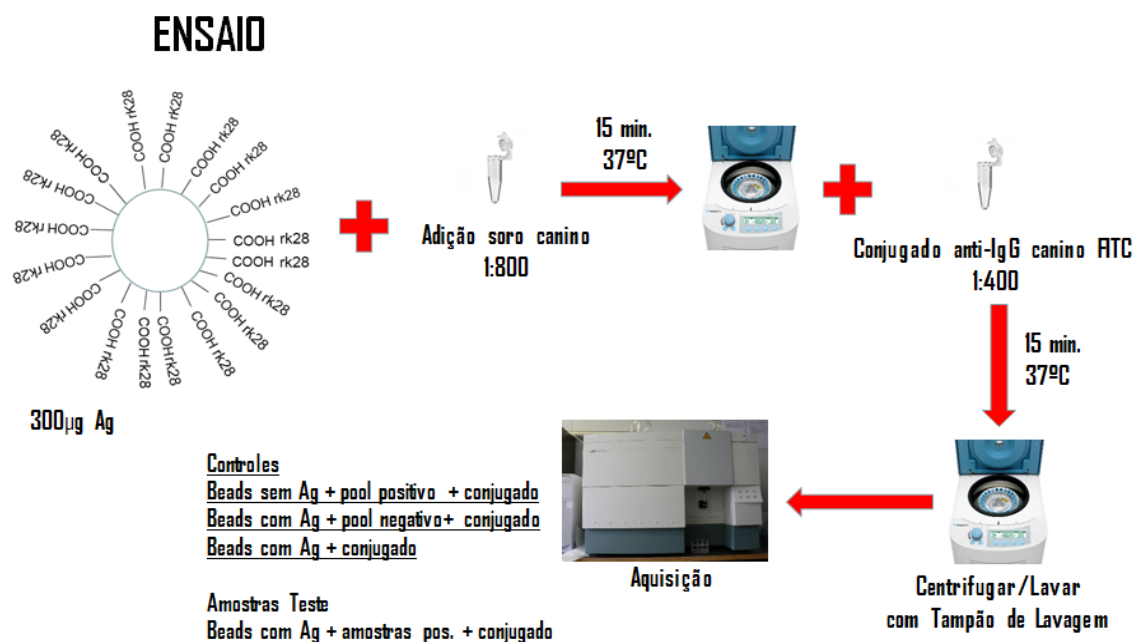
Definida a concentração do antígeno adsorvido, a diluição do soro e a diluição do conjugado, puderam ser iniciados os ensaios com as amostras armazenadas em diferentes temperaturas.

Os ensaios foram realizados com as amostras às temperaturas de -20°C (± 2), 5°C (± 3) e 37°C (± 2), utilizando-se amostras dos Grupos 1 e 2. Entretanto, as amostras A, B e F não puderam ser avaliadas a 37°C (± 2) por não possuírem alíquotas estocadas a essa temperatura.

A cada ensaio realizado, um controle positivo (microesfera não acoplada + pool de soros positivos + conjugado), um controle negativo (microesfera acoplada + pool de soros negativos + conjugado) e um controle sem soro (microesfera acoplada + conjugado) foram utilizados.

Um volume de $4,1\ \mu\text{L}$ de microesferas acopladas na concentração de $300\ \mu\text{g}$ de antígenos foram pipetados em tubos cônicos tipo *ependorf* de $1,5 - 2,0\ \text{mL}$, tanto para os controles, como para amostras, exceto para o pool de controle positivo, onde as microesferas não continham o antígeno recombinante em que pipetou-se o volume de $2,9\ \mu\text{L}$. Os ensaios foram realizados como descrito na etapa da titulação, item 3.2.2. (Figura 14).

Figura 14 - Ensaio



3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada no programa GraphPad Prism 5. Para a comparação de amostras pareadas testadas em diferentes períodos de tempo e/ou diferentes temperaturas utilizamos o teste não paramétrico de Wilcoxon. Nas análises de citometria de fluxo que envolveram a comparação entre diferentes grupos de soros e controles internos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. As análises de correlação foram realizadas utilizando-se o teste de correlação de Spearman. Foi adotado um intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significantes quando encontrados valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados que compõem a corrente dissertação podem ser separados em duas etapas. Primeiro, relatamos os resultados obtidos com a titulação de anticorpos e posterior análise de amostras pelo teste rápido e as análises por EIE. As amostras sofreram 24 ou 12 ciclos de descongelamento. Na segunda parte dos resultados descrevemos um ensaio utilizando a citometria de fluxo, desenvolvido para a avaliação da positividade de amostras caninas de soro para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania*, específicos para o antígeno rK28.

4.1 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANA EM AMOSTRAS CANINAS DE SORO E PLASMA PELO MÉTODO TR DPP® LVC

O primeiro passo do estudo foi realizar a titulação das amostras de soro e plasma através do método TR DPP® LVC-Bio Manguinhos (Figura 15). A avaliação do título foi necessária para verificar possíveis diferenças intrínsecas entre as amostras obtidas. De fato, ao analisá-las individualmente observou-se uma larga variação entre os títulos obtidos, tendo sido observado um título mínimo de 1:4 (amostras E e J) e um valor máximo de 1:4096 (amostra B e N). As amostras homólogas de soro e plasma na maioria dos casos obtiveram a mesma titulação, com exceção das amostras H, N e P. A amostra N apresentou uma titulação mais alta no plasma que no soro, diferentemente de H e P, que apresentaram maior titulação no soro. Quanto as amostras A, G e L não foi possível obter espécime de plasma. Quando analisamos comparativamente a distribuição dos títulos mensurados nas amostras de soro e de plasma, pôde-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa, sendo as medianas de cada grupo similares, bem como os valores de percentil e mín./máx (Figura 16).

Figura 15 - Titulação de anticorpos anti-leishmania em amostras caninas de soro e plasma pelo TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos

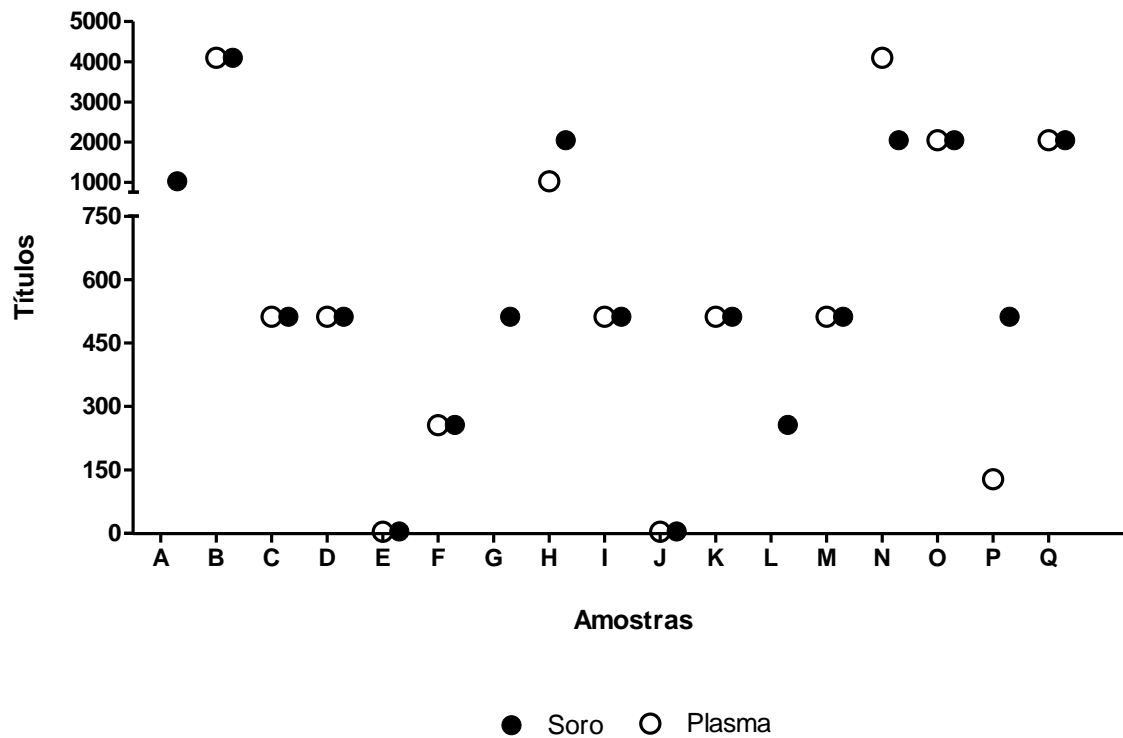
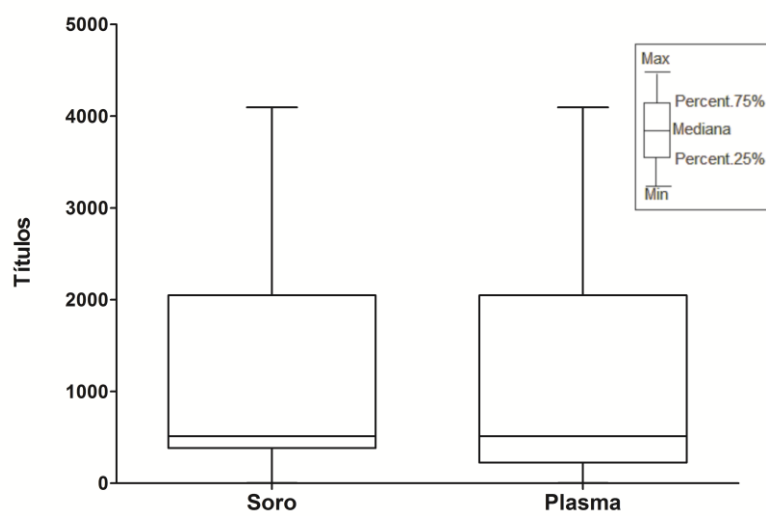


