



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Fabiana Farinello Grecco Barichello**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES VACINADOS COM A VACINA FML (LEISHMUNE®) E CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR MEIO DE DOIS MÉTODOS SOROLÓGICOS: ELISA E RIFI**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

---

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Silmara Marques Allegretti*  
Orientadora: Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Campinas, 2010

Unidade IBCC  
Nº Chamada UNICAMP  
B239a  
v. \_\_\_\_\_ Ed. \_\_\_\_\_  
Tombo BC 91149  
Tombo unidade \_\_\_\_\_  
Proc. 16.130-7011  
C. \_\_\_\_\_ P. \_\_\_\_\_  
Preço R\$ 11,00  
Data 29/05/2011  
Cód. lit. 799153

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B239a

Barichello, Fabiana Farinello Grecco

Avaliação da resposta imunológica de cães vacinados com a vacina FML (Leishmune®) e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina por meio de dois métodos sorológicos: ELISA e RIFI / Fabiana Farinello Grecco Barichello. - Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. ELISA. 3. RIFI.  
4. Vacina FML. 5. Sorologia. 6. Vacinas contra leishmaniose. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em Inglês:** Leishmune®-vaccinated versus naturally infected dogs with canine visceral leishmaniasis: serological diagnostic differentiation.

**Palavras-chave em Inglês:** Visceral canine leishmaniasis; ELISA; IFA; FML vaccine; Serology; Leishmaniasis vaccines.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Silmara Marques Allegretti, Rosângela Zacarias Mechado, Fábio dos Santos Nogueira.

**Data da defesa:** 20/08/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

Campinas, 30 de agosto de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti (Orientadora)

*Silmara Marques Allegretti*  
Assinatura

Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

*Rosângela Zacarias Machado*  
Assinatura

Prof. Dr. Fabio dos Santos Nogueira

*Fabio dos Santos Nogueira*  
Assinatura

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Selma Giorgio

\_\_\_\_\_  
Assinatura

201140144

Dedico este trabalho à querida amiga Ingrid Menz, fonte de inspiração para a realização deste projeto.

## Agradecimentos

Aos meus queridos pais, que sempre foram meu porto seguro, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por me apoiarem em minhas escolhas, estarem sempre ao meu lado e pelo amor incondicional. Amo vocês!

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia Animal da Unicamp, na pessoa de sua atual coordenadora, Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco, pela oportunidade, apoio e incentivo.

À Silmara, minha orientadora, pela paciência, ajuda e confiança, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Fort Dodge, na pessoa da Ingrid Menz e Diptendu Mohan Sen, por acreditarem em mim e na importância do projeto, permitindo e apoiando meu ingresso no Mestrado. Obrigada! Vocês foram muito importantes e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ingrid, você foi especial... obrigada pela ajuda, pela força, pelos ensinamentos, pelas palavras certas nas horas difíceis, pelo constante bom humor, pelas risadas (e quantas...), pelos momentos especiais, enfim, agradeço a oportunidade de ter tido um convívio tão próximo durante estes anos, foram incríveis! Vou levar para sempre estas lembranças...

Ao Vinícius, meu marido, namorado, melhor amigo... obrigada pela paciência, amor e compreensão nestes anos que estamos juntos, e principalmente neste período... Te amo!

Às minhas irmãs, Fernanda e Roberta, minhas melhores amigas, confidentes e companheiras. Vocês sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis e nos mais alegres... Fe, obrigada pelos “papos-cabeça”, por me escutar e me apoiar,

sempre! Pelas risadas, baladas, enfim, pelos momentos. Ro, maninha, obrigada por “tudo”! As lembranças de nossas risadas, confidências, choros e desabafos e a certeza de ter uma pessoa tão parecida comigo me dão forças sempre que acho que não vou conseguir...

Agradecimento especial ao Izoel. Quando tudo parecia perdido, foi ele quem conseguiu o contato com o CCZ de Três Lagoas, para a realização dos exames sorológicos. Obrigada Izoel, você sabe o quanto foi importante. Obrigada também por ter me ciceroneado durante toda a semana em Três Lagoas!

À Neide, por toda a ajuda e paciência na realização das sorologias. Neide, você foi especial!

A toda a equipe do CCZ de Três Lagoas, que me recebeu de braços abertos, me auxiliou e me ensinou muito. Agradecimento especial à Paulinha e Rose, vocês foram demais! Obrigada pelos bons momentos.

Ao Jaime Dias. “Sheilo”... Jamais vou conseguir retribuir tudo o que você fez por mim, desde o primeiro dia que trabalhamos juntos. Sua ajuda foi fundamental para que eu conseguisse cursar as disciplinas e me dedicar a este projeto. Obrigada pelas viagens de última hora, pelas palestras improvisadas, pelos treinamentos em cima da hora, enfim, obrigada por ser meu amigo! Te adoro de coração!

Ao André Cutolo, que participou deste projeto desde os momentos iniciais. Obrigada pela força, pela ajuda e pela amizade!

Ao Gustavo Sabatini, que me ensinou muito sobre como redigir um trabalho científico. Obrigada pelas infundáveis leituras do trabalho, pelas sugestões de melhoria e pelo incentivo.

Ao Tiago Papa, pela compreensão das ausências em momentos importantes em decorrência deste projeto, pelo incentivo e por toda a ajuda para meu desenvolvimento e crescimento profissional. Aprendi muito nos dois anos em que trabalhamos juntos. Obrigada!

Ao Márcio Moreira, pessoa que admiro por seu conhecimento e pela facilidade e clareza com que os transmite. Muito obrigada pelos trabalhos e por toda a ajuda.

Ao Fábio Nogueira, que hoje, mais do que um grande profissional considero um amigo. Obrigada por tudo o que aprendi com você, por compartilhar seus conhecimentos e pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Vítor Ribeiro, uma das pessoas mais admiráveis que tive a oportunidade de conhecer. Seu conhecimento sobre a Leishmaniose e sua luta pela vida são pontos que admiro e que pretendo perpetuar. Vítor, você é um exemplo, não só de um grande profissional, mas de uma pessoa incrível. Obrigada por toda a atenção, pelos ensinamentos e pela grande contribuição na correção deste trabalho.

À Professora Rosangela Zacarias Machado, pelo incentivo e apoio mesmo antes deste projeto ter iniciado. E também pela correção e sugestões de melhoria, muito obrigada!

À Mara Cristina Pinto, pela cuidadosa correção, pelo interesse e pelas sugestões.

À querida amiga Isabela Coudry, por todo o apoio, dedicação e amizade. Sua presença no Departamento Técnico, mesmo que por curto período, foi muito importante. Obrigada por toda a força, pelas palavras, pelo incentivo, e principalmente, pelas risadas!

Ao Rogério, que com sua calma, sempre me inspirou a relaxar nos momentos de pânico! Obrigada, Roger, pelas dicas para a redação da dissertação, pelas leituras e correções.

À Paola, que me acompanhou durante a os momentos iniciais de estudo para ingressar neste projeto, por toda a ajuda no Departamento Técnico nas minhas ausências.

À Rafaela Munhoes e Fernanda Pinheiro. Já falei muitas vezes que vocês me surpreenderam pela rapidez com que aprenderam a nova função e pela qualidade do trabalho que realizam. Sem vocês eu não teria conseguido me dedicar a este projeto. Obrigada por toda a ajuda, sempre!

Aos estagiários Noemi e João. Cada um de vocês foi muito importante em uma fase deste trabalho.

Ao Eduardo Ishii, por ter feito a “via sacra” para coleta dos soros comigo, sempre prestativo e atencioso.

Ao pessoal da Informática, especialmente ao Vagner, ao Matheus e ao Eric, os “anjos da informática”, sempre prontos e dispostos a auxiliar nos momentos de pânico! Vagner, obrigada pelos inúmeros gráficos, tabelas dinâmicas e formatações. Matheus e Eric, obrigada por estarem disponíveis!

À Xu, amiga de faculdade e de vida. Minha veterinária favorita!!! E do Dustin, Frida e Zé também!!! Nos momentos mais difíceis sempre encontrei palavras de incentivo. Obrigada pelas longas conversas, pelas risadas e acima de tudo, pela sua amizade.

A todos os meus amigos que não participaram diretamente deste projeto, mas que são fundamentais na minha vida.

“Chegará o dia em que o Homem conhecerá o íntimo dos animais.

Neste dia, um crime cometido contra um animal será considerado um crime contra a Humanidade”.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina, doença grave e fatal, tem o cão como o principal reservatório do seu agente etiológico no meio urbano. Devido ao alto parasitismo cutâneo nestes animais, da quantidade de cães infectados, e do próximo convívio com o homem, as ações desenvolvidas pelo Programa Brasileiro de Controle da Leishmaniose Visceral são centradas no reservatório canino, através da identificação e eutanásia dos animais soropositivos. Sendo assim, a adoção de ações profiláticas, com a utilização de vacinas nos cães, constituiria uma importante ferramenta para a diminuição da doença nestes animais, e conseqüentemente, da infecção do vetor e da transmissão do agente. Além disso, a adoção de medidas profiláticas, como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina, repelentes de uso tópico e vacinas, são as únicas alternativas disponíveis atualmente para os cães, pois no Brasil, o tratamento de cães está proibido desde a publicação da Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Apesar de disponível desde 2004, a vacina Leishmune® ainda não é amplamente utilizada no Brasil, principalmente devido à possibilidade dos cães vacinados apresentarem sorologia positiva em inquéritos epidemiológicos, não sendo possível diferenciá-los dos infectados. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil sorológico de cães vacinados e saudáveis que residem em áreas endêmicas, e de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum/ chagasi*, e avaliar a possibilidade de diferenciação sorológica a partir dos métodos utilizados atualmente nos inquéritos epidemiológicos oficiais e nos laboratórios de diagnóstico particulares: ELISA e RIFI com antígenos *L. major*-like, produzidos pelo Laboratório Bio-Manguinhos e ELISA S7, produzido pelo Laboratório Biogene. Todos os soros de cães foram testados nos três métodos, e os resultados demonstraram que nenhum cão vacinado apresentou resultado positivo em mais de um teste. Apenas um cão vacinado (1/39) apresentou resultado de 1:40 na RIFI, e quatro cães (4/39) apresentaram resultado positivo no ELISA *L. major*-like. Nenhum soro de cão vacinado apresentou resultado positivo no ELISA S7. O único resultado positivo na RIFI foi negativo nos outros dois métodos, e os quatro soros positivos no ELISA *L. major*-like foram negativos tanto na RIFI quanto no ELISA S7. Estes resultados sugerem reações falso-positivas, e demonstram que, de acordo com o Manual de Vigilância Epidemiológica, se os soros de cães vacinados forem testados em dois métodos (ELISA e RIFI), a possibilidade de um cão vacinado apresentar resultado positivo será remota. Desta maneira, a vacinação da população canina não dificultaria as ações atualmente empregadas para o controle da Leishmaniose Visceral, mas poderia, no futuro, ser somada as medidas já adotadas, evitando assim a eutanásia de cães.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral Canina, ELISA, RIFI, vacina FML, sorologia.

## ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis, serious and fatal disease, has the dog as main reservoir of the agent *Leishmania infantum* in urban environment. The control actions developed by the Brazilian Program of Visceral Leishmaniasis Control are focused on the canine reservoir through identification and euthanasia of seropositive animals, due to high cutaneous parasitism in these animals, the amount of infected dogs and the closeness to the human being. Therefore, the adoption of prophylactic measures like dog vaccination would be an important tool to reduce the number of infected dogs and consequently the vector infection and the disease transmission. Besides that, the adoption of prophylactic measures in these animals, like the usage of deltamethrin embedded collars, topic usage repellent and vaccines are the only available alternatives for these animals, since dogs treatment has been forbidden by law in Brazil since 2008. Although it has been available since 2004, the Leishmune® vaccine is not widely used in Brazil yet, especially due to the possibility of vaccinated dogs showing positive serology, being impossible to differentiate them from infected dogs. The objective of this work was to evaluate the serologic profile of healthy and vaccinated dogs who live in endemic areas and of naturally infected dogs with *Leishmania Infantum/ chagasi*, and also evaluate the possibility of serologic differentiation using the same methods nowadays adopted by official epidemiological surveys and in private diagnosis laboratories: ELISA and IFA with *L. major*-like antigens, produced by Bio-Manguinhos Laboratory and ELISA S7, produced by Biogene Laboratory. All the dogs sera were tested in the three methods, and the results showed that no vaccinated dog presented a positive result in more than one test. Only a vaccinated dog (1/39), presented 1:40 in IFA, and 4 dogs (4/39) presented a ELISA *L. major*-like positive result. No vaccinated dog sera presented positive result in ELISA S7. The only IFA positive result was negative in the other two methods and the four positive sera in ELISA *L. major*-like were negative either in IFA, as in ELISA S7. These results suggest false positive reactions and demonstrate that according to the Epidemiological Surveillance Manual, if the vaccinated dogs sera are tested in two methods (ELISA and IFA), the possibility of a vaccinated dog to present a positive result is remote. Thus, the vaccination of a big quantity of dogs would not disturb the presently adopted actions for Visceral Leishmaniasis control, but could in the future be added to the already adopted measures, therefore avoiding the dogs euthanasia.

**Key-words:** Visceral Canine Leishmaniasis, ELISA, IFA, FML vaccine, serology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cão positivo para LVC – lesão de pele .....	60
Figura 2: Cão positivo para LVC – lesão ocular .....	60
Figura 3: Cão positivo para LVC – caquexia .....	60
Figura 4. Cão saudável vacinado .....	60
Figura 5. Título dos soros de cães vacinados no ELISA <i>L. major</i> -like .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. ....	83
Reatividade dos soros de cães vacinados com Leishmune® e dos cães naturalmente infectados de áreas endêmicas em diferentes métodos sorológicos.	
Tabela 2. ....	84
Soros de cães vacinados com Leishmune® que apresentaram resultado positivo em um ou mais testes.	

## Sumário

1. Introdução .....	16
2. Revisão de literatura .....	20
2.1 Leishmanioses .....	20
2.2 Leishmaniose visceral .....	21
2.2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral .....	22
2.3 Leishmaniose visceral canina.....	24
2.3.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral canina .....	24
2.4 Ciclo biológico .....	25
2.5 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral canina .....	26
2.6 Resposta Imune .....	29
2.7 Diagnóstico.....	32
2.8 Tratamento .....	39
2.9 Medidas de controle da LV.....	46
2.10 Desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral .....	49
3. Justificativa.....	54
4. Objetivos .....	57
5. Material e Métodos.....	58
5.1 Área do estudo .....	58
5.2 Grupos.....	58
5.3 Soros .....	61
5.4 ELISA com antígeno <i>L. major</i> -like (anexo 2) .....	62
5.5 Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI) com antígeno <i>L. major</i> -like (anexo 3).....	63
5.6 ELISA S7 (anexo 4).....	64
5.7 ELISA FML .....	65
5.8 Análise estatística .....	66
6 Resultados .....	67
7. Capítulo 1 .....	68
Diferenciação sorológica entre cães vacinados com Leishmune® e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina .....	68
Resumo .....	69

1. Introdução.....	71
2. Materiais e métodos .....	76
2.1 Área do estudo .....	76
2.2 Grupos.....	77
2.3 Soros .....	78
2.4 ELISA com antígeno L. major-like .....	79
2.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com antígeno L. major-like .....	79
2.6 ELISA S7 .....	79
2.7 ELISA FML .....	80
2.8 Análise estatística .....	80
3. Resultados .....	81
4. Discussão.....	85
5. Referências bibliográficas .....	92
8. Conclusões.....	98
9. Referências bibliográficas .....	100
10. Anexos.....	112

## 1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose severa e crônica causada, no Novo Mundo, pelo protozoário *Leishmania infantum/ Leishmania chagasi* (Maurício et al. 1999; Dantas-Torres, 2006a). É transmitida pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* e pode acometer humanos e outros animais, especialmente cães (ROBERTS, 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2005; DANTAS-TORRES 2006b; CARRILLO & MORENO, 2009).

Na epidemiologia da LV neotropical, o cão é a espécie mais importante, porém a participação de humanos e outros animais silvestres não pode ser negligenciada (CARRILLO & MORENO, 2009). Por esta razão a leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada uma enfermidade de importância não só na saúde pública, mas também veterinária (FRANÇA-SILVA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006b).

No Brasil, a eliminação de cães infectados está baseada principalmente em métodos sorológicos, sendo parte do Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral Canina. A eutanásia é um procedimento controverso, não só devido à falta de consenso entre os pesquisadores sobre sua real eficácia no controle da LV, mas também pela oposição dos proprietários dos cães, médicos veterinários e organizações protetoras dos animais (DYE, 1996; DIETZE et al., 1997; COURTNEY et al., 2002; LAINSON & RANGEL, 2005; DANTAS-TORRES, 2006b; NUNES et al., 2008). O estabelecimento de ferramentas imunoproláticas representa uma importante contribuição para a estratégia de controle da LV (ARAÚJO et al., 2009), tendo a vacinação canina sido apontada, através de um modelo matemático (DYE, 1996), como o mais potente fator para redução da LV humana e canina.

Em junho de 2003 foi licenciada no Brasil, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Leishmune®, uma vacina de segunda geração composta pela glicoproteína Fucose Manose Ligante (FML), uma fração purificada isolada da *Leishmania donovani* e adicionada ao adjuvante de imunidade saponina. A vacina demonstrou proteção de 92% a 99% em estudos de campo realizados com desafio natural (DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002; BORJA-CABRERA et al., 2008).

Nos estudos realizados com a Leishmune®, a avaliação de parâmetros sanguíneos como contagem de linfócitos CD4+, CD8+ e CD21+, além da intradermorreação (IDR), foram utilizados para comprovar a resposta imune celular (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1994; PARAGUAI DE SOUSA et al., 2001; DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002; SANTOS et al., 2002; ARAÚJO et al., 2008).

Já o método ELISA-FML, cujo antígeno é a mesma glicoproteína da vacina, foi utilizado para a mensuração da resposta imune humoral (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1994; PARAGUAI DE SOUSA et al., 2001; DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002; SANTOS et al., 2002; MENDES et al., 2003).

A detecção de anticorpos específicos anti-FML em cães imunizados com a Leishmune®, quando utilizado o ELISA FML, abriu caminho para a hipótese de que estes anticorpos também pudessem ser identificados pelos métodos sorológicos licenciados no Brasil (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like, utilizados nos inquéritos sorológicos oficiais e no ELISA S7 utilizado nos laboratórios particulares), apresentando reações falso-positivas.

Atualmente, no Brasil, somente os kits ELISA produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (ELISA *L. major*-like) e pelo laboratório

Biogene (ELISA S7), e o método RIFI (RIFI *L. major*-like), produzido pelo Instituto Bio-Manguinhos, estão devidamente registrados no Ministério da Saúde (Bio-Manguinhos) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, (Biogene), sendo, portanto, os únicos testes sorológicos oficialmente aceitos para o diagnóstico da LVC.

Os *kits* ELISA e RIFI produzidos pelo Instituto Bio-Manguinhos, possuem antígenos complexos de *Leishmania major*-like, e o *kit* ELISA S7, produzido pelo laboratório Biogene, utiliza a proteína recombinante HSP70, o fragmento S7 da HSP 70 - Heat Shock Protein - de *L. chagasi* como antígeno (Andrade & Andrade, 1995). O ELISA *L. major*-like apresenta especificidade 91,7% e sensibilidade de 94,7% e a RIFI *L. major*-like apresenta especificidade de 80% e sensibilidade de 90%, de acordo com o fabricante. O *kit* ELISA S7 apresenta especificidade de 94,3% e sensibilidade de 89%, de acordo com o fabricante. De acordo com Palatnik et al. (1995), o método ELISA FML apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico de pacientes humanos infectados com *L. chagasi*, além de ter apresentado maior sensibilidade quando comparada à RIFI na detecção de cães assintomáticos infectados pela *L. chagasi* (Borja-Cabrera et al., 1999).

Desde que a vacina Leishmune® foi licenciada, como uma ferramenta a mais para o controle da LVC, o maior entrave ao seu uso em larga escala foi a dúvida sobre a possibilidade de diferenciação sorológica entre cães vacinados saudáveis e cães doentes, através dos métodos sorológicos utilizados nos inquéritos caninos oficiais (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like), já que no Brasil, os cães soropositivos são eutanasiados. Sendo assim, a vacinação de cães poderia dificultar as ações de controle da LV e resultar em eutanásia de animais vacinados e sadios em um eventual inquérito epidemiológico realizado.

Caso os testes sorológicos atualmente disponíveis e utilizados nos inquéritos sorológicos caninos não identifiquem os anticorpos gerados após a vacinação dos cães, um grande obstáculo ao uso da vacina terá sido superado, podendo, no futuro, a vacinação canina ser somada às medidas já adotadas pelo Programa Brasileiro de Controle da leishmaniose visceral.