Figura 16: Comparação da titulação de anticorpos anti-leishmania entre amostras de soro e plasma caninos pelo método TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos. Gráfico de *box whiskers*



4.2 ENSAIO DE ESTABILIDADE

A fim de avaliar a estabilidade das amostras de soro foram realizados ciclos de congelamento e descongelamento (-80°C e -20°C), bem como avaliação do período de armazenamento de amostras à temperatura de refrigeração de 5°C e a 37°C . Uma possível queda na titulação das amostras reutilizáveis foi desta forma avaliada em distintos ciclos de congelamento e descongelamento e após diferentes períodos de estocagem.

Para os ensaios de estabilidade foi inicialmente realizado o método imunocromatográfico e posteriormente foram realizados testes de ELISA (EIE) para amostras previamente selecionadas.

4.2.1 Avaliação da estabilidade de amostras após diferentes ciclos de descongelamento pelo método imunocromatográfico – TR DPP® LVC

O estudo da estabilidade das amostras congeladas foi acompanhado pelo descongelamento de alíquotas homólogas controle, que foram descongeladas uma única vez.

Conforme demonstrado na Figura 17, todas as amostras de soro que apresentavam titulação de anticorpos mediana ($\geq 1:256$ e $< 1:1024$) ou alta ($\geq 1:1024$) antes do congelamento (amostras A a Q), ainda apresentavam resultado reagente até o último ciclo de descongelamento avaliado (24 ciclos e 12 ciclos) quando acondicionadas a -80°C (± 5). Entretanto, as duas amostras de baixa titulação testadas ($< 1:16$), apresentaram resultados não reagentes no primeiro (amostra J) e no sexto ciclo de descongelamento (amostra E).

Observamos os mesmos resultados obtidos com as amostras acondicionadas -20°C (± 2), onde, com exceção das amostras de baixa titulação (E e J) todas as demais amostras de soro ainda apresentavam resultado reagente até o 24º e 12º ciclos de congelamento e descongelamento (Figura 18).

Os mesmos resultados foram observados pela avaliação das alíquotas controle descongeladas uma única vez e estocadas pelo mesmo período de tempo a -80°C e a -20°C (dados não mostrados). Desta forma foi possível observar claramente que, nas circunstâncias de estocagem a -80°C (± 5) e a -20°C (± 2) os

espécimes reutilizáveis e controle, apresentaram o mesmo desempenho no perfil de reatividade quando avaliados pelo TR DPP® LVC, indicando que as duas condições de armazenamento são, em princípio, bastante similares.

Os ensaios imunocromatográficos realizados com amostras a 5°C não apresentaram resultados divergentes quando comparados às amostras armazenadas a -80°C e -20°C. Com relação aos espécimes armazenados a 37°C, além das amostras E e J que já apresentavam baixos títulos, sendo por isso não reagentes, a amostra C negativou na 8ª análise, ou seja, na 21ª semana de armazenamento.

Figura 17: Ensaio de estabilidade de anticorpos anti-*Leishmania* das amostras de soro armazenadas a -80°C seguido de 1, 6, 12 e 24 ciclos de congelamento e descongelamento. As análises foram realizadas pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC - Bio Manguinhos