De acordo com levantamento realizado por Palatnik-de-Sousa et al. (2009), a vacinação dos cães com a Leishmune® não interferiu na campanha de controle da LV do Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, uma vez que neste Município, nos bairros onde havia a maior porcentagem de cães vacinados, foi identificado o menor número de soropositividade nos exames sorológicos oficiais (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like), de acordo com levantamentos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade. O mesmo foi observado no Município de Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, em um levantamento epidemiológico envolvendo 110 mil cães (Palatnik-de-Sousa et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi investigar o perfil sorológico dos cães vacinados com a Leishmune® e dos cães infectados que vivem em áreas endêmicas para a LVC, nos três testes atualmente licenciados no Brasil – ELISA *L. major*-like, RIFI *L. major*-like e ELISA S7 e avaliar a interferência dos cães vacinados no Programa Brasileiro de Controle da LV. Além desses testes, o ELISA FML foi realizado para comprovar a presença de anticorpos específicos anti-FML nos cães vacinados, confirmando a suspeita de que os anticorpos induzidos pela vacina Leishmune® podem ser detectados somente quando se utiliza o ELISA FML .

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* compreende parasitos heteroxênicos de hospedeiros mamíferos, entre eles o homem, canídeos e roedores. Os insetos vetores são flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* os mais importantes na transmissão das leishmanias no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (LAINSON & SHAW, 1987).

Este grupo de doenças está entre as três mais importantes transmitidas por vetores, depois somente da malária e da filaríase linfática. O complexo é endêmico em muitas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, estando presente em 88 países, estimando-se mais de 350 milhões de pessoas em área de risco. A incidência é estimada em dois milhões de novos casos por ano, sendo 500 mil de LV e um e meio milhões de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (DESJEUX, 2004). A média anual gira em torno de 59 mil mortes em humanos, no mundo, em decorrência da LV, média superada apenas pela malária entre as doenças parasitárias. A LV é hoje considerada a principal doença infecciosa entre as populações pobres, que vivem principalmente em áreas rurais e suburbanas (ALVAR et al., 2006).

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

relacionados à condição nutricional e imunológica do hospedeiro. As leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas denominadas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral (LV), sendo que no Novo Mundo as três primeiras formas são agrupadas em uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA).

## **2.2 Leishmaniose visceral**

A LV é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* (DEANE & GRIMALDI, 1985). As Leishmanias envolvidas na LV pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, que é representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (LAINSON & SHAW, 1987).

Estudos atuais utilizando técnicas bioquímicas e moleculares (MAURÍCIO et al., 1999) demonstraram que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* apresentam diferenças mínimas entre si. Entretanto, atualmente existe uma grande diversidade de denominação para o agente etiológico da Leishmaniose Visceral nas Américas (DANTAS-TORRES, 2006a). Segundo Shaw (2006), a denominação *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é correta, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica 1999), e, portanto, neste trabalho, adotaremos a nomenclatura *L. (L.) infantum chagasi* para o agente etiológico da LV e LVC.

### 2.2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral

A LV ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo, estando distribuída em todos os continentes, à exceção da Oceania e Antártida. Na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia, o agente etiológico da LV é *L. donovani*, onde a doença possui perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003). Na Ásia central e sudoeste, no nordeste da China, norte da África e Europa mediterrânea é causada por *L. infantum*, e nos 12 países em que ocorre nas Américas, o agente etiológico é considerado *L. chagasi*. O Brasil é responsável pela quase totalidade dos casos de LV na Américas, sendo que no período compreendido entre os anos de 1984 a 2004, a média anual de casos de LV foi de 3.352 registros com incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes, apresentando tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (ELKHOURY, 2006).

É também conhecida como calazar (Kala-azar), febre dum-dum, febre de Assam, esplenomegalia tropical ou doença negra (DEANE & GRIMALDI, 1985), sendo a forma mais grave da doença e considerada antrozoönose. Em áreas urbanas, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios da *L. (L.) infantum chagasi*, para a infecção humana (ASHFORD, 1996), devido à alta susceptibilidade à infecção e ao alto parasitismo de pele, frequentemente observado nestes hospedeiros, além da próxima relação com o homem, tanto em áreas rurais quanto em urbanas (CUNHA et al., 1995). Em áreas rurais, animais silvestres como raposas e gambás também são importantes na epidemiologia da doença (CORREDOR et al., 1989).

No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor implicado na disseminação e transmissão do agente, sendo a *Lutzomyia cruzi* incriminada como vetor no Estado do

Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997; DOS SANTOS et al., 1998, DE PITA PEREIRA et al., 2008). A espécie *Lutzomyia evansi* é incriminada na transmissão da LV em outros países da América Latina (ADLER et al., 2003, MONTOYA-LERMA et al., 2003, DE LIMA et al., 2009).

A LV é uma doença emergente em diferentes áreas urbanas brasileiras. Transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, porque a LV, doença originalmente restrita às áreas rurais, passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica em grandes cidades brasileiras (COSTA et al., 1990; MENDES et al., 2002). O processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e destruição ambiental, fatores que também podem ter influenciado a emergência da doença no meio urbano.

Por um lado, o vetor se adapta facilmente às condições peridomésticas de áreas depauperadas, explorando o acúmulo de matéria orgânica gerada por animais domésticos e más condições sanitárias. Por outro, cães abandonados vagando na periferia da cidade podem infectar-se quando entram em contato com vetores infectados do meio silvestre e, ao retornarem para o interior da cidade, servirem de amplificadores da infecção para outros cães e humanos. Evidências indicam que pessoas infectadas também podem atuar como reservatórios da infecção para os flebótomos (COSTA et al., 2002).

## 2.3 Leishmaniose visceral canina

### 2.3.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral canina

A LVC está entre as principais zoonoses globais, sendo responsável por doença severa e fatal nos cães. No caso da *L. (L.) infantum chagasi*, o cão é considerado o principal hospedeiro doméstico (MOLANO et al., 2003). Outros membros da família Canidae também são apontados como reservatórios: *Licalopex vetulus* (DEANE, 1956) e *Cerdocyon thous* (LAINSON & SHAW, 1987; CURI et al., 2006).

Os cães desempenham papel importante na transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* para o homem, já que preenchem as condições necessárias para serem considerados reservatórios de *L. (L.) infantum chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por possuírem alto parasitismo cutâneo, e principalmente pelo seu convívio junto ao homem (OLIVEIRA et al., 2005; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Os demais canídeos proporcionam a manutenção do ciclo silvestre da LV (ALVAR et al., 2004). *L. (L.) infantum chagasi* já foi descrita também em outros animais como o gato doméstico (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*), roedores (*Rattus rattus*; *Nectomys squamipes*; *Proechimys canicollis*) entre outros (SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Entretanto, o papel destes animais em relação à epidemiologia da LV carece de mais estudos, para determinar sua relevância no contexto da transmissão ao homem (ALVAR et al., 2004; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Os cães podem ser infectados por outras espécies de *Leishmania*, responsáveis pelas formas cutânea e mucocutânea da doença em humanos (LEMRANI et al., 2002;

DANTAS-TORRES 2007), porém, para estas espécies, os cães parecem não atuar como reservatórios (DANTAS-TORRES 2007).

## **2.4 Ciclo biológico**

A *Leishmania* é um parasito digenético, que completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros: um flebotomíneo, que abriga as formas extracelulares flageladas, as promastigotas, e um mamífero, onde as formas amastigotas intracelulares se desenvolvem (KILLICK-KENDRICK, 1999). A infecção dos vetores ocorre pela ingestão de formas amastigotas do parasito, existentes no citoplasma de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) presentes na derme do hospedeiro infectado. No intestino médio do flebótomo as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, formas móveis que se aderem ao epitélio do tubo digestivo, iniciando então o processo de multiplicação, com migração para o intestino anterior e diferenciação para as formas promastigotas metacíclicas, infectantes, que invadem a faringe do inseto. As fêmeas se tornam infectantes três a quatro dias após o repasto sanguíneo. Em nova alimentação, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são depositadas na derme do próximo hospedeiro, junto à saliva do inseto (SCHLEIN, 1993, LAINSON & RANGEL, 2005).

Lerner et al. (1991), Castro-Sousa et al. (2001) e Killick-Kendrick (2002) relatam que a saliva dos flebotomíneos exerce importante papel na transmissão de *Leishmania*, potencializando a infecção, quer seja pela sua capacidade anticoagulante, quer por conter peptídeos de grande poder vasodilatador.

## **2.5 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral canina**

A LVC se caracteriza pela sua enorme variabilidade de manifestações clínicas e dos tipos de lesões apresentadas, devido basicamente a fatores individuais relacionados ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infecção, tempo de evolução da enfermidade e aos órgãos afetados (FERRER et al., 1995). Cerca de 50% a 60% de todos os cães portadores de formas amastigotas não exibem qualquer sinal clínico da doença, e 20% destes animais apresentam parasitos na pele (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006). Alvar et al. (2004) citam que cerca de 15% dos animais infectados são capazes de se recuperar dos sinais clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente.

Durante o curso da doença pode ocorrer proliferação generalizada do parasito, colonizando órgãos linfóides e não linfóides (linfonodos, baço, medula óssea, fígado, rim, pâncreas, intestino, testículos, pulmão, olhos e articulações entre outros) e indução de reação granulomatosa com número variável de formas amastigotas (BURACCO et al., 1988). Ocorre ainda proliferação de linfócitos B, histiócitos, macrófagos, plasmócitos, resultando em linfadenopatia generalizada e algumas vezes hepatoesplenomegalia (FERRER, 2002).

Além da proliferação parasitária e celular, ocorre produção de grande quantidade de imunocomplexos que se depositam na parede dos vasos, responsáveis por processos inflamatórios degenerativos e necróticos em diversas regiões do organismo, constituindo o componente mais patogênico da enfermidade (FERRER, 2002; NOLI, 1999).

As alterações dermatológicas estão presentes na maioria dos casos e incluem excessiva descamação da epiderme, pelame seco, queda de pêlos, áreas de alopecia,

despigmentação cutânea, hiperqueratose, úlceras e nódulos intradérmicos (FERRER et al., 1992, KONTOS & KOUTINAS, 1993, FERRER, 1999, KOUTINAS et al., 1999, NOLI, 1999, FEITOSA et al., 2000, BANETH, 2006). Pode-se observar também onicogribose, associada à presença do parasito estimulando a matriz ungueal (MARZOCHI et al., 1985, FERRER et al., 1988, CIARAMELLA et al., 1997, KOUTINAS et al., 1999, BANETH, 2006) e uma mioatrofia, inicialmente nos músculos das fossas temporais, seguida, sucessivamente, pelo resto da musculatura do corpo (FERRER et al., 1988; FERRER et al., 1992; KONTOS & KOUTINAS, 1993).

Quadros de LVC podem vir acompanhados de lesões oculares como blefarconjuntivite, ceratoconjuntivite seca ou não, uveíte, conjuntivite folicular e membranosa e panoftalmite, dentre outras, que são decorrentes, principalmente, do depósito de imunocomplexos (FERRER et al., 1988). Os exames histopatológicos do trato uveal, revelam infiltrado linfohistioplasmocitário perivascular, além da observação de amastigotas. Durante a evolução da enfermidade, as primeiras estruturas oculares que se alteram são a conjuntiva e a úvea, devido a sua maior vascularização. As uveítes granulomatosas associadas à presença de amastigotas nos macrófagos, ou linfoplasmocitária de origem imunitária frequentemente são resistentes à terapia tópica e/ou sistêmica que evoluem para quadros de glaucomas e endoftalmites com consequente perda do globo ocular (ROZE, 1986, PEÑA et al., 2000).

A multiplicação dos parasitos nos macrófagos hepáticos pode causar, além da hepatomegalia, hepatite difusa crônica, que se manifesta clinicamente por vômitos, poliúria, poilidipsia, anorexia e perda de peso (FERRER, 1992; KONTOS & KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999). Existem controvérsias sobre a ocorrência de lesão hepática em cães com LV; há autores que relatam que é muito comum (KONTOS E KOUTINAS,

1993), enquanto outros reportam que o envolvimento hepático ocorre apenas em pequena porcentagem de animais (FERRER et al., 1992, CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999, COSTA VAL, 2004).

As lesões renais associadas à infecções por LV nos cães, são decorrentes do depósito de imunocomplexos nos glomérulos e por ativação do complemento, causando normalmente a morte do animal (FERRER et al., 1988).

A anorexia normalmente é observada em animais que já apresentam comprometimento renal e geralmente ocorre como resultado de azotemia crônica (KONTOS & KOUTINAS, 1993).

Alterações no baço de cães portadores de LV são bastante variáveis (COSTA VAL, 2004). Os parasitos induzem uma desorganização na estrutura celular do órgão, com hiperplasia da polpa branca e vermelha, determinando esplenomegalias em diferentes graus (CIARAMELLA et al., 1997, KOUTINAS et al., 1999, ALVAR et al., 2004, BANETH, 2006).

Cães com LV podem apresentar sinais clínicos de diáteses hemorrágicas, como petéquias, sufusões e, principalmente epistaxe (FERRER et al., 1988, CIARAMELLA et al., 1997, KOUTINAS et al., 1999). Além da ocorrência de ulcerações na cavidade nasal, que é a provável causa da epistaxe (KONTOS & KOUTINAS, 1993; KOUTINAS et al., 1999), outras causas para a ocorrência de hemorragias incluem vasculite, hiperglobulinemia, uremia, sequestro esplênico de plaquetas e, eventualmente, trombocitopenia por aplasia ou hipoplasia medular (KONTOS & KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999).

Ocorre também elevação das proteínas plasmáticas totais e na eletroforese sérica observa-se inversão da relação albumina/globulina, com aumento da fração

gama, caracterizando hipergamaglobulinemia, com diminuição da albumina em alguns casos (KEENAN et al., 1984). Segundo Noli (1999), a hipoalbuminemia pode ser devido ao comprometimento hepático, à proteinúria observada no paciente nefropata, além da desnutrição em animais com anorexia.

## 2.6 Resposta Imune

Em relação à imunidade protetora e aos processos imunopatológicos, durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, evidências experimentais indicam que aspectos inerentes tanto ao parasito quanto ao hospedeiro podem influenciar de maneira crucial nestes processos. A incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção está aparentemente relacionada a dois fatores principais: a habilidade de algumas cepas de *Leishmania* resistirem à imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, bem como o estabelecimento de um perfil de imunidade celular e humoral pelo hospedeiro vertebrado que favoreça um microambiente apropriado para a instalação do parasito no SFM (GRIMALDI & TESH, 1993). Uma observação importante referente à resposta imune na infecção por *Leishmania* é que, durante a infecção, o organismo hospedeiro fica exposto a uma série de antígenos derivados do parasito, respondendo a estes estímulos através de mecanismos múltiplos da imunidade celular e humoral.

O estabelecimento de uma resposta imune protetora ou não exige também antígenos apropriados presentes nas células, a indução e a proliferação de células T e a ativação de macrófagos eficientes no controle da infecção. As subpopulações de células T que expressam a molécula de CD4 podem ser subdivididas em linhagens Th1 e Th2, e são distinguíveis pelas citocinas produzidas e pelos efeitos imunológicos que elas comandam. As células Th1 produzem principalmente as interleucinas 2 (IL-2) e 12

(IL-12), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que pode iniciar a imunidade celular mediada e citotoxicidade. As células Th2 mediam a imunidade humoral, através da produção predominantemente das interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 e apresenta comportamento antagonista das células Th1. O tipo de resposta imune produzida (Th1 ou Th2) é determinada principalmente pelas citocinas produzidas após o encontro dos macrófagos com o antígeno (NOLI,1999, PINELLI, et al.,1999, BELKAID, 2000, DAY, 2004).

PINELLI (1997) demonstrou que linfócitos T CD8+ desempenham importante papel na imunidade protetora na LVC causada por *L. (L.) infantum chagasi*, uma vez que essas células são capazes de montar resposta do tipo Th1, através da produção de IFN- $\gamma$  além de apresentarem habilidade de lisar macrófagos infectados por este parasito. Foi observado ainda por PINELLI et al. (1994), que células de cães assintomáticos, estimuladas *in vitro*, com o antígeno solúvel do parasito, são capazes de produzir elevados níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  quando comparado às células de cães sintomáticos. Por outro lado, células de cães sintomáticos foram incapazes de produzir IFN- $\gamma$  quando cultivados na presença de antígenos do parasito, sugerindo que a suscetibilidade de cães à infecção está associada a inabilidade de ativar resposta imune do tipo Th1.

Adicionalmente a esses encontros, REIS (2001) em estudos realizados em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, observaram elevação no percentual de esplenócitos T CD8+ em culturas *in vitro* estimuladas com antígenos de *L. chagasi*, em relação a culturas controle, apenas no grupo de cães assintomáticos. Esse dado reforça a hipótese de que a habilidade do hospedeiro assintomático em recrutar células T CD8+

na presença do estímulo antigênico estaria intimamente ligada ao estabelecimento / manutenção de estado de equilíbrio com o parasito.

Outro fator importante durante o processo de infecção pela *Leishmania* é a atividade anti-*Leishmania* (efeito citostático e citotóxico) promovida pelos macrófagos por meio da produção de óxido nítrico (NO). Para a ativação dos macrófagos e consequente produção de NO são necessários dois sinais consecutivos, sendo que comumente o primeiro sinal é o IFN- $\gamma$  (DING et al., 1988, DRAPIER et al., 1988, CRAWFORD, et al., 1994). Em condições fisiológicas, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é o segundo sinal para macrófagos primados com IFN- $\gamma$  (DING et al., 1988; DRAPIER et al., 1988) e evidências indicam que componentes dos parasitos podem atuar como estímulos direto para a produção de TNF- $\alpha$  (GREEN et al., 1990). Outras citocinas, principalmente interleucina 2 (IL-2), (COX et al., 1990) podem atuar sinergisticamente com IFN- $\gamma$  para ativação de macrófagos (NUSSLER & BILLAR, 1993; OSWALD et al., 1994). Estudos realizados em modelos murinos para leishmaniose têm mostrado que a indução de óxido nítrico é um dos principais mecanismos efetores de macrófagos na eliminação da infecção por *Leishmania* (LIEW, 1990; MAUEL et al., 1991).

A resposta imune humoral (Th2), com a produção de citocinas antiinflamatórias, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), e a proliferação de células B, com a subsequente produção de anticorpos, é deletéria e não protetora (NOLI, 1999, PINELLI et al., 1999, FEITOSA et al., 2000). A atividade exuberante de linfócitos B pode gerar grande quantidade de imunocomplexos circulantes, responsáveis por quadros de vasculite, uveíte, poliatrite e glomerulonefrite (KONTOS & KOUTINAS, 1993; FERRER et al., 1995; NOLI, 1999; FEITOSA et al.,

2000). Na enfermidade natural, estão ativados tanto Th1 quanto Th2, sendo que a variedade dos sintomas e a gravidade da doença dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Solano-Gallego et al., (2000) demonstraram que a raça “Ibizian hound” desenvolve resposta predominante celular, apresentando resistência natural à doença.

Assim, acredita-se que uma intervenção vacinal que possibilite o desencadeamento de imunidade do tipo 1, com predomínio de resposta celular antígeno-específica, seja fundamental para o êxito do processo de vacinação contra a LVC.

## **2.7 Diagnóstico**

O diagnóstico acurado da LVC pode ser difícil, e só deve ser estabelecido após criterioso exame físico, e deve haver uma combinação de exames parasitológicos, sorológicos e moleculares (FERRER, 1999, ALVAR et al., 2004). Este processo representa desafio real ao clínico veterinário, pela presença de animais assintomáticos, pela diversidade da sintomatologia clínica apresentada e pela dificuldade em se obter uma prova diagnóstica que ofereça 100% de sensibilidade e especificidade (FERRER et al., 1988; NOLI, 1999).

Por tratar-se de doença de notificação compulsória no Brasil, o diagnóstico da LV deve ser feito de forma precisa, e, para isso, é importante profundo conhecimento do método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica (FERRER, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2003). Existem, basicamente, três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico da LV: as parasitológicas, para demonstração do parasito; as sorológicas, para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e as

moleculares, que se fundamentam na amplificação do DNA do parasito (FERRER, 1999).

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes, utilizando técnicas sorodiagnósticas, constitui instrumento essencial no diagnóstico da LVC (FERRER, 1999). Animais doentes desenvolvem, principalmente, resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999, FERRER, 2002). A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por pelo menos dois anos (FERRER, 2002).

A grande produção de anticorpos causada pelo parasitismo faz dos métodos sorológicos uma ferramenta importante, seja para o diagnóstico individual da infecção e da enfermidade ou na aplicação de inquéritos epidemiológicos. No entanto, estes métodos apresentam como desvantagens a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos que são prevalentes em algumas regiões (COSTA et al., 1991; GENARO, 1993; GRADONI, 2002; ALVES & BEVILACQUA, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006; FERREIRA et al.; 2007).

Diversas técnicas sorodiagnósticas são utilizadas na busca de anticorpos específicos da doença, principalmente a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA, reação de fixação de complemento, teste de aglutinação direta e Western blotting (GRADONI, 2002). Porém, todas as técnicas apresentam suas limitações, principalmente quanto à especificidade e sensibilidade (GENARO, 1991). As técnicas sorológicas recomendadas atualmente no Brasil, pelo Ministério da Saúde, para o inquérito canino são a RIFI e o ELISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006).

A RIFI é considerada “padrão ouro” entre os pesquisadores europeus, principalmente porque, a princípio, nos países do Mediterrâneo, não há preocupação

com reações cruzadas, contrariamente aos países do Novo Mundo (GRADONI, 2002). Sua especificidade é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi*, LTA (COSTA et al., 1991; ALVES & BEVILACQUA, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006) e *Ehrlichia canis* (FERREIRA et al., 2007), mas ainda assim é amplamente utilizado em levantamentos epidemiológicos visando a detecção da infecção em cães (COSTA et al., 1991; GENARO, 1991).

Alves e Bevilacqua (2004), baseados em dados de inquéritos sorológicos caninos realizados na cidade de Belo Horizonte (MG), no período de 1993 a 1997, concluíram que, de acordo com os valores preditivos positivos e negativos da RIFI, (14,5% e 99,5%, respectivamente), dos 15.117 cães identificados como positivos, de um total de 415.683 cães examinados pela RIFI, 12.925 seriam falso-positivos. E, dentre os 400.566 identificados como negativos, 2003 seriam, na verdade, falso-negativos. Neste trabalho, os pesquisadores concluem que há elevada confiança no resultado negativo de um animal, não sendo verdade tal assertiva para um cão que apresente exame com resultado positivo pela RIFI, já que o número de resultados falso-positivos foi muito mais elevado do que o número de resultados falso-negativos.

O ELISA, introduzido por Hommel et al. (1978), é uma metodologia que permite a realização de grande número de exames em curto espaço de tempo, apresentando alta sensibilidade. Estudos em áreas endêmicas demonstraram maior sensibilidade deste método em relação à RIFI, quando utilizado soro e sangue total de cães, coletados em papel de filtro (EVANS et al., 1990; OLIVEIRA et al, 2005).

Segundo Gontijo e Melo (2004), o ELISA caracteriza-se por apresentar algumas vantagens, como a sensibilidade mais elevada, permitir a detecção de baixos títulos de anticorpos; rapidez; fácil execução e leitura. Os antígenos utilizados são

tradicionalmente derivados de culturas *in vitro* de promastigotas e consistem em um repertório de pelo menos 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície (TAVARES et al., 2003).

De forma semelhante ao que ocorre na RIFI, reações cruzadas com espécimes pertencentes à mesma família ou com microorganismos filogeneticamente distantes podem ocorrer (TAVARES et al., 2003; ROSÁRIO et al., 2005, FERREIRA et al., 2007).

Paranhos-Silva et al. (1996) num inquérito epidemiológico canino, envolvendo 148 amostras, 46 positivas e 102 negativas, compararam as técnicas RIFI e ELISA quanto à sensibilidade e à especificidade, os melhores resultados foram obtidos com o ELISA, que apresentou 78% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Almeida et al. (2005) em estudo realizado nos Estados da Bahia e Pernambuco, em áreas endêmicas de LVC, avaliaram a sorologia de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* utilizando-se RIFI e ELISA. Considerando os sinais clínicos de LV, os cães foram agrupados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, além de um grupo controle negativo. Ao final do estudo os resultados indicaram reduzida sensibilidade e elevada especificidade da RIFI (83 e 100%) quando comparadas aos do ELISA (94 e 90%). Os autores concluíram que os anticorpos IgG anti-*Leishmania* foram detectados em todos os animais pertencentes aos grupos sintomáticos e oligossintomáticos utilizando os dois testes simultaneamente, indicando a necessidade de se utilizar dois diferentes testes sorológicos no diagnóstico da LVC.

O fato das técnicas sorológicas convencionais utilizarem antígenos brutos, formas completas de promastigotas ou amastigotas ou extratos solúveis destes, limita consideravelmente sua especificidade (ALVAR et al., 2004). Desta forma, ênfase tem sido dada na caracterização de componentes antigênicos da *Leishmania*, antígenos

purificados e recombinantes, como ferramenta para obtenção de um diagnóstico mais específico (TAVARES et al., 2003).

Considerando isto, uma questão relevante na execução do ELISA consiste na especificidade do antígeno utilizado no ensaio. Sabe-se que alguns podem estar estreitamente relacionados a outros parasitos. A proteína de superfície gp63 está presente em todas as espécies do gênero *Leishmania* e outros parasitos da Família Trypanosomatidae. Da mesma forma, a crescente distribuição geográfica da LV, LTA e Doença de Chagas incrementam os problemas relativos à especificidade dos ensaios imunodiagnósticos (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 1995).

Considerando a necessidade da caracterização de antígenos espécie específicos para acurado diagnóstico e prognóstico da LV, Palatnik-de-Souza et al. (1995) avaliaram o complexo glicoprotéico de superfície (FML) de formas promastigotas de *L. donovani* na realização do ELISA. Os resultados obtidos mostraram sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico do calazar em pacientes infectados por *L. chagasi*. Não foi observada reação cruzada com pacientes que apresentavam LTA ou Doença de Chagas e em 20% dos pacientes aparentemente saudáveis, com valores positivos para o ELISA-FML, ocorreu o desenvolvimento da LV durante os meses subseqüentes.

Em estudo posterior, Borja-Cabrera et al. (1999) avaliaram o potencial diagnóstico e prognóstico do ELISA-FML em cães com LV. Avaliou-se a sorologia de animais naturalmente e experimentalmente infectados com *L. chagasi*, vacinados com a vacina-FML e portadores de outras infecções. Outras técnicas diagnósticas foram empregadas como a RIFI com promastigotas de *L. chagasi* e *L. mexicana* e o ELISA utilizando o antígeno solúvel de *L. mexicana*. Os resultados revelaram que não houve

reatividade com o soro de cães portadores de outras patologias, indicando que o ELISA-FML pode ser usada no diagnóstico da LVC. Outros resultados revelaram elevada sensibilidade do ELISA-FML comparada com a RIFI na detecção de anticorpos em soros de cães assintomáticos.

Nos estudos sobre a vacina FML (Leishmune®) o método FML ELISA foi utilizado para a mensuração da resposta imune humoral específica (Palatnik-de-Sousa et al., 1994; Paraguai de Sousa et al., 2001; Da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002; Santos et al., 2002; Mendes et al. 2003) e avaliar a soropositividade nos infectados (Borja-Cabrera et al., 1999). Este ELISA utiliza como antígeno o FML, mesma glicoproteína da vacina, e por este motivo identifica os anticorpos específicos anti-FML induzidos pela vacinação. Desenvolvido pela mesma pesquisadora que desenvolveu a vacina, o ELISA FML só está disponível para uso na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Departamento de Controle de Qualidade da Leishmune®, no laboratório Fort Dodge Saúde Animal, para os testes de controle de qualidade da vacina.

Atualmente, no Brasil, somente os kits ELISA produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e pelo laboratório Biogene, e o método RIFI, produzido pelo Instituto Bio-Manguinhos, estão devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo, portanto, os únicos testes sorológicos oficialmente aceitos para o diagnóstico da LVC.

Os kits ELISA e RIFI produzidos pelo Instituto Bio-Manguinhos, possuem antígenos de *Leishmania major*-like, e o kit ELISA S7, produzido pelo laboratório Biogene, utiliza a proteína recombinante HSP70 como antígeno (fragmento S7 da HSP 70 de *L. chagasi*) (ANDRADE & ANDRADE, 1995).

O ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like são os testes utilizados nos inquéritos epidemiológicos oficiais, e, de acordo com o fabricante, apresentam especificidade e sensibilidade de 91,7% e 94,7% para ELISA *L. major*-like e 80% e 90% para RIFI *L. major*-like. O kit ELISA S7, utilizado pelos laboratórios particulares de todo o Brasil, apresenta uma especificidade de 94,3% e sensibilidade de 89%, de acordo com o fabricante.

Os exames parasitológicos são fundamentados na demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de aspirados de medula óssea e linfonodos, e por aposição de fragmentos de pele ou outros tecidos, ou indiretamente pelo isolamento do parasito em meio de cultura, a partir de formas amastigotas presentes nestes materiais (GRADONI, 2002, ALVAR et al., 2004).

A visualização de formas amastigotas em esfregaços a partir de punção aspirativa de linfonodo ou medula óssea representa o método de eleição para o diagnóstico de uma infecção estabelecida e disseminada na LVC, com 100% de especificidade. Entretanto, a sensibilidade do exame microscópio pode ser baixa, pois depende basicamente da coleta, do profissional e principalmente da amostra obtida, que pode apresentar baixa densidade populacional de parasitos (GRADONI, 2002). O isolamento destes materiais em meio de cultura apropriado para o crescimento de *Leishmania* é capaz de aumentar a sensibilidade destes testes em cerca de 20%. Estes exames permitem, diante da positividade, o diagnóstico de certeza da infecção (ALVAR et al., 2004).

O exame histopatológico, de fragmentos da pele e linfonodos, pode ser usado como método de diagnóstico, mas deve-se ter em mente que o infiltrado inflamatório encontrado não é específico de LVC e que apenas o encontro das formas amastigotas

fornece o diagnóstico de positividade (COSTA VAL, 2004). As técnicas de imunohistoquímica podem melhorar os problemas relacionados à evidência do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com maior sensibilidade e especificidade as formas amastigotas nos cortes de tecidos (TAFURI et al., 2004).

O diagnóstico molecular realizado, sobretudo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), baseia-se na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno. Este teste é altamente sensível e específico para *Leishmania*, e apresenta como vantagem sua realização em grande variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele, urina, dentre outros (ALVAR et al., 2002), entretanto, sua limitação para uso em inquéritos epidemiológicos se baseia no custo, disponibilidade de reagentes, equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo (ALVES & BEVILACQUA, 2004). De acordo com Assis et al., (2010), o método PCR deve ser analisado com cautela nas campanhas epidemiológicas, pois detecta apenas o DNA do parasito no sangue e tecidos dos cães, diferentemente do exame parasitológico, que detecta o parasito intacto nos tecidos. Desta forma, um animal com resultado positivo no PCR não significa necessariamente um animal doente.

## **2.8 Tratamento**

Na terapia da LVC são utilizados os mesmos fármacos aplicados ao tratamento da LV humana, desde a primeira metade do século 20, variando sua posologia e via de administração (ALVAR et al., 2004). Os derivados antimoniais são os fármacos de

escolha, e suas limitações incluem toxicidade, resistência parasitária, e alto custo (BANETH, 2002).

Os antimoniais bloqueiam o metabolismo parasitário através da inibição seletiva das enzimas leishmaniais que são necessárias para a atividade glicolítica e da via oxidativa dos ácidos graxos, com consequente inibição da síntese de ATP e da replicação do seu DNA (TASSI, et al., 1994; FERRER et al., 1995; NOLI, 1999; BANETH, 2002).

De acordo com Ferrer et al. (1995), o uso do antimoniato de N-metil glucamina por via subcutânea ou intravenosa durante 30 dias, associado ao uso do alopurinol como terapêutica de cães infectados, promoveu a recuperação clínica e imunológica, porém, em alguns animais não ocorreu à eliminação total do parasito.

Em estudo recente, João et al. (2006) demonstraram que houve melhora no quadro clínico em cães tratados com antimoniato sozinho ou em combinação com alopurinol, além da redução ou eliminação completa dos parasitos da pele, concluindo que este protocolo seria capaz de diminuir a infectividade aos flebotomíneos e como consequência a transmissão da *Leishmania*.

A alta toxicidade atribuída aos antimoniais parece não ser importante no tratamento canino, pois os poucos efeitos adversos, quando produzidos, são normalmente reversíveis e em raras ocasiões é recomendada a suspensão do tratamento. Os principais efeitos adversos são: mialgias e artralguas, diarreias, vômitos, náuseas, dor abdominal e anorexia. Pode ocorrer dor no local da aplicação, abscessos e fibrose (NIETO et al., 2005).

No Brasil, desde fevereiro de 2004, o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®, Rhône Mérieux, Lyon, França) tem sua distribuição e uso restrito ao serviço público de

saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado para o tratamento da LVC (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006).

A anfotericina b (Fungizone®, Bristol-Myers Squibb, EUA) considerado fármaco de segunda linha para o tratamento da LVC, é um antibiótico da classe dos polienos produzido a partir do *Streptomyces nodosus*. É primariamente um fármaco fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania spp.* (LEMKE et al., 2005; BANETH, 2006).

O mecanismo de ação da anfotericina b está baseado na ligação do fármaco ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania*. Nos mamíferos, a anfotericina b se liga ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos do fármaco nestes. A ligação ao ergosterol provoca desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasito por lise osmótica (LEMKE et al., 2005; NIETO et al., 2005; BANETH, 2006).

Os possíveis efeitos adversos estão relacionados com a dose utilizada, sendo que a nefrotoxicidade é a principal expressão tóxica da anfotericina b. Durante o tratamento da LVC, o fármaco provoca a diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina, e diminuição do *clearance* de creatinina. Também ocorre diminuição na osmolaridade da urina (NIETO et al., 2005).

Durante a terapia prolongada, alguns animais podem ainda apresentar náuseas, vômitos, diarréia, flebites localizadas, febres, tremores, além de alterações hepáticas como icterícia (VALLADARES, et al., 1997; LAMOTHE, 2001).

MALIK et al., 1996 demonstraram que a administração da anfotericina b na forma livre, por via subcutânea de forma lenta, diluída em solução de dextrose a 5%, reduziu a

nefrotoxicidade sem interferir na eficácia. Outros autores também verificaram a importância da diluição com solução de dextrose à 5% via intravenosa, para reduzir os efeitos colaterais (NOLI, 1999; LAMOTHE, 2001)

O fármaco encapsulado em lipossomas surge como alternativa de tratamento, uma vez que o princípio ativo fica protegido de eliminação e/ou degradação rápida *in vivo*. A liberação lenta no interior da célula alvo proporciona a redução da concentração do fármaco quando comparado à forma livre e, o aumento da biodisponibilidade potencializa a ação e reduz os efeitos secundários indesejáveis (VALLADARES, et al., 2001; ALVAR et al., 2004; NIETO et al., 2005; BANETH, 2006).

Outro fármaco utilizado em associação com antimoniais e anfotericina b no tratamento da LVC é o alopurinol, que é análogo da purina e seu mecanismo de ação está relacionado com a síntese protéica. Segundo NOLI, (1999), as leishmanias não são capazes de sintetizar purinas, necessitando dos hospedeiros, portanto atua no RNA parasitário, incorporando-o e estimulando a síntese de proteínas anormais, exercendo importante efeito leishmanioestático.

Utilizada na dose de 10 a 20 mg/kg/v.o./BID, não apresenta efeitos colaterais, é de fácil administração, proporciona melhora clínica evidente e pode ser utilizada por um período de tempo indeterminado, com vantagens devido ao baixo custo e por não representar risco de resistência parasitária (LAMOTHE 2001). Como desvantagens são citadas a interrupção do tratamento por parte do proprietário após a melhora clínica e a pouca efetividade quando utilizada de maneira isolada (LAMOTHE, 2001).

A miltefosina atua no metabolismo de lipídeos, com atividade sobre a membrana de *Leishmania*, e acumula-se em macrófagos, sendo diretamente tóxica para o parasito. Este composto induz *in vitro* a ativação de macrófagos e células T, que

produzem interferon gama, citocina associada ao controle da infecção. Este fármaco é efetivo para o tratamento de humanos e de animais experimentais (BANETH & SHAW, 2002; NIETO et al., 2005).

Recente pesquisa avaliou a eficácia da miltefosina no tratamento de cães naturalmente infectados por *L. infantum* na França e Espanha. O fármaco foi administrado na dose de 2mg/kg, uma vez ao dia, por via oral, durante 28 dias. Os autores concluíram que este fármaco demonstrou, em resultados preliminares, maior eficácia e segurança, além de poucos efeitos colaterais, quando comparada ao tratamento com antimoniato de meglumina. A cura parasitológica neste estudo foi de 93,9%. A facilidade de administração e a eficácia da miltefosina demonstradas neste estudo indicam que esta é um fármaco promissor para o tratamento da LVC. Os principais efeitos colaterais relacionados com o uso da miltefosina são distúrbios gastrointestinais transitórios, sendo recomendado sua administração junto a ingestão de alimentos (MIRÓ et al., 2005; NIETO et al., 2005).

A utilização de imunossupressores, em especial os glicocorticóides, na terapia da leishmaniose tem sido amparada com objetivo de deprimir a imunidade humoral através da redução na produção de anticorpos e restringir os efeitos causados pelo depósito de imunocomplexos nos órgãos e tecidos (DENEROLLE, 1996). NOLI, (1999); descreveu o uso de prednisolona na dose diária de 1 mg/kg em associação ao allopurinol quando o uso do antimoniato ou anfotericina b está contra indicado em cães com insuficiência renal.

Trabalhos recentes demonstraram a ação imunoterapêutica da vacina FML (Leishmune®) em cães com LVC, quando utilizada com o dobro da concentração de saponina (1mg de saponina) (BORJA-CABRERA et al., 2004; SANTOS et al., 2007,

BORJA-CABRERA et al., 2010). Ribeiro et al., 2009 acompanharam durante dois anos oito cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e tratados somente com a Leishmune® em concentração dupla (duas doses, aplicadas três vezes com intervalo de 21 dias entre as aplicações, mais reforços semestrais). Ao final de dois anos, todos os cães estavam assintomáticos, com imunohistoquímica de pele negativa e com a fração albumina/globulina acima de 0,6. Os autores concluíram que a Leishmune® em concentração dupla pode ser considerada eficaz para o tratamento da LVC, como um agente único ou em combinação com outros fármacos.

A opção pelo tratamento de um cão deve considerar parâmetros ligados à condição clínica do paciente e a participação consciente do proprietário, que somados irão determinar os critérios de tratamento e sua viabilidade (MIRÓ, 2005).

O médico veterinário só deve iniciar o tratamento após a avaliação clínica, e de posse de detalhado perfil laboratorial do paciente, que inclui confirmação do diagnóstico sorológico e determinação do título final de positividade da RIFI, necessário ao acompanhamento da resposta ao tratamento; da presença do parasito em amostras de pele, de linfonodos, ou de medula óssea; hemograma completo, perfil renal, hepático e eletroforético das proteínas séricas; além da identificação e tratamento prévio de infecções concomitantes (RIBEIRO & MICHALICK, 2001; MIRÓ, 2005; NIETO et al., 2005).

O significado do termo tratamento bem sucedido para a LVC é dependente da ótica dos autores envolvidos com o diagnóstico e tratamento da LVC. Para o proprietário e para o clínico veterinário, o sucesso do tratamento se dá a partir da remissão dos sinais e melhoria da condição clínica apresentada pelo animal. Para os parasitologistas, a cura significa completa eliminação do parasito do hospedeiro,

enquanto que para os entomologistas, órgãos de saúde pública e epidemiologistas, a incapacidade do animal em transmitir o parasito aos insetos vetores (quebrando o ciclo de transmissão) é suficiente para considerar o tratamento como sucesso (BANETH & SHAW, 2002).

Alguns autores sugerem que os cães tratados para LV, que permanecem assintomáticos pós tratamento, apresentam menor quantidade de parasitos na pele do que aqueles sintomáticos sejam estes tratados ou não. Sugerem também que o tratamento para LVC poderia ser considerado como uma medida profilática no controle da doença (ALVAR et al., 1994; MIRÓ et al., 2005; JOÃO et al., 2006; RIBEIRO, 2006).

Apesar do avanço nas pesquisas sobre o tratamento canino, no Brasil, a Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008 proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Desde esta data, os veterinários estão impedidos de tratar os cães, sejam eles sintomáticos ou assintomáticos, já que não existe, até o momento, um fármaco registrado no MAPA para o tratamento canino. A seguir, alguns trechos da portaria em vigor:

Considerando que não há, até o momento, nenhum fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão;

Considerando a existência de risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios e fonte de infecção para o vetor e que não há evidências científicas da redução ou interrupção da transmissão;

Considerando a existência de risco de indução a seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos; e

Considerando que não existem medidas de eficácia comprovada que garantam a não-infectividade do cão em tratamento, resolvem:

Art. 1º - Proibir, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## **2.9 Medidas de controle da LV**

Fundamentado na concepção de transmissão da LV, o Programa Brasileiro de Controle da leishmaniose visceral baseia sua estratégia em três medidas: detecção precoce e tratamento dos casos humanos, controle de vetores e controle dos reservatórios domésticos, através da eliminação de cães soropositivos. Estas estratégias de controle permanecem inalteradas desde 1950 (DEANE, 1956) e não estão sendo capazes de reduzir a incidência de casos humanos a um nível aceitável (BRAGA et al., 1998; COSTA & VIEIRA, 2001). Foi observado aumento do número de casos humanos nas últimas duas décadas, com um total de 51.222 casos oficialmente reportados no Brasil entre 1980 e 2003 (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2005), tornando-se sério problema de saúde pública em diversas regiões do país.

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2006), a eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou com resultado parasitológico positivo. Ainda segundo o manual, a confirmação do exame parasitológico canino se faz obrigatória somente nas áreas sem casos humanos, nas demais áreas, em cães sororreagentes deve-se proceder a eutanásia (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006).