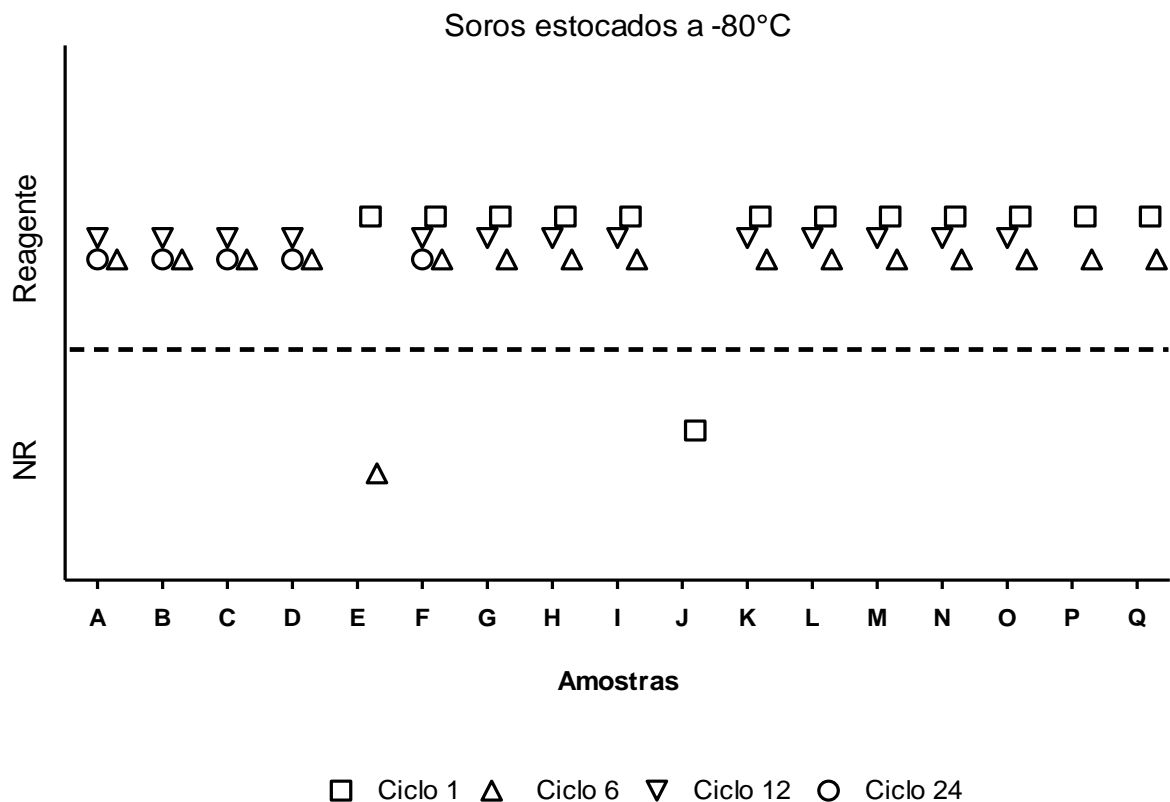
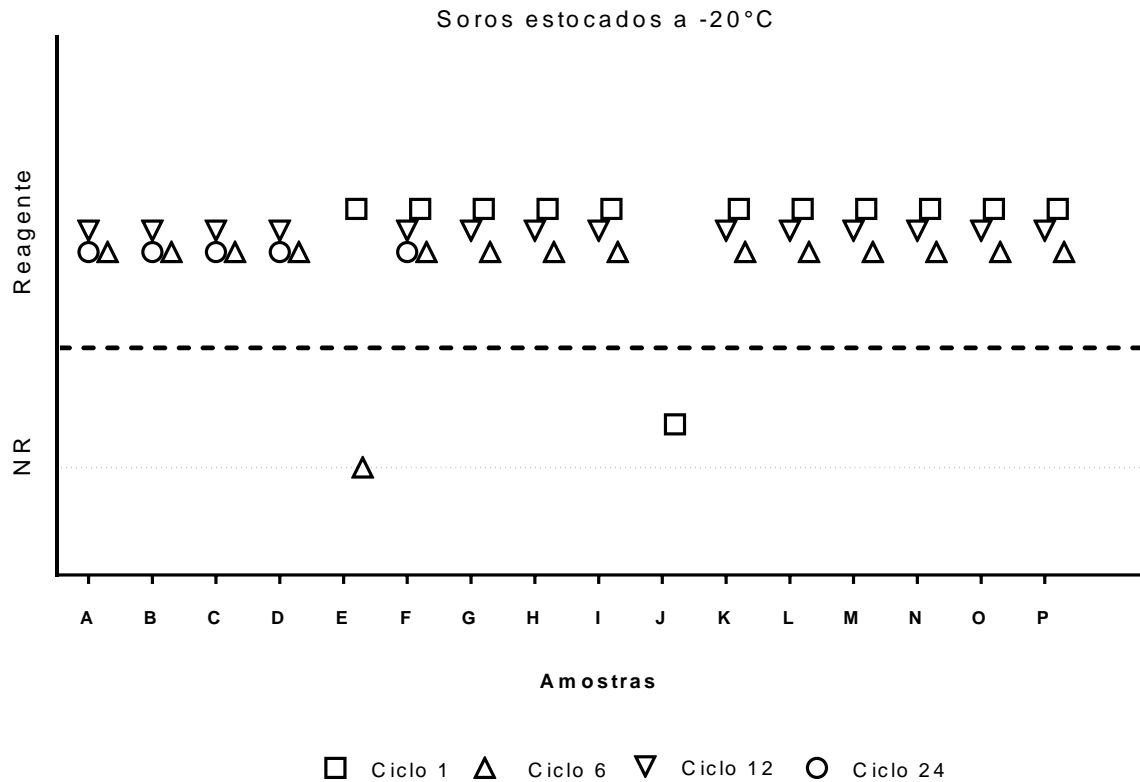


Figura 18: Ensaio de estabilidade de anticorpos anti-*Leishmania* das amostras de soro armazenadas a -20°C seguido de 1, 6, 12 e 24 ciclos de congelamento e descongelamento. As análises foram realizadas pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC - Bio-Manguinhos



4.2.2 Avaliação da estabilidade de amostras estocadas a diferentes temperaturas pelo método de ensaio imunoenzimático - EIE LVC.

As 10 alíquotas analisadas pela técnica do EIE, (G, H, I, J, K, L, M, N, O e P) foram tituladas inicialmente, a partir de alíquotas controle (descongelamento único, armazenadas a -20°C) e posteriormente ensaiadas, utilizando-se amostras “reutilizáveis”, ou seja, espécimes (- 80°C e - 20°C) que foram submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento, ou estocadas por diferentes períodos às temperaturas de 5°C e 37°C (Tabela 8)

Comparando-se os títulos obtidos nas amostras controles estocadas a -20°C com as que foram descongeladas após 16, 17 ou 18 ciclos de congelamento/descongelamento podemos observar que os títulos se mantiveram (teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas $p=0,1736$), demonstrando que os

anticorpos permanecem estáveis nesta temperatura mesmo após terem sido descongelados várias vezes, exceto as amostras L, N e P que apesar de terem seus títulos alterados ainda permaneciam com alta positividade.

Considerando-se as temperaturas, nas amostras estocadas pelo mesmo período de tempo a 5°C ou 37°C observamos uma nítida queda nos títulos das amostras estocadas a 37°C (teste não paramétrico de Wilcoxon $p=0,0156$).

Tabela 8: Titulação de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro canino pelo método EIE

Amostras	Primeira Titulação -20°C	Título -80°C	Título -20°C	Título 5°C	Título 37°C
	Após 7 semanas	Após 19 ciclos	Após 20 ciclos	Após 24 semanas	Após 24 semanas
G	1: 4096	1: 4096	1:4096	1:2048	1:128
H	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096	1:2048
I	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096	1:4096
J	1:128	1:64	1:128	1:64	Não reagente
K	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:2048
	Após 5 semanas	Após 17 ciclos	Após 18 ciclos	Após 22 semanas	Após 22 semanas
L	1:2048	1:1024	1:1024	1:512	1:256
M	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096	1:1024
N	1:4096	1:4096	1:2048	1:512	1:512
O	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096	1:4096
	Após 2 semanas	Após 16 ciclos	Após 17 ciclos	Após 18 semanas	Após 18 semanas
P	1:4096	1:4096	1:2048	1:1024	Não reagente

Os retângulos representam amostras estocadas a -20°C em que observou-se queda da titulação após 17 e 18 ciclos de congelamento e descongelamento. As elipses circundam amostras estocadas pelo mesmo período de tempo em que observou-se queda do títulos nas amostras estocadas a 37°C quando comparadas as mesmas amostras estocadas a 5°C.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Após obtermos os resultados com o método convencional para o diagnóstico de LVC, verificamos a possibilidade de utilizarmos a técnica de citometria de fluxo para a mesma finalidade. Conforme descrito anteriormente, microesferas foram acopladas com antígeno rK28 (mesmo antígeno empregado no TR DPP® LVC) e incubadas com as amostras de soro armazenadas a -20°C, 5°C e 37°C. No caso das amostras estocadas a -20°C, estas foram descongeladas uma única vez, no dia da análise.

As 17 amostras previamente tituladas pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC conforme demonstrado na tabela 4 (material e métodos) foram avaliadas de acordo com o grau de reatividade dos soros como de baixa (<1:16; Soros E e J), média (\geq 1:256 e <1:1024; Soros C, D, F, G, I, K, L, M e P) ou alta titulação (\geq 1:1024; Soros A, B, H, N, O e Q). Os resultados obtidos com essa metodologia estão ilustrados nas figuras 19 e 20. Com essa técnica foi possível determinar a positividade ou negatividade da amostra e também distinguir e quantificar através da intensidade de fluorescência soros altamente reativos de medianos ou fracamente reativos (Figura 19). Quanto a estabilidade, podemos observar que a temperatura de armazenamento influenciou na intensidade de fluorescência de forma significativa e que o armazenamento a -20°C obteve médias mais altas quando comparado as outras temperaturas (Figura 20).