Apesar da eutanásia de cães soropositivos ser uma medida de controle recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a própria entidade reconhece que existem cães de grande valor afetivo e econômico, e, por isso, não podem ser indiscriminadamente eliminados. Atualmente esta prática não é universalmente aceita devido a questões éticas (GRAMICCIA & GRADONI, 2005) e ao baixo impacto em situações de transmissão permanente. É o ponto mais controverso do programa, não apenas pela falta de consenso entre os pesquisadores, mas também pela oposição dos proprietários de cães, clínicos veterinários e organizações protetoras de animais (DYE, 1996; LAINSON E RANGEL, 2005, DANTAS-TORRES E BRANDÃO-FILHO, 2006). Foi observado que o momento da busca do cão para a eutanásia é carregado de forte componente emocional, fazendo com que muitos proprietários de cães não aceitem esta estratégia de controle. Diferentes estudos demonstraram que a eliminação de cães apresenta um impacto limitado no controle da LV humana, pois a reposição de cães ocorre com grande frequência, e um cão susceptível introduzido na população contribui para a manutenção da doença (DIETZE, 1997, ASHFORD et al., 1998, BRAGA et al, 1998, COURTENAY, 2002, NUNES et al., 2008).

A OMS reconhece que a eutanásia dos cães infectados, na maioria dos países, se reserva cada vez mais para casos especiais, pois a maioria dos veterinários prefere administrar um tratamento anti leishmaniótico, acompanhando atentamente as recaídas (WHO, 1990).

Muitos pontos devem ser considerados sobre a eliminação de cães soropositivos: a limitação dos inquéritos sorológicos em detectar anticorpos anti-*Leishmania*, quer com RIFI quer com ELISA, a demora entre a detecção da positividade e a retirada do cão, a oposição dos proprietários de cães em eutanasiar animais

assintomáticos, a rápida reposição dos cães (NUNES et al., 2008) e a falta de evidências de que esta medida é efetiva em reduzir a incidência da LV nas áreas onde foi realizada (COSTA et al. , 2002, MOREIRA et al., 2004). Modelos matemáticos também demonstraram as limitações desta estratégia (COURTENAY, 2002), que parece ser menos efetiva do que o controle do vetor e vacinação canina (TESH, 1995, DYE, 1996).

Segundo Dietze et al. (1997), entre os anos de 1990 e 1994, quase cinco milhões de cães foram submetidos a exames sorológicos e mais de 80.000 animais eutanasiados no Brasil, entretanto, a doença humana aumentou em quase 100% no mesmo período.

Queiroz et al. (2004) demonstraram que programas de eliminação canina não reduzem a incidência da infecção canina por *Leishmania*. A partir do acompanhamento de um grupo de cães de área urbana do Brasil entre 1997 e 2003, os autores observaram que, apesar da realização da eutanásia dos cães soropositivos neste período, muitos cães imigraram para a área do estudo durante o período estudado. Estes novos cães substituíram a maior parte dos eliminados. Mais importante foi o fato de que 15% dos novos cães já eram infectados pela *Leishmania*. Este estudo não só demonstrou a ineficiência dos programas de eliminação canina, mas também a necessidade de novas estratégias para o controle da doença

Em vista do citado, faz-se necessário o estabelecimento de novas estratégias para o controle da LV. Todo método adicional para o controle da LV é bem vindo, devido à complexidade da doença. Miró (2005) acredita que, sempre que possível, todos os cães com LV devem ser tratados, tendo em vista a diminuição da carga parasitária e da infecciosidade aos flebotomíneos obtidas pelo tratamento, o que

refletiria positivamente na epidemiologia da doença canina e humana. Como no Brasil o tratamento canino é proibido, ferramentas imunoproláticas podem apresentar uma importante contribuição para o controle desta enfermidade (Araújo et al., 2009), já que a vacinação canina foi apontada, através de um modelo matemático (Dye, 1996), como o mais potente fator para redução da LV humana e canina.

Atualmente, as medidas profiláticas disponíveis para cães são as coleiras impregnadas com deltametrina, piretróides de uso tópico e repelentes naturais como citronela e Neen, além de vacinas, no Brasil.

## **2.10 Desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral**

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a LV foi recomendado pela OMS como uma importante ferramenta no controle da LVC, assim como para efetiva erradicação da doença (COURTENAY et al., 2002). Muitas candidatas a vacinas caninas contra *L. (L.) infantum chagasi* foram propostas, incluindo vacinas a partir de *Leishmania* viva/ morta (primeira geração), de antígeno purificado ou recombinantes (segunda geração), às de DNA (terceira geração) (DANTAS-TORRES, 2006b). Até o momento, as únicas que chegaram ao mercado foram as de segunda geração.

A OMS também estabeleceu quatro fases de experimentação para o desenvolvimento de vacina. A Fase I caracteriza-se por estudos de segurança e imunogenicidade da formulação da vacina. Nesta não há desafio infectante nos indivíduos vacinados, o que ocorre na Fase IIa, na qual os indivíduos vacinados recebem desafio experimental. As Fases IIb e III são compostas de estudos que analisam a eficácia da vacina a campo, com indivíduos expostos ao desafio natural. Estes testes são de média escala (centenas) e aplicados a um grupo vacinado e a um

grupo controle. Finalmente, a Fase IV na qual estudos, em larga escala, são realizados após o registro da vacina com indivíduos vacinados e expostos ao desafio natural (WHO, 1997).

Apesar da intensificação nas pesquisas para uma vacina eficaz contra a LVC, apenas duas vacinas de segunda geração concluíram os estudos a campo de Fase III: a vacina FML e a vacina LÆSAp (LEMESTRE et al, 2007), sendo que esta última, apesar de ter concluído o estudo de Fase III no sul da França, não está disponível comercialmente. Uma vacina, de segunda geração, constituída da proteína recombinante A2 está comercialmente disponível no Brasil (Leish-Tec®), apesar de não ter estudo de fase III publicado.

A vacina FML, após concluir os estudos de Fase III, foi devidamente registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2003, e tornou-se comercialmente disponível sob o nome Leishmune® como a primeira vacina registrada contra a LVC no mundo. A Leishmune® foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Dra. Clarissa Palatnik de Sousa, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Composta por uma fração purificada chamada fucose mannose ligand (FML), isolada de promastigotas da *L. donovani*, trata-se de um complexo que inibe fortemente a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de forma espécie específica (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1989; PALATNIK de SOUSA et al., 1993). O FML está presente na superfície da *Leishmania* durante todo seu ciclo e é comum a todas as Leishmanias do complexo *donovani*, ou seja, é específico para as espécies que causam LV. Utiliza como adjuvante de imunidade a saponina, que por sua vez é um potente adjuvante com capacidade de estimular a resposta imune ao

antígeno, promovendo aumento na síntese de várias citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL2, IL-12 e TNF (COX & COUTER, 1997). A vacina comprovou ser segura e altamente imunogênica para cães (DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002).

Nos estudos realizados com a Leishmune®, a avaliação de parâmetros sanguíneos como contagem de linfócitos CD4+, CD8+ e CD21+, além da intradermorreação (IDR), foram utilizados para comprovar a resposta imune celular (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1994; PARAGUAI DE SOUSA et al., 2001; DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002; SANTOS et al., 2002; ARAÚJO et al., 2008;).

O método ELISA-FML, cujo antígeno é a mesma glicoproteína da vacina, foi utilizado para a mensuração da resposta imune humoral (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1994; PARAGUAI DE SOUSA et al., 2001; DA SILVA et al., 2001; BORJA-CABRERA et al., 2002; SANTOS et al., 2002; MENDES et al., 2003).

Os estudos de Fase III a campo com a Leishmune® demonstraram eficácia de 76 a 80%, com proteção de 92 a 95%, destacando a longa duração e a forte ação imunoproliférica contra a LVC. A imunogenicidade da Leishmune® foi demonstrada pela sua habilidade de disparar resposta imune humoral específica e uma potente resposta celular protetora, comprovadas pela alta soropositividade anti-FML, além de reação de intradermorreação positiva mesmo após três anos e meio da vacinação (BORJA-CABRERA et al., 2002).

A eficácia vacinal é influenciada por inúmeros fatores, como o ambiente, idade do indivíduo, condições sanitárias da população, densidade populacional e prevalência de infecções. O resultado da eficácia vacinal é diretamente afetada pela cobertura vacinal, que deve ter uma abrangência, preferencialmente, maior do que 95% população. Um exemplo da interferência da idade na eficácia vacinal foi observado por

Talley & Salama (2003), que, ao vacinarem crianças de nove a 36 meses contra o sarampo, na Etiópia, observaram eficácia vacinal de 66,9%. Porém, a eficácia foi de 85% quando foi avaliado um grupo de crianças entre 9 e 12 meses e de 95% quando a idade analisada foi de 12 meses a 5 anos. Eficácias inferiores a 70% foram observadas em diversas vacinas, como relatado por Grassly et al. (2007), que avaliaram a eficácia da vacina monovalente (mOPV1) contra a poliomielite tipo I na Índia, com resultados de 30% de eficácia. Quando usada a vacina trivalente oral contra a poliomielite pelos mesmos autores, a eficácia vacinal foi de 11%. Hallander & Gustafsson (2009), testaram duas fórmulas de vacina tríplice na Suécia, contra a difteria/ tétano/ coqueluche, a DTaP1 composta de toxóides inativados por formaldeído e a DTaP2, contendo, além de toxóides inativados, hemaglutininas filamentosas (FHA). As eficácias vacinais observadas foram de 75% e 81%, respectivamente. Esses resultados foram obtidos com uma cobertura vacinal de 98-99% da população.

Além da eficácia e proteção demonstradas pela Leishmune®, foi observado por Nogueira et al. (2005) que os cães vacinados não são infectantes para o vetor, demonstrado pela completa ausência de sinais clínicos e de parasitos na pele, linfonodos e sangue. Por outro lado, os controles não vacinados apresentaram manifestações clínicas (25%), e parasitos nos linfonodos (56,7%), PCR de sangue positivo (15,7%) e reação de imunohistoquímica de pele positiva (25%).

Saraiva et al. (2006) demonstraram a habilidade da Leishmune® para inibir formas amastigotas de *L. donovani* e *L. chagasi* de se ligarem no sistema digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, abrindo uma nova perspectiva para o controle da LVC, inclusive, alcançando impacto na diminuição da transmissão da LV humana (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2009).

BORJA CABRERA et al. (2008), em estudo sobre a Leishmune® com 550 cães soronegativos de áreas endêmicas demonstraram 99% de sobreviventes saudáveis, no final do segundo ano, entre os cães vacinados, comparado com 61% de sobreviventes ( $p < 0,001$ ) monitorados no grupo controle. A Leishmune® está sendo utilizada há cinco anos no Brasil, e os resultados de campo mostram média de proteção de 97% (comunicação pessoal Ingrid Menz, gerente técnica Fort Dodge Saúde Animal). Esta vacina tem demonstrado ser segura, protetora e imunogênica para cães, além de ser capaz de bloquear a transmissão (NOGUEIRA et al., 2005; SARAIVA et al., 2006) e ser efetiva na imunoterapia da LVC (SANTOS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009).

Apesar da proteção conferida pela vacina, a necessidade de três doses iniciais no esquema de vacinação com a Leishmune®, com intervalo de 21 dias entre elas, mais reforços anuais, o custo, e a utilização da saponina como adjuvante de imunidade, responsável por dor local em aproximadamente 14% dos cães de raças de pequeno porte (PARRA et al., 2007), ainda são considerados fatores limitantes para sua utilização. Não obstante, a impossibilidade de diferenciação sorológica entre cães vacinados e cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* é considerado o maior entrave ao uso da vacina em grande escala. Embora devidamente registrada no MAPA, o Ministério da Saúde não recomenda o uso da Leishmune® como medida de controle da LV, por não existir constatação de seu custo-benefício e efetividade para o controle do reservatório da LVC em programas de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006).

### 3. Justificativa

A leishmaniose é uma doença de notificação obrigatória de acordo com a legislação brasileira, e é regida pelo decreto do Senado Federal número 51.838, de 14 de março de 1963, que a considera endemia rural. Com o passar dos anos e o surgimento de casos de leishmaniose em áreas urbanas, a doença foi inserida no contexto das legislações estaduais e municipais sobre zoonoses, definindo-se que os animais soropositivos, além dos doentes, devem ser eutanasiados.

No Brasil, o constrangimento provocado por essa medida é relatado por profissionais ligados ao setor público e responsáveis pelo controle da LV quando da busca do cão sorologicamente positivo, nem sempre sintomático, para eliminação. São crescentes as ocorrências de recusa em entregar o animal, o que, conseqüentemente, mantém a cadeia de transmissão (MESLIN et al., 2000, FEIJÃO et al., 2001). A ausência de alternativas, como o tratamento dos cães infectados, leva muitos proprietários a remover seus animais para outros ambientes, às vezes não atingidos pela doença, gerando, dessa forma, foco de dispersão do agente (ARIAS et al., 1996). Soma-se a esses fatos a inexistência de programas de controle permanentes e eficazes do cão vadio, que perambula pelos centros urbanos e representa fonte potencial de disseminação de *Leishmania* e de outros agentes zoonóticos (RIBEIRO & MICHALICK, 2001).

Importante estudo de modelagem matemática indica que a eutanásia de cães soropositivos deveria ser, em escala de importância, a terceira medida adotada, e que o controle dos flebotomíneos e a vacinação canina constituiriam ferramenta útil na redução da incidência da doença em humanos (DYE, 1996). Trabalhos realizados no

Brasil concluem que a retirada de cães soropositivos não foi eficaz na diminuição da força de transmissão entre os animais; e, de acordo com estudos controlados, a propagação do calazar não foi afetada pela exclusiva eliminação de cães soropositivos (DIETZE et al., 1997, BRAGA et al., 1998; ASHFORD et al., 1998, COURTENAY, 2002).

Desde que a vacina Leishmune® tornou-se disponível, em 2004, os médicos veterinários do Brasil têm a disposição mais uma ferramenta contra a LVC. Porém, o maior entrave ao seu uso em larga escala foi a dúvida sobre a possibilidade de diferenciação sorológica entre cães vacinados e cães doentes através dos métodos utilizados nos inquéritos caninos oficiais (ELISA e RIFI *L. major*-like) .

A presença de anticorpos contra o antígeno vacinal (Ac específicos anti-FML) em cães imunizados (BORJA-CABRERA et al., 1999) abriu caminho para a hipótese de que estes anticorpos também pudessem ser identificados pelos antígenos presentes nos extratos complexos usados nos ensaios sorológicos oficiais, produzindo reações falso-positivas.

Atualmente, no Brasil, somente os kits ELISA produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e pelo laboratório Biogene, e o método RIFI, produzido pelo Instituto Bio-Manguinhos, estão devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo, portanto, os únicos testes sorológicos oficialmente aceitos para o diagnóstico da LVC.

Caso a suspeita de que os *kits* ELISA e RIFI disponíveis no Brasil e devidamente registrados no MAPA não identifiquem anticorpos de cães vacinados, um grande obstáculo ao uso da vacina em cães será superado.

Os resultados não efetivos obtidos no controle da LV, associados ao caráter descontínuo das políticas de saúde, têm suscitado debates nos órgãos responsáveis pelo controle da doença.

Por todas estas explicações, novos estudos para o aprimoramento dos métodos diagnósticos e possibilidade de uso da vacina em larga escala devem evoluir, a fim de proporcionar nova visão sobre essa importante doença no cenário brasileiro, mas infelizmente ainda considerada “negligenciada”, como tantas outras parasitoses.

#### **4. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi verificar se os dois ensaios oficiais (ELISA e RIFI com *L. major*-like) e o ELISA S7, são capazes de diferenciar cães vacinados com Leishmune® de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* e avaliar a concordância entre eles.

Além disso, utilizando os mesmos soros, o FML-ELISA também foi utilizado, para verificar se os soros de animais infectados e de animais vacinados seriam positivos, uma vez que os trabalhos publicados sobre a vacina Leishmune® utilizaram este método como forma de mensuração da resposta imune humoral.

## 5. Material e Métodos

### 5.1 Área do estudo

Os cães que participaram deste estudo eram residentes das cidades de Andradina (20°53'46''S, 51°22'46''W), Bauru (22°18'53''S, 49°03'38''W) e Dracena (21°28'57''S), Estado São Paulo.



### 5.2 Grupos

Para este estudo foram selecionados cães que frequentavam regularmente clínicas veterinárias, sendo todos os cães domiciliados, para se aproximar ao máximo da realidade das áreas endêmicas. Foram selecionados cães com esquema completo de vacinação com a Leishmune®, realizado pelos veterinários responsáveis e

acompanhados regularmente por estes veterinários para certificação de seu *status* clínico. Foram selecionados também cães positivos para LVC, situação comprovada através de exames clínicos e laboratoriais: parasitológico (citologia e/ou PCR de medula óssea), proteínas totais, relação albumina-globulina.

Os cães foram separados em dois grupos, o primeiro composto por cães saudáveis vacinados, com resultado prévio à vacinação negativo no ELISA S7, e o segundo pelos cães infectados, comprovados através de resultados positivos em exames parasitológicos.

O grupo de cães vacinados incluiu 39 animais sadios, que haviam sido vacinados com Leishmune® (três doses iniciais da vacina, com intervalo de 21 dias entre as doses, mais reforços anuais) pelos veterinários clínicos responsáveis após confirmação da sua soronegatividade para anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com exigências do fabricante. Os testes sorológicos realizados previamente à vacinação, para comprovação da negatividade destes cães, foram o ELISA S7 e RIFI *L. major*-like. Os cães eram de diversas raças, incluindo cães sem raça definida (SRD), de ambos os sexos, com idade entre quatro meses e 10 anos, todos domiciliados e frequentadores regulares de clínicas veterinárias.

O grupo de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum/ chagasi* incluiu 48 animais, de diversas raças, incluindo cães sem raça definida (SRD), com idade entre quatro meses e 12 anos, de ambos os sexos, domiciliados, que apresentavam sinais clínicos de LVC e estavam nas clínicas veterinárias para a realização do diagnóstico definitivo, sendo que nestes cães a infecção foi confirmada pela observação microscópica de formas amastigotas nos esfregaços corados com Giemsa, obtidos a partir de punção de medula óssea e/ou linfonodo ou pela técnica de

PCR. Todos os cães apresentavam sinais característicos de LVC, como emagrecimento, crescimento exagerado das unhas, lesões oculares, perda de pêlos e alterações das proteínas totais, entre outros. Após o diagnóstico definitivo e coleta das amostras, estes animais foram eutanasiados, de acordo com as normas do Comitê de Ética estabelecido pela Sociedade Protetora dos Animais e com o consentimento dos proprietários.



Figura 1: Cão positivo para LVC – lesão ocular



Figura 2: Cão positivo para LVC – lesão de pele



Figura 3: Cão positivo para LVC - caquexia



Figura 4. Cão saudável vacinado

### 5.3 Soros

Em outubro de 2008 foram coletados os soros dos cães vacinados e dos cães infectados, nos municípios de Andradina, Dracena e Bauru. Para a obtenção dos soros, amostras de sangue (5 mL) foram coletadas da veia jugular ou veia cefálica dos cães e armazenadas em tubos estéreis de 10 mL, sem anticoagulante, a 22°C, até o momento da centrifugação a 3.500 rpm durante quatro minutos, cerca de quatro horas após a coleta. Os soros foram centrifugados nas clínicas veterinárias e congelados em freezer -20°C. Posteriormente todos os soros foram armazenados no laboratório do controle de qualidade da Fort Dodge, em freezer -70°C até a data da realização dos testes. Em 14/11/08 foi realizado o ELISA FML, no próprio laboratório da Fort Dodge, e neste momento os soros foram separados em quatro alíquotas, para a realização dos outros métodos. Todos os soros foram devidamente identificados e posteriormente analisados em duplo cego.

O ELISA e RIFI *L. major*-like foram realizados em novembro de 2008, no Centro de Controle de Zoonoses do Município de Três Lagoas, Estado do Mato Grosso do Sul. O ELISA S7 foi realizado em dezembro, no laboratório TECSA, no Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Um dado importante a ser relatado é sobre a conservação dos *kits* no CCZ. De acordo com a bula do ELISA *L. major*-like, alguns dos reagentes devem ser conservados a -20°C (R-08, R-09, R-10 e R-11) e os demais entre 2° e 8°C (R01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06 e R-07). Porém, no CCZ só havia uma geladeira convencional, onde a temperatura mínima do freezer alcança -4°C. Este é um fato importante e que deve ser considerado como possível fator de impacto na sensibilidade destes *kits*.

Já os reagentes da RIFI estavam conservados na temperatura indicada em bula, entre 2° e 8°C, porém, a lâmpada do microscópio de fluorescência estava vencida há dois anos, o que pode prejudicar muito a leitura das lâminas e influenciar o resultado das amostras.

No presente estudo foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto tem aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Unicamp, protocolo número 1721-1 (Anexo 1).

#### **5.4 ELISA com antígeno *L. major-like* (anexo 2)**

Este método ELISA, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, utiliza *L. major-like* como antígeno complexo (comunicação verbal de André Vieira, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), sendo o teste padrão realizado nos inquéritos epidemiológicos oficiais do Brasil para o controle da LV, com comercialização proibida para laboratórios privados. O teste foi realizado conforme instruções do fabricante, que segue o seguinte padrão: os soros foram diluídos 1:100 no diluente do *kit*. Foram distribuídos 100 µl dos soros já diluídos em cada orifício da placa, que foi selada com folha adesiva e incubada a 37°C por 30 minutos. A placa foi lavada por seis vezes com tampão lavagem (200 µl / orifício). Foram adicionados 100 µl de anti-imunoglobulina de cão marcada com peroxidase, a placa foi novamente selada e os procedimentos de incubação e lavagem repetidos. A reação foi revelada com 100 µl de Tetrametilbenzidina (TMB), selada,

incubada a temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 minutos, e interrompida com 50 µl de ácido sulfúrico 2M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro EXL 800 a 450nm, logo após o término do teste. Os *kits* incluem controles positivos que devem apresentar densidade óptica (DO)  $\geq 0.500$  e controles negativos entre 0.05 e 0.120. O *cut-off* do método é definido pela média da densidade ótica a 450nm dos controles negativos multiplicado por dois.

### **5.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com antígeno *L. major-like* (anexo 3)**

O teste RIFI, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, também com o antígeno de *L. major-like* (comunicação verbal de André Soares, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos), é preparado em lâminas de vidro, de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente foram colocados 10µl do antígeno, composto de promastigotas fixados, em cada orifício das lâminas e as lâminas incubadas a 37°C durante duas horas para a fixação dos parasitos. Os soros teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), diluídos em solução salina tamponada (PBS), foram adicionados em cada orifício (10 µl), incubados por 30 minutos a 37°C, lavados com PBS por três vezes (cinco minutos cada banho) e lavadas rapidamente em água destilada. A lâmina foi novamente seca a 37°C por dez minutos em estufa. A solução de PBS adicionada de azul de Evans a 0,004% (PBS-AE) foi então empregada para diluir o a 1:50 o conjugado anti-Ig de cão marcado com fluoresceína. Foram adicionados 15 µl desta diluição do conjugado em cada orifício das lâminas e repetido o procedimento descrito anteriormente de incubação e lavagens.

Após a secagem, três a quatro gotas de glicerina tamponada foram adicionadas sobre as lâminas, que foram cobertas com lamínulas. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X (em um período de até quatro horas após a execução do teste). Os controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparação no momento da leitura. De acordo com a bula, os resultados são considerados positivos em diluições  $\geq 1/40$ , ou seja, aqueles soros que, a partir da diluição 1:40, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitos mais intensa que o *background* observado no orifício do controle negativo.

#### **5.6 ELISA S7 (anexo 4)**

O *kit* ELISA S7, do Biogene Indústria e Comércio Ltda. ME, utiliza um polipetídeo recombinante, representando a fração carboxi-terminal da HSP70, denominado S7. No Brasil, o ELISA recombinante S7 está licenciado pelo MAPA sob o número 7434/00, sendo o único *kit* ELISA disponível para laboratórios de diagnóstico veterinário privados. O teste foi realizado de acordo com as orientações de bula. Foram utilizadas 100  $\mu$ l da solução S7 em tampão carbonato (pH 9.6), por cavidade, para sensibilização da placa ELISA; as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. A solução S7 foi desprezada e as placas lavadas três vezes com tampão PBST, e depois distribuídos 100  $\mu$ l por poço de PBST mais 2% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente, a solução foi desprezada e mais três lavagens com PBST foram realizadas. Os soros testes foram diluídos em meio de coleta a 1:100, incubados por quatro horas à temperatura ambiente para

imunoadsorção e em seguida 100 µl de cada soro previamente imunoadsorvido foram distribuídos na placa. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e lavadas três vezes com tampão PBS. Anticorpos ligados aos poços foram detectados pela incubação com uma solução de proteína-A ligada a peroxidase, diluída a 1:10.000. A reação cromogênica foi desenvolvida com tetrametil benzidina e bloqueada com ácido sulfúrico 1 N. A densidade ótica foi lida a 450nm. Controles positivos devem mostrar DO >0.300 e controles negativos <0.100. Para o cálculo do *cut off* a média aritmética das densidades óticas dos soros não reagentes é somada ao fator R=0,142, e para a determinação da faixa de indeterminados foi subtraído 0,03 do *cut off*.

## 5.7 ELISA FML

O método ELISA FML foi realizado de acordo com a descrição de Borja Cabrera, 1999. Para a sensibilização das placas foi utilizado 2 µg de FML por cavidade da placa ELISA, em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6), incubados por uma hora a 37°C e deixados *overnight* a 4°C. Após lavagens, os soros foram adicionados previamente diluídos a 1:100 em tampão de diluição e lavagem (PBST) e deixados a 37°C por uma hora. Após a incubação e lavagens, os anticorpos ligados à placa foram detectados por proteína-A ligada a peroxidase, diluída a 1:20.000. Após nova incubação e lavagens, a reação cromogênica foi desenvolvida com orto-fenileno-diamina, diluído em tampão citrato e na presença de peróxido de hidrogênio, na incubação de 30 minutos a temperatura ambiente no escuro, e interrompida com ácido sulfúrico 1 N. A absorbância foi medida a 492 nm. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada

placa. O *cut-off* do ELISA FML foi 0.450, correspondente à média dos valores de absorvância de soros controle negativos mais 2 desvios padrão, determinado pelo teste de Youden, 1949.

### **5.8 Análise estatística**

As diferenças entre as proporções de positividade nos diferentes testes sorológicos foram comparadas pelo teste exato de Fisher usando o programa Graphpad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>)

## **6. Resultados**

Esta dissertação foi estruturada em capítulo, sendo que os resultados serão expostos no capítulo 1, que é o artigo a ser encaminhado à publicação.

## 7. Capítulo 1

### **Diferenciação sorológica entre cães vacinados com Leishmune® e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina**

FABIANA FARINELLO GRECCO<sup>a</sup>, PAULO ANDRADE<sup>b</sup>, INGRID MENZ<sup>c</sup>, SILMARA MARQUES ALLEGRETTI<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Parasitologia, IB, Unicamp.

<sup>b</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE, Brasil

<sup>c</sup> Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp. Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, s/n, CP:6109, CEP:13083-970, Campinas-SP (sallegre@unicamp.br)

Correspondência para: Fabiana Farinello Grecco: [fabianafgrecco@uol.com.br](mailto:fabianafgrecco@uol.com.br)

## Resumo

A Leishmaniose Visceral Canina, doença grave e fatal, tem o cão como o principal reservatório da doença no meio urbano. Devido ao alto parasitismo cutâneo nestes animais, da quantidade de cães infectados, e do próximo convívio com o homem, as ações desenvolvidas pelo Programa Brasileiro de Controle da Leishmaniose Visceral são centradas no controle do reservatório canino, através da identificação e eutanásia dos animais soropositivos. Sendo assim, a adoção de ações profiláticas, com a utilização de vacinas nos cães, constituiria importante ferramenta para a diminuição da doença nestes animais, e conseqüentemente, a infecção do vetor e a transmissão do agente. Apesar de disponível desde 2004, a vacina Leishmune® ainda não é amplamente utilizada no Brasil, principalmente devido à possibilidade dos cães vacinados apresentarem sorologia positiva em inquéritos epidemiológicos, não sendo possível diferenciá-los dos cães infectados. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil sorológico de cães vacinados e saudáveis residentes em áreas endêmicas para a doença, e de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, e avaliar a possibilidade de diferenciação sorológica a partir dos métodos utilizados nos inquéritos epidemiológicos e laboratórios de diagnóstico particulares: ELISA e RIFI com antígenos *L. major*-like, produzidos pelo Laboratório Bio-Manguinhos e ELISA S7, produzido pelo Laboratório Biogene, respectivamente. Os soros foram testados nos três métodos, e os resultados demonstraram que nenhum cão vacinado apresentou resultado positivo em mais de um teste. Apenas um cão vacinado (1/39) apresentou resultado de 1:40 na RIFI, e quatro cães (4/39) apresentaram resultado positivo no ELISA *L. major*-like. Nenhum soro de

cão vacinado apresentou resultado positivo no ELISA S7. O único resultado positivo na RIFI foi negativo nos outros dois métodos, e os quatro soros positivos no ELISA *L. major*-like foram negativos tanto na RIFI quanto no ELISA S7. Estes resultados sugerem reações falso-positivas, e demonstram que, se os soros de cães vacinados forem testados em dois métodos (ELISA e RIFI), a possibilidade de um cão vacinado apresentar resultado positivo será remota. Desta maneira, a vacinação de grande quantidade de cães não dificultaria as ações atualmente empregadas para o controle da Leishmaniose Visceral, mas poderia, no futuro, ser somada as medidas já adotadas, evitando assim a eutanásia de cães.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral Canina, ELISA, RIFI, vacina FML, sorologia.

## 1. Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) pertence ao complexo das leishmanioses, doenças com grande diversidade clínica e epidemiológica, que envolvem diferentes espécies do parasito *Leishmania*, de vetores flebotomíneos e de hospedeiros, tanto no ciclo zoonótico quanto no antroponótico (Desjeux, 1991). No Brasil a *L. (L.) infantum chagasi* é o agente (Shaw, 2006) e a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são as espécies incriminadas na transmissão da leishmaniose visceral (Galati et al., 1997, Ministério da Saúde Brasil, 2006, de Pita Pereira et al., 2008).

O cão é o mais importante reservatório urbano, quando se considera a forma zoonótica da doença (Alvar et al., 2004), sendo responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da infecção nestes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele e pela sua proximidade ao homem. Por esta razão estes animais são considerados um dos alvos estratégicos para o controle da LV (Ashford, 1996; Costa Val, 2004).

O Programa Nacional de Controle da leishmaniose visceral no Brasil, proposto pela Fundação Nacional de Saúde, remonta à década de 50 (Deane, 1956; Gontijo & Melo, 2004) e tem como objetivo quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão do agente. As medidas adotadas desde então se baseiam em três pontos fundamentais: o diagnóstico precoce e tratamento gratuito da população humana, o controle do reservatório doméstico através da eliminação de cães soropositivos, e o controle de vetores, realizado por meio do uso de inseticidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2006).

Dada a importância do cão na manutenção da doença, da dificuldade de execução da eliminação canina, e da proibição do tratamento canino, outras ações

devem ser adotadas nestes animais, de forma a impedir que atuem como reservatórios da infecção, ou evitando sua infectividade para os vetores. Diversos autores sugerem o uso de vacinas profiláticas, quer seja para uso animal ou humano, como ferramenta para substituir a eutanásia dos cães portadores de *L. (L.) infantum chagasi* e diminuir a incidência da LV (Tesh, 1995; Dye, 1996; Gontijo & Melo, 2004; Dantas-Torres, 2006b. Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Além disso, a adoção de medidas profiláticas nos cães, como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina, repelentes de uso tópico e vacinas, são as únicas alternativas disponíveis atualmente, pois no Brasil, o tratamento de cães está proibido desde a publicação da Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008.

Desta maneira, o estabelecimento de ferramentas imunoprofiláticas representa uma importante contribuição para a estratégia de controle da LV (Araújo et al., 2009), tendo a vacinação canina sido apontada, através de um modelo matemático (Dye, 1996), como o mais potente fator para redução da LV humana e canina.

Em junho de 2003 foi licenciada no Brasil (no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) a Leishmune®, uma vacina de segunda geração composta pela glicoproteína Fucose Manose Ligante (FML), uma fração purificada isolada da *Leishmania donovani* e adicionada ao adjuvante de imunidade saponina. A vacina demonstrou proteção de 92% a 99% em estudos de campo realizados com desafio natural (Da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002; Borja-Cabrera et al., 2008), além de ter demonstrado seu potencial como bloqueadora da transmissão (Nogueira et al., 2005; Saraiva et al., 2006), e na diminuição da incidência da LV canina e humana (Palatnik-de-Sousa et al., 2009).

Nos estudos sobre a vacina FML (Leishmune®) o método FML ELISA foi utilizado para a mensuração da resposta imune humoral específica (Palatnik-de-Sousa et al., 1994; Paraguai de Sousa et al., 2001; Da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002; Santos et al., 2002; Mendes et al. 2003) e avaliar a soropositividade nos infectados (Borja-Cabrera et al., 1999). Este ELISA utiliza como antígeno o FML, mesma glicoproteína da vacina, e por este motivo identifica os anticorpos específicos anti-FML induzidos pela vacinação. Desenvolvido pela mesma pesquisadora que desenvolveu a vacina, o FML ELISA só está disponível para uso na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Departamento de Controle de Qualidade da Leishmune®, no laboratório Fort Dodge Saúde Animal, para os testes de controle de qualidade da vacina.

A detecção de anticorpos específicos anti-FML em cães imunizados com a Leishmune®, quando utilizado o FML ELISA, abriu caminho para a hipótese de que estes anticorpos também pudessem ser identificados pelos métodos sorológicos licenciados no Brasil (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like, utilizados nos inquéritos sorológicos oficiais e no ELISA S7 utilizado nos laboratórios particulares), apresentando reações falso-positivas.

Atualmente, no Brasil, somente os *kits* ELISA produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (ELISA *L. major*-like) e pelo laboratório Biogene (ELISA S7), e o método RIFI (RIFI *L. major*-like), produzido pelo Instituto Bio-Manguinhos, estão devidamente registrados no Ministério da Saúde (Bio-Manguinhos) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, (Biogene), sendo, portanto, os únicos testes sorológicos oficialmente aceitos para o diagnóstico da LVC.

Os *kits* ELISA e RIFI produzidos pelo Instituto Bio-Manguinhos, possuem antígenos complexos de *Leishmania major*-like, e o *kit* ELISA S7, produzido pelo laboratório Biogene, utiliza a proteína recombinante HSP70, o fragmento S7 da HSP 70 - Heat Shock Protein - de *L. chagasi* como antígeno (Andrade & Andrade, 1995). O ELISA *L. major*-like apresenta especificidade de 91,7% e sensibilidade de 94,7% e a RIFI *L. major*-like apresenta especificidade de 80% e sensibilidade de 90%, de acordo com o fabricante. O *kit* ELISA S7 apresenta especificidade de 94,3% e sensibilidade de 89%, de acordo com o fabricante. De acordo com Palatnik et al. (1995), o método ELISA FML apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico de pacientes humanos infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Em cães, o método apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 100% em soro de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, além de ter apresentado maior sensibilidade quando comparada à RIFI na detecção de cães assintomáticos infectados pela *L. chagasi* (Borja-Cabrera et al., 1999).

Desde que a vacina Leishmune® foi licenciada, como mais uma ferramenta para o controle da LVC, o maior entrave ao seu uso em larga escala foi a dúvida sobre a possibilidade de diferenciação sorológica entre cães vacinados saudáveis e cães doentes, através dos métodos sorológicos utilizados nos inquéritos caninos oficiais, ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like. Apesar da alta proteção conferida pela vacina, a necessidade de três doses iniciais no esquema de vacinação com a Leishmune®, com intervalo de 21 dias entre elas, mais reforços anuais, o alto custo e a utilização da saponina como adjuvante de imunidade, responsável por dor local em aproximadamente 14% dos cães de raças de pequeno porte (Parra et al., 2007), ainda são considerados fatores limitantes para sua utilização. Não obstante, a impossibilidade

de diferenciação sorológica entre cães vacinados e cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* é considerado o maior entrave ao uso da vacina em grande escala, já que no Brasil, os cães soropositivos são eutanasiados. Sendo assim, a vacinação de cães poderia dificultar as ações de controle da LV e resultar em eutanásia de animais vacinados e sadios em inquéritos epidemiológicos.

Embora devidamente registrada no MAPA, o Ministério da Saúde não recomenda o uso da vacina Leishmune® como medida de controle da LV, por não existir constatação de seu custo-benefício e efetividade para o controle do reservatório da LVC em programas de saúde pública (Ministério Da Saúde Brasil, 2006).

Caso os testes sorológicos atualmente disponíveis e utilizados nos inquéritos sorológicos caninos não identifiquem os anticorpos gerados após a vacinação dos cães, um grande obstáculo ao uso da vacina terá sido superado, podendo, no futuro, a vacinação canina ser somada às medidas já adotadas pelo Programa Brasileiro de Controle da LV.

De acordo com levantamento realizado por Palatnik-de-Sousa et al. (2009), a vacinação dos cães com a Leishmune® não interferiu na campanha de controle da LV do Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, uma vez que neste Município, nos bairros onde havia a maior porcentagem de cães vacinados, foi identificado o menor número de soropositividade nos exames sorológicos oficiais (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like), de acordo com levantamentos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade. O mesmo foi observado em Campo Grande, em um levantamento epidemiológico envolvendo 110 mil cães (Palatnik-de-Sousa et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi investigar o perfil sorológico dos cães vacinados com a Leishmune® e dos cães infectados que vivem em áreas endêmicas para a LVC, nos

três testes atualmente licenciados no Brasil – ELISA *L. major*-like, RIFI *L. major*-like e ELISA S7 e avaliar a real interferência dos cães vacinados no Programa Brasileiro de Controle da LV. Além desses testes, o FML ELISA foi realizado para comprovar a presença de anticorpos específicos anti-FML nos cães vacinados, a fim de confirmar a suspeita de que os anticorpos induzidos pela vacina Leishmune® podem ser detectados somente quando se utiliza o FML ELISA.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Área do estudo**

Os cães que participaram deste estudo eram residentes das cidades de Andradina (20°53'46''S, 51°22'46''W), Bauru (22°18'53''S, 49°03'38''W) e Dracena (21°28'57''S), Estado de São Paulo. A região noroeste do Estado de São Paulo é considerada endêmica para LVC e a Cidade de Andradina é uma das cidades que apresenta a enfermidade desde 1999. Foram notificados no período de 1999 a 2007, 62 casos humanos da doença, com 10 óbitos. A Cidade de Dracena também tem registrado casos caninos e humanos (110 casos humanos com três óbitos entre 2005 e 2009) e Bauru iniciou com casos de LVC a partir de 2003, apresentando 271 casos humanos com 30 óbitos no período de 2003 a 2009. Nestas cidades há também relatos de casos humanos de Leishmaniose Tegumentar. (Fonte: Div. Zoonoses e DIRs VI, X, XIV e DIR XVI).

## 2.2 Grupos

Para este estudo foram selecionados cães que frequentavam regularmente clínicas veterinárias, sendo todos os cães domiciliados, para se aproximar ao máximo da realidade de campo. Foram selecionados cães com esquema completo de vacinação com a Leishmune®, realizado pelos veterinários responsáveis e acompanhados regularmente por estes veterinários para certificação de seu *status* clínico. Foram selecionados também cães positivos para LVC, situação comprovada através de exames laboratoriais: parasitológico (citologia e/ou PCR de medula óssea), proteínas totais, relação albumina-globulina.

Os cães foram separados em dois grupos, um composto por cães saudáveis vacinados, negativos no ELISA S7, e outro composto pelos cães infectados, comprovados através de resultados positivos em exames parasitológicos.

O grupo de cães vacinados incluiu 39 animais sadios, que haviam sido vacinados com Leishmune® (três doses iniciais da vacina, com intervalo de 21 dias entre as doses, mais reforços anuais) pelos veterinários clínicos responsáveis após confirmação da sua soronegatividade para anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com exigências do fabricante da vacina. Os testes sorológicos realizados previamente à vacinação, para comprovação da negatividade destes cães, foram o ELISA S7 e RIFI *L. major*-like. Os cães eram de diversas raças, incluindo cães sem raça definida (SRD), de ambos os sexos, com idade entre quatro meses e 10 anos, todos domiciliados e frequentadores regulares de clínicas veterinárias.

O grupo de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* incluiu 48 animais, de diversas raças, incluindo cães SRD, com idade entre quatro meses e 12 anos, de ambos os sexos, domiciliados, que apresentavam sinais clínicos de LVC e

estavam nas clínicas veterinárias para a realização do diagnóstico definitivo, sendo que nestes cães a infecção foi confirmada pela observação microscópica de formas amastigotas nos esfregaços corados com Giemsa, obtidos após punção de medula óssea e/ou linfonodo ou pela técnica de PCR. Todos os cães apresentavam sinais clínicos característicos de LVC, como emagrecimento, crescimento exagerado das unhas, lesões oculares, perda de pêlos e alterações das proteínas totais entre outros. Após o diagnóstico definitivo e coleta das amostras, estes animais foram eutanasiados, de acordo com as normas do Comitê de Ética estabelecido pela Sociedade Protetora dos Animais e com o consentimento dos proprietários.

### **2.3 Soros**

Para a obtenção dos soros, amostras de sangue (5 mL) foram coletadas da veia jugular ou veia cefálica dos cães e armazenadas em tubos estéreis de 10 mL, sem anticoagulante, a 22°C, até o momento da centrifugação, a 3.500 rpm durante quatro minutos, cerca de quatro horas após a coleta,. Os soros foram separados em quatro alíquotas e armazenados a -70°C até a realização dos exames sorológicos: ELISA FML, ELISA S7, ELISA e RIFI *L. major*-like. Todos os soros foram devidamente identificados e posteriormente analisados em duplo cego. Os resultados dos testes sorológicos foram confrontados para verificação da concordância. Como foram utilizados pacientes regulares das clínicas veterinárias, as amostras de soro dos animais vacinados foram coletadas entre três a 10 meses após a última dose vacinal, de acordo com a data das visitas de rotina à clínica.