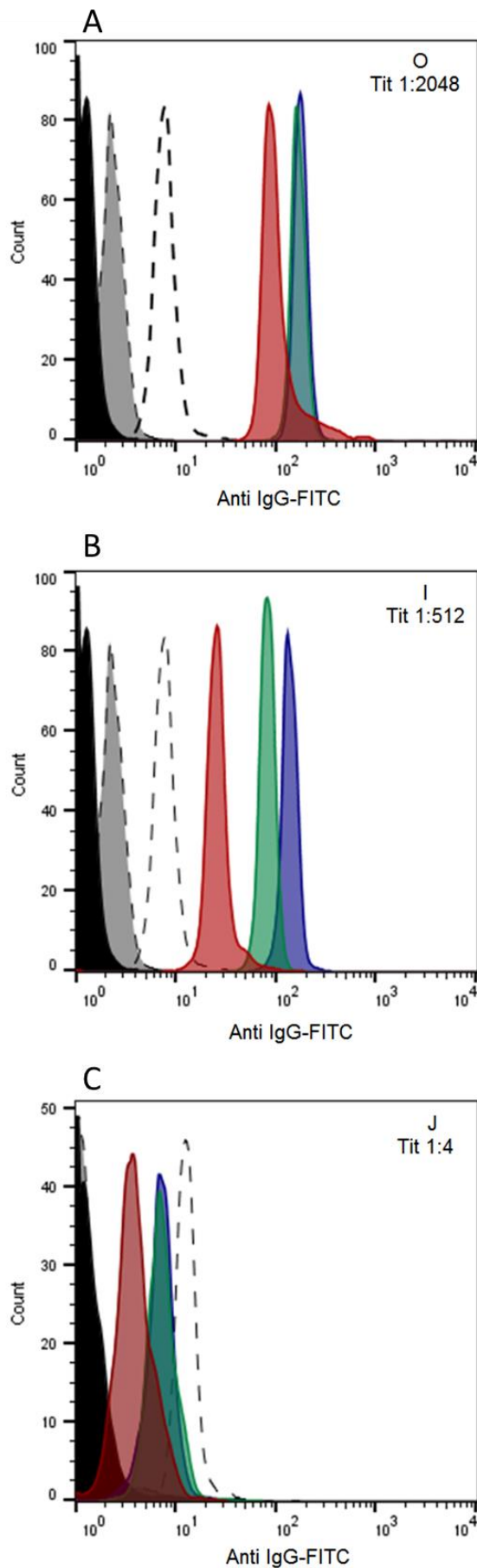


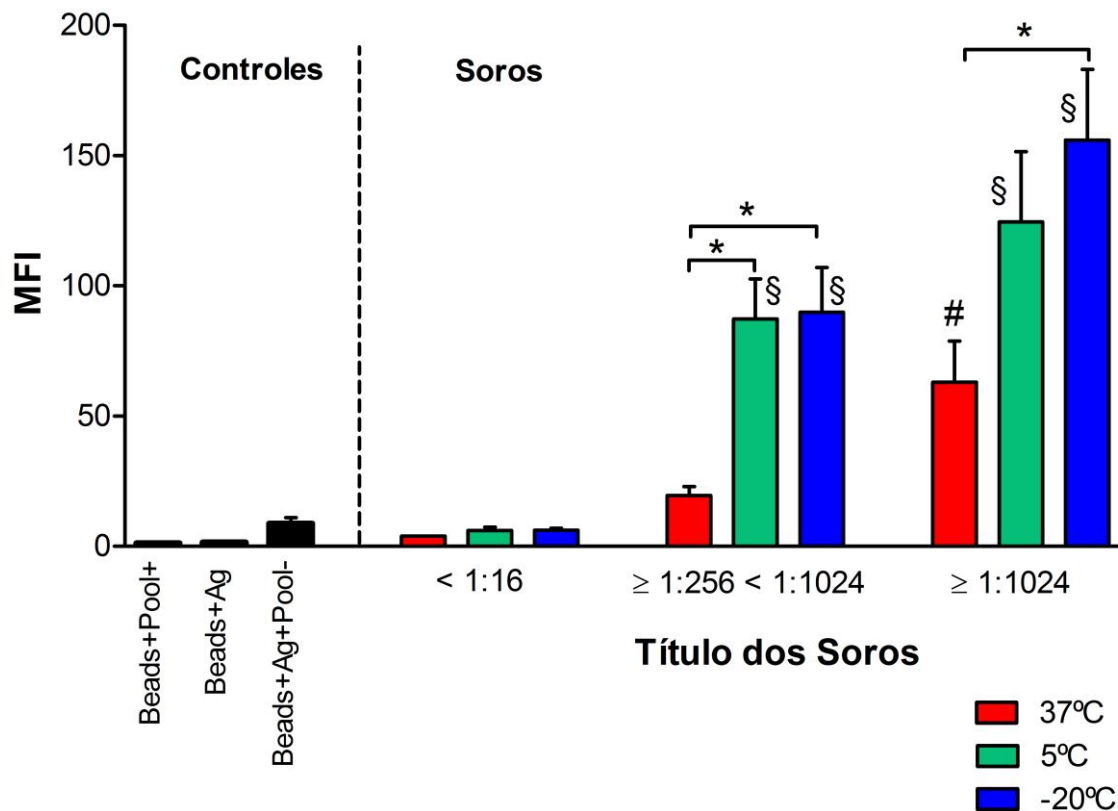
Figura 19: Histograma com intensidade de fluorescência a diferentes temperaturas.

Histogramas demonstrativos das intensidades de fluorescência obtidas após a incubação das microesferas (*beads*) acopladas ao antígeno rK28 com soros de alto (A), médio (B) e baixo (C) títulos de anticorpos específicos anti-rK28. Em azul estão representas as marcações obtidas com soro estocado a -20°C, em verde o mesmo soro estocado a 5°C e em vermelho a amostra estocada a 37°C. Como controles internos de cada marcação foram utilizadas microesferas acopladas ao antígeno sem adição de soro (preto), microesferas acopladas ao antígeno e incubadas com um pool de soros negativos (linhas tracejadas) e microesferas não acopladas incubadas com um pool de soros positivos (cinza).

Figura 20: Intensidade média de fluorescência (MFI) para anticorpos IgG específicos para o antígeno rK28, obtidas com soros que apresentavam baixa ($<1:16$; $n=2$), média ($\geq 1:256$ e $<1:1024$; $n=9$) ou alta ($\geq 1:1024$; $n=6$) titulação de anticorpos específicos para o antígeno rK28 pelo método TR DPP® LVC.

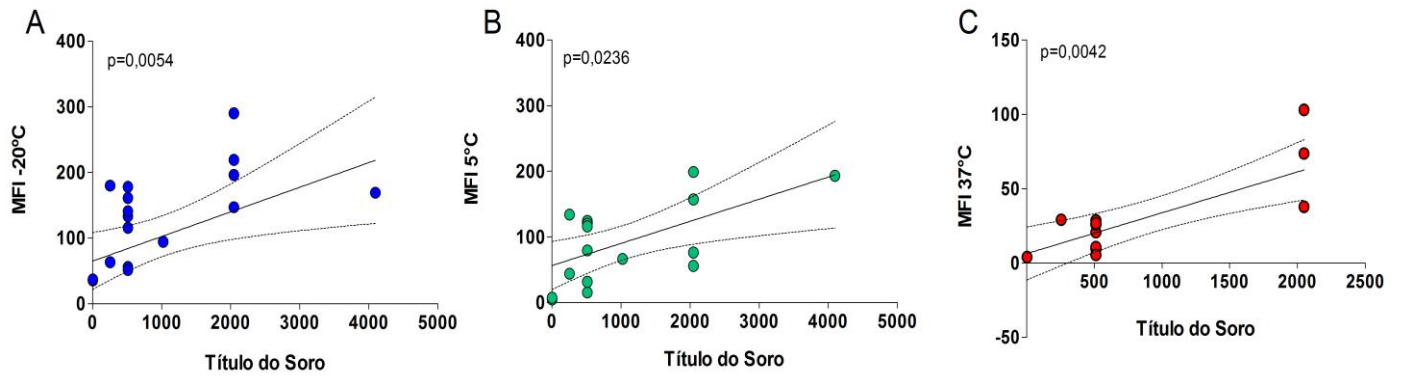
diferente dos soros de titulação média estocados a 37°C e § diferente do grupo controle com pool de soros negativos - Teste de Mann Whitney $p \leq 0,05$

* diferenças entre os mesmos soros estocados a diferentes temperaturas - análise de amostras pareadas pelo teste Wilcoxon $p \leq 0,05$



Por fim, avaliamos a possibilidade de correlação entre os títulos dos soros e a intensidade de fluorescência média, com o objetivo de aferirmos a capacidade do ensaio em aferir e determinar título de anticorpos. Independente do tempo de armazenamento, a correlação em todas as três condições foi significativa (Figura 21).