No presente estudo foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O trabalho tem aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Unicamp, protocolo número 1721-1.

#### **2.4 ELISA com antígeno *L. major-like***

Este método ELISA, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, utiliza *L. major-like* como antígeno complexo (comunicação verbal de André Vieira, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), sendo o teste padrão realizado nos inquéritos epidemiológicos oficiais do Brasil para o controle da LV, com comercialização proibida para laboratórios privados. O teste foi realizado conforme instruções do fabricante.

#### **2.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com antígeno *L. major-like***

O teste RIFI, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, também com o antígeno de *L. major-like* (comunicação verbal de André Soares, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), é preparado em lâminas de vidro, de acordo com as instruções do fabricante.

#### **2.6 ELISA S7**

O *kit* ELISA S7, do Biogene Indústria e Comércio Ltda. ME, utiliza um polipetídeo recombinante, representando a fração carboxi-terminal da HSP70, denominado S7. No Brasil, o ELISA recombinante S7 está licenciado pelo MAPA sob o número 7434/00,

sendo o único *kit* ELISA disponível para laboratórios de diagnóstico veterinário privados. O teste foi realizado de acordo com as orientações de bula.

## **2.7 ELISA FML**

O método ELISA FML foi realizado de acordo com a descrição de Borja Cabrera, 1999. Para a sensibilização das placas foi utilizado 2 µg de FML por cavidade da placa ELISA, em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6), incubados por uma hora a 37°C e deixados *overnight* a 4°C. Após lavagens, os soros foram adicionados previamente diluídos a 1:100 em tampão de diluição e lavagem (PBST) e deixados a 37°C por uma hora. Após a incubação e lavagens, os anticorpos ligados à placa foram detectados por proteína-A ligada a peroxidase, diluída a 1:20.000. Após nova incubação e lavagens, a reação cromogênica foi desenvolvida com orto-fenileno-diamina, diluído em tampão citrato e na presença de peróxido de hidrogênio, na incubação de 30 minutos a temperatura ambiente no escuro, e interrompida com ácido sulfúrico 1 N. A absorbância foi medida a 492 nm. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O *cut-off* do FML ELISA foi 0.450, correspondente à média dos valores de absorbância de soros controle negativos mais 2 desvios padrão, determinado pelo teste de Youden, 1949.

## **2.8 Análise estatística**

As diferenças entre as proporções de positividade nos diferentes testes sorológicos foram comparadas pelo teste exato de Fisher usando o programa Graphpad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm> 2002-2005).

### 3. Resultados

Os resultados dos quatro ensaios frente a soros de animais vacinados ou infectados podem ser observados na Tabela 1. Quando a sorologia foi realizada utilizando o antígeno FML (ELISA FML), não houve diferença significativa ( $p=0,5315$ ) entre as amostras dos dois grupos. A positividade foi de 89,6% (43/48) no grupo de cães infectados e 84,6% (33/39) no grupo de cães saudáveis vacinados (Tabela 1). Estes resultados demonstram que, tanto os cães vacinados, quanto os naturalmente infectados apresentam anticorpos anti-FML. Sendo o FML uma glicoproteína presente na *L. (L.) infantum chagasi*, é esperado que tanto os cães infectados quanto os vacinados apresentem anticorpos anti-FML. Por este motivo, o ELISA FML foi o método utilizado para a mensuração de anticorpos anti-FML desenvolvidos após a vacinação com a Leishmune®.

Os resultados dos testes ELISA *L. major*-like, RIFI *L. major*-like e ELISA S7 foram significativamente diferentes entre o grupo de cães vacinados e o grupo de cães infectados ( $p<0,0001$ ). Os soros de cães vacinados com a Leishmune® apresentaram negatividade de 87,2% (34/39) no ELISA *L. major*-like e 97,4% (38/39) na RIFI *L. major*-like. A diferença entre o grupo de cães vacinados e de cães infectados foi ainda mais pronunciada quando utilizado o ELISA S7, o qual mostrou completa ausência de reatividade com soros de cães vacinados.

A diferença entre os dois grupos de cães foi altamente significativa ( $P<0,0001$ ) para o ELISA S7, RIFI e ELISA *L. major*-like. No grupo de animais infectados, a positividade nas amostras de soro foi de 70,8% (34/48) no ELISA S7, 68,8% (33/48) na RIFI e 58,3% (28/48) no ELISA *L. major*-like, enquanto que, no grupo de cães

vacinados, nenhum soro apresentou resultado positivo no ELISA S7 (0/39), 2,6% (1/39) foi positivo na RIFI e 10,3% (4/39) no ELISA *L. major*-like.

É importante salientar que o único animal vacinado que apresentou RIFI positiva (1:40) foi negativo no ELISA *L. major*-like e no ELISA S7, e os quatro animais vacinados que apresentaram resultados positivos no ELISA *L. major*-like foram negativos na RIFI *L. major*-like e no ELISA S7, não havendo, portanto, nenhum animal vacinado com a Leishmune® positivo nos dois métodos utilizados no controle oficial da LV (Tabela 2). A Tabela 1 também sumariza os números de animais positivos no teste ELISA *L. major*-like e confirmados no teste de RIFI *L. major*-like.

Os soros dos cães infectados apresentaram positividade de 70,8% no ELISA S7, 68,8% na RIFI *L. major*-like e 58,3% no ELISA *L. major*-like, sendo a sensibilidade dos três testes neste estudo, inferior à descrita nas bulas dos produtos.

Entre os soros de cães vacinados analisados, um apresentou resultado indeterminado no ELISA *L. major*-like e dois no ELISA S7. Entre os soros de cães infectados também foi observado um resultado indeterminado no ELISA *L. major*-like e dois no ELISA S7. Estes soros foram retestados e novamente apresentaram resultado indeterminado no teste.

Tabela 1. Reatividade dos soros de cães vacinados com Leishmune® e dos cães naturalmente infectados de áreas endêmicas em diferentes métodos sorológicos.

	% de resultados positivos (positivos/amostras totais)						*Detecção do parasito
	Testes oficiais com antígeno <i>L. major-like</i>		Testes ELISA com antígenos definidos		Combinação de positividade		
	Lm	RIFI	S7	FML	Lm+RIFI	Lm+S7	
Cães vacinados com Leishmune®	10.3 (4/39)	2.6 (1/39)	0 (0/39)	84.6 (33/39)	0 (0/39)	0 (0/39)	0 (0/39)
Cães naturalmente infectados	58.3 (28/48)	68.8 (33/48)	70.8 (34/48)	89.6 (43/48)	48 (23/48)	48 (23/48)	100 (48/48)
Valores de p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.5315	<0.0001	<0.0001	<0.0001

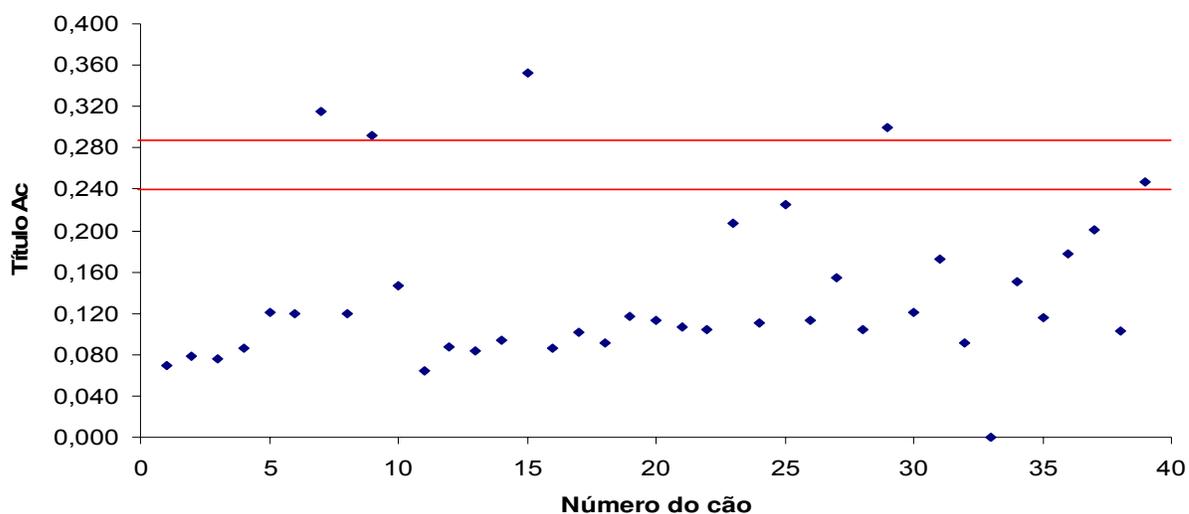
Os soros dos cães vacinados e dos cães infectados foram analisados por: Lm: ELISA *L. major-like*; RIFI: RIFI *L. major-like*; S7: ELISA test with S7 fragment of the 70kDa Heat shock protein; FML: ELISA FML test. Todos os cães infectados apresentaram uma ou mais manifestações clínicas de LVC: lesões de pele, perda de peso, caquexia, onicogribose, alopecia, ceratoconjuntivite, linfadenomegalia. \*A detecção do parasito foi baseada na presença de formas amastigotas de *Leishmania* a partir de punção aspirativa de medula óssea e/ou linfonodo. O teste exato de Fisher foi utilizado para a análise estatística.

Tabela 2. Soros de cães vacinados com Leishmune® que apresentaram resultado positivo em um ou mais testes.

Grupo Vacinado	Cão n.7	Cão n.9	Cão n.15	Cão n.29	Cão n.37
ELISA <i>L. major</i> -like	0,315	0,292	0,352	0,300	NEGATIVO
ELISA S7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
RIFI <i>L. major</i> -like	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1:40

O Cut-Off (CO) do teste ELISA *L. major*-like foi calculado de acordo com as instruções de bula, ou seja, CO= média das densidades óticas dos orifícios do controle negativo multiplicado por 2, que neste ensaio foi de 0,240. A “faixa-cinza” (indeterminados) é considerada para as densidades entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2 (faixa cinza = densidade ótica entre 0,240 a 0,288). Para a RIFI, são consideradas positivas as amostras que apresentem fluorescência na membrana dos parasitos, mais intensa do que o *back-ground* observado no orifício do controle negativo, a partir da diluição de 1:40, inclusive, de acordo com a bula do produto.

Figura 5. Título dos soros de cães vacinados no ELISA *L. major*-like



O Cut-Off (CO) do teste ELISA *L. major*-like foi calculado de acordo com as instruções de bula, e neste ensaio foi de 0,240. A “faixa-cinza” (indeterminados) é considerada para as densidades entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2 (faixa cinza = densidade ótica entre 0,240 a 0,288).

#### 4. Discussão

A positividade no ELISA FML, de 43 (89,6%) dos 48 soros dos cães infectados e 33 (84,6%) dos 39 soros dos cães saudáveis vacinados, demonstra que anticorpos específicos anti-FML são produzidos durante a LVC e também como resultado da vacinação com antígeno FML. A glicoproteína FML, antígeno utilizado na vacina Leishmune<sup>®</sup>, está presente nas formas amastigotas e promastigotas das leishmanias do complexo *L. donovani* e seu principal componente, a enzima nucleosídeo hidrolase 36 (NH36) é o principal epítipo do FML (Santana et al., 2002). Contudo, não é esperado encontrar NH36 em quantidade significativa tanto no antígeno solúvel, utilizado no ELISA *L. major*-like, como nas promastigotas utilizadas na RIFI, já que esta glicoproteína representa uma fração muito pequena do proteoma do parasito e não foi identificada como um antígeno importante em análises proteômicas de *Leishmania* (Dea-Ayuela et al., 2006; Forgber et al., 2006).

De fato, o antígeno FML purificado interage com uma fração definida dos anticorpos séricos, enquanto que o antígeno *L. major*-like, utilizado no ELISA e na RIFI dos inquéritos epidemiológicos oficiais, pode reagir com todos os anticorpos gerados durante a multiplicação dos parasitos no hospedeiro infectado, mascarando ou diluindo a resposta contra o antígeno FML. Além disso, o processo de denaturação sofrido pelo FML durante sua purificação pode expor epítopos de peptídeos e carboidratos que não estão disponíveis para as interações no lisado de *Leishmania* ou com as promastigotas do parasito presentes nos ensaios oficiais (Palatnik-de-Sousa et al., 2009).

Os resultados deste estudo mostraram uma reduzida reatividade dos soros de animais vacinados nos ensaios RIFI e ELISA com antígeno *L. major*-like (5/39).

Importante ressaltar que nenhum soro apresentou positividade nessas duas técnicas simultaneamente. Os quatro soros positivos no ELISA (4/39) foram negativos na RIFI, e o único soro positivo na RIFI (1/39) foi negativo no ELISA. Além disso, todos os soros apresentaram resultado negativo quando o ELISA S7 foi utilizado.

Dessa maneira, embora houvesse a suspeita de que os anticorpos produzidos na vacinação pudessem ser identificados pela fração FML presente nos extratos complexos usados como antígeno nos ensaios sorológicos oficiais, produzindo reações falso-positivas, os resultados deste estudo não dão suporte a esta hipótese, já que nenhuma amostra de soro de cães vacinados se mostrou positiva, simultaneamente nas provas sorológicas ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like.

Existe a probabilidade destes resultados serem devido a uma falha do método, ou ainda serem falso-positivos, já que as quatro amostras com resultado positivo no ELISA *L. major*-like apresentaram resultado negativo tanto no ELISA S7 quanto na RIFI, e a única amostra de soro positiva na RIFI apresentou resultado negativo nos dois testes ELISA realizados (ELISA S7 e ELISA *L. major*-like). Estes resultados foram provavelmente obtidos a partir de co-infecções com *Leishmania* sp, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (Oliveira et al., 2008) ou em decorrência de reações cruzadas dos anticorpos contra tripanossomídeos, *Ehrlichia canis*, e leishmaniose tegumentar. Corroborando com esta suspeita, diversos estudos demonstraram que a maior desvantagem dos métodos sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas (Costa et al., 1991; Genaro, 1993; Gradoni, 2002; Alves & Bevilacqua, 2004; Ministério da Saúde Brasil, 2006, Ferreira et al., 2007;).

Ferreira et al. (2007) demonstraram a ocorrência de reações cruzadas, utilizando os métodos ELISA e RIFI, ambos do laboratório Bio-Manguinhos. No estudo, realizado

com 20 amostras de soros de cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* (n=7), *Leishmania brasiliensis* (n=5), *Toxoplasma gondii* (n=5) e *Erlichia canis* (n=3), 11 apresentaram reação cruzada na metodologia RIFI (sete para *T. cruzi*, duas para *L. brasiliensis* e duas para *E. canis*) e oito no ELISA (quatro para *T. cruzi*, três para *L. brasiliense* e uma para *E. canis*).

De acordo com Alvar et al. (2004), o fato das técnicas sorológicas convencionais utilizarem antígenos brutos, formas completas de promastigotas ou amastigotas ou extratos solúveis destes, limita consideravelmente sua especificidade.

Segundo Tavares et al. (2003), para a obtenção de um diagnóstico sorológico mais específico, é necessário o aprimoramento da caracterização de componentes antigênicos da *Leishmania*, com a utilização de antígenos purificados e recombinantes, como o ELISA S7, que contém uma única proteína de *Leishmania chagasi*, a HSP70, um dos antígenos dominantes da *Leishmania chagasi* (Andrade & Andrade, 1995; Quijada et al., 1996).

No presente estudo, a partir deste método, os resultados foram negativos em todas as amostras de soros de cães vacinados. Apesar de ser uma proteína recombinante, foi demonstrado por Talmi-Frank et al. (2006) e Carrillo et al. (2008) o aparecimento precoce de anticorpos anti-HSP70. Também foi observado pelos mesmos autores que a cinética de produção de anticorpos anti-HSP70 é muito similar àquela observada para os anticorpos totais contra antígeno solúvel de *Leishmania*, sugerindo boa sensibilidade do método.

Neste estudo foi observada sensibilidade menor do ELISA S7, 70,8%, do que aquela indicada pelo fabricante, de 89%, mas ainda assim superior aos ensaios oficiais. A sensibilidade dos ensaios oficiais avaliada neste estudo, 68,8% para RIFI e 58,8%

para ELISA, ficou aquém daquela mencionada nos manuais dos produtos, 90% para RIFI e 94,7% para ELISA. Os valores de sensibilidade dos testes ELISA obtidos neste estudo, embora inferiores ao reivindicado pelo fabricante, estão dentro da faixa descrita por Pinheiro et al. (2009) para o sorodiagnóstico do calazar canino com antígenos complexos de *Leishmania*. Da mesma forma, a sensibilidade da RIFI também foi inferior à constante da bula do produto, mas na faixa descrita por Mettler et al. (2005). Os resultados indeterminados obtidos tanto no ELISA *L. major*-like, quanto no S7, estavam na faixa considerada “zona cinza”, calculada de acordo com cada fabricante, a fim de não considerar como positivo ou negativo um resultado de densidade ótica muito próxima ao cut-off.

Esta diferença de sensibilidade pode ser devida a variações de lote, a alterações nos procedimentos, ou ainda ao fato de que neste estudo, os cães do grupo positivo foram considerados positivos a partir de provas parasitológicas e/ou moleculares, que identificam a infecção mais precocemente do que as provas sorológicas. Estudo conduzido por Solano-Galego et al., (2001), na Ilha de Mallorca, Espanha, demonstrou que, na população de cães avaliada, enquanto 63% apresentavam PCR positivo, apenas 26% eram positivos na sorologia, e somente 13% apresentavam doença clínica, indicando que a sorologia pode não identificar animais já infectados. Courtenay et al. (2002) demonstraram que a sensibilidade do ELISA, durante o período pré-patente, é menor do que a estimada, já que o método é eficiente para detectar cães com infecção ativa, mas é menos sensível em cães durante o período pré-patente. O mesmo é citado por Baneth et al. (2008), os quais afirmaram que a maioria dos cães de áreas endêmicas, exposta à infecção, torna-se infectada sem apresentar evidências clínicas da doença ou anticorpos anti-*Leishmania*.

Outro fato que pode impactar na sensibilidade dos métodos sorológicos é a utilização de antígenos heterólogos. A identificação destes antígenos por anticorpos séricos na LVC de fato ocorre (Barbosa de Deus et al., 2002), mas em geral é menos intensa e menos específica do que aquela observada com antígenos homólogos (Rajasekariah et al., 2008). A adoção de ensaios diagnósticos para a LVC, empregando antígeno heterólogo é uma decisão única do fabricante e encontra pouco apoio na literatura. Os dois parasitos (*L. infantum* e *L. major*) são evolutivamente muito diferentes, assim como a clínica das doenças que causam e o elenco de hospedeiros na natureza, embora possam em condições excepcionais formar híbridos inter-específicos (Ravel et al., 2006). A reatividade dos soros de cães infectados nos ensaios sorodiagnósticos oficiais se deve, naturalmente, a antígenos comuns entre os dois parasitos, como demonstrado existir entre *L. (L.) infantum chagasi* e várias leishmanias do Novo Mundo (Vale et al., 2009).

Atualmente, o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose refere a RIFI e o ELISA como metodologias de diagnóstico para fins de inquéritos epidemiológicos caninos amostrais e censitários. O ELISA é recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA ou como técnica diagnóstica de rotina (Ministério da Saúde Brasil, 2006).

Esta recomendação do Ministério da Saúde está de acordo com o preconizado por Almeida et al. (2005) e Assis et al. (2010), que concluem em seus estudos que, devido à baixa concordância entre os resultados das provas sorológicas atualmente disponíveis, é essencial que o diagnóstico da LVC seja realizado baseado no resultado de duas provas. Alves e Bevilacqua (2004) corroboram esta afirmação, quando reportam que, em inquéritos sorológicos caninos realizados na cidade de Belo

Horizonte (MG), no período de 1993 a 1997, de acordo com os valores preditivos positivos e negativos da RIFI, (14,5% e 99,5%, respectivamente), dos 15.117 cães identificados como positivos, de um total de 415.683 cães examinados pela RIFI, 12.925 seriam falso-positivos. E, dentre os 400.566 identificados como negativos, 2003 seriam, na verdade, falso-negativos.

Se, conforme o preconizado pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde Brasil, 2006), os soros dos cães vacinados com a Leishmune® reagentes em ELISA *L. major*-like forem confirmados pela RIFI *L. major*-like, a probabilidade de uma reação falso-positiva será remota, como indicam os resultados sumarizados na Tabela 1. Desta maneira, os resultados do presente estudo corroboram com os resultados apresentados por Palatnik-de-Sousa et al. (2009) de que a vacinação dos cães com a Leishmune® não interfere nas ações de controle da LV no Brasil.

Em conclusão, os resultados deste estudo apontam para uma similaridade no desempenho dos três ensaios sorológicos empregados no sorodiagnóstico da LVC no Brasil, além de demonstrar que, mesmo sendo observado resultado positivo em amostras de cães vacinados, nenhum cão vacinado apresentou resultado positivo em mais de uma prova sorológica, sugerindo fortemente resultados falso-positivos. Os resultados deste estudo também confirmam a necessidade de realização de pelo menos dois métodos sorológicos para o diagnóstico definitivo da LVC, dada a complexidade da doença e as limitações dos métodos atualmente disponíveis. Além disso, indicam a necessidade de uma reavaliação dos métodos sorológicos atualmente utilizados para o diagnóstico da LV no Brasil, com o emprego de testes mais sensíveis e específicos, a partir de antígenos purificados e/ou recombinantes, com o objetivo de

diminuir a possibilidade de reações falso-positivas, responsáveis pela eliminação de animais saudáveis e minimizar as reações falso-negativas, mantendo reservatórios da doença e representando ameaça à saúde pública.

Finalmente, não parece ter fundamento a hipótese de que a vacinação de elevado percentual de cães em áreas endêmicas possa dificultar as ações de controle da LV adotadas no Brasil, mas que a vacinação de cães pode ser, no futuro, mais uma ferramenta, associada às demais medidas já adotadas para o controle da LV.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fort Dodge, pelo apoio na realização dos ELISA FML. Agradecimento especial ao Izoel Vieira da Silva, que foi a pessoa que possibilitou o início do trabalho e aos médicos veterinários que participaram a partir da seleção dos animais para o estudo: Dr. Fábio dos Santos Nogueira (Andradina), Dra. Débora Bereta (Dracena), Dr. Otávio Volpato (Bauru).

## 5. Referências bibliográficas

Almeida, M. A., Jesus, E. E., Souza-Atta, M. L., Alves, L. C., Berne, M. E., Atta, A. M., , 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Parasitol., 127, 3-4, 227-232.

Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. Adv. Parasitol., 57, 1-87.

Alves, W. A., Bevilacqua, P. D., 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad. Saúde Pública do. 20, 1, 259- 265.

Andrade, P.P., Andrade, C.R., 1995. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In: W. van Eden editor. Stress Proteins in Medicine. New York, Marcel Dekker Publish. Co. 308-326.

Araújo, M.S.S., Andrade, R.A., Sathler-Avelar, R., Teixeira-Carvalho, A., Andrade, M.C., Vianna, L.R., Mayrink, W., Reis, A.B., Malaquias, L.C.C., Mello, M.N., Martins-Filho, A.O., 2009. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. Vaccine 27, 1008-17.

Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin. Derm., 14: 523-532.

Assis, J., Queiroz, N.M.G.P., Silveira, R.C.V., Nunes, C.M., Oliveira, T.M.F.S., Noronha Jr., A.C.F., Neves, M.F., Machado, R.Z., Buzetti, W.A.S., 2010. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19, 1, 17-25.

Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. 2008. Canine Leishmaniosis – new Concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.. Trends in Parasitology, 24 (7), 324-330.

Barbosa-de-Deus, R., Mares-Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania major*-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1361-1366.

Borja-Cabrera, G.P., Pontes, N.N.C., Silva, V.O., Souza, E.P., Santos, W.R., Gomes, E.M., Luz, K.G., Palatnik, M., Palatnik de Sousa, C.B., 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the

FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 20, 3277-84.

Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Bauer, F.S., Parra, L.E., Menz, I., Morgado, A.A., Soares, I.S., Batista, L.M.M., Palatnik de Sousa, C.B., 2008. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 26, 4991-7.

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

Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas, M.C., Martínez, E., Valladares, B., Cañavate, C., Requena, J.M., López, M.C., Alvar, J., Moreno, J., 2008. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26(15), 1902-11.

Costa Val, A. P., 2004. Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. 125p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Costa, C.H., Pereira, H.F., Araujo, M.V., 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.*, 24, 1, 21-25.

Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L.M., Shaw, J. J., Dye, C., 2002. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314-20.

Da Silva, V.O., Borja-Cabrera, G.P., Pontes, N.N.C., Souza, E.P., Luz, K.G., Palatnik, M., Palatnik de Sousa, C.B., 2001. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 19, 1082-92.

Dantas-Torres, F., 2006a. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* 101(1), 117-8.

Dantas-Torres F., 2006b. Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.* 141, 1-8.

Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48(3), 151-56.

De Pita-Pereira, D., Cardoso, M.A., Alves, C.R., Brazil, R.P., Britto, C., 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Plebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.*, 107(1), 66-69.

Dea-Ayuela, M.A., Rama-Iniguez, S., Bolas-Fernandez, F., 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6(14), 4187-94.

Deane, L.M., 1956. Leishmaniose Visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária.

Desjeux, P., 1991. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. WHO/LEISH/91.30. Geneva: CTD/TRY, WHO.

Dye, C., 1996. The Logic of Visceral Leishmaniasis Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125-30.

Ferreira, E.C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., Da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M.F. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, 146, 235-241.

Forgber, M., Basu, R., Roychoudhury, K., Theinert, S., Roy, S., Sundar, S., Walden, P., 2006. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS One* 20; 1, e 40.

Galati, E.A.B.; Nunes, V.L.B.; Rego Jr, F.A.; Oshiro, E.T.; Chang, M.R., 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 31(4), 378-90.

Genaro, O., 1993. Leishmaniose Visceral Canina Experimental. 146p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Gontijo, C.M.F., Melo, M.N., 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 7 (3), 338- 349.

Gradoni, L., 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., Sevilha. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilha: [s.n.], 7-14.

Graphpad Program – Programa Graphpad <http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>, 2002-2005.

Grecco, F.F., 2010. Avaliação da resposta imunológica de cães vacinados com a vacina FML (Leishmune®) e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina por meio de dois métodos sorológicos: ELISA e RIFI. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp, Campinas, São Paulo.

Mauricio, I.L., Howard, M.K., Stothard, J.R., Miles, M.A., 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitol. 119, 237-46.

Mendes, C.O., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G.P., Batista, L.M.M., Santos, M.A., Parra, L.E., Menz, I., Palatnik, M., Palatnik de Sousa, C.B., 2003. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. Vaccine 21, 2589-97.

Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. J. Clin. Microbiol. 43 (11), 5515-19.

Ministério da Saúde Brasil – SINAN – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Editora Ministério da Saúde, Brasília-DF, 120 pp.

Nogueira, F.S., Moreira, M.A.B., Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Menz, I., Parra, L.E., Xu, Z., Chu, H.J., Palatnik-de Sousa, C.B., Luvizotto, M.C.R., 2005. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. Vaccine. 23 (40), 4805-4810.

Oliveira, T.M.F.S., Furuta, P.I., Carvalho, D., Machado, R.Z., 2008. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Fluorescent Antibody Test. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17 (1), 7-11.

Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, Paraguai-de-Souza E, Palatnik M, Luz K, Borojevic R., 1995. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg; 89: 390-3

Palatnik-de-Sousa, C.B., Moreno, M.M.B., Paraguai-de-Souza, E., Borojevic, R., 1994. The FML vaccine (fucose-mannose ligand) protects hamsters from experimental kala-azar. Ciência e Cultura, 46, 290-96.

- Palatnik-de-Sousa, C.B., Silva-Antunes, I., Morgado, A.A., Menz, I., Palatnik, M., Lavor, C., 2009. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. *Vaccine* 27, 3505-12.
- Paraguai-de-Souza, E., Bernardo, R.R., Palatnik, M., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2001. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine* 19, 3104-15.
- Pinheiro, P.H.C., Pinheiro, A.N., Ferreira, J.H.L., Costa, F.A.L., Katz, S., Barbiéri, C.L., 2009. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 162, 32-39.
- Quijada, L., Requena, J.M., Soto, M., Alonso, C., 1996. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitol.* 112 (3), 277-84.
- Rajasekariah, G.H., Cardoso, L., Dogcio, D.A., Martin, S.K., Smithyman, A.M., 2008. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78 (4), 616-23.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.P., Campino, L., 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.* 36 (13), 1383-8.
- Santana, D.M., Borja-Cabrera, G.P., Paraguai-de-Souza, E., Sturm, N.R., Palatnik-de-Sousa, C.B., Campbell, D.A., 2002. Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 315-19.
- Santos, W.R., Lima, V.M.F., Paraguai-de-Souza, E., Bernardo, R.R., Palatnik, M., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2002. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21, 30-43.
- Saraiva, E.M., Barbosa, A.F., Santos, F.N., Borja-Cabrera, G.P., Nico, D., Souza, L.O.P., Mendes-Aguiar, C.O., De Souza, E.P., Fampa, P., Parra, L.E., Menz, I., Dias Jr., J.G., Oliveira, S.M., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2006. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine, *Vaccine*, 24, 2423-2431.
- Shaw, J.J., 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(5): 577-579.

Solano-Gallego, L., LLull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J. Clin. Microbiol., 39, 560–563.

Talmi-Frank, D., Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Baneth, G., 2006. Kinetics and Diagnostic and Prognostic Potential of Quantitative Western Blot Analysis and Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Experimental Canine Leishmaniasis. Clin. Vaccine Immunol. 13 (2), 271-76.

Tavares, C.A., Fernandes, A.P., Melo, M.N., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert. Rev. Mol. Diagn., 3 (5), 657-667.

Tesh, R.B. 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am. J. Trop. Med. Hyg., 52, 287– 292.

Vale, A.M., Fujiwara, R.T., da Silva Neto, A.F., Miret, J.A., Alvarez, D.C., da Silva, J.C., Campos-Neto, A., Reed, S., Mayrink, W., Nascimento, E., 2009. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. Zoonoses Public Health, 56 (1), 41-8.

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

## 8. Conclusões

Os resultados deste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

1. Os métodos sorológicos ELISA S7, ELISA e RIFI com antígeno *L. major*-like (Bio-Manguinhos) foram capazes de diferenciar cães vacinados com a vacina FML (Leishmune<sup>®</sup>) de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* nas condições realizadas e com as amostras de soro utilizadas neste estudo.
2. O método ELISA FML, por utilizar como antígeno a mesma glicoproteína utilizada na vacina FML (Leishmune<sup>®</sup>), identifica os anticorpos de cães vacinados e de cães naturalmente infectados.
3. Há necessidade de realização de pelo menos dois métodos sorológicos para o diagnóstico definitivo da LVC, dada a complexidade da doença e as limitações dos métodos atualmente disponíveis. Além disso, os resultados deste trabalho indicam a necessidade de reavaliação dos métodos sorológicos atualmente utilizados para o diagnóstico da LV no Brasil, com o emprego de testes mais sensíveis e específicos, a partir de antígenos purificados e/ou recombinantes, com o objetivo de diminuir a possibilidade de reações falso-positivas, responsáveis pela eliminação de animais saudáveis e minimizar as reações falso-negativas, mantendo reservatórios da doença e representando ameaça à saúde pública.

4. A sensibilidade dos três ensaios sorológicos atualmente empregados no diagnóstico da LVC no Brasil, ELISA e RIFI que utilizam antígeno *L. major*-like e ELISA S7, nas condições realizadas e com as amostras de soro utilizadas neste estudo, foi inferior à preconizada nas bulas dos produtos. Esta baixa sensibilidade dos métodos utilizados para levantamentos epidemiológicos pode ser responsável por incidência subestimada da LVC no Brasil.
  
5. A vacinação de um elevado percentual de cães contra a LVC não interfere com o Programa Brasileiro de Controle da LV.

## 9. Referências bibliográficas

- ADLER, G.H., BECERRA, M.T., TRAVI, B.L. Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal hosts in an endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colômbia. **Biomédica**, v. 23, n. 4, p. 396-400, 2003.
- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ALVAR, J.; CRUZ, I.; MORALES, M. A.; CAÑAVATE, C. Molecular biology tools in leishmaniasis diagnosis and epidemiology. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 25-30.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 0, p. 1-8, 1994.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 552-557, 2006.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259- 265, 2004.
- ANDRADE, P.P.; ANDRADE, C.R. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In: W. van Eden editor. *Stress Proteins in Medicine*. New York, Marcel Dekker Publish. Co. 308-326, 1995.
- ARAÚJO, M.S.S., ANDRADE, R.A., VIANNA, L.R., MAYRINK, W., REIS, A.B., SATHLER-AVELAR, R., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ANDRADE, M.C., MELLO, M.N., MARTINS-FILHO, A.O. Despite Leishvaccine and Leishmune® trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, p. 2211-2224, 2008.
- ARAÚJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C.; MELLO, M.N.; MARTINS-FILHO, A.O. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. **Vaccine**, v. 27, p. 1008-17, 2009.
- ARIAS, J.; MONTEIRO, P.; ZICKER, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 2, p. 145-146, 1996.
- ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59. p. 53-57, 1998.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 523-532, 1996.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NORONHA JR., A.C.F.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. 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.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3a ed. Canada: Saunders Elsevier, 2006. cap. 73, p. 685-698.

BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum** (Sevilla, Spain), p.7-14, 2002.

BANETH, G; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 315-314, 2002.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine Leishmaniasis – new Concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES, A.Z.; COSTA, K.M.; JUNQUEIRA, R.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C.A.P. *Leishmania major*-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, p. 1361-1366, 2002.

BELKAID, Y. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v. 165, p.969–997, 2000.

BORJA-CABRERA, G.P.; DA SILVA, V.O.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; MAYRINK, W.M.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The fucose-manose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, n.2, p.296- 301, 1999.

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

BORJA-CABRERA, G.P.; MENDES, A.C.; PARAGUAI-DE SOUZA, E.; OKADA, L.Y.H.; TRIVELLATO, F.A.A.; KAWASAKI, J.K.A.; COSTA, A.C.; REIS, A.B.; GENARO, O.; BATISTA, L.M.M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, p. 2234-2243, 2004.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; BAUER, F.S.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; MORGADO, A.A.; SOARES, I.S.; BATISTA, L.M.M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine.**, v. 26, p. 4991-4997, 2008.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SANTOS, F.B.; TRIVELLATO, F.A.A.; KAWASAKI, J.K.A.; COSTA, A.C.; CASTRO, T.; NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 3, p. 597-603, 2010.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 419-424, 1998.

- BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **J. Small. Anim. Pract.**, v. 38, p. 29-30, 1988.
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e leishmaniose canina. **Rev. Port. Ciên. Vet.**, n.13, p. 121-141, 1999.
- CARRILLO, E.; CRUSAT, M.; NIETO, J.; CHICHARRO, C.; THOMAS, M.C.; MARTINEZ, E.; VALLADARES, B.; CAÑAVATE, C.; REQUENA, J.M.; LOPEZ, M.C.; ALVAR, J.; MORENO, J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1902-1911, 2008.
- CARRILLO, E., MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v. 128, p. 67-70, 2009.
- CASTRO-SOUSA, F.; PARANHOS-SILVA, M.; SHERLOCK, I.; PAIXÃO, M.S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DOS-SANTOS, W.L.C. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n.7, p. 997-999, 2001.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141, n.21, p.539-543, 1997.
- CORREDOR, A.; GALLEGRO, J.F.; TESH, R.B.; MORALES, A.; FERRO DE CARRASQUILLA, C.; YOUNG, D.G.; KREUTZER, J.B.; PALAU, M.T.; CACERES, E.; PELEAZ, D. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir in Columbia, South America. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p.195-197, 1989.
- COSTA VAL, A. P. **Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas**. 2004. 125f. Tese (Tese de Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.
- COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.24, n.1, p.21-25, 1991
- COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-372, 1990.
- COSTA, C.H.N.; STEWART, J. M.; GOMES, R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSINAYAKE, S.; SANTOS, R.S.; SILVA, M.R.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 334-337, 2002.
- COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 223-228, 2001.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1314-20. 2002.
- COX, G.W.; MATHEIESON, B.J.; GIARDINA, S.L.; VARESI, L. Characterization of IL-12 receptor expression and function on murine macrophages. **J. Immunol.**, v. 145, p. 1719-1726, 1990.
- COX, J.C.; COUTER, A.L. Classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.

- CRAWFORD, R.M.; LEIBY, D.A.; GREEN, S.J.; NACY, C.A.; FORTIER, A. H.; MELTZER, M.S. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. **Immunolo. Ser.**, v. 60, p. 26-46, 1994.
- CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULÁLIO, C.; CRISTOVÃO, J.; NETTO, E.; JOHNSON JR, W.D.; REED, S.G.; BADARO, R. Visceral Leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 155-158, 1995.
- CURI, N.H.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n.1, p. 99-101, 2006.
- DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DE SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1082-1092, 2001.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v. 48, n. 3, p.151-56. 2006.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006a.
- DANTAS-TORRES F. Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet. Parasitol.**, v. 141, p. 1-8., 2006b.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol.**, v. 149, n. 3-4, p.139-46, 2007.
- DAY, M.J. Implications of the immune system during infection by *Leishmania* organism in canine. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS**, 1., 2004, Nápoles. Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 21-28.
- DEA-AYUELA, M.A.; RAMA-INIGUEZ, S.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v. 6, n. 14, p. 4187-4194, 2006.
- DEANE, L.M. **Leishmaniose Visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará**. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.
- DEANE, L.M.; GRIMALDI JR., G. Leishmaniasis in Brazil. In: CHANG, K.P. & BRAY, R.S. **Leishmaniasis**. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers B.U., p.247-281, 1985.
- DE LIMA, H., RODRIGUEZ, N., FELICIANGELI, M.D., BARRIOS, M.A., SOSA, A., AGRELA, I., SANCHEZ, E., LOPEZ, O. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/ Le. Infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 7, p. 721-726, 2009.
- DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement. **Prat. Med. Chir. Anim. Comp.**, v.31, p.137-145, 1996.
- DE PITA-PEREIRA, D., CARDOSO, M.A., ALVES, C.R., BRAZIL, R.P., BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Plebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

DESJEUX, P.; **Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory**. WHO/1990.

DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. WHO/ LEISH/91.30. Geneva: CTD/TRY, WHO, 1991.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DING, A.; NATHAN, C.F.; STUDEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2406-2414, 1988.

DOS SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FRIETAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 315-317, 1998.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS JR., J.B. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunology.**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.

DYE, C. The Logic of Visceral Leishmaniasis Control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 125-30, 1996.

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p. 24-26.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MCAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine Visceral Leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of seroserodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, n. 2, p. 118-123, 1990.

FEIJÃO, A.M.M.; LIMA, J.W.O.; VIEIRA, F.; NATIONS, M.K. In: O significado do cachorro para a família – estudo qualitativo sobre a estratégia de eliminação de cães infectados com *Leishmania* para o controle do calazar. **Rev. Soc. bras. Med. Trop.**, v. 34 – Suplemento I, XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2001.

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

FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; DA SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C.M.F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.**, v. 146, p. 235-241, 2007.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v. 29, n. 6, p. 381-388, 1988.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. **J. Comp. Pathol.**, v. 106, n. 3, p. 311-314, 1992.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. **Proceedings of the international canine leishmaniasis forum**. Barcelona: [s.n.], 1999. p. 6-10.
- FERRER, L.M. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 21-24.
- FORGBER, M.; BASU, R.; ROYCHOUDHURY, K.; THEINERT, S.; ROY, S.; SUNDAR, S.; WALDEN, P. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. **PLoS One**, 20; 1 e 40. 2006.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; DA COSTA, R.T.; MONTEIRO, E.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTES-DIAS, C.L.; DA SILVA, J.C.; DIAS, E.S., 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 131, p. 213-20.
- GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO JR, F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.
- GENARO, O. **Leishmaniose Visceral Canina Experimental**. 1993. 146f. Tese (Tese de Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1993.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana** 8, ed. São Paulo: Livraria e Editora Ateneu, 501p. Cap. 9, p.55-72, 1991.
- 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.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 7-14.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.
- GRAPHPAD PROGRAM – Programa Graphpad <http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>, 2002-2005.
- GRASSLY, N.C.; WENGER, J.; DURRANI, S.; BAHL, S.; DEHPANDE, J.M.; SUTTER, R.W.; HEYMANN, D.L.; AYLWARD, R.B. Protective efficacy of a monovalent oral type 1 poliovirus vaccine: a case-control study. **The Lancet**, v. 369, p. 1356-1362, 2007.
- GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B.; NACY, C.A. Activated macrophage destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by L-arginine-dependent killing mechanism. **J. of Immunol.**, v. 111, p. 278-283, 1990.
- GRIMALDI Jr, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- HALLANDER, H.; GUSTAFSSON, L. Efficacy and effectiveness of acellular pertussis vaccines: a 20-year Swedish experience. **Expert Reviews**, v. 8, n. 10, p. 1303-1307, 2009.

HOMMEL, M.A.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro – ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.72, p.213-218, 1978.

JOÃO, A.; PEREIRA, M. A.; CORTES, S.; SANTOS-GOMES, G. M. Canine Leishmaniasis Chemotherapy: Dog.s clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. **J. Vet. Med.**, v. 53, n. 10, p. 540-545, 2006.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog-II. Pathology. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 80-86, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 57-69, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 279–289, 1999.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World canine leishmaniasis. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 15, p. 949-960, 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R.** The leishmaniasis in biology and medicine, v. 1. 1a ed. Londres: Academic Press, 1987. cap. 7, p. 291-364.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.42, p.170-175, 2001.