Figura 21: Correlação entre o título dos soros obtidos pelo método imunocromatográfico TR DPP® LVC e as intensidades médias de fluorescência (MFI) obtidas com os mesmos soros, estocados em diferentes temperaturas.



Teste de correlação por postos de Spearman

5. DISCUSSÃO

Armazenamentos por longos períodos de tempo e a conduta de congelar e descongelar amostras de soro deve advir do conhecimento do impacto desses procedimentos para cada classe de anticorpo e tipo de ensaio utilizado, para garantir que os resultados obtidos em estudos prospectivos sejam fidedignos (KRONENBERG et al, 1994).

Estudos realizados com imunoglobulinas IgG e IgM em soros de pacientes com sífilis relata a preocupação com múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento impactando na detecção desses anticorpos. Existe a preocupação de que a desnaturação dessas imunoglobulinas possa ocorrer e afetar os resultados de um determinado ensaio por danificar fisicamente o anticorpo de interesse (CASTRO & HEATHER, 2013).

Atualmente, temos como protocolo de diagnóstico para LVC canina o teste TR DPP® LVC como triagem e o EIE LVC como teste confirmatório. A positividade para ambos os métodos de diagnóstico sorológicos é mandatória para a retirada dos animais da área endêmica e posterior eutanásia, como mecanismo de controle da doença e uma forma de se evitar o aparecimento de casos humanos. Desta forma, é imprescindível que esses imunobiológicos sofram um rigoroso controle de qualidade já que falhas ocorridas em resultados por essas metodologias podem levar a eliminação de animais não infectados (falso positivos), e, por outro lado, não detectar casos positivos (falso negativos) (FARIA & DE ANDRADE, 2012).

A avaliação semiquantitativa do título das amostras empregadas no controle de qualidade faz-se necessária por diferentes métodos, paralelamente à aquisição desses espécimes, bem como ao longo do seu período de estocagem, tendo em vista a escassez de trabalhos voltados para o comportamento de anticorpos em ensaios imunológicos, quando submetidos a distintas condições ambientais.

Nossos resultados demonstraram que amostras de soro congeladas nas temperaturas de -80°C e -20°C (Figuras 16 e 17) permanecem estáveis com relação a sua positividade pelo teste de triagem TR DPP® LVC mesmo após um número elevado de ciclos de congelamento e descongelamento (12 a 24 ciclos), exceto para soros com baixa titulação como no caso dos soros E e J. Nesse caso não podemos descartar o fato de que a leitura do teste foi realizada por observação visual da linha

positiva no suporte, onde ocorre a revelação da ligação Ag-Ac, o que torna a avaliação de certo modo subjetiva, principalmente na avaliação de uma amostra de baixa positividade. Por outro lado, a amostra J também foi avaliada pelo teste confirmatório EIE LVC em que também demonstrou baixa positividade além de resultado não reagente quando estocada a 37°C por 24 semanas (Tabela 8). Esses resultados nos advertem para a necessidade de utilizarmos soros com títulos altos nos ensaios de controle de qualidade e que os mesmos sejam reavaliados quanto a sua reatividade após um número pré-estabelecido de ciclos de congelamento e descongelamento a fim de minimizar possíveis quedas e negativas do mesmo, que poderiam afetar nos testes de controle e validação dos referidos kits diagnósticos. Além disso, nos alertam para a possibilidade do teste de triagem fornecer resultados falso negativo já que os animais E e J eram comprovadamente positivos para LVC visto que apresentaram cultura parasitológica positiva em diferentes tecidos, conforme demonstrado no anexo C.

Por outro lado, através da utilização do teste de Elisa (EIE LVC) a amostra J, que se mostrou não reativa no TR DPP® LVC já no primeiro ciclo de congelamento e descongelamento, ainda permanecia positiva pelo teste EIE LVC mesmo após 20 ciclos de congelamento e descongelamento, demonstrando a maior sensibilidade desta técnica. Este é um dos motivos pelos quais Coura-Vital et al, 2014, sugerem uma mudança no protocolo atual aconselhado pelo Ministério da Saúde, onde o teste EIE LVC seja adotado como método de triagem e o TR DPP® LVC como método confirmatório.

Com relação as temperaturas de armazenamento, ficou claro, pelos nossos resultados com o EIE LVC, que a estocagem das amostras sem congelamento (a 5°C ou a 37°C) têm um impacto grande no título de anticorpos das amostras, principalmente no caso da estocagem a 37°C em que soros com títulos altos após o congelamento não só diminuem seus títulos, como pode mesmo perder sua positividade. Este é um ponto importante a ser levantado em inquéritos sorológicos, como a amostra foi coletada e armazenada, já que esta variável pode resultar em resultados falso negativos.

É importante também citar um estudo realizado por D'Andrea et al, 2015 que demonstra que a utilização dos referidos métodos diagnósticos preconizados para inquéritos caninos, quando utilizados em áreas de baixa endemicidade, têm apresentando resultados discordantes.

Tendo em vista uma enorme gama de artigos que atestam a necessidade de melhorias com relação às técnicas atualmente utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral, tanto em caninos, como em humanos, a citometria de fluxo aparece como um método sensível e específico capaz de auxiliar não apenas no diagnóstico, como também no controle de qualidade de amostras para esse fim.

O emprego da citometria de fluxo no diagnóstico de doenças como Malária, leishmanioses e doença de Chagas, causadas por protozoários intracelulares obrigatórios, que embora de forma distinta, constituem um grande problema de saúde pública, é ainda utilizada de modo incipiente em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico sorológico. Muitas vezes, as técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico dessas doenças baseiam-se na detecção de anticorpos, sem a distinção da espécie envolvida. A sensibilidade torna-se variável devido a correlação em parte com o tempo de evolução da doença, tendo a especificidade, em alguns casos, limiares aquém do desejado. Tal situação evidencia a existência de uma lacuna a ser preenchida por métodos que apresentem melhor sensibilidade e especificidade. A citometria de fluxo seria uma alternativa no preenchimento desta lacuna já que poderia ser aplicada no diagnóstico dessas doenças objetivando não só a detecção de anticorpos como, em algumas situações a identificação de antígenos (SALES & VASCONCELOS, 2013, p. 569-570). Uma técnica desenvolvida por Andrade et al, 2007, utilizando a citometria de fluxo e subclasses de IgG, foi capaz de distinguir entre cães vacinados e cães infectados, o que não ocorre com métodos como EIE e RIFI, mais uma vez constatando a grande utilidade da citometria de fluxo como um ensaio promissor na identificação dessa protozoose.

Microesferas magnéticas recobertas com antígenos, separação imunomagnética e citometria de fluxo para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania*, caracterizou a técnica desenvolvida por Souza et al., 2013b. Através de um ensaio imunofluorescente, utilizando microesferas, de tamanhos distintos, adsorvidas com dois antígenos recombinantes diferentes de *Leishmania* (rK39 e LicTXNPx), alcançaram um alto “score” entre ambos os cães sintomáticos e assintomáticos, para todos os antígenos utilizados (SOUZA et al, 2013b), os quais foram recentemente comprovados serem ferramentas práticas úteis na detecção das formas clínicas e subclínicas da infecção canina por *Leishmania*.

Tais achados justificam a utilização da citometria de fluxo como método pertinente na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* ou como técnica auxiliar na caracterização de amostras para o controle de qualidade.

No corrente trabalho, a citometria de fluxo, apesar de ser uma técnica, ainda que não inovadora, é, todavia, pouco utilizada. Geralmente, o método utiliza parasitos íntegros, neste caso empregou-se microesferas carboxiladas adsorvidas com o antígeno recombinante K28, o mesmo utilizado no teste TR DPP® LVC. Esta metodologia, executada em paralelo com as demais técnicas preconizadas no algoritmo de diagnóstico para LVC, demonstrou grande sensibilidade e especificidade já que o resultado é avaliado pela média de intensidade de fluorescência mensurada na amostra, que por sua vez é diretamente proporcional à relação correspondente a ligação antígeno (Ag) anticorpo (Ac). Essa capacidade de mensuração foi claramente demonstrada em nosso ensaio (Figura 20), reforçando a capacidade da citometria de fluxo como método quantitativo. Ademais, os resultados com essa técnica demonstraram claramente o efeito da temperatura de armazenamento na queda de titulação das amostras, indicando sua grande sensibilidade. Desta forma, esta seria uma ferramenta interessante e de fácil execução não só como método de diagnóstico, mas também como controle interno de amostras utilizadas em ensaios de controle de qualidade.

6. CONCLUSÃO

1. Considerando-se os resultados encontrados pelos diferentes métodos, podê-se observar que o comportamento das amostras quando submetidas a vários ciclos de congelamento/descongelamento e a diferentes temperaturas, têm comportamento diferenciado de acordo com a técnica utilizada.
2. O TR DPP® LVC é um método de diagnóstico baseado na leitura visual do suporte, onde ocorre a revelação da ligação Ag-Ac, o que torna a avaliação de certo modo subjetiva, podendo revelar falsos resultados negativos em amostras com baixos títulos de anticorpos.
3. No que concerne ao ensaio imunoenzimático (EIE LVC) verificou-se, a princípio, ser uma técnica mais “sensível”, com relação a avaliação de amostras expostas a condições ambientais adversas, apresentando um decaimento mais expressivo no título de anticorpos.
4. A citometria de fluxo utilizando microesferas carboxiladas adsorvidas com antígeno recombinante de *Leishmania* demonstrou ser uma técnica bastante viável para a avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos presentes em amostras caninas positivas e negativas para LV e que sem dúvida merece uma maior atenção e aprimoramento.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T. R. et al. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected área by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo*, v. 58, n.3, p. 1 – 5, 2016.
- AGUIAR, G. M., MEDEIROS W. M. Distribuição regional e habitats das espécies flebotomíneos do Brasil, p.207-255, 2003. In Rangel E F, Lainson R (orgs) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz.
- AIT-OU DHIA, K.; et al. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, p. 386-393, 2012.
- ALEMU, A. et al. Knowledge, attitude and practices related to visceral leishmaniasis among residents in Addis Zemem town, South Gondar, Northwest Ethiopia. **BMC Public Health**, v. 13, n.382, p. 2-7, 2013.
- ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.76, p. 321–324, 2013.
- ALMEIDA, A.S.; WERNECK, G.L.; RESENDES, A.P.C. Clasificación orientada a objetos procedentes de imágenes satélites en los estudios epidemiológicos sobre leishmaniasis visceral em zonas urbanas. **Cad. Saúde Pública**, v.30, n.8, p. 1639-1653, Rio de Janeiro, 2014.
- 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. **Cadernos de Saúde Pública** n. 20, p. 259–265, 2004.
- ALVAR, J., et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5 p. 1 -12. Austrália, 2012.
- ARAÚJO, V. E. M. et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p.1-9, 2013.
- ARRUDA, M. M. **ACURÁCIA E REPRODUTIBILIDADE DE TESTES IMUNOENZIMÁTICOS COM ANTÍGENOS DE *Leishmania major* e *Leishmania infantum* PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO BRASIL**. 2014. 124f. Tese (Núcleo de Medicina Tropical), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269- 1281, 2000.

ASPÖCK, H. Postglacial formation and fluctuations of the biodiversity of Central Europe in the light of climate change, **Parasit Res**, v. 103, n. 1, p. 7-10, 2008

ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

AVERSI-FERREIRA, R.A.G.M.F, et al. Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission. **INTECH**, Chapter 5, 2015.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/57546>>.
Acessado em: 02 Jun. 2015.

BARATA, R. A., et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Research International**; v. 2013, p. 1-6, 2013.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/405083>>.
Acessado em: 25 Jan. 2016

BARATI, M. et al. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence survey of asymptomatic dogs in an endemic area of northwestern Iran. **J Parasit Dis**, v.39, n.2, p. 221-224, 2015.

BARBOSA, D.S. et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica do Município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BARRIO, A. et al. *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases** • www.cdc.gov/eid • v.18, n. 2, p. 354-355, 2012.

BASTOS, T. S. A. et al. Aspectos gerais da leishmaniose visceral. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 293-318, 2015.
Acessado em: 02 Jun.15
Disponível:
<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/agrarias/Aspectos%20gerais%20da%20leishmaniose.pdf>>

BATES, P. A. Leishmanina and sand fly interaction: progress and challenges. **Curr Opin Microbiol**. v.11, n.4, p. 340–344, 2008.
doi:10.1016/j.mib.2008.06.003.

BISUGO, et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização do teste rápido com o antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n.2, p.185-193, 2007.

BOULOS, M. Doenças emergentes e reemergentes no Brasil. **Ciência Hoje**, v.29, n.170, p. 58-60, 2001.

Acessado: 02 Jun.15

Disponível em:

<http://ucbweb.castelobranco.br/webcaf/arquivos/13029/6145/Doencas_emergentes_e_reemergentes_no_Brasil.pdf>

BRAGA, M.D.M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419-424,1998.

BRASIL. Lei nº 6259, de 31 de outubro de 1975. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 31.out.1975.

BRASIL. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional De Saúde, Centro Nacional De Epidemiologia, Coordenação Nacional De Dermatologia Sanitária**, p. 44 Brasília. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde; Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Portaria Interministerial N°1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**

Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html>

Acessado em: 05 de Fev. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8. ed., Brasília; 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta Nº1/2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2014.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da Leishmania (Leishmania) chagasi Cunha & Chagas,1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ : estudo de possíveis variáveis preditoras**. 1999. 90f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CAMARGO, L. B., LANGONI, H. Impacto of Leishmaniasis on Public Health. **J. Venom. Anim.Toxins incl.Trop. Dis.**, v. 12, n.4, p. 527-548, 2006.

CAMARGO, E, P. Doenças tropicais. **ESTUDOS AVANÇADOS**, v.22, n.64, p. 1-16 2008.

CARDIM, M. F. M. et al. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. **Rev Saúde Pública** v.47, n.4, p. 691-700, 2013.

CARNEIRO, A. P.; TOCANTINS, S. Leishmaniose Visceral Canina: Fatores importantes na manutenção da doença no município de Mirassol D'Oeste-MT. **Rev. Uniara**. v.14, n.1, 2011.

CASTEJON, M. J. et al. Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para detecção de anticorpos anti-HIV. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.573-81, 2012.

CASTEJON, M. J. et al. Stability of anti-HIV antibodies in serum samples stored for two to eighteen years periods. **J Bras Patol Med Lab**, v. 50, n. 4, p. 272-277, 2014.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-leishmania e mecanismos de evasão. **VITAE Academia Biomédica Digital**, n. 25, p. 1- 10, 2005.
Disponível em:< <http://www.bioline.org.br/pdf?va05017>>.
Acessado em: 12 Set. 2014.

CASTRO, A.R.; HEATHER, A. J. Effect of Multiple Freeze and Thaw Cycles on the Sensitivity of IgG and IgM Immunoglobulins in the Sera of Patients With Syphilis. **Sexually Transmitted diseases**, v. 40, n.11, 870-871, 2013.

CHATZIS, M. K., et al. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. **Experimental Parasitology**, n.147, p. 54 - 59, 2014.

CHAGAS, E. Leishmaniose visceral americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p. 89-229, 1938.

CHARGUI, N. et al. Use of PCR, IFAT and *in vitro* culture in detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. **Parasite**, v. 16, p. 65-69, 2009.

COELHO, L. I. C.; et al. Characterization of *Leishmania spp.* Causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitol Res**, v.108, p. 671–677, 2011.

COSTA, P. L. **Comportamento da Fauna de Flebotomíneos, com ênfase em Lutzomyia longipalpis, em área endêmica para Leishmaniose visceral no Município de Passira, agreste de Pernambuco**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

COURA-VITAL, W., et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **Plos One**, v. 9, n.3, p. 1 – 6, 2014.

Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0091009&representation=PDF>>.

Acessado em: 25 Mai. 2014.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmssion. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 186, p. 1.314- 1320, 2002.

Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/186/9/1314.full.pdf>

Acessado em: 24-05-14

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n. 1, p. 1 – 9, 2014.

D'ANDREA, L. A. Z. et al. The shadows of ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.273, p. 1 - 7, 2015.

DA SILVA, S. M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

DA SILVA, D. T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v. 23, n.2, p. 179-186, 2014.

DE LIMA, V. M. F., et al. Serological diagnosis of leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 4, p. 215 – 218, 2005.

DEMIR, M. et al. Does multiple freezing and thawing cycles of sérum affect the detection of anti-nuclear antibodies and anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies by indirect immunofluorescent method? **Biomedical Research**, v.24, n. 4, p. 522 – 527, 2014.

DE OLIVEIRA, E.F., et al. Climatic factors and population density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in a urban endemic area of visceral leishmaniasis in the midwest Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.38, n. 2, p. 224 – 228, 2013.

DE OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; JUNIOR, V. A. S. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p, 1622- 1628, 2015.

DE SOUZA, A. P. A. et al. Influência de diferentes condições de armazenamento sob congelamento na reatividade de anticorpos séricos. **RBAC**, v. 44, n. 1, p. 39 -43, 2012.

Acessado em: 30 Jun.2016.

Disponível em:

<[https://issuu.com/sbac2/docs/rbac volume 44 n mero 1 ano 2012](https://issuu.com/sbac2/docs/rbac_volume_44_n_mero_1_ano_2012)>

DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban áreas. **Journal of infection in Developing Countries**, v.2, n. 1, p. 24-33, 2008.

DI MUCCIO, T. et al. Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. **PLOS ONE**, p. 1-16, 2015.

DOI: 10.1371/journal.pone.0129418

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF. P. Leishmania development in sand flies parasite: interactions overview. **Parasites & Vectors**, n.5, v. 276, p. 1-12, 2012

ENGWERDA, C. R., et al. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**. v. 20, n. 11, p. 524-530, 2004.

FARIA, A.R.; DE ANDRADE E. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000

FIGUEIREDO, F. B. et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n. 2, p. 200-201, 2008.

FIGUEIREDO, F. B.; et al. Canine Visceral Leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 52, n. 4, p. 193-196, 2010.

FISCHER et al. Combining Climatic Projections and Dispersal Ability: A Method for Estimating the Responses of Sand fly Vector Species to Climate Change. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.11, p. 1 -13, 2011.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2009.

FREGOLA, J. B.; VINYETA, M. P. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). **Revista Española de Salud Pública, Madrid**, v. 67, n. 4, p. 255-266, 1993.

FREITAS, V. C. **O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG)**. 2010. 210f. Tese (Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências na área de concentração Doenças infecciosas e Parasitárias, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2010.

FUJI, Y. et al. Serological Surveillance Development for Tropical Infectious Diseases Using Simultaneous Microspheres-Based Multiplex Assays and Finite Mixture Models. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.7, p. 1-15, 2014.

GARCEZ, L.M. et al. Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v.1, n.1, p.107-116, 2010.

GARCÍA, N., et al. Evidence of *Leishmania infantum* infections in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a Natural Area in Madrid, Spain. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1 – 5. 2014.

GIL, L. H.S., et al. Recent observations on the Sand Fly (Diptera : Psychodidea) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychopygus davis* as a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.6, p. 751-755, 2003.

GONÇALVES, S.A. et al. Leishmaniose visceral: um desafio às políticas de saúde brasileiras. **Periód. Cient. do Núcleo de Biociências Centro Univer. Metodista Izabela Hendrix**. v. 3, n.06, 2013. Disponível em: <http://www.bibliotekevirtual.org/revistas/Methodista-IH/PCNB/v03n06/v03n06a01.pdf> Acessado em: 13 Ago. 2014>.

GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GIUNCHETTI, R.C., et al. 2006. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J. Comp.Pathol.** v. 135, p.100 –107, 2006.

GUSMÃO, J.D.; DE BRITO, P. A.; LEITE, M. T. S. Perfil epidemiológico da Leishmaniose visceral no Norte de Minas Gerais, Brasil, período de 2007 a 2011. **Rev. Baiana de Saúde Pública**, v.38, n.3, p.615-624, 2014.

HELZAGAR, M. et al. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus Musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra-Portugal. **Parasites and Vectors**. v. 6, n. 1, p. 1 – 6, 2013, Portugal.

IKEDA-GARCIA, F.A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 218-223, 2010.

KAR, K. et al. Serodiagnosis of Leishmaniasis Leishmania Group, Indian Institute of Chemical Biology, 4, Raja S.C. Mullick Road, Jadavpur, Calcutta, 700 032, India.

Critical Reviews in Microbiology, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

(doi:10.3109/10408419509113537)

Read More: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10408419509113537>>.

KRONENBERG, F., et al. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoproteinmcholesterol and triglycerides. **J Lipid Res.** v. 35, p. 1318 - 1328,1994.

LAINSON, R; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brasil – Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M.D. **Patologia e Patogenia das Leishmaniose**. 2010.140f. Tese (Título de Professor Livre Docente) Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E., GRAIN J., HONIGBERG B.M. A newly revised classification, **Journal Parasitology**, v.66, p. 830-834, 1980.

LIMA, V. M. F., et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.173, p. 330-333. São Paulo, 2010.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

LUNA, E.J.A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 5, n. 3, p. 229-243, 2002.

MACEDO, I. T. F. et al. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no Município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v.18, n.2, p.67-74, 2008.

MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v.158, n.4, p. 274-87, 2008.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARINHO, D.S. et al. Health Economic Evaluations of Visceral Leishmaniasis Treatments: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1-12, 2015.

MARQUES, N., et al. Leishmaniose Visceral e Infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana - Na Era da Terapêutica Anti - Retroviral de Alta Eficácia. **Acta Med Port.**, v. 20, p. 291-98, 2007.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Leishmaniose visceral-calazar. **J. bras. Med.**, v. 41, p. 69 - 84, 1981.

MATOS, H.J. et al. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 6, n. 1, p. 51-54, 2015.

McCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLOS Pathogens**, v. 9, n.1, p. 1-7, 2013.

MOLINA, R., et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 88, p.491–93. 1994.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, C. L.; GARCIA, G.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 64, n. 2, p. 108-131, 2012.

MORAIS, R. C. S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Exp Appl Acarol** v. 59, p. 473-481, 2013.

NAUCKE, T. J., et al. Sandflies and leishmaniasis in Germany. **Parasitology Res.**, v.103, n. 1, p. 65-8. Germany, 2008.

NAUCKE, T. J. & LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, n.67, p. 1-5, 2012.

NGURE, P. K.; KIMUTAI, A.; NG'ANG'A, Z. W.; RUKUNGA, G.; TONUI, W. K.; A review of leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n.2, p. 79-86, 2009.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* spp., *Babesia canis* and *Ehrlichia Canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, n.1, p. 7-11, 2008.

OLIVEIRA, E. N.; PIMENTA, A. M. Perfil epidemiológico das pessoas portadoras de Leishmaniose Visceral no Município de Paracatu – MG no período de 2007 a 2010. **Rev Min Enferm.** v.18, n. 2, p. 365-370, 2014.

OPAS/OMS. Leishmanioses. **Informe Leishmaniose**, n.3, Julho de 2015. Disponível em: <<file:///C:/Users/glibm/Downloads/2015-cha-leish-informe-epi-das-americas.pdf>>.

Acessado em: 10 Jul. 2016.

PALATNIK-DE-SOUZA C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 510-17, 2001.

PAZ, F.A.Z.; BERCINI, M.A. Doenças emergentes e reemergentes no contexto da Saúde Pública. **Bol. Saúde**, v. 23, n. 1, p. 9-13, Porto Alegre, 2009.

PEIXOTO, H. M., DE OLIVEIRA, M. R. F., ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v.20, n.3, p. 334-352, 2015.

PÉTERFI, Z., et al. Visceral leishmaniasis in an immunocompetent Hungarian adult patient. **Health**, v.3, n.1, p. 1 – 5. 2011.

POEPPL, W., et al. Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a central European country. **Springer-Verlag**. v.112, p. 4231-37, 2013.

POUBEL, S.B; **Variabilidade genética de isolados de Leishmania infantum x Leishmania chagasi procedentes de várias regiões do Brasil**. UFPR. 2010, 75 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Setor Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v.19, n.1, p. 32-38, 2010.

QUEIROZ, N.M.G.P., et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**. v. 178, p.1-8, 2011.

Disponível : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711000021>
Acessado em: 24-05-14

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v.6 p. 147–154, 2014.

REBÊLO, J. M. M.; et al. Flebótomos (Diptera: Phlebotominae) da Ilha de São Luís, Zona do Golfão Maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n. 3, p.247-253, 1999.

RODAS, L. A. C. **Relação entre a carga parasitária de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e infectividade para *Lutzomyia longipalpis***. 2014. 97f. Tese (Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus Araçatuba.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Parasitol.**, v.37, p. 683-689, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A., et al. Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. **Am J Trop Med Hyg** v. 82, n.2 p.251–56, 2010. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0366.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT M. Control of leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.1, p. 1-17, 2010.

ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, n.3, p. 251–262, 2014.

SALES, M.M.; VASCONCELOS, D. M. Citometria de Fluxo Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. 609 f.

SANGENIS, L.H.C., et al. Expansion of Visceral Leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: Report of first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and difficulty of diagnosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 56, n.3, p.271-274, 2014.

SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. Leishmaniose visceral canina – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano X, n. 19, ISSN – 1679-7353, 2012.

Disponível em:

<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/QKOlwIDa047cxSZ_2013-6-24-15-1-25.pdf>.

Acessado em: 08 Jun. 2016.

SCHWANKE, K. et al. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesq. Vet. Bras**, v. 34, n. 3, p. 255-260, 2014.

SHAW, J. J. Taxonomia do gênero *Leishmania*. Conceito tradicionalista x conceito moderno. **An Bras Dermatol**, v. 60, p. 67-72, 1985.

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**, v. 101, n.5, p. 577-579, 2006.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop**, v. 11, n. 1, p. 685 – 704, 2011.

SOARES, M. R.A., et al. Análise molecular da infecção de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2409-2413, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.2, p.560–563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**. v.4, n. 86, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen, and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. **Parasites & Vectors**, v.7, n. 111, p. 1-10, 2014.

SOUZA, N. P. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n. 3, p. 333-335, 2010 a.

SOUZA, W., et al. **Doenças Negligenciadas**. Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional – Estudos estratégicos. Academia Brasileira de Ciências, 2010 b.

SOUZA, C. M. et al. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniosis immunodiagnostic using recombinant proteins. **Parasite Immunology**, v.34, n.1 p.1-7, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2011.01334.x

SOUZA, R.F. et al. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v.125, n.1, p. 60– 66, 2013a.

SOUZA, S. et al. Development of a Fluorescent Based Immunosensor for the Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis Combining Immunomagnetic Separation and Flow Cytometry. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.8, p. 1-7, 2013b.
Disponível em:
<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002371>>.
Acessado em: 08 Fev. 2015.

SCHWANKE, K. et al. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesq. Vet. Bras**, v. 34, n. 3, p. 255-260, 2014.

WERNECK, G.L.; HASSELMANN, M.H.; GOUVÊA, T.G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.1, p.39-62, 2011.

WERNECK, G.L. Visceral Leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related control to reservoir control. **Rev Saúde Pública**, v. 48, n.5, p. 851-855, 2014.

WHO. The Control of Neglected Zoonotic Diseases. Community-based interventions for prevention and control. **WHO headquarters**, Geneva, Switzerland, 23-24 November, 2010.

TAVARES, C. A. P. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, September 2003, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.
Read More: <<http://informahealthcare.com/doi/pdfplus/10.1586/14737159.3.5.657>>.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica**, v. 34, n. 1, p. 7-12, 2014.
Disponível em:
<<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2153>>.
Acessado em: 13 Fev. 2016

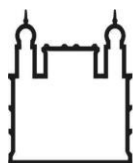
VERAS, P. S.T. et al. New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Chapter 12, p. 239 - 273, 2014.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/57573>>.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. n. 54, p. 1-881, 1994.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia Canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.47 n.1, p.105-107, 2013.
Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v47n1/0037-8682-rsbmt-00-14-05.pdf>>
Acessado em: 06 Nov. 2014>.

ANEXOS

ANEXO A – LICENÇA DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-54/13

Certificamos que o protocolo (P-40/13-2), intitulado "HIBRIDIZAÇÃO IN SITU NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR Leishmania infantum EM CÃES DOMÉSTICOS", sob a responsabilidade de FABIANO BORGES FIGUEIREDO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/12/2017 e inclui o uso total de:

Canis familiaris

- 75 Machos.
- 75 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 2 de dezembro de 2013

**Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA**

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO B – PLANILHA TITULAÇÃO DE AMOSTRAS PELO MÉTODO IMUNOCROMATOGRÁFICO

N° Lote amostra:	
Alíquota (S/P):	
Titulação inicial:	
Ciclo de descong.: 0	
Data:	
Diluição	Int. Linha Teste
1:4 =	
1:32 =	
1:64 =	
1:128 =	
1:256 =	
1:512 =	
1:1024 =	
1:2048 =	
1:4096 =	

ANEXO C – RESULTADO PARASITOLÓGICO CANINO EM VÁRIOS TECIDOS –
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI

Cultura Parasitológica									
Prontuário (Amostra)	Nome	Local	Data Necrópsia	Med. óssea	Pele	Frag. baço	Frag. linfonodo	Fígado	Laudos
14015 (A)	Frederico	Barra Mansa	03/06/15	2	1	2	1	2	Positivo
14016 (B)	Dog	Barra Mansa	03/06/15	1	2	2	2	1	Positivo
14032 (C)	Lobo	Barra Mansa	17/06/15	1	1	2	1	1	Positivo
14033 (D)	Leão	Barra Mansa	17/06/15	1	1	1	1	1	Positivo
14038 (E)	Tobi	Barra Mansa	18/06/15	1	1	1	1	1	Positivo
14039 (F)	Neguinho	Barra Mansa	18/06/15	2	2	1	1	1	Positivo
14190 (G)	Pongo	Barra Mansa	22/10/15	2	1	1	1	1	Positivo
14191 (H)	Pitoco	Barra Mansa	22/10/15	2	1	1	1	1	Positivo
14192 (I)	Lili	Barra Mansa	22/10/15	2	1	1	1	1	Positivo
14195 (J)	Max	Barra Mansa	23/10/15	2	2	2	1	2	Positivo
14196 (K)	Sheik	Barra Mansa	23/20/15	1	1	1	1	1	Positivo
14206 (L)	Zeus	Barra Mansa	05/11/15	1	1	1	1	1	Positivo
14207 (M)	Paçoquita	Barra Mansa	05/11/15	1	1	1	1	1	Positivo
14208 (N)	Tony	Barra Mansa	06/11/15	2	1	1	1	1	Positivo
14209 (O)	Barbie	Barra Mansa	06/11/15	1	1	1	1	1	Positivo
14229 (P)	Jade	Barra Mansa	25/11/15	1	1	1	1	1	Positivo
14230 (Q)	Nero	Barra Mansa	25/11/15	2	1	2	2	2	Positivo

Legenda: 1- Positivo

2- Negativo