LEMESRE, J.L.; HOLZMULLER, P.; GONÇALVES, R.B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the *Lt*ESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, p. 4223-4234, 2007.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

LEMRANI, M.; NEJJAR, R.; PRATLONG, F. A new *Leishmania tropica* zymodeme - causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 96, p. 637–638, 2002.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.C.; NELSON, R.J.; LERNER, M. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11234-11236, 1991.

LIEW, F.Y. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. **Curr. Trop. Microbiol. Immunol.**, v.155, p. 53-64, 1990.

MALIK, R. Combination chemotherapy of canine and feline cryptococcosis using subcutaneously administered amphotericin B. **Aust. Vet. J.**, v.73, n.4, p.124-128, 1996.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALD, Jr.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL, Jr. F.B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-357, 1985.

MAUEL, J.; CORRADIN, S.B.; BUCHMULLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Res. Immunol.**, v. 142, n. 7, p. 577-80; 1991.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitol.**, v. 119, p. 237-46. 1999.

MENDES, C.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P.; BATISTA, L.M.M.; SANTOS, M.A.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003.

MENDES, W.S.; SILVA, A.A.M.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M.L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 227-231, 2002.

MESLIN, F.X.; MILES, M.A.; VEXENAT, J.Á.; GEMMEL, M.A. In: Zoonoses Control in Dogs In: **Dogs, Zoonoses and Public Health**, CABI Publishing, London, 342-50. 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P.. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL - **Série histórica de casos e óbitos de doenças de notificação compulsória, Brasil, 1980 a 2003**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL – SINAN – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Editora Ministério da Saúde, Brasília-DF, 120 pp.

MIRÓ, G. C. La Leishmaniosis canina. 2a Parte. Manejo clínico da La leishmaniosis canina: ¿ Podemos unificar critérios?. **Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colégios Veterinarios de España**, setembro, p. 44-49, 2005.

MIRÓ, G.; MATEO, I.; CAÑAVATE, C.; NIETO, J.; MONTOYA, A.; GALY, S.; MÉDAILLE, C.; ALVAR, J. Miltefosine: A new treatment for canine leishmaniosis . Preliminary results. In: **WORLD LEISH**, 3., 2005, Palermo-Terrasini. *Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis*. Sicília: [s.n.], 2005. p. 171.

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

MONTOYA-LERMA, J., CADENA, H., OVIEDO, M., READY, P.D., BARAZARTE, R., TRAVI, B.L., LANE, R.P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. Longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v. 85, n. 1, p. 19-29, 2003.

MOREIRA JR, E.D.; MENDES-DE-SOUZA, V.M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet. Parasitol.**, v. 122, p. 245–252, 2004.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1a Parte. Terapéutica. **Inf. Vet. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, junho, p. 34-40, 2005.

NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.B.; BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; MENZ, I.; PARRA, L.E.; XU, Z.; CHU, H.J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; LUVIZOTTO, M.C.R. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, 2005.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 19-23, 2008.

NUSSLER, A.K.; BILLAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leucocyte Biol.**, v. 54, p. 171-178, 1993.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 129, n. 3-4, p.219-227, 2005.

OLIVEIRA, T.M.F.S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z.. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *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.

OLIVER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

OSWALD, I.P.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SCHWARTZ, B.; CASPAR, P.; PAULIN, D.; SHER, A.; JAMES, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill intravascular parasite, *shistosoma mansoni*, through production of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 999-1003, 1994.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and Immunity.**, v. 57, n. 3, p. 754-763, 1989.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate gp63 is the major immunogen of the fucose mannose ligand (FML). **Acta trop.**, v. 53, p. 59-72, 1993.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., MORENO, M.M.B., PARAGUAI-DE-SOUSA, E., BOROJEVIC, R. The FML vaccine (fucose-mannose ligand) protects hamsters from experimental kala-azar. **Ciência e Cultura**, v. 46, p. 290-96, 1994.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; GOMES, E.M.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89. n. 4, p. 390-392, 1995.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A.A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v.27, p. 3505-3512, 2009.

PARAGUAI-DE-SOUZA, E., BERNARDO, R.R., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 19, p. 3104-3115, 2001.

PARRA, L.E.; BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SOUZA, L.O.P.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; MENZ, I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 2180-2186, 2007.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. Across sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Vet. Ophthalmol.**, v. 3: n. 1, p. 35-41, 2000.

PINELLI, E. Cytokines in Canine Visceral Leishmaniasis. In: Cytokines in Veterinary Medicine (ed. SCHIJNS, V.E.C.J. & HORZINEK, M.C), (Cap.14) p 217-247, 1997.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, 1999. p.60-64.

PINHEIRO, P.H.C.; PINHEIRO, A.N.; FERREIRA, J.H.L.; COSTA, F.A.L.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C.L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 32-39, 2009.

QUEIROZ, M.J.; ALVES, J.G.; CORREIA, J.B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **J. Pediat. (Rio de J.)**, v. 80, p. 141-146, 2004.

QUIJADA, L.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; ALONSO, C. During canine viscero-cutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. **Parasitol.**, v. 112, n. 3, p. 277-284, 1996.

RAJASEKARIAH, G.H.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D.A.; MARTIN, S.K.; SMITHYMAN, A.M.. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 4, p. 616-623, 2008.

RAVEL, C.; CORTES, S.; PRATLONG, F.; MORIO, F.; DEDET, J.P.; CAMPINO, L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n. 13, p. 1383-1388, 2006.

REIS, A.B. **Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção**. 2001. 176f. Tese (Tese de Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2001.

RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Nosso clínico**, n. 24, p. 10-20, 2001.

RIBEIRO, V. M.; MACIEL JR., B. S.; SOUZA, A. A.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. Histopatologia e amastigotas na pele de cães com leishmaniose e a fração albumina/globulinas. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 27., 2006, Vitória. **Anais do XXVII Congresso brasileiro de clínicos veterinários de pequenos animais**. Vitória: Associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais-Espírito Santo, 2006. p. 66.

RIBEIRO, V.M.; TAFURI, W.L.; LIMA, M.C.C.D.; NOGUEIRA, F.S.; MICHALICK, M.S.M. Immunotherapy with Leishmune® in dogs naturally infected with *L. infantum*. In: **4 World Congress on Leishmaniasis**, Lucknow, Índia, February, 2009.

ROBERTS, M.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br. Med. Bull.**, v. 75 and 76, p. 115-30, 2006.

ROSARIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROZE, M. Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. **Rec. Med. Vet.**, v. 162, p. 19-26, 1986.

SANTANA, D.M.; BORJA-CABRERA, G.P.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; STURM, N.R.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; CAMPBELL, D.A.. Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 315-319, 2002.

SANTOS, F.N.; BORJA-CABRERA, G.P.; MIYASHIRO, L.M.; GRECHI, J.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.; MARTINS FILHO, O.A.; LUVIZOTTO, M.C.; MENZI, I.; PESSOA, L.M.; GONÇALVES, P.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 6176-6190, 2007.

SANTOS, W.R.; LIMA, V.M.F.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 30-43, 2002.

SARAIVA, E.M.; BARBOSA, A.F.; SANTOS, F.N.; BORJA-CABRERA, G.P.; NICO, D.; SOUZA, L.O.P.; MENDES-AGUIAR, C.O.; DE SOUZA, E.P.; FAMPA, P.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; DIAS JR., J.G.; OLIVEIRA, S.M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine, **Vaccine**, v.24, p. 2423-2431. 2006.

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.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TALLEY, L.; SALAMA, P. Short report: assessing field vaccine efficacy for measles in famine-affected rural Ethiopia. **Am.J.Trop.Med. Hyg.**, v. 68, n. 5, p. 545-546, 2003.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BANETH, G. Kinetics and Diagnostic and Prognostic Potential of Quantitative Western Blot Analysis and Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Experimental Canine Leishmaniasis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 271-276, 2006.

TASSI, P.; ORMAS, P.; MADONNA, M. Pharmacokinetic of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog, **Res Vet Sci**, v.56, p.144-50, 1994.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, p.287- 292, 1995.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; PASTOR, J.; GALLEGU, M.; PORTUS, M.; ARBOIX, M. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v.141,n.22, p.574-575, 1997.

VALLADARES, J. E.; RIERA, C.; GONZÁLES-ENSENYAT, P.; DÍEZ-CASCÓN, A.; RAMOS, G.; SOLANO-GALLEGU, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using a antimony liposomal formulation. **Vet.Parasitol.**, v. 97, n.1, p. 15-21, 2001.

VALE, A.M.; FUJIWARA, R.T.; DA SILVA NETO, A.F.; MIRET, J.A.; ALVAREZ, D.C.; DA SILVA, J.C.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. **Zoonoses Public Health**, v. 56, n. 1, p. 41-48, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. UNDP/ world Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). **Guidelines for de evaluation of *Plamodium falciparum* vaccines in populations exposed to natural infection**, p. 11-49, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniases**. Report of a WHO Expert Committee Technical Report Series, n° 793, 1990.

Youden, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 32-35. 1950.

## **ANEXO I**



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

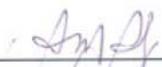
**CERTIFICADO**

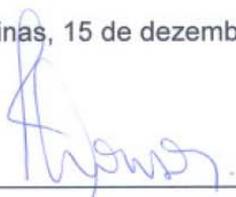
Certificamos que o Protocolo nº 1721-1, sobre "ELISA FML (Fucose Manose Ligand) como método sorológico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral. Comparação com o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e com dois kits ELISA licenciados", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Fabiana Farinello Grecco, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de dezembro de 2008.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1721-1, entitled "ELISA FML (Fucose Manose Ligand) as serologic method diagnostic for Vsiceral Leishmaniasis. Comparison with indirect imunofluorescence and two licenced ELISA kits", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on December 15, 2008.

Campinas, 15 de dezembro de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## **ANEXO II**

#### Critérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles **não reagentes** devem ser sempre inferiores a **0,100**. E as D.Os do controles **reagentes** devem ser sempre superiores a **0,300**.

#### Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. do soros não reagentes e somar ao fator **R = 0,142**. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte **0,03**.

#### Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 8888.9072 ou por e-mail [servio@biogene.ind.br](mailto:servio@biogene.ind.br).

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos  
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:  
**Biogene Indústria e Comércio Ltda ME**  
Rua Costa Sepúlveda, 749  
Engenho do Meio - Recife - PE  
CEP 50.730-260  
CGC.: 69.951.234/0001-10  
Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0  
Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 8888.9072  
E-mail: [servio@biogene.ind.br](mailto:servio@biogene.ind.br)  
MAPA Licença n°. 7434/2000  
**Indústria Brasileira**



Validade e data de fabricação na embalagem



## Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

#### Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O ELISA/S7® tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - ELISA/S7® confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

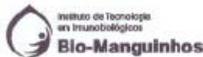
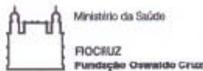
#### Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários à realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

## **ANEXO III**



Tel: (21) 3882.9393  
FAX: (21) 2561.0277  
SAC: 0800.210.310  
www.bio.fiocruz.br

## IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

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

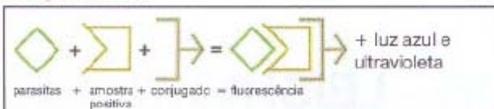
#### PRINCÍPIO DO TESTE:

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

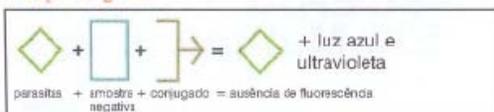
A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultra-violeta, sendo considerado reagente os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo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

#### ESQUEMA DO TESTE:

##### Reação Positiva



##### Reação Negativa



### IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 3

#### MATERIAL FORNECIDO:

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

#### MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

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

#### CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

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

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

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

#### CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Somente para uso "IN VITRO".

4 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

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

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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 5

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

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

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

TITULAÇÃO DO CONJUGADO:

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

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

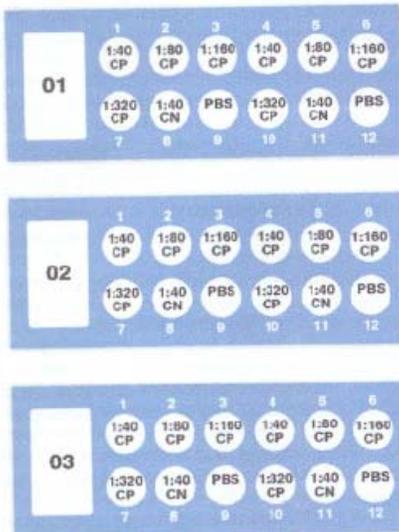
- 1- Ferver as lâminulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição, e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.
- 2- Separar 3 lâminas e pingar 10 µL do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo.
- 3- Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente ou duas horas a 37°C, para uma boa fixação dos parasitas.

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

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

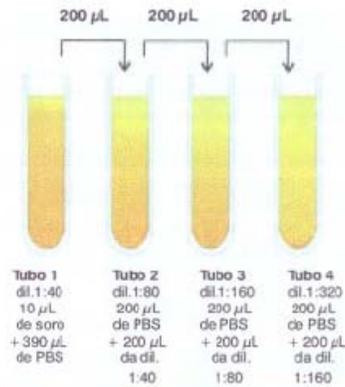
6 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Ex:



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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 7



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

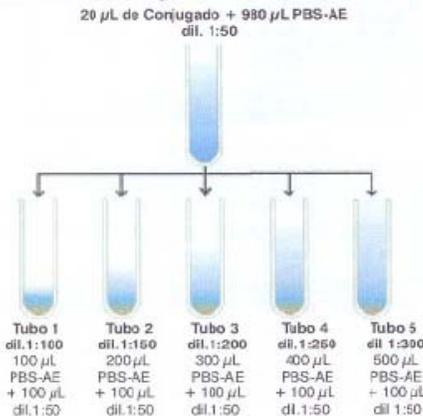
6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

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

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

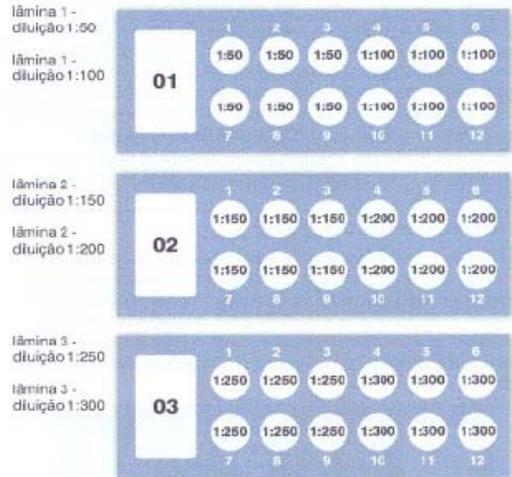
8 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

- 8- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.
- 9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.
- 10- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C, em estufa, para secar. No entanto não exceder muito nesta etapa.
- 11- Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.
- 12- Diluir o conjugado anti-Ig cão marcado com fluoresceína, conforme descrito a seguir:



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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 9



- 14- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em estufa.
- 15- Lavar as lâminas 3 (três) vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.
- 16- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C para secagem. No entanto, não exceder muito nesta etapa.
- 17- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com laminula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

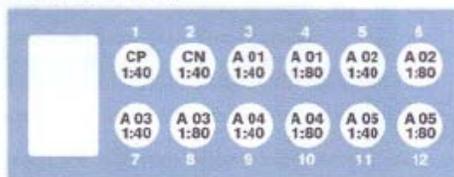
10 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

**DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO**

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

**PROCEDIMENTO DO TESTE:**

- 1- Ferver as laminulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.
- 2- Fazer o protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).



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

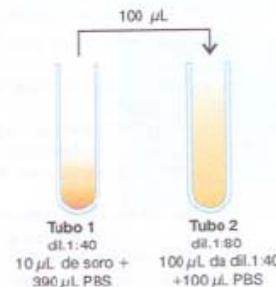
Obs. 2: os controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 11

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

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

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



- 5- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.
- 6- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C.
- 7- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.
- 8- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.
- 9- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.
- 10- Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE, conforme tabela a seguir:

12 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

11- Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15 µL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

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

Obs. 2: evitar pipetar menos de 5 µL de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição.

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

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

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

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

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

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

**LEITURA E INTERPRETAÇÃO:**

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

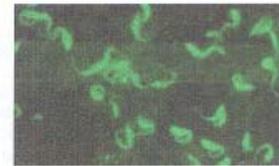
2- Focalizar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo "background".

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 13

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

**Amostras reagentes**

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



**Amostras não reagentes**

Os soros teste que não apresentarem fluorescência.



**ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:**

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

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

14 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

- Labelled Antibodies in Biology and Medicine, Abacus Press and McGraw Hill International Book Company, 1978.

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

**ATENÇÃO:**

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

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8972, em 04/10/2004. Resp. Téc. Méd. Vet.: Dr. Joel Majerowicz. CRMV-RJ 2342

**ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:**

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

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

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

SAC: 0800.210.310 www.bio.fiocruz.br

edição: dezembro de 2004

BM\_008\_07Bk

**ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA MODELO DE PROTOCOLO**

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

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

Lâmina nº:

- 1 \_\_\_\_\_
- 2 \_\_\_\_\_
- 3 \_\_\_\_\_
- 4 \_\_\_\_\_
- 5 \_\_\_\_\_
- 6 \_\_\_\_\_

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

Lâmina nº:

- 1 \_\_\_\_\_
- 2 \_\_\_\_\_
- 3 \_\_\_\_\_
- 4 \_\_\_\_\_
- 5 \_\_\_\_\_
- 6 \_\_\_\_\_

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

Técnico responsável: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

## **ANEXO IV**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
**Bio-Manguinhos**

Tel.: (21) 3882.9393  
FAX: (21) 2561.0277  
SAC: 0800.210.310  
www.bio.fiocruz.br



LEISHMANIOSE

## EIE - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

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

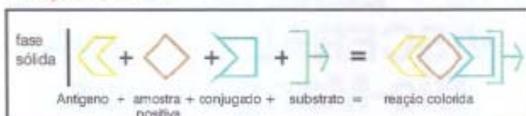
#### PRINCÍPIO DO TESTE:

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

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

#### ESQUEMA DO TESTE:

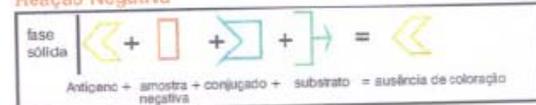
##### Reação Positiva



#### EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

3

##### Reação Negativa



#### MATERIAL FORNECIDO:

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

#### MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

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

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

**CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:**

Manter a -20°C: R-08, R-09, R-10, R-11.  
 Manter entre 2° e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06 e R-07.

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

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

**CUIDADOS E PRECAUÇÕES:**

- Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.
- A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas de laboratório, tais como:
- as amostras, assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado;
  - homogeneizar as amostras e controles antes de usar;

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

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

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

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

- 2 - Diluir em tubos 5 µL dos controles e das amostras de soros de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostra /conjugado (1:100).
- 3 - Distribuir 100 µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o controle positivo, na "C" e "D" o

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra										
B	CN	Amostra										
C	Amostra											
D	Amostra											
E	SS	Amostra										
F	SS	Amostra										
G	Amostra											
H	Amostra											
I	Amostra											
J	Amostra											

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

- 4 - Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.
- 5 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

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

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

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

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

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

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

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

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

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

11 - Preparo do substrato:

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

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

**LEITURA:**

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

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

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

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

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

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

**RESULTADOS**

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

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

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

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

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

**VALIDAÇÃO DO TESTE:**

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

- Controle Positivo:  $\geq 0,500$  de DO
- Controle Negativo:  $\geq 0,050 \leq 0,120$  de DO

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

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

- 1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

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

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

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

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

5 - Diluir em tubos, 5µL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

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

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

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

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

8 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

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

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

n° strips duplas	n° placas	R-03	H <sub>2</sub> O dest.
até 3	1/2	20 mL	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

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

10 - Preparo do conjugado:

n° strips duplas	n° reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	15 µL
6	até 96	15 mL	15 µL

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

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

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

14 - Preparo do substrato:

n° strips duplas	n° reações	R-04	R-05	R-06
1	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
3	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
4	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
5	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
6	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

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

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

#### VALIDAÇÃO DO TESTE:

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

Controle Positivo  $\geq 0,500$  densidade ótica

Controle Negativo  $\geq 0,050 \leq 0,120$  densidade ótica

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

#### CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO DO TESTE

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

#### DISPONIBILIDADE

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

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

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

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

#### LEITURA:

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

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

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

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

#### RESULTADOS

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

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

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

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

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Visceral Canina

MODELO DE PROTOCOLO

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

Disposição das amostras

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

Densidade ótica das amostras

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

Cálculo do Cut-Off: (amostras de soro)

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

CO =

Técnico Responsável: \_\_\_\_\_

Observações:

Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina  
 MODELO DE PROTOCOLO

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

Disposição das amostras

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

Densidade ótica das amostras

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

Cálculo do Cut-Off: (amostras colhidas em Papel Filtro)

$Co = \bar{X}_{CN} \times 3$

Co =

Técnico Responsável: \_\_\_\_\_

Observações: