

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***“DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE KIT PARA DIAGNÓSTICO  
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EMPREGANDO A CITOMETRIA  
DE FLUXO”***

Henrique Gama Ker

Escola de Farmácia

Ouro Preto - 2012

**Henrique Gama Ker**

***“DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE KIT PARA DIAGNÓSTICO  
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EMPREGANDO A CITOMETRIA  
DE FLUXO”***

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas área de concentração Fármacos, Medicamentos e Vacinas.

**Orientador:** Dr. Alexandre Barbosa Reis, Laboratório de Pesquisas Clínicas /CIPHARMA, Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

**Co-Orientador:** Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti, Laboratório de Imunoparasitologia /NUPEB/ICEB, Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

Escola de Farmácia

Ouro Preto – 2012

*Dedico este trabalho ao meu afilhado João Pedro fonte de renovação, mudança, e alegria. Aos meus pais João Carlos Ker e Maria José de Souza Gama Ker pela dedicação aos sonhos dos filhos.*

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende  
é com a vida e com os humildes”*

Cora Coralina

*A Deus por proporcionar a vida e iluminar os caminhos*

*Aos meus pais João Carlos e Maria José pela dedicação, amor e compreensão durante todos esses anos*

*Aos meus irmãos Pedro e Mariana pela amizade e companheirismo*

*Ao meu sobrinho e afilhado João Pedro por proporcionar grande alegria a toda família*

*A Cristina pela amizade e apoio durante longos anos*

*Aos meus avós Carlito e Lourdes, João e Irene (in memoriam) pelos valores familiares*

*Aos primos Valéria e Aureliano pelos incentivos e pela amizade*

*A todos meus familiares que sempre apoiaram minhas decisões*

*A Universidade Federal de Ouro Preto por contribuir na minha formação profissional e científica*

*Ao professor Alexandre Barbosa Reis, sobretudo amigo, pelos ensinamentos e por incentivar e acreditar no meu potencial*

*À Dra Denise da Silveira Lemos Giunchetti pela dedicação e incentivo para realização deste trabalho*

*Aos professores Cláudia Martins Carneiro e Rodolfo Cordeiro Giunchetti pelos ensinamentos e anos de convivência agradável*

*À Tânia Kelly Martins pela dedicação à organização do laboratório, pela ótima convivência e amizade*

*Aos amigos Sheler Martins de Souza e Rodrigo Dian pelos conselhos e amizade verdadeira*

*Ao amigo Bernardo Machado grande companheiro da graduação pela amizade e incentivo à minha carreira*

*Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia e Laboratório de Pesquisas Clínicas pela convivência harmoniosa e pelos valores de união*

*Aos amigos do curso de mestrado pelo apoio e aprendizado nos momentos de estudo.*

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral.....	3
2.2. Leishmaniose Visceral Canina .....	4
2.3. Controle e Profilaxia da Leishmaniose Visceral Canina.....	6
2.4. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	8
2.5. Conservação de Imunobiológicos.....	12
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1. Objetivo Geral .....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
4.1. Desenho experimental e animais avaliados.....	15
4.1.1. Soroteca I .....	15
4.1.2. Soroteca II .....	15
4.2. Cultivo das Formas Promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	16
4.2.1. Preparo das Formas Promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	16
4.2.2. Condicionamento dos Parasitos nos Diferentes Meios Conservantes e Temperaturas de Armazenamento.....	17
4.3. Pesquisa de Anticorpos IgG Anti-Promastigotas Fixadas de <i>L. infantum</i> (AAPF- IgG).....	17
4.3.1. Análise dos Dados por Citometria de Fluxo .....	18
4.3.2. Análise do Desempenho AAPF.....	19
4.4. Análise Morfológica dos Parasitos em Diferentes Condições de Conservação e Armazenamento.....	23
4.4.1. Análise morfológica dos parasitos por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) em gráficos de <i>dot plot</i> e histogramas.....	23
4.4.2. Análise morfológica de lâminas coradas pelo Giemsa .....	23
4.5. Análise Microbiológica.....	24
4.5.1. Cultura para crescimento de bactérias.....	24
4.5.2. Cultura para crescimento de fungos.....	24
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>

5.1. Avaliação da reatividade da reação de pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de <i>L. infantum</i> (AAPF-IgG), por citometria de fluxo, para estabelecimento das condições metodológicas.....	26
5.2. Avaliação do controle de qualidade do antígeno de promastigota de <i>L. infantum</i> , empregado no protótipo de <i>kit</i> de diagnóstico da LVC .....	28
5.2.1. Avaliação da reatividade sorológica em <i>pool</i> e amostras individuais de soros de cães não infectados (NI) e infectados (INF) empregando promastigotas <i>L. infantum</i> em diferentes condições de armazenamento e conservação .....	28
5.2.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos de promastigotas de <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes condições de conservação e estocagem por fotomicrografias de lâminas coradas pelo <i>Giemsa</i> e por citometria de fluxo .....	32
5.2.3. Avaliação do controle de qualidade microbiológica das promastigotas de <i>L. infantum</i> submetidas a diferentes condições de conservação e estocagem .....	40
5.3. Avaliação do desempenho da pesquisa de AAPF-IgG no diagnóstico da LVC utilizando promastigotas de <i>L. infantum</i> conservados em Formol 0,5%.....	41
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.....18
- Figura 2:** Reatividade da AAPF-IgG, em mistura de soros de cães não infectados e infectados incubados com diferentes diluições do anticorpo conjugado com FITC.....26
- Figura 3:** Reatividade da AAPF-IgG, em *pool de soros* de cães não infectados (NI) e infectados (INF) na diluição de 1:4096, após 6 meses de avaliação.....29
- Figura 4:** Reatividade da AAPF-IgG, em amostras de soros individuais de cães não infectados (NI) e infectados (INF) na diluição de 1:4096, após 6 meses de avaliação.....31
- Figura 5:** Avaliação morfológica dos antígenos de *L. infantum* conservados em PBS e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C).....35
- Figura 6:** Avaliação morfológica dos antígenos de *L. infantum* conservados em Fenol e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C).....36
- Figura 7:** Avaliação morfológica dos antígenos de *L. infantum* conservados em Thimerosal e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C).....37
- Figura 8:** Avaliação morfológica dos antígenos de *L. infantum* conservados em Formol e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C).....38
- Figura 9:** Curva ROC da pesquisa da AAPF-IgG construída a partir dos índices de sensibilidade e 1-especificidade do teste avaliado.....42
- Figura 10:** Avaliação do desempenho da pesquisa da pesquisa de AAPF-IgG no diagnóstico da LVC empregando a diluição dos soros de 1:4096 e utilizando antígenos de *L. infantum* conservados em Formol 0,5%.....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Categorias de resultados do teste diagnóstico em uma população que inclui cães não infectados e cães infectados com <i>L. infantum</i> .....	19
<b>Tabela 2:</b> Interpretação de <i>Kappa</i> .....	22
<b>Tabela 3:</b> Análise microbiológica em ágar sangue (bactérias) e ágar sabourad (fungos) das preparações antigênicas.....	39
<b>Tabela 4:</b> Análise microbiológica em ágar sangue e ágar sabouraud após diferentes tempos de exposição das preparações antigênicas.....	40
<b>Tabela 5:</b> Sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia da pesquisa AAPF-IgG com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.....	42
<b>Tabela 6:</b> Razões de verossimilhança (RVs) e probabilidade pós teste da AAPF-IgG utilizando o ponto de corte 20%.....	42
<b>Tabela 7:</b> Valores de concordância <i>Kappa</i> entre resultados de ELISA (LZOON-PBH) e AAPF-IgG.....	43

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AAPF-IgG - Anticorpo IgG Anti-Promastigota Fixada

ASC - Área sobre a curva

BOD - *Body Oxigen Demand*

CA - Cães assintomáticos

CCA - Centro de Ciência Animal

CCZ-BH – Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte

CD4<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliar

CD8<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxico

CO - Cães oligossintomáticos

CS - Cães sintomáticos

DAT - *Direct Agglutination Test*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ELISA - *Enzime Lynked Immunosorbent Assay*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL1 - Fluorescência 1

FSC - *Foward Scatter*

g - Grama

IARC - Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

Ig - Imunoglobulina

IgA - Imunoglobulina da classe A

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgG1 - Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2 - Imunoglobulina da classe G2

INF - Cães infectados

L - Litro

LIT - Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose*

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MFF - *Max Fax Fix solution*

mL - Mililitros

MS - Ministério da Saúde

NI - Cães não infectados

NNN - Meio de cultura *Novy-MacNeal-Nicolle*

NUPEB - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

PBS - *Phosphate Buffer Salin*

PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

pH - Potencial hidrogeniônico

PPFP - Percentual de Parasitos Fluorescentes Positivos

RFC - Reação de Fixação do Complemento

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

ROC - *Receiver Operation Curve*

rpm - Rotação por minuto

RV - Razão de Verossimilhança

SFB - Soro Fetal Bovino

SSC - *Side Scatter*

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

WHO - Organização Mundial de Saúde

μL - Microlitro

Mm - Micrometro

## Resumo

A leishmaniose visceral encontra-se em expansão em alguns centros urbanos sendo importante destacar o papel dos cães como reservatório da doença. Assim, o controle da leishmaniose visceral canina (LVC) torna-se relevante, sendo as ações preconizadas pelo ministério da saúde baseadas num tripé de ações que sugerem o tratamento dos casos humanos, combate ao vetor e a eutanásia dos cães soropositivos. No entanto, devido à limitação na eficiência dos testes de diagnósticos atualmente empregados (RIFI e ELISA), a eliminação destes cães torna-se cada vez mais difícil e questionável. Neste contexto, o presente projeto propôs desenvolver e validar um protótipo de *kit* de diagnóstico pela pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* fixada através da técnica de citometria de fluxo. Para cumprir com o objetivo, foram utilizados soros de cães naturalmente infectados, portadores de diferentes formas clínicas, provenientes da área endêmica de Belo Horizonte, e soros de cães não infectados do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Na primeira etapa deste projeto, houve a produção de promastigotas de *L. infantum* que, em seguida, foram preservadas em diferentes conservantes (Fenol 0.35%, Formol 0.5%, Thimerosal 0.01% e controle PBS) e em diferentes condições de temperatura (25°C, 4°C e -20°C). Na etapa seguinte, a etapa de validação dos antígenos, foram realizadas avaliações mensais das condições de rendimento reacional, aspectos morfológicos e microbiológicos das diferentes preparações antigênicas. Estas análises revelaram que a condição ideal de preservação dos antígenos de *L. infantum* a serem empregados no protótipo de *kit* é a fixação por formol 0,5% e acondicionamento em geladeira. A última etapa deste estudo avaliou os índices de desempenho do protótipo empregando o suporte antigênico conservado em formol 0,5% e estocado em geladeira. Os resultados observados revelaram um excelente potencial do protótipo no diagnóstico da LVC, com valores de sensibilidade igual a 95%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo igual a 83,3% e a acurácia do teste foi estimada em 96%. Desta forma, a partir deste trabalho, torna-se disponível uma nova alternativa para o diagnóstico sorológico da LVC, que poderá ser empregada em campanhas de controle da doença no Brasil.

### Abstract

Visceral leishmaniasis is expanding in some urban centers and it is important to highlight the role of dogs as reservoirs of the disease. Therefore, the control of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is important, and the Brazilian Ministry of Health established three pivotal actions that include the treatment of the human cases of the disease, vector control and the euthanasia of seropositive dogs. However, due to the limited efficiency of the diagnosis tests commonly used in serological trials (RIFI and ELISA), the elimination of these dogs becoming increasingly difficult and questionable. So, this project proposed the development and validation of a new diagnosis prototype kit employing the flow cytometry anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes as a novel serological device for laboratorial diagnosis of CVL. To achieve this goal, sera of naturally infected dogs that have different clinical forms from the endemic area of Belo Horizonte were used. In addition to these, sera of non-infected dogs maintained in the UFOP Animal Facilities were included as a control group. In the first step of this study, promastigotes of *L. infantum* were produced and kept in different preservative solutions (Phenol 0,35%, Formaldehyde 0,5%, Thimerosal 0,01% and PBS) and stored at different temperatures (25°C, 4°C e -20°C). Then, in the next stage to validate these antigens, evaluations of reaction yield, so as the morfologic and microbiologic features, were conduced monthly. These assessment showed that the best condition to preserve the antigenic support of the prototype was obtained when the promastigotes forms are put in Formaldehyde 0,5% at the refrigerator temperature (4°C). Lastly, the performance of the prototype was evaluated when those antigens were used. The results demonstrated an excellent potencial os this new method in the diagnosis of CVL. It is possible to observe great values of sensibility (95%), specificity (100%), positive and negative predictive values (100% and 83,3% respectively) so as de accuracy (96%). In conclusion, from this work, one alternative methodology is available for the CVL immunodiagnosis. The prototype may contribute as a supplementary device in the disease campaigns of control in Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral canina (LVC) encontra-se em franca expansão no mundo e no Brasil principalmente, com incidência estimada de cerca de 25.000 novos casos por ano em nosso país. Atualmente, a soropositividade é empregada como critério para indicar a eutanásia dos cães, como medida de controle da leishmaniose visceral (LV), segundo normas do Ministério da Saúde. Considerando a limitação na eficiência dos métodos sorológicos convencionais Reação de Imunofluorescência Indireta e *Enzyme Lynked Immunosorbant Assay* (RIFI e ELISA) em discriminar cães infectados de não infectados, vacinados ou portadores de outras doenças infecto-parasitárias, torna-se extremamente importante o desenvolvimento e a disponibilização de técnicas alternativas com elevada especificidade e sensibilidade, capazes de fornecer um diagnóstico sorológico mais confiável. Além disto, estas técnicas atualmente empregadas apresentam-se com dificuldades de diagnosticar com certeza cães assintomáticos principalmente na fase inicial da doença onde observa-se uma baixa produção de anticorpos.

A iniciativa de introduzir a citometria de fluxo como método complementar para análise sorológica na LVC pelo nosso grupo de pesquisa abriu novas perspectivas para o estabelecimento de técnicas diagnósticas empregando parasitos fixados como suporte antigênico. Acredita-se que a pesquisa de anticorpos caninos anti-*L. infantum* por citometria de fluxo poderá contribuir fundamentalmente para que os órgãos de saúde pública responsáveis pelo controle da LV no Brasil tenham uma alternativa mais segura para implementação das medidas preventivas.

Considerando que um dos grandes problemas dos órgãos públicos de saúde que atuam no campo do controle, profilaxia e vigilância epidemiológica da LVC é a carência de técnicas diagnósticas com elevada sensibilidade e especificidade capazes de identificar cães infectados nos focos de transmissão, com segurança e rapidez, de modo a tornar o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) mais eficiente. Assim, o presente trabalho propôs analisar a melhor forma de preservação de promastigotas de *L. infantum* na elaboração de um protótipo de *kit* de diagnóstico para aplicação na

técnica de pesquisa de Anticorpos IgG Anti-Promastigotas Fixadas de *L. infantum* (AAPF-IgG) por citometria de fluxo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral

As Leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (Ross, 1903). O gênero *Leishmania* compreende parasitos heteroxênicos de hospedeiros mamíferos, dentre eles homens, cães e roedores. Os insetos vetores são flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Lainson & Shaw, 1987). A Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral.

Neste complexo espectro clínico, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar possui uma grande importância devido à elevada taxa de mortalidade nos pacientes infectados quando não são submetidos ao tratamento, representando assim, um sério problema de saúde pública em vários países (Hommel *et al.*, 1995; WHO, 2010). A doença possui uma ampla distribuição epidemiológica no mundo sendo endêmica em 87 países, incluindo 21 no Novo Mundo e 66 no Velho Mundo. No Brasil encontram-se registrados 90% dos casos de LV que ocorrem no continente americano (MS, 2006).

No ciclo biológico, os parasitos sob a forma de amastigotas internalizados em macrófagos na derme de hospedeiros vertebrados são ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos. Durante o repasto sanguíneo e transformam-se em promastigotas que se multiplicam e passam por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, com adesão do parasito no tubo digestivo do inseto vetor. O final deste processo, denominado de metaciclogênese, culmina no aparecimento de formas promastigotas metacíclicas infectantes que migram para o tubo digestivo anterior. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado. Neste momento, os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos, onde, após transformarem em formas amastigotas, resistentes à ação das enzimas

lisossomais, residem e se multiplicam no interior de fagolisossomos (Chang, 1983). Desta maneira, proliferação das amastigotas dentro do macrófago favorece o rompimento da membrana celular e a liberação de parasitos, os quais infectam rapidamente outros macrófagos, protegendo-se da ação do complemento e de anticorpos, podendo assim iniciar nova fase de multiplicação binária.

Em relação aos hospedeiros vertebrados encontrados no Brasil, destacam-se mamíferos pertencentes à família Canidae (Deane & Deane, 1955). No caso da *L. infantum*, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório doméstico do parasito, tanto em ambiente urbano quanto rural. No ciclo silvestre, as raposas *Dusicyon vetulus* no Nordeste do Brasil e o *Cerdocyon thous* na Amazônia brasileira são até o momento os supostos hospedeiros de *L. infantum* neste ambiente.

## 2.2. Leishmaniose Visceral Canina

O cão é apontado como o mais importante reservatório considerando, principalmente, o grande número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) e o intenso parasitismo cutâneo que ocorre nestes animais (Deane & Deane, 1955; Abranches *et al.*, 1991; Alvar *et al.*, 1994; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2009; 2010). A importância dos cães como fonte de infecção de *L. infantum* fica ainda mais evidente quando se observa que a maioria dos focos de LV humana no Brasil está diretamente relacionada às áreas onde se encontram altos índices de soroprevalência canina (Coura-Vital, 2011; Coura-Vital, *et al.*, 2011a).

Assim como no homem, a doença no cão é de evolução lenta e insidiosa. As características clínicas do calazar canino variam muito, devido a numerosos mecanismos imunopatológicos envolvidos na evolução da doença e à diversidade da resposta imune desenvolvida pelos diferentes animais (Mancianti *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2009).

Durante a infecção por *Leishmania*, o sistema imune do cão fica exposto a uma série de antígenos derivados do parasito, e responde a estes estímulos através de mecanismos múltiplos da imunidade celular e humoral. Quanto aos mecanismos envolvendo a resposta imune celular, Reis *et al.* (2006a)

observaram uma série de alterações nas populações de linfócitos: cães assintomáticos apresentaram um aumento de linfócitos T circulantes acompanhado de aumento nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>; cães oligossintomáticos apresentaram um aumento de linfócitos T circulantes e cães sintomáticos apresentam queda de linfócitos T circulantes acompanhada de redução nas subpopulações TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram queda de linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) circulantes, enquanto uma diminuição de monócitos (CD14<sup>+</sup>) é observada apenas em cães sintomáticos.

Os aspectos da resposta imune humoral na LVC estão focalizados em avaliações prognósticas e, sobretudo, soro-epidemiológicas e diagnósticas. No âmbito do prognóstico, Reis *et al.* (2006b) avaliaram o impacto desta resposta imunológica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* portadores de diferentes formas clínicas. As evidências encontradas apontam para um aumento dos níveis de IgG total de acordo com a evolução clínica da LVC. Além disso, cães assintomáticos e oligossintomáticos apresentam maiores níveis de IgG1, e a presença de IgG total, IgG2, IgA e IgE está correlacionada com a gravidade da doença, sendo mais evidente em cães sintomáticos. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Iniesta *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007; Teixeira-Neto *et al.*, 2010).

Recentemente nosso grupo de pesquisa ampliou as investigações das alterações imunopatológicas no compartimento da resposta celular e humoral durante o decurso da história natural da LVC (Coura-Vital *et al.*, 2011b). Estes autores reclassificaram as formas clínicas da LVC com ênfase na fase inicial da doença onde os cães assintomáticos foram subdivididos em dois grupos: cães assintomáticos I (CA-I) animais soronegativos e PCR positivos e assintomáticos II (CA-II) animais soropositivos e PCR positivos. De forma interessante foi observado que cães do grupo CA-I apresentam monócitos CD14<sup>+</sup> e células B CD21<sup>+</sup> elevados em relação aos demais grupos. Já no compartimento da resposta humoral cães do grupo CA-II já demonstram uma intensa atividade policlonal de linfócitos B com produção de diversas classes e sub-classes imunoglobulinas (Ig). (Coura-Vital *et al.*, 2011b).

### 2.3. Controle e Profilaxia da Leishmaniose Visceral Canina

Os programas que buscam o desenvolvimento de medidas profiláticas e de controle para as doenças parasitárias baseiam-se, geralmente, nas condições epidemiológicas em que as mesmas se desenvolvem. O Brasil é o único país endêmico para LV que regularmente conduz um programa epidemiológico e profilático no combate à doença (Palatnik de Souza *et al.*, 2001). O programa brasileiro de controle da LV é composto de três medidas: diagnóstico e tratamento dos casos humanos, borrifação com inseticidas para eliminação do vetor, e identificação e eliminação dos cães infectados (MS, 2006).

A recomendação de sacrifício dos cães está respaldada na consideração de que o cão é um importante reservatório da doença para o homem e na demonstração de que a doença canina precede a doença humana, sendo a primeira um dos responsáveis pelo avanço tanto espacial como temporal da segunda (Alves & Bevilacqua, 2004). Entretanto, o sacrifício dos animais soropositivos provoca profundo impacto e indignação dos proprietários, em face ao papel que o cão representa na sociedade atual, não só no valor afetivo como também zootécnico, além da prática de segurança da população.

Um dos principais fatores que contribui para a expansão da LV é a limitação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no quesito eliminação do reservatório doméstico, devido principalmente a questões como: demora no diagnóstico e eutanásia dos animais infectados (Braga *et al.* 1998; Vieira & Coelho 1998), reposição imediata de cães pela população (Dye, 1996; Ashford *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 1998 ) e o método diagnóstico adotado como padrão-ouro (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI), que é questionado quanto à sensibilidade e especificidade (Braga *et al.*, 1998; Rosário *et al.*, 2005). Diante disso, torna-se necessário a busca por alternativas para evitar a eutanásia de animais e, ao mesmo tempo, proporcionar um melhor controle da doença.

O emprego de medidas terapêuticas teria como finalidade a recuperação dos cães infectados, o que poderia auxiliar no controle profilático da infecção

humana (Alencar, 1959). Diversos autores demonstraram que os tratamentos através de drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos, os antimoniais, apresentam baixa eficácia em produzir cura parasitológica no cão (Deplazes *et al.*, 1992; Moritz *et al.*, 1999; Rieira *et al.*, 1999). Segundo Marzochi *et al.* (1985), esse fato poderia ser explicado em parte pela alta excreção renal do antimônio, por diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados. A associação do alopurinol ao antimonial demonstrou uma potencialização da remissão dos sinais clínicos, mas não foi capaz de proporcionar cura parasitológica (Alvar *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1995; Baneth & Shaw, 2002). Além disto, observa-se que de um modo geral animais tratados reduzem os títulos de anticorpos, mas não tornam-se negativos em testes sorológicos convencionais indicando a formação de uma cicatriz sorológica que gera confusão no diagnóstico sorológico da LVC. Cabe ressaltar que a indução de resistência, a toxicidade e o elevado custo dos fármacos também constituem limitações sérias para o tratamento da LVC (Gramiccia *et al.*, 1992).

Considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz, a WHO não recomenda e, atualmente, o MS condena o uso de antimoniais e de outras drogas usadas na quimioterapia humana para o tratamento da LVC (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, MS, 2006). Considerando ainda que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, a aplicação de medidas imunoproláticas apresenta-se como uma possível ferramenta a ser empregada no controle da infecção canina (Dunan *et al.*, 1989). Além disso, para Marzochi *et al.* (1985) a possibilidade de aplicação de uma vacina para o controle da LVC seria uma importante medida sanitária, uma vez que tal vacina poderia ser aplicada juntamente com a vacina anti-rábica, cujo programa no Brasil tem sido bem sucedido.

Atualmente, verifica-se a existência de duas vacinas anti-LVC registradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil: uma vacina composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania donovani* associada ao adjuvante saponina (Palatnik de Souza, *et al.*, 2001), comercialmente chamada Leishmune<sup>®</sup> (Fort Dodge); e a outra vacina cuja composição antigênica é a

proteína recombinante de amastigota A2 (Fernandes *et al.* 2008) sendo comercializada como Leish-Tec<sup>®</sup> (Hertape Calier). Todavia, devido à inexistência de estudos que comprovem o impacto da vacinação na incidência da doença humana e canina, bem como a relação custo-benefício, levaram o Ministério da Saúde não utilizar ainda o uso de ambas as vacinas como medida de saúde pública.

Visto que tanto a prática terapêutica quanto as estratégias imunoprolifáticas necessitam ainda de mais estudos para que possam ser empregadas de maneira confiável, uma importante ferramenta para auxiliar no PCLV seria o desenvolvimento e a disponibilização de técnicas alternativas com elevada especificidade e sensibilidade capazes de fornecer um diagnóstico confiável.

#### **2.4. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Para o diagnóstico da LVC, as suspeitas iniciais baseiam-se na presença de sinais clínicos que muitas vezes são inespecíficos e comuns a outras infecções caninas (Ferrer *et al.*, 1995). Além disso, aproximadamente 70% dos animais infectados soropositivos nas áreas endêmicas não apresenta qualquer alteração clínica (Mancianti *et al.*, 1986; Brandonisio *et al.*, 1992; Coura-Vital *et al.*, 2011a), o que compromete o emprego do diagnóstico clínico como definidor de doença.

O diagnóstico conclusivo depende do achado do parasito em tecidos alvos como fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pele, pela demonstração direta de formas amastigotas em esfregaços por aposição em lâminas coradas pelo *Giemsa*. Outra alternativa para o diagnóstico parasitológico direto se da pela pesquisa das formas promastigotas após isolamento e cultivo destes tecidos em meios de cultura específicos. O diagnóstico parasitológico, embora seja um método de certeza, apresenta várias desvantagens, pois a punção e/ou biópsia de órgãos é um método invasivo e traumático, podendo causar sérios danos para os animais (Alvar *et al.*, 2004). Além disso, a observação de parasitos torna-se mais difícil quando a carga parasitária for baixa, geralmente observada em animais assintomáticos e oligossintomáticos (Ashford *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006a).

Dentre as ferramentas de diagnóstico molecular, destaca-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) descrita por Mullis & Faloomo (1987) e vem sendo utilizada no diagnóstico da LVC. Este método visa a amplificação de fragmentos de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* e apresenta sensibilidade variável de 70-100% e especificidade em torno de 95-100% (Ashford *et al.*, 1995; Quaresma *et al.*, 2009; Teixeira-Neto, *et al.*, 2010). Entretanto, sua sensibilidade e especificidade estão relacionadas a diversos fatores como os iniciadores utilizados, número de ciclos, métodos de extração e escolha dos tecidos para realização da técnica e, portanto, ainda são necessários mais estudos sobre esta técnica de modo a facilitar sua aplicação na rotina laboratorial (Quaresma *et al.*, 2009; Teixeira-Neto, *et al.*, 2010).

Os métodos sorológicos são mais utilizados devido, a grande produção de anticorpos no decurso da doença (Bray, 1980), bem como ao baixo custo e facilidade para obtenção de amostras para os ensaios. Dessa forma, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por técnicas sorológicas constituem ferramentas essenciais no diagnóstico de doença canina (Deplazes *et al.*, 1995; Gosttstein *et al.*, 1988).

O exame sorológico realizado pela reação de fixação do complemento (RFC) foi utilizado pela primeira vez para diagnosticar a LV humana, em 1938. Em 1957, pesquisadores brasileiros descreveram a RFC para inquéritos caninos concluindo que esta técnica possuía sensibilidade e especificidade melhores que os exames parasitológicos diretos. Com a demonstração da possibilidade de aplicação da RFC em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, essa técnica tornou-se largamente difundida (Nussenzweig, *et al.* 1957) com a vantagem sobre os demais métodos sorológicos de não apresentar reações cruzadas com outras enfermidades (Hockmeyer, *et al.* 1984, Flemmings, *et al.* 1984, Pappas, *et al.* 1984, Smith, *et al.* 1984, Pappas, *et al.* 1985).

O *Direct Agglutination Test* (DAT), citado como um método alternativo para o diagnóstico da LV foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção canina no final da década de 80 (Harith, *et al.* 1986). Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último

demonstrou semelhante sensibilidade e especificidade quando comparado aos outros dois testes (Evans *et al.* 1990; da Silva *et al.* 2006).

Atualmente no Brasil, o diagnóstico sorológico para a LVC baseia-se na pesquisa de anticorpos IgG através de métodos convencionais, onde apenas duas técnicas são empregadas (RIFI e ELISA). A RIFI tem sido considerada rápida e prática, porém as variações de sensibilidade podem ocasionar uma baixa estimativa do número de casos devido à grande quantidade de falsos negativos, podendo atingir valores de até 30% (Berrahal *et al.*, 1996; Alvar *et al.*, 2004). Neste sentido, o emprego deste método pode dificultar o diagnóstico de cães em estágios iniciais da doença e, desta forma, subestimar a taxa de infecção por *Leishmania* na população canina de áreas endêmicas.

Diversos trabalhos demonstram que o teste de ELISA possui valores de sensibilidade variável entre aproximadamente 70-98%. Sua especificidade apresenta-se variável (70-100%) e depende do antígeno empregado (Badaró *et al.*, 1986; Mancianti *et al.*, 1996; Rosario *et al.*, 2005, Mettler *et al.*, 2005). A utilização de antígenos recombinantes (k39 e k26) tem aumentado consideravelmente a especificidade dessa técnica (Burns *et al.*, 1993; Scalone *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Rosário *et al.*, 2005), entretanto, reações cruzadas ainda podem ocorrer (Badaró *et al.*, 1996).

Segundo Lira *et al.* (2006) a RIFI (Biomanguinhos/FIOCRUZ) apresentou sensibilidade de 68% e especificidade de 87,5% e o ELISA (Biomanguinhos/FIOCRUZ) sensibilidade de 72% e especificidade de 75%, mas o desempenho de ambos os testes não apresentou diferença estatística. Esses autores sugerem que as técnicas deveriam ser utilizadas em conjunto para reduzir o número de resultados falso negativos.

Cabe ressaltar que o RIFI e ELISA, além de apresentarem limitações de eficiência na detecção de reatividade em cães que possuem baixos títulos de anticorpos, na maioria das vezes cães assintomáticos (Moll *et al.*, 1996; Brito *et al.*, 2000; Mettler *et al.*, 2005), também são incapazes de discriminar a reatividade sorológica de cães infectados daquela observada em animais vacinados com a vacina Leishmune<sup>®</sup> (Andrade *et al.*, 2007).

Nesse panorama, o aumento no contingente de cães vacinados agrava ainda mais a utilização das técnicas sorológicas convencionais (RIFI e ELISA), dentro do programa de controle da leishmaniose visceral. Neste sentido, estudos pioneiros realizados por pesquisadores de nosso grupo como o de Andrade *et al.*, (2007) mostraram uma elevada capacidade da citometria de fluxo empregando a técnica de pesquisa AAPF-IgG no diagnóstico da LVC na diferenciação de cães naturalmente infectados de vacinados com o imunobiológico Leishmune<sup>®</sup>.

A iniciativa de introduzir a pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo como método complementar para análise sorológica em doenças parasitárias abriu novas perspectivas para o estabelecimento de técnicas diagnósticas empregando parasitos fixados como suporte antigênico (Martins-Filho *et al.*, 1995; Rocha *et al.*, 2002). No contexto do diagnóstico sorológico da LVC, o estabelecimento da metodologia da AAPF-IgG por Carvalho-Neta *et al.* (2006) evidenciou o elevado desempenho da citometria de fluxo no diagnóstico sorológico da doença canina. No estabelecimento desse método, Gomes (2006) realizou a avaliação da influência do tempo de cultura na reação antígeno-anticorpo no contexto específico da *L. infantum*. Segundo este autor, formas promastigotas de *L. infantum* na fase estacionária inicial são mais apropriadas para uso na AAPF-IgG, ponderando suas características intrínsecas de aspectos morfométricos e de antigenicidade. Outras variáveis metodológicas, como o número de parasitos em suspensão, temperatura e tempo de reação foram descritas por Rocha *et al.* (2002) para pesquisa de anticorpos humanos anti-*Leishmania braziliensis*.

Neste contexto, o presente trabalho propôs analisar a melhor forma de preservação de promastigotas de *L. infantum* para aplicabilidade em um protótipo de *kit* para ser empregado como método diagnóstico alternativo da LVC através da técnica de AAPF-IgG por citometria de fluxo. Para isto, a seleção do melhor meio conservante e a temperatura ideal para estocagem serão avaliadas por parâmetros que verificam a validade da preparação antigênica. Além disto, incluímos neste estudo diversas abordagens para um acompanhamento do controle de qualidade do suporte antigênico por meio de avaliações da capacidade reacional do antígeno, manutenção e preservação

morfológica bem como o controle microbiológico da preparação antigênica frente a diferentes condições de preservação (conservantes e temperaturas).

## 2.5. Conservação de Imunobiológicos

A conservação ideal das preparações antigênicas em um *kit* de diagnóstico apresenta algumas características relevantes. Em relação ao conservante, este deve apresentar algumas propriedades essenciais tais como atividade de amplo espectro contra microorganismos, ser efetivo a baixas concentrações e possuir estabilidade em diferentes temperaturas e condições de pH.

O PBS (*phosphate buffer saline*) possui muitas aplicações, pois trata-se de uma solução isotônica e não tóxica às células. O soro fetal bovino (SFB) é considerado um suplemento essencial a cultura de diferentes tipos celulares por fornecer um amplo espectro de macromoléculas importantes na estabilização das células (Tapparo, 2009). Dessa forma, o uso do PBS associado ao soro fetal bovino atua promovendo um ambiente que favorece a disponibilização conformacional para ligações antígeno-anticorpo.

Dentre os conservantes empregados neste estudo, o Thimerosal é um produto farmacêutico desenvolvido em 1927, e é composto por 49,55% de mercúrio. Desde então, tem sido comercializado como um agente antimicrobiano em diferentes produtos, incluindo soluções anti-sépticas e, principalmente, como conservante em vacinas e outros injetáveis (Geier *et al.*, 2007).

Recentemente, estudos apontando a toxicidade pelo uso tópico do Thimerosal indicaram a remoção do composto destas preparações farmacêuticas. A partir de então, outros candidatos a conservantes de antígenos vem sendo estudados e, neste contexto, Mayrink e *et al.* (2006), avaliaram o potencial do Fenol a 0,35% na conservação dos antígenos empregados no teste intradérmico de Montenegro.

O formaldeído é um fixador e conservante amplamente utilizado na preservação de tecidos além de outras aplicações tais como a conservação de produtos cosméticos e de saneantes. Em 2006 a WHO, através da Agência

Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), limitou a concentração máxima desta substância utilizada em soluções conservantes a um valor máximo de 0,5%. A solução formalina (formol 10%) já era empregada como conservante de suportes antigênicos de *kits* de diagnóstico, e um exemplo prático desta utilização é verificada nos *kits* de diagnósticos por RIFI da Doença de Chagas, Leishmaniose Humana e Canina produzidos pela Biomanguinhos (Fiocruz/RJ).

Além do conservante, a temperatura é um fator de extrema importância para a conservação. A escolha da temperatura ideal de armazenamento de um *kit* de diagnóstico é de suma importância para assegurar que os produtos imunobiológicos (vacinas, *kits* diagnósticos e imunoterápicos) mantenham suas características iniciais, haja vista que são produtos que se deterioram depois de determinado tempo quando expostos a variações de temperaturas inadequadas à sua conservação (Manual de Rede de Frio, MS 2001).

A termoestabilidade dos imunobiológicos varia de acordo com as características de cada produto. As vacinas constituídas de vírus vivos atenuados, por exemplo, são mais sensíveis ao calor. As que contêm derivados de alumínio como adjuvante, tais como os toxóides, são mais tolerantes às temperaturas elevadas, mas o congelamento pode inutilizá-las. Outros imunobiológicos são sensíveis à luz, como a vacina BCG e, por isso são envasados em ampolas/frascos de cor âmbar (Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais, MS 2006).

O conhecimento sobre a estabilidade dos antígenos frente a diferentes condições de estoque é de grande importância não somente na determinação do melhor desempenho em um teste de diagnóstico. Adicionalmente, a temperatura de armazenamento do imunobiológico pode levar a possíveis alterações da preparação antigênica quando armazenadas em condições diferentes daquelas preconizadas na bula, tais como, em situações de transporte ou controle inadequado da temperatura. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar o comportamento de promastigotas fixadas em diferentes conservantes e estocadas em temperatura ambiente (24°C), de geladeira (4°C) e de freezer (-20°C) no sentido de propor um protótipo de *kit* para o diagnóstico da LVC.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Desenvolver e padronizar um protótipo de *kit* para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina através da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas (AAPF-IgG) de *L. infantum*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- I. Estabelecer os procedimentos metodológicos para a pesquisa de AAPF-IgG aplicada ao diagnóstico da LVC;
- II. Validar a melhor condição de conservação e estocagem do antígeno a ser empregado no protótipo de *kit*;
- III. Avaliar, por um período de seis meses, o desempenho do antígeno conservado e estocado na condição ideal em soro de cães não infectados (NI) e infectados (INF) portadores de diferentes formas clínicas da LVC, através da citometria de fluxo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho experimental e animais avaliados

Neste trabalho foram utilizados soros de 110 cães sem raça definida (*Canis familiaris*) não infectados (NI) e naturalmente infectados (INF) com *L. infantum* e portadores de diferentes formas clínicas da doença. A seguir, os grupos serão descritos detalhadamente.

#### 4.1.1. Soroteca I

A soroteca I foi criada para compor os experimentos de avaliação mensal da reatividade sorológica das diferentes preparações antigênicas deste trabalho, e foi composta por:

- Cinco soros de cães do grupo NI nascidos, criados e mantidos no canil do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP que apresentavam exames sorológicos (RIFI e ELISA) negativos para LVC;
- Cinco soros de cães do grupo INF (2 assintomáticos, 1 oligossintomático e 2 sintomáticos) provenientes do município de Belo Horizonte fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (CCZ-BH) que apresentavam exames sorológicos (RIFI e ELISA) positivos para LVC.

#### 4.1.2. Soroteca II

A soroteca II foi criada para compor os experimentos de avaliação da pesquisa AAPF-IgG, utilizando a preparação antigênica de melhor desempenho, no diagnóstico da LVC e foi composta por:

- Quinze soros de cães do grupo NI provenientes de área endêmica da regional noroeste do município de Belo Horizonte que apresentavam exames sorológicos (RIFI e ELISA) e molecular (PCR) negativos para LVC;
- Vinte e cinco soros de cães que apresentavam exames sorológicos (ELISA) negativos e molecular (PCR) positivo para LVC. Estes cães, segundo Coura-Vital *et al.*, 2011, foram classificados como assintomáticos I (CA-I);

- Sessenta soros de cães do grupo INF provenientes do município de Belo Horizonte fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (CCZ-BH) que apresentavam exames sorológicos (RIFI e ELISA) positivos para LVC. Estes cães foram divididos em 3 grupos clínicos de acordo com a classificação proposta por Mancianti *et al.* (1988): 18 cães assintomáticos (CA), 22 cães oligossintomáticos (CO) e 20 cães sintomáticos (CS).

#### 4.2. Cultivo das Formas Promastigotas de *L. infantum*

As formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) criopreservadas em nitrogênio líquido na terceira passagem, *in vitro*, foram descongeladas e inoculadas em tubos estéreis contendo meio ágar sangue: Novy-MacNeal-Nicolle – NNN (Novy Macneal, 1903; Nicolle, 1908), associado ao meio líquido complexo *liver infusion tryptose* – LIT (Camargo, 1964), conhecido como meio NNN-LIT. As culturas foram mantidas em estufa Body Oxygen Demand (B.O.D) à temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante o período de quatro dias. A cada quatro dias as culturas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação. Em seguida, os parasitos foram re-inoculados pela transferência de  $1 \times 10^7$  promastigotas/mL para *erlenmeyers* contendo o meio NNN-LIT. Este procedimento foi repetido a cada quatro dias para expansão e manutenção de culturas em fase logarítmica. Posteriormente, as culturas mantidas nos *erlenmeyers* foram utilizadas para o inóculo de parasitos ( $1 \times 10^7$  promastigotas/mL) para garrafas de cultivo contendo apenas o meio LIT. Os parasitos foram incubados por um período de 4 dias e novamente examinados e repicados para novas garrafas de cultivo. Todo o procedimento foi realizado a fim de obter a quantidade suficiente de parasitos até a 9ª passagem, *in vitro*, permitindo, desta forma, a obtenção das formas promastigotas morfologicamente semelhantes, com um perfil de tamanho e granulidade mais homogêneo, além de garantir a composição antigênica dos parasitos, considerando as possíveis alterações inerentes ao processo de cultivo.

##### 4.2.1. Preparo das Formas Promastigotas de *L. infantum*

Os parasitos, no sexto dia de cultivo em LIT, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego),

homogeneizados em vórtex a baixa rotação para desfazer os grumos de parasitos (Gomes, 2006). Em seguida, a suspensão celular foi submetida a uma centrifugação diferencial (25°C, 200rpm por 10 minutos) para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitos no sedimento. Para recuperação dos parasitos no sobrenadante, estes foram deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS contendo 3% de Soro Fetal Bovino (SFB), por duas vezes, por centrifugação a 4°C, 2.200rpm por 10 minutos. Os sedimentos formados foram homogeneizados cuidadosamente, ressuspendidos em 10 mL de PBS 3% de SFB e agrupados em um único volume. Posteriormente, uma alíquota de 10µL foi separada e diluída (1:10) para a realização da contagem do número de parasitos no aparelho BC-Vet 2800, Mindray®.

#### **4.2.2. Condicionamento dos Parasitos nos Diferentes Meios Conservantes e Temperaturas de Armazenamento**

Ao final das etapas de lavagem e contagem do número de parasitos, a suspensão celular foi ajustada para  $5 \times 10^7$  promastigotas/mL nas diferentes soluções conservantes: Fenol 0,35%, Thimerosal 0,01%, Formol 0,5%, e PBS suplementado com 3% SFB como controle. Posteriormente, as diferentes preparações antigênicas foram alíquotadas em frações de 1 mL em tubos de criopreservação estéreis e, em seguida, armazenadas em diferentes temperaturas: 25 °C (estufa), 4°C (geladeira) e -20 °C (freezer).

#### **4.3. Pesquisa de Anticorpos IgG Anti-Promastigotas Fixadas de *L. infantum* (AAPF-IgG)**

Os ensaios de citometria de fluxo para a pesquisa de AAPF de *L. infantum* foram realizados segundo protocolo descrito Martins-Filho *et al.* 1995, modificado por Rocha *et al.* 2002 e Carvalho-Neta, *et al.*, 2006. Em placas de 96 poços, fundo em “U” (Linbro, ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio), alíquotas de 10µL da suspensão de parasitos na concentração  $5 \times 10^7$  promastigotas/mL ( $5 \times 10^5$  parasitos/poço) foram incubados a 37°C por 30 minutos na presença de 50µL do soro diluído em PBS-3% SFB em diferentes titulações (1:2048, 1:4096, 1:8192). Após incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com

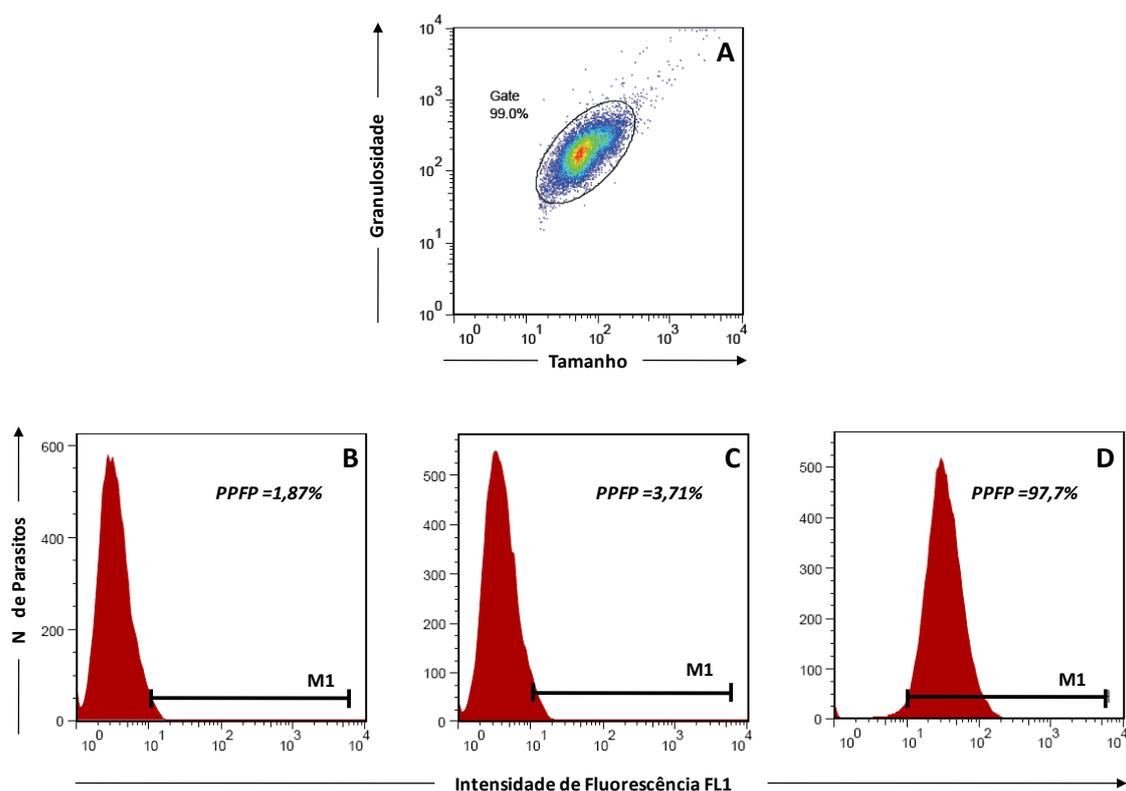
150µL de PBS 3% SFB e centrifugados a 4°C, 2.200rpm por 10 min. Posteriormente, 50µL de anticorpo anti-IgG canino (específico para a porção Fc) marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Bethyl<sup>®</sup>, Inc., Montgomery, Texas, EUA) diluído em diferentes diluições (1:500, 1:1.000 e 1:2.000) em PBS 3% SFB foram colocados em cada poço da placa, que foi incubada a 37°C por 30 minutos e ao abrigo da luz. Após a incubação, os parasitos foram novamente lavados duas vezes com 150µL de PBS 3% SFB, centrifugados (4°C, 2.200rpm, 10 minutos) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foi colocado 200µL de solução fixadora - MFF (10g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson) empregando o *software Cell-Quest* e a análise destes dados foram feitas através do *software FlowJo<sup>®</sup>*.

#### 4.3.1. Análise dos Dados por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema óptico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (*FSC-Forward Scatter*), granulosidade ou complexidade interna (*SSC-Side Scatter*) e a emissão de fluorescência. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas ao tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 20000 parasitos incubados com anticorpos marcados com FITC que, quando excitados, emitem sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1-fluorescência verde). A análise da reatividade de anticorpos anti-formas promastigotas de *L. infantum* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 1A).

Para avaliar a intensidade média de fluorescência (FL1) da população selecionada, histogramas foram construídos em função do número de parasitos (Figuras 1B, C e D). Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros dos grupos NI e INF foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP).

O PFP para cada amostra de soro foi determinado através do estabelecimento de um marcador de reatividade (M1) em função da fluorescência obtida para o controle isotípico da reação (Figura 1B). Desta forma, empregando-se este marcador (M1), foram obtidos os valores de PFP para amostras do parasito incubado com soro de cão do grupo NI (Figura 1C) e do grupo INF (Figura 1D).



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

#### 4.3.2. Análise do Desempenho AAPF

##### 4.3.2.1. Receiver Operating Characteristic Curve – Curva ROC

Neste estudo, utilizou-se a estratégia de análise *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para definição do melhor ponto de corte para o teste e avaliação da acurácia global da AAPF. As curvas foram obtidas utilizando-se o programa estatístico STATA versão 10.0 (StataCorp, 2007).

A curva consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (taxa de falso-positivo) no eixo horizontal, para diferentes pontos de corte do teste diagnóstico avaliado (Griner *et al.*, 1981; Zweig *et al.*, 1993; Greiner *et al.*, 2000). Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva (ASC), que é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa valores mais próximo de 1, melhor é o desempenho do método avaliado.

#### 4.3.2.2. Índices de Desempenho

Para avaliar o desempenho do protótipo empregando a composição antigênica validada foram utilizados índices de validade expressos em porcentagem e em chance, calculados a partir da classificação dos resultados em quatro categorias de acordo com a presença (grupo INF) ou ausência de infecção (grupo NI) (Griner *et al.*, 1981; Fletcher *et al.*, 1989; Sackett *et al.*, 1991; Jaescheke *et al.*, 1994a; Jaescheke *et al.*, 1994b). Tais categorias estão expressas na Tabela 1 e foram definidas da seguinte forma: “verdadeiro-positivo” (VPos) = presença de infecção e teste positivo; “falso-positivo” (FPos) = ausência de infecção e teste positivo; “falso-negativo” (FNeg) = presença de infecção e teste negativo e “verdadeiro-negativo” (VNeg) = ausência de infecção e teste negativo.

**Tabela 1:** Categorias de resultados do teste diagnóstico em uma população que inclui cães não infectados e cães infectados com *L. infantum*.

	LVC		TOTAL
	INF	NI	
TESTE POSITIVO	VPos (a)	FPos (b)	(a+b)
TESTE NEGATIVO	FNeg (c)	VNeg (d)	(c+d)
TOTAL	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Com base nesses fundamentos, tabelas similares foram preenchidas de acordo com o modelo da Tabela 1 com o número de ocorrências de cada uma

das categorias (a, b, c, e d). A partir dos resultados obtidos, o desempenho dos testes sorológico foi avaliado segundo diferentes índices, incluindo: sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e acurácia. Os índices de desempenho foram obtidos utilizando-se o programa estatístico STATA versão 10.0 (StataCorp, 2007).

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

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

Para se conhecer a contribuição dos testes investigados na confirmação ou exclusão do diagnóstico da LVC, os valores preditivos foram determinados considerando-se a prevalência artificial e a prevalência da doença no município de Belo Horizonte-MG no ano de 2010. Assim, para este cálculo, empregou-se o Teorema de Bayes, que é definido pela seguinte fórmula:  $VPP = \text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência} / (\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência} + (1 - \text{Especificidade}) \times (1 - \text{Prevalência}))$ ;  $VPN = \text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência}) / (\text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência}) + (1 - \text{Sensibilidade}) \times \text{Prevalência})$  (Vecchio, 1966).

A acurácia indica a proporção de todos os resultados corretos de um teste, ou seja, os “verdadeiro-positivos” e os “verdadeiro-negativos”. Assim, constitui-se em um indicador do valor global do teste.

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

Segundo a literatura, valores de RV negativa abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência de doença e valores de RV positiva acima de 10 praticamente confirmam a presença de doença (Jaeschke *et al.*, 1994b). Cabe ainda ressaltar, que as proporções empregadas no cálculo das razões de verossimilhança são definidas a partir do eixo vertical da Tabela 1 ou de tabelas semelhantes, não apresentando, assim, variações em relação a mudanças na prevalência da doença em questão.

#### **4.3.2.3. Índice Kappa**

Para estimar a concordância entre a positividade e a negatividade dos testes sorológicos utilizou-se o Índice *Kappa*, que pode ser interpretado segundo faixa de valores, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Interpretação de *Kappa*

<b>KAPPA</b>	<b>CONCORDÂNCIA</b>
< 0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

#### **4.4. Análise Morfológica dos Parasitos em Diferentes Condições de Conservação e Armazenamento**

##### **4.4.1. Análise morfológica dos parasitos por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) em gráficos de *dot plot* e histogramas**

Para avaliar o perfil morfológico dos antígenos de *L. infantum* em diferentes condições de conservação e armazenamento, foram construídos gráficos *dot plot* de tamanho (FSC) *versus* granulidade (SSC). Neste sentido, foi construído um *gate*, delimitado e selecionado a população de interesse, para que fosse feita uma análise individual do tamanho e da granulidade da população selecionada em gráficos do tipo histograma.

##### **4.4.2. Análise morfológica de lâminas coradas pelo Giemsa**

Mensalmente, durante a realização dos experimentos para avaliação da reatividade sorológica, foram retiradas uma alíquota de 10µL das preparações antigênicas nos diferentes meios conservantes e temperaturas de armazenamento para realização de um esfregaço em lâmina de vidro e posterior coloração com *Giemsa* para a avaliação das características morfológicas das formas promastigotas em microscópio óptico. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 100X e digitalizadas através do microscópio

Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada, pertencente ao laboratório multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB).

#### **4.5. Análise Microbiológica**

As análises microbiológicas das diferentes preparações antigênicas foram conduzidas por duas maneiras distintas descritas a seguir.

Uma investigação foi realizada nos tempos de 1, 3 e 6 meses para avaliação do crescimento de microorganismos (fungos e bactérias). Os tubos de criopreservação estéreis contendo os antígenos preservados em diferentes conservantes foram retirados diretamente do local de armazenagem (estufa, geladeira e freezer) sem que os mesmos fossem abertos antes da realização dos testes microbiológicos. Esta análise foi realizada a fim de verificar se alguma possível contaminação era proveniente do processo de produção das diferentes preparações antigênicas.

Outra avaliação foi feita retirando-se os tubos de criopreservação estéreis contendo os diferentes antígenos do local de armazenagem e, em seguida, estes tubos foram abertos e deixados sobre a bancada do Laboratório de Pesquisas Clínicas da UFOP e fechados após um período de 1, 2, 6, 12, e 24 horas de exposição. Esta avaliação foi efetuada de modo a conferir a possibilidade de contaminação dos diferentes antígenos em condições normais de uso de um de *kit* diagnóstico.

As culturas para crescimento de bactérias e fungos foram realizadas no Laboratório Claudino (CNPJ: 25706318000113) localizado na cidade de Ouro Preto-MG.

##### **4.5.1. Cultura para crescimento de bactérias**

Foram utilizadas placas contendo o meio ágar com 5% sangue de carneiro (MBiolog<sup>®</sup>) e o inóculo da amostra foi realizado com auxílio de uma alça microbiológica de 0,01mL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa à temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e examinadas após 48 horas.

##### **4.5.2. Cultura para crescimento de fungos**

Foram utilizados tubos de cultura contendo o meio ágar *sabouraud* com clorafenicol (MBiolog<sup>®</sup>). O inóculo da amostra foi realizado vertendo-se o

conteúdo dos tubos de criopreservação contendo os diferentes antígenos diretamente sobre o tubo de ensaio com o meio de crescimento. Os tubos foram incubados por 40 dias, mantidos à temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , e examinados todos os dias macroscopicamente.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da reatividade da pesquisa de anticorpos IgG anti-promastigotas fixadas de *L. infantum* (AAPF-IgG), por citometria de fluxo, para estabelecimento das condições metodológicas

Diferentes concentrações do anticorpo anti-imunoglobulina G canino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) em três diferentes diluições (1:500, 1:1.000 e 1:2.000) foram empregadas a fim de definir a concentração capaz de segregar as amostras de cães dos grupos NI e INF (Figura 2). Os resultados da AAPF-IgG foram obtidos após incubação das misturas de soros caninos (soroteca I) submetidos à diluição seriada (1:256 a 1:262.144) com formas promastigotas fixadas de *L. infantum*, nas condições previamente padronizadas por Rocha *et al.*, (2002), Carvalho-Neta *et al.*, (2006).

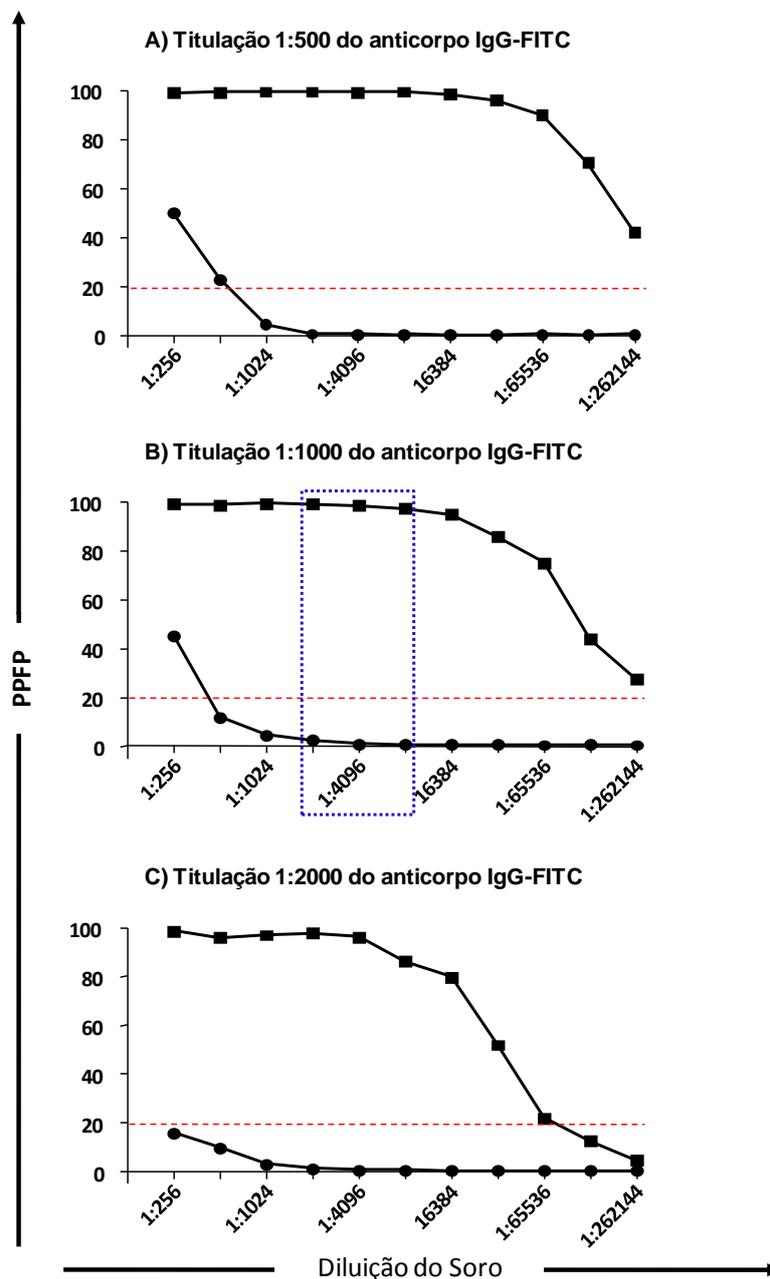
Empregando o critério descrito por Martins-Filho *et al.* (1995) a análise de reatividade de cada grupo estão expressos como percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), empregando o valor de 20% (Figura 2 - linha pontilhada vermelha) como ponto de corte entre os resultados positivos (PPFP>20%) e negativos (PPFP≤20%).

A análise dos resultados mostrou curvas de titulação de anticorpos que configuram a alta sensibilidade do teste. Os resultados em *pool* de soros de cães do grupo NI apresentaram valores de PPFP positivos até a diluição de 1:512 e na diluição de 1:256 quando os anticorpos foram titulados 1:500 e 1:1.000, respectivamente (Figura 2A e B). Além disso, é importante destacar que quando o anticorpo foi titulado 1:2.000, os valores de PPFP iniciam negativos desde a diluição 1:256 (Figura 2C).

Os resultados da pesquisa AAPF-IgG em *pool* de soros de cães do grupo INF mostraram valores de PPFP positivos até a diluição 1:262.144 para as titulações de 1:500 e 1:1.000 do anticorpo (Figuras 2A, B). No entanto, na titulação do conjugado fluorocromo de 1:2.000, as diluições do soro de cães INF em 1:131.072 e 1:262.144 apresentaram abaixo do ponto de corte.

Considerando a melhor reatividade diferencial média entre misturas de soros dos grupos NI e INF nas diluições de 1:2.048, 1:4096, 1:8.192 (retângulo tracejado em azul, Figura 2B), a escolha da titulação do conjugado foi 1:1.000, uma vez que demonstrou boa sensibilidade do método com uma especificidade

alcançada em títulos menores. Assim, para as análises subsequentes de avaliação da reatividade sorológica dos suportes antigênicos preservados em diferentes conservantes e para avaliação do desempenho da pesquisa de AAPF-IgG no diagnóstico da LVC, foram realizadas com a diluição do soro de 1:4.096, em que observa-se maior amplitude diagnóstica na segregação entre os grupos NI e INF.



**Figura 2:** Reatividade da AAPF-IgG em pool de soros de cães não infectados (NI = ●) e infectados (INF = ■) incubados com diferentes titulações do anticorpo conjugado com FITC, por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como PPFP.

## **5.2. Avaliação do controle de qualidade do antígeno de promastigota de *L. infantum*, empregado no protótipo de *kit* de diagnóstico da LVC**

### **5.2.1. Avaliação da reatividade sorológica em *pool* e amostras individuais de soros de cães não infectados (NI) e infectados (INF) empregando promastigotas *L. infantum* em diferentes condições de armazenamento e conservação**

A Figura 3 mostra o percentual da reatividade pela AAPF-IgG, durante o primeiro até o sexto mês, em *pool* de soros (soroteca I) de cães não infectados (NI = representados pelos círculos) e cães infectados (INF = representados pelos quadrados) na presença do de *L. infantum* em diferentes condições de conservação (PBS, Fenol, Thimerosal ou Formol) e armazenamento (temperaturas ambiente, geladeira ou freezer).

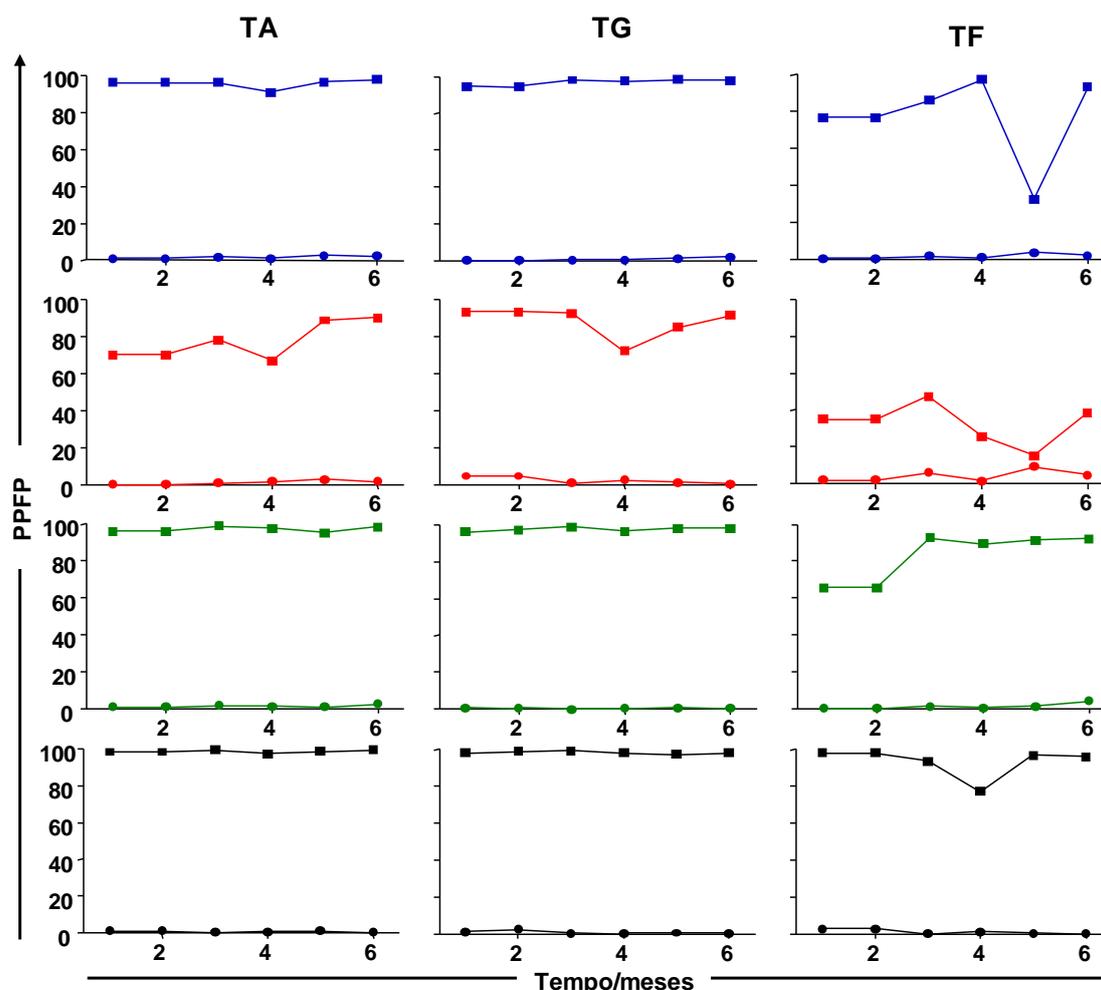
Os resultados mostraram que nos soros incubados com os parasitos mantidos a temperatura ambiente e estocados em PBS, Thimerosal e Formol apresentaram uma manutenção da reatividade sorológica de IgG-total em torno de 95%. Por outro lado, observou-se que as promastigotas de *L. infantum* conservadas em Fenol, apresentaram uma queda oscilante no PFP de aproximadamente 30% nos primeiros 4 meses avaliados e, nos meses posteriores, apresentou uma variação no rendimento de reatividade atingindo valores próximos a 90%.

Promastigotas de *L. infantum* conservadas PBS, Thimerosal e Formol e acondicionadas em temperatura de geladeira apresentaram um excelente desempenho de reatividade sorológica para IgG-total com PFP próximo ou superior a 95%. Ao analisarmos o desempenho do Fenol nota-se que nos 3 primeiros meses avaliados uma reatividade para IgG-total com valores próximos a 90%. Além disto, observa-se que no quarto mês ocorre uma queda de aproximadamente 30% nos valores de PFP. No entanto, nos meses subsequentes, houve um aumento nos valores de PFP, retomando a um desempenho similar daqueles obtidos nos 3 primeiros meses de avaliação.

A reatividade sorológica para IgG-total em promastigotas de *L. infantum* quando armazenadas na temperatura de freezer apresentou uma queda de reatividade nos 2 meses iniciais de 20% e 35% quando conservadas em PBS e Thimerosal, respectivamente. A partir do terceiro mês, estes grupos atingiram valores no PFP próximos a 90%. Entretanto, no quinto mês de avaliação,

analisando isoladamente aquelas condicionadas em PBS, podemos observar uma queda acentuada (70%) no desempenho da reação. A avaliação dos resultados dos parasitos preservados em Fenol mostraram queda acentuada e oscilante da reatividade sorológica de aproximadamente 60% durante os 6 meses avaliados. A avaliação do conservante Formol mostrou um excelente desempenho atingindo valores de PFP próximos a 95% no primeiro trimestre de avaliação. No entanto, no quarto mês observou-se uma queda pontual de 20% na reatividade para IgG-total mas que, em seguida, retoma aos valores anteriormente observados.

O conjunto de dados apresentados na Figura 3 demonstra uma melhor capacidade de preservação do Formol em temperaturas ambiente e de geladeira, uma vez que este conservante conferiu aos antígenos de *L. infantum* elevados valores de PFP que se mantiveram estáveis durante todo o período avaliado. Contudo, PBS e Thimerosal acondicionados à temperatura de geladeira também obtiveram bom rendimento na reação.



**Figura 3:** Reatividade da AAPF-IgG, em *pool* de soros de cães não infectados (NI= representados por círculos) e infectados (INF=representados por quadrados), na diluição de 1:4096, durante o primeiro até o sexto mês de preservação com os conservantes: ● ■ = PBS, ● ■ = Fenol, ● ■ = Thimerosal, ● ■ = Formol; Temperaturas e armazenamento (TA = temperatura ambiente [24°C], TG = temperatura de geladeira [-4°C], TF = temperatura de freezer [-20°C]). Os resultados foram expressos como PPFP.

A Figura 4 mostra o percentual da reatividade de AAPF-IgG durante o primeiro até o sexto mês em amostras individuais de soros (soroteca I) de cães não infectados (NI representados pelos círculos) e cães infectados (INF representados pelos quadrados) na presença de *L. infantum* em diferentes condições de conservação (PBS, Fenol, Thimerosal ou Formol) e armazenamento (temperaturas ambiente, geladeira ou freezer).

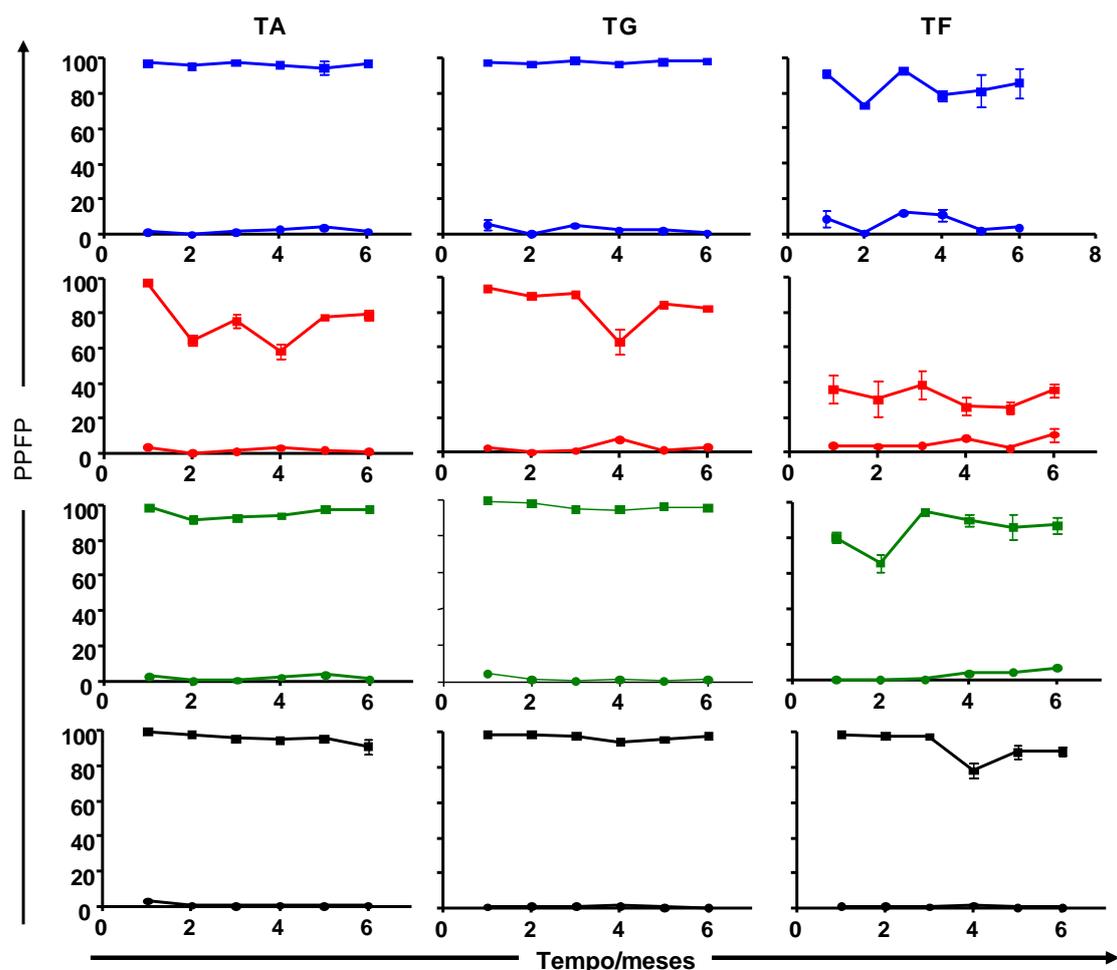
Os resultados demonstraram que os parasitos mantiveram um rendimento excelente da reatividade sorológica de IgG-total com valores próximos a 95% durante todo o período avaliado quando armazenados a temperatura ambiente e conservados em PBS, Thimerosal e Formol, como já observado anteriormente nas reações que empregamos o *pool* de soros. Por outro lado, observou-se que as promastigotas de *L. infantum* conservadas em

Fenol, apesar de apresentar um desempenho semelhante aos demais grupos de conservantes no primeiro mês de avaliação, tiveram uma queda oscilante no PFP nos meses subsequentes.

Os resultados apontam que promastigotas de *L. infantum* preservadas em PBS, Thimerosal e Formol apresentaram um excelente desempenho de reatividade sorológica para IgG total com PFP acima de 95% quando estocadas em temperatura de geladeira. Entretanto, quando avaliamos os parasitos acondicionados em Fenol, observa-se após o terceiro mês de avaliação, uma queda da reatividade para valores de PFP próximos ou inferiores a 80%.

Promastigotas de *L. infantum* quando armazenadas em temperatura de freezer apresentam um perfil de queda variável na reatividade sorológica para IgG total quando conservada em PBS e Thimerosal nos 6 meses avaliados. A reatividade sorológica observada utilizando promastigotas preservadas em Fenol apresentou uma queda acentuada de aproximadamente 60%. Por outro lado, quando preservadas em Formol, mantiveram um ótimo desempenho no PFP durante o primeiro trimestre de avaliação com valores próximos a 95%. No quarto mês estes antígenos apresentaram uma redução moderada de aproximadamente 20% na reatividade e que, posteriormente, apesar de se observar uma melhora nos meses seguintes, esses valores são inferiores aos verificados para os 3 meses iniciais.

Assim como nos resultados do *pool* dos soros (Figura 3), os dados apresentados na Figura 4 apontam uma melhor capacidade de preservação dos antígenos quando utilizado o Formol a 0,5% estocado em temperatura ambiente ou de geladeira. Além deste, o controle PBS e Thimerosal acondicionados à temperatura de geladeira também apresentaram elevados valores de PFP.



**Figura 4:** Reatividade média da AAPF-IgG, em amostras individuais de soros de cães não infectados (NI= representados por círculos) e infectados (INF=representados por quadrados), na diluição de 1:4096, durante o primeiro até o sexto mês de preservação com os conservantes: ●■ = PBS, ●■ = Fenol, ●■ = Thimerosal, ●■ = Formol; Temperaturas e armazenamento (TA = temperatura ambiente [24°C], TG = temperatura de geladeira [-4°C], TF = temperatura de freezer [-20°C]).

### 5.2.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos de promastigotas de *L. infantum* submetidos a diferentes condições de conservação e estocagem por fotomicrografias de lâminas corados pelo *Giemsa* e por citometria de fluxo

Com intuito de avaliar as interferências dos diferentes conservantes bem como das condições de temperaturas de armazenamento na morfologia dos parasitos, foram realizados experimentos empregando-se microscopia ótica e uma avaliação dos perfis de tamanho *versus* granulosidade por citometria de fluxo. Estas análises foram realizadas nos tempos de 1, 3 e 6 meses onde foram avaliados as modificações morfológicas através de parâmetros

relacionados a visualização de estruturas tais como flagelos e kinetoplasto bem como as transformações no aspecto original do parasito.

As características morfológicas das promastigotas coradas pelo *Giemsa* através do microscópio ótico (Leica DM5000B) revelam uma melhor nitidez nas estruturas celulares, sendo possível visualizar flagelos e kinetoplasto no primeiro e terceiro mês de avaliação quando estes parasitos armazenados em PBS e temperatura de geladeira. Quando estes parasitos foram avaliados à temperatura ambiente, observou-se a visualização destas estruturas com resolução inferior quando comparado à temperatura de geladeira para todos os tempos avaliados. Os resultados do acondicionamento em freezer mostraram maior agrupamento dos parasitos e a observação das estruturas celulares é comprometida (Figura 5 - Painel A).

Em relação aos aspectos morfológicos obtidos por citometria de fluxo (Figura 5 - Painel B, C e D), o gráfico *dot plot* FSC *versus* SSC que representa o perfil de distribuição da população evidencia um manutenção deste parâmetro no primeiro e terceiro mês de avaliação para todas as temperaturas. No sexto mês de avaliação nota-se um aumento neste perfil para as temperaturas de geladeira e freezer. Esses achados são confirmados pela análise individual dos histogramas (Figura 5 - Painel C e D) em que se observa que as promastigotas de *L. infantum* quando conservados em PBS não apresentam modificações nos perfis de tamanho (Figura 5 - Painel C) e granulosidade (Figura 5 - Painel D) independentemente da temperatura de estoque para os tempos de 1 e 3 meses. No entanto, ao avaliarmos estes parasitos armazenados em temperatura de geladeira ou freezer, observou-se um aumento moderado, tanto em FSC quanto em SSC no sexto mês.

A avaliação dos aspectos morfológicos obtidos por microscopia óptica (Leica DM5000B) dos parasitos conservados em Fenol (Figura 6 – Painel A) mostrou um perfil morfológico dos parasitos semelhante caracterizado por visualização de estruturas (flagelo e kinetoplasto) com perda moderada de resolução quando os mesmos foram estocados em temperatura ambiente e geladeira no primeiro, terceiro e sexto mês avaliado. Nestas temperaturas, podemos observar que com o passar do tempo, a qualidade da visualização das estruturas celulares é comprometida e, além disso, é possível evidenciar um aumento no agrupamento das promastigotas. Os resultados da

preservação dos parasitos em Fenol e acondicionado em freezer apresenta, em todos os três tempos avaliados, uma total perda das características morfológicas originais das *Leishmanias*.

A avaliação dos gráficos FSC *versus* SSC obtidos no citômetro de fluxo (Figura 6 – Painel B) revela que há uma manutenção no perfil de distribuição da população dos parasitos para as condições de estoque à temperatura de ambiente e geladeira. Já à temperatura de freezer nota-se uma perda total deste perfil de distribuição no terceiro e sexto mês. Adicionalmente, ao avaliarmos os gráficos do tipo historama (Figura 6 – Painel C e D) as promastigotas conservadas em Fenol à temperatura ambiente apresentaram no primeiro mês de avaliação um perfil de distribuição em que nenhuma alteração nos parâmetros de tamanho ou granulosidade foram verificadas. Entretanto, é evidenciado um aumento moderado tanto em FSC quanto em SSC em todos os tempos avaliados à temperatura de geladeira. Os resultados à temperatura de freezer mostraram um leve aumento em FSC e SSC no primeiro mês, mas que a partir do terceiro mês nota-se uma elevação acentuada destes parâmetros para esta mesma condição (Figura 6 – Painel C e D).

Os resultados das fotomicrografias das promastigotas de *L. infantum* acondicionadas em Thimerosal (Figura 7- Painel A) mostraram, de uma maneira geral, que esta preparação mantém as características morfológicas das promastigotas em todas as temperaturas avaliadas (ambiente, geladeira e freezer) tanto no primeiro quanto no terceiro mês de avaliação. No entanto, no sexto mês avaliado, ao consideramos a temperatura ambiente, a visualização das estruturas é de qualidade inferior àquelas observadas nos meses anteriores. Quanto às promastigotas preservadas em freezer observa-se uma tendência de agrupamento dos antígenos que se acentua no último tempo avaliado.

Nos resultados das características morfológicas obtidas pelo citômetro de fluxo, verificou-se que quando conservadas em Thimerosal, as promastigotas de *L. infantum* apresentaram alterações no perfil de distribuição da população similar às observadas em PBS armazenadas à temperatura ambiente e geladeira. Por outro lado, quando conservadas em freezer, as promastigotas apresentaram um leve aumento em FSC e SSC no primeiro e terceiro mês. No sexto mês de avaliação, observa-se um aumento acentuado

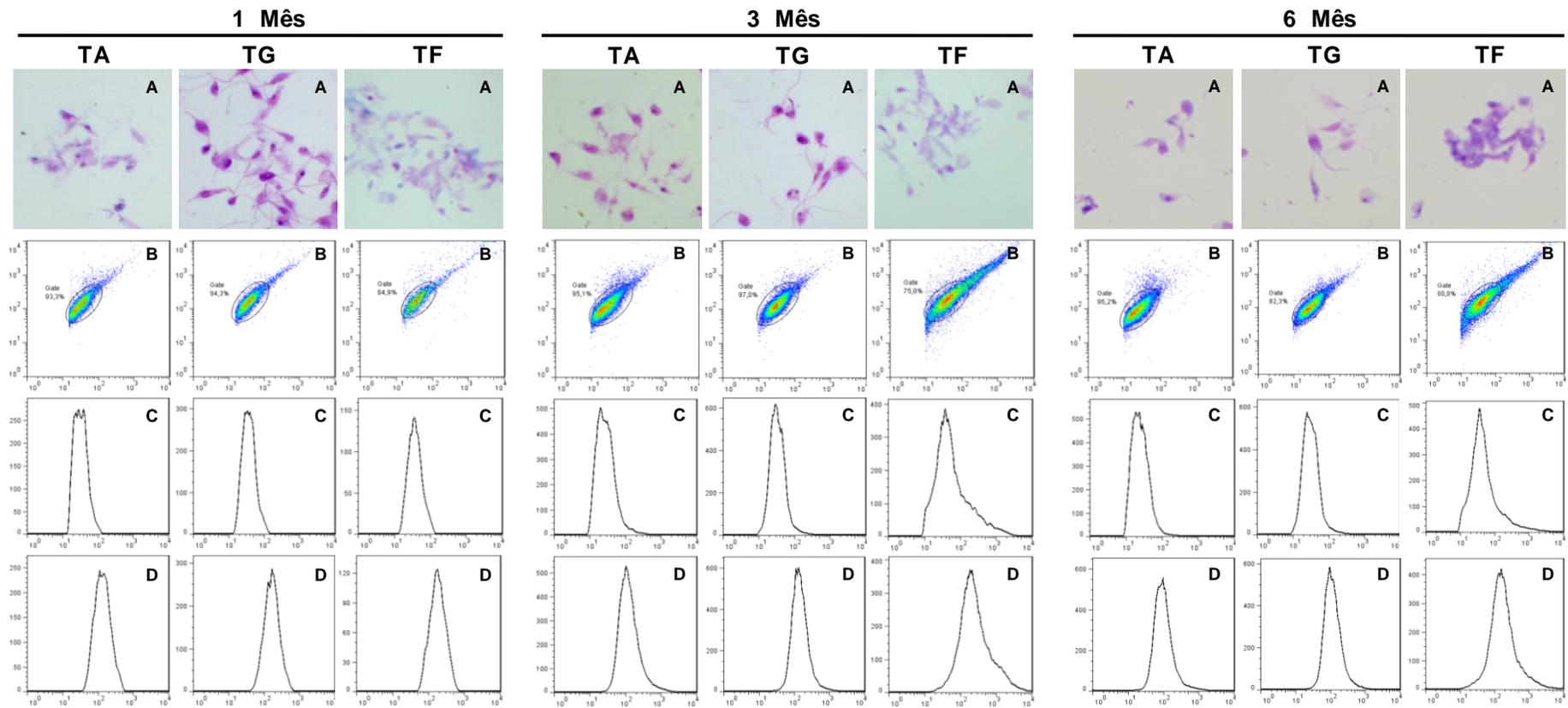
destes parâmetros (Figura 7- Painel B, C e D). Estes dados são observadas nos gráficos de *dot plot* e confirmadas pelos histogramas.

As características morfológicas das promastigotas foram avaliadas quando as mesmas foram armazenadas em Formol e os resultados por microscopia em todos os meses avaliados, independente da temperatura de estocagem, mostraram que esses parasitos apresentaram um perfil morfológico mais homogêneo, onde é possível visualizar as estruturas celulares de forma mais nítida quando comparado aos demais conservantes. (Figura 8- Painel A)

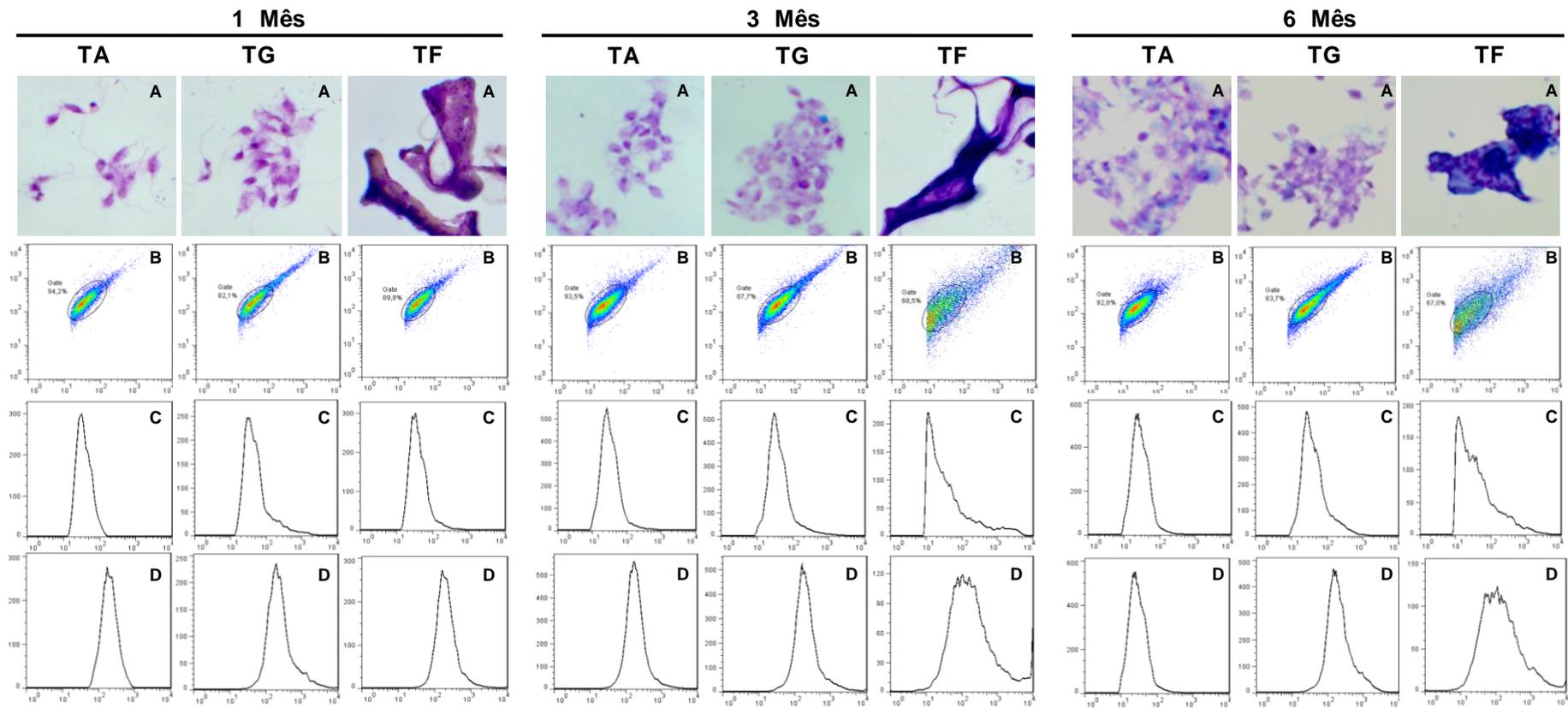
De maneira interessante, um mesmo perfil homogêneo de FSC e SSC das promastigotas foi observado nos gráficos de *dot plot* e histogramas obtidos por citometria de fluxo nas diferentes temperaturas de armazenagem e ao longo dos meses avaliados (Figura 8 Painel B, C e D).

Cabe aqui ressaltar que estes achados mostraram que apesar de verificarmos uma diferente apresentação quanto à afinidade tintorial das promastigotas, não podemos inferir que estas alterações foram devido às condições de preservação das mesmas, seja em relação aos conservantes ou às temperaturas avaliadas. Além disso, é importante ressaltar que as promastigotas fixadas nas lâminas foram coradas logo após a realização dos experimentos mensais e, portanto, não foram coradas na mesma bateria de coloração.

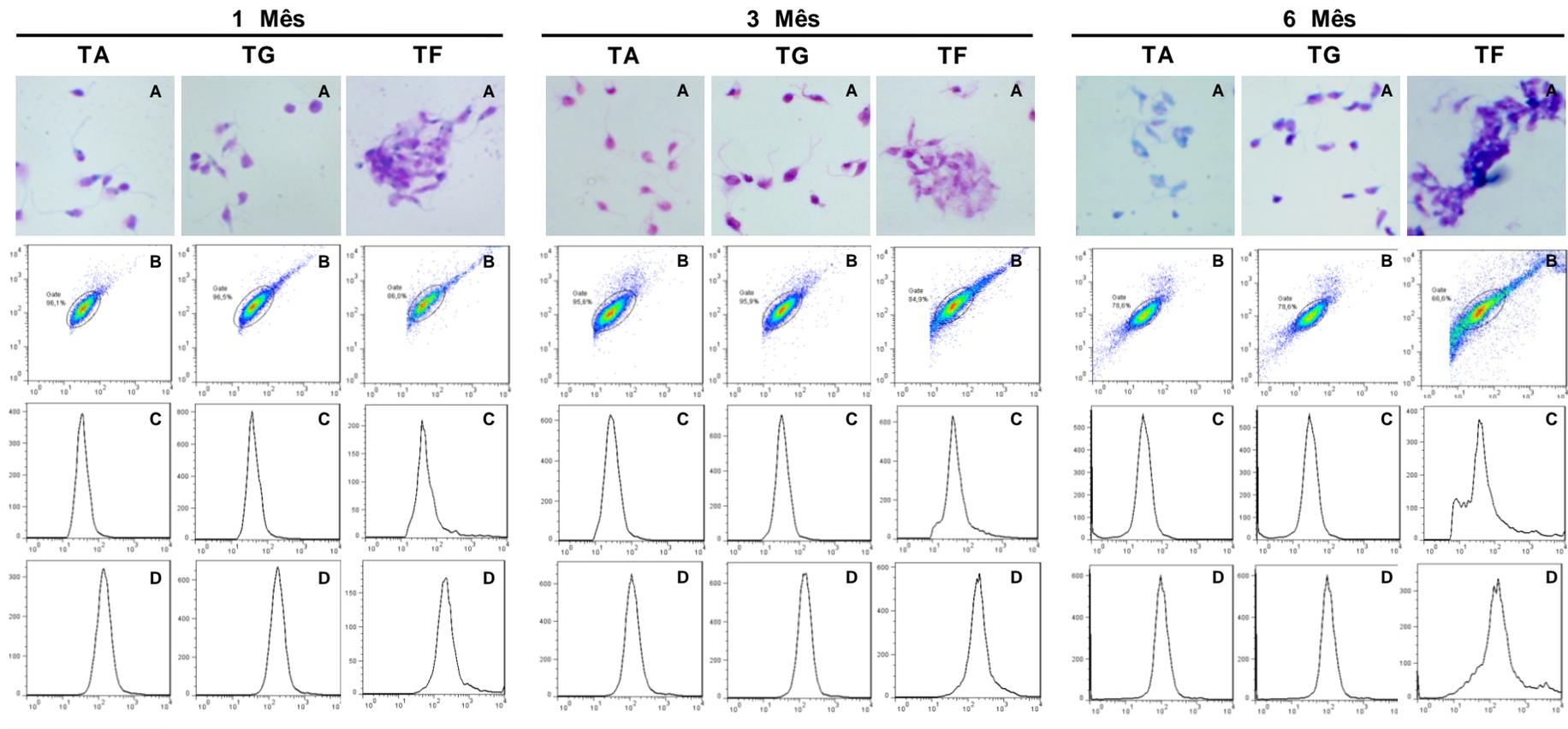
Em conclusão, diante os resultados obtidos sugerimos que o Formol foi o melhor conservante levando em consideração os aspectos morfológicos obtidos pela microscopia ótica e citometria de fluxo independente da temperatura de armazenamento. Além disso, podemos verificar que as promastigotas conservadas em Fenol apresentaram os piores aspectos morfológicos.



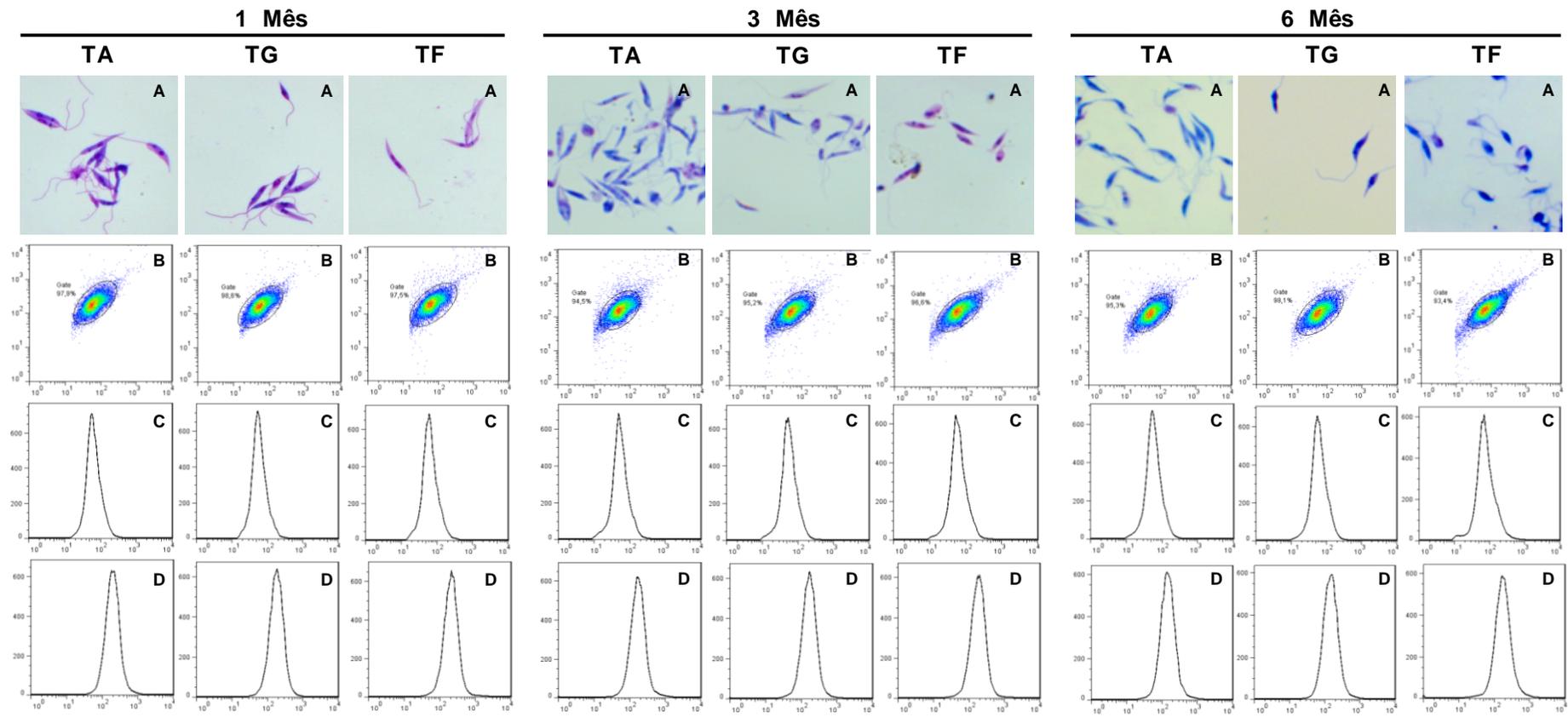
**Figura 5:** Avaliação morfológica de promastigotas de *L. infantum* conservados em PBS e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C). Paineis A, promastigotas coradas pelo *Giemsa*; Paineis B, *dot plot* tamanho versus granulosidade; Paineis C, histograma de FSC versus número de parasitos; Paineis D, histograma de SSC versus número de parasitos.



**Figura 6:** Avaliação morfológica de promastigotas de *L. infantum* conservados em Fenol e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C). Paineis A, promastigotas coradas pelo Giemsa; Paineis B, dot plot tamanho versus granulicidade; Paineis C, histograma de FSC versus número de parasitos; Paineis D, histograma de SSC versus número de parasitos.



**Figura 7:** Avaliação morfológica de promastigotasde *L. infantum* conservados em Thimerosal e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C). Painel A, promastigotas coradas pelo *Giemsa*; Painel B, *dot plot* tamanho versus granulicidade; Painel C, histograma de FSC versus número de parasitos; Painel D, histograma de SSC versus número de parasitos.



**Figura 8:** Avaliação morfológica de promastigotasde *L. infantum* conservados em Formol e acondicionados à temperatura ambiente (24°C), temperatura de geladeira (4°C) e temperatura de freezer (-20°C). Paineil A, promastigotas coradas pelo Giemsa; Paineil B, dot plot tamanho versus granulicidade; Paineil C, histograma de FSC versus número de parasitos; Paineil D, histograma de SSC versus número de parasitos.

### 5.2.3. Avaliação do controle de qualidade microbiológica das promastigotas de *L. infantum* submetidas a diferentes condições de conservação e estocagem

Para constatar a esterilidade da conservação das promastigotas armazenadas em diferentes temperaturas e conservantes, foi realizado experimentos de controle de qualidade através da análise microbiológica para o crescimento de bactérias (ágar sangue) e de fungos (ágar *saboraud*). Para tanto, em um primeiro experimento, os tubos de criopreservação estéreis contendo as diferentes preparações de promastigotas foram retirados do local de armazenagem (estufa, geladeira e freezer) sem que os mesmos fossem abertos antes da realização dos testes microbiológicos.

A análise dos resultados deste primeiro experimento, mostrou que não houve crescimento de nenhum microorganismo (fungos ou bactérias) nas diferentes condições de conservação e armazenamento durante os meses avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3:** Análise microbiológica em ágar sangue (bactérias) e ágar sabourad (fungos) das preparações de promastigotas.

VARIÁVEL		MESES AVALIADOS		
CONSERVANTE	TEMPERATURA	1° Mês	3° Mês	6° Mês
PBS	TA	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo
FENOL	TA	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo
THIMEROSAL	TA	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo
FORMOL	TA	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo

No segundo experimento, com objetivo de avaliar a capacidade dos diferentes conservantes em preservar a preparação antigênica composta por promastigotas de *L. infantum*, foi realizado uma simulação do uso cotidiano de um de *kit* diagnóstico em laboratório. Desta forma, os tubos de criopreservação estéreis contendo as diferentes preparações de promastigotas foram retirados do local de armazenagem e em seguida foram abertos e deixados sobre a

bancada do Laboratório de Pesquisas Clínicas. Posteriormente estes tubos foram fechados após um período de 1, 2, 6, 12, e 24 horas de exposição.

A Tabela 4 ilustra os resultados obtidos da avaliação microbiológica descrita anteriormente, mostrando que apenas as promastigotas conservadas em Fenol à temperatura de freezer apresentaram crescimento microbiano. Além disso, foi verificado que nos tempos de 2 e 6 horas de exposição houve crescimento de colônias fúngicas sugestivas de *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*, enquanto nos tempos de exposição de 12 e 24 horas, além destas duas colônias, observou-se também o crescimento de colônia sugestiva de *Absidia sp.*

**Tabela 4:** Análise microbiológica em ágar sangue (bactérias) e ágar sabouraud (fungos) após diferentes tempos de exposição das preparações de promastigotas.

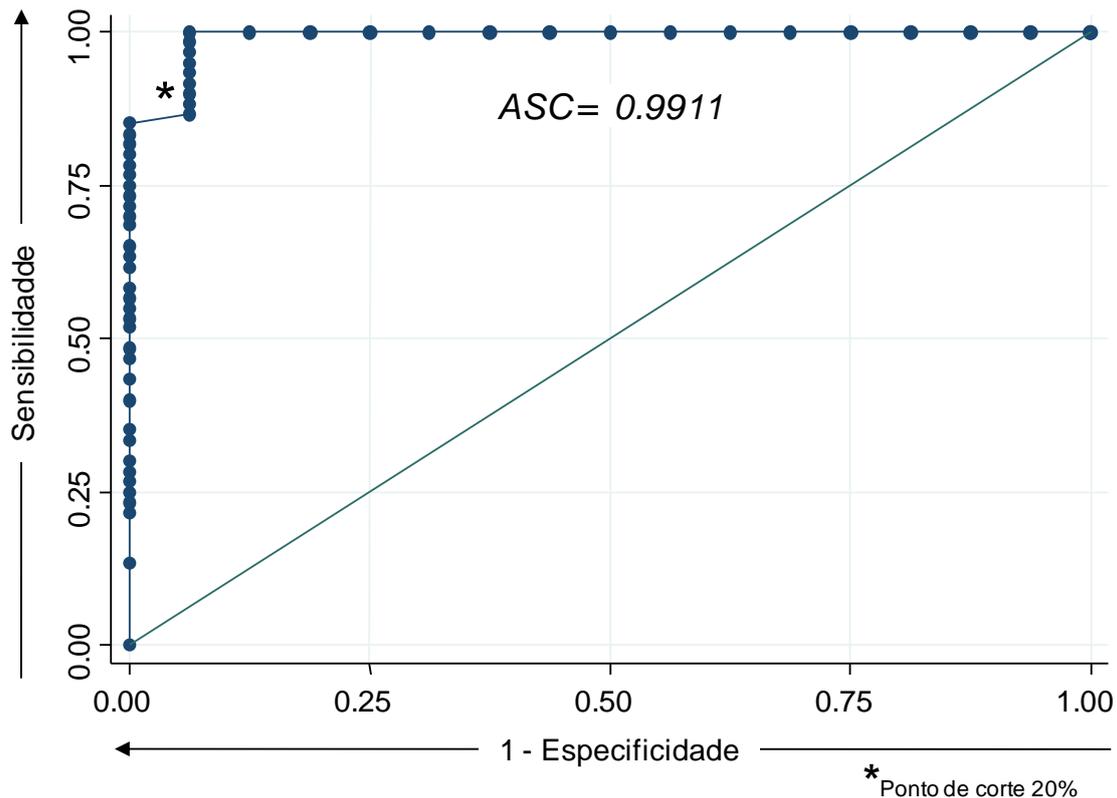
VARIÁVEL		TEMPO DE EXPOSIÇÃO (HORAS)				
Conservante	Temperatura	1	2	6	12	24
PBS	TA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
FENOL	TA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
THIMEROSAL	TA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
FORMOL	TA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	TF	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

### 5.3. Avaliação do desempenho da pesquisa de AAPF-IgG no diagnóstico da LVC utilizando promastigotas de *L. infantum* conservados em Formol 0,5%

Após concluída a avaliação do controle de qualidade (reatividade sorológica, perfil morfológico e microbiológico), foi considerado e selecionado a preparação antigênica em Formol 0,5% e armazenado a temperatura de geladeira como a melhor condição de preservação das promastigotas a serem empregadas no protótipo de *kit*. Assim, os resultados descritos a seguir foram obtidos utilizando estas promastigotas como suporte antigênico do teste.

A curva ROC da AAPF-IgG para os ensaios em amostras de soros individuais utilizando a diluição de 1:1.000 e 1:4.096 para a os anticorpo conjugado (FITC) e soro respectivamente, está representada na Figura 9. A

análise dos resultados demonstraram que o valor da área sobre a curva (ASC) é de 0,9911, indicando uma elevada acurácia do teste. Além disso, o estudo da curva confirmou que o valor de 20% de PFP é o melhor ponto de corte para a segregação de cães dos grupos NI e INF. Dessa forma, a avaliação do desempenho da AAPF-IgG foi realizada de modo que valores de  $PPFP \leq 20\%$  referem-se a resultados negativos e valores de  $PPFP > 20\%$  refletem os positivos.



**Figura 9:** Curva ROC da pesquisa da AAPF-IgG construída a partir dos índices de sensibilidade e 1-especificidade do teste avaliado.

A Tabela 5 sumariza as informações referentes aos índices de desempenho (Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e Acurácia) da AAPF-IgG com seus respectivos intervalos de confiança a 95% calculados a partir da prevalência artificial da doença (80%) utilizando o programa estatístico STATA versão 10.0 (StataCorp, 2007).

A pesquisa AAPF-IgG mostrou uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100%. O valor preditivo positivo do método (VPP) foi de 100% e o valor preditivo de um resultado negativo (VPN) na AAPF-IgG foi igual a 83,3%. A acurácia do teste foi estimada em 96%, o que traduz a proporção de resultados corretos nos grupos NI e INF.

Os índices referentes aos valores preditivos também foram calculados considerando-se a prevalência da doença no município de Belo Horizonte-MG no ano de 2010 (7,8%). Considerando que a AAPF-IgG apresentou uma especificidade de 100%, para permitir o cálculo das variáveis VPP e VPN, estabeleceu-se o valor de especificidade de 99%. A análise dos resultados demonstrou que as variáveis VPP e VPN contribuem para a confirmação ou exclusão de LVC com valores iguais a 88,9% e 99,5% respectivamente.

ÍNDICE	VALOR(%)	INTERVALO DE CONFIANÇA
<b>Sensibilidade</b>	95,0	(86,3 – 98,29)
<b>Especificidade</b>	100,0	(100-100)
<b>VPP</b>	100,0	(93.69, 100)
<b>VPN</b>	83.3	(60.78, 94.16)
<b>Acurácia</b>	96,0	(88,89 – 98,63)

**Tabela 5:** Sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia da pesquisa AAPF-IgG com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

Além das análises de desempenho descritas acima, foi também realizado as razões de verossimilhança (RVs), como mostrado na Tabela 6. A análise das RVs da AAPF-IgG confirmou o bom desempenho do método avaliado através de indicadores expressos em chance, demonstrando que valores de  $PPFP > 20\%$  contribuem para a confirmação do diagnóstico e que valores de  $PPFP \leq 20\%$  praticamente excluem o diagnóstico de LVC.

ÍNDICE	RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA
<b>RV+</b>	15,2
<b>RV-</b>	0,05

**Tabela 6:** Razões de verossimilhança (RVs) e probabilidade pós teste da AAPF-IgG utilizando o ponto de corte 20%.

De modo a complementar as análises de desempenho do teste, foi avaliado o grau de concordância dos resultados entre os métodos diagnósticos ELISA (LZOON-PBH) e AAPF-IgG. A análise dos resultados mostrou ótima

concordância dos métodos segundo a interpretação proposta na Tabela 2 em Material e Métodos.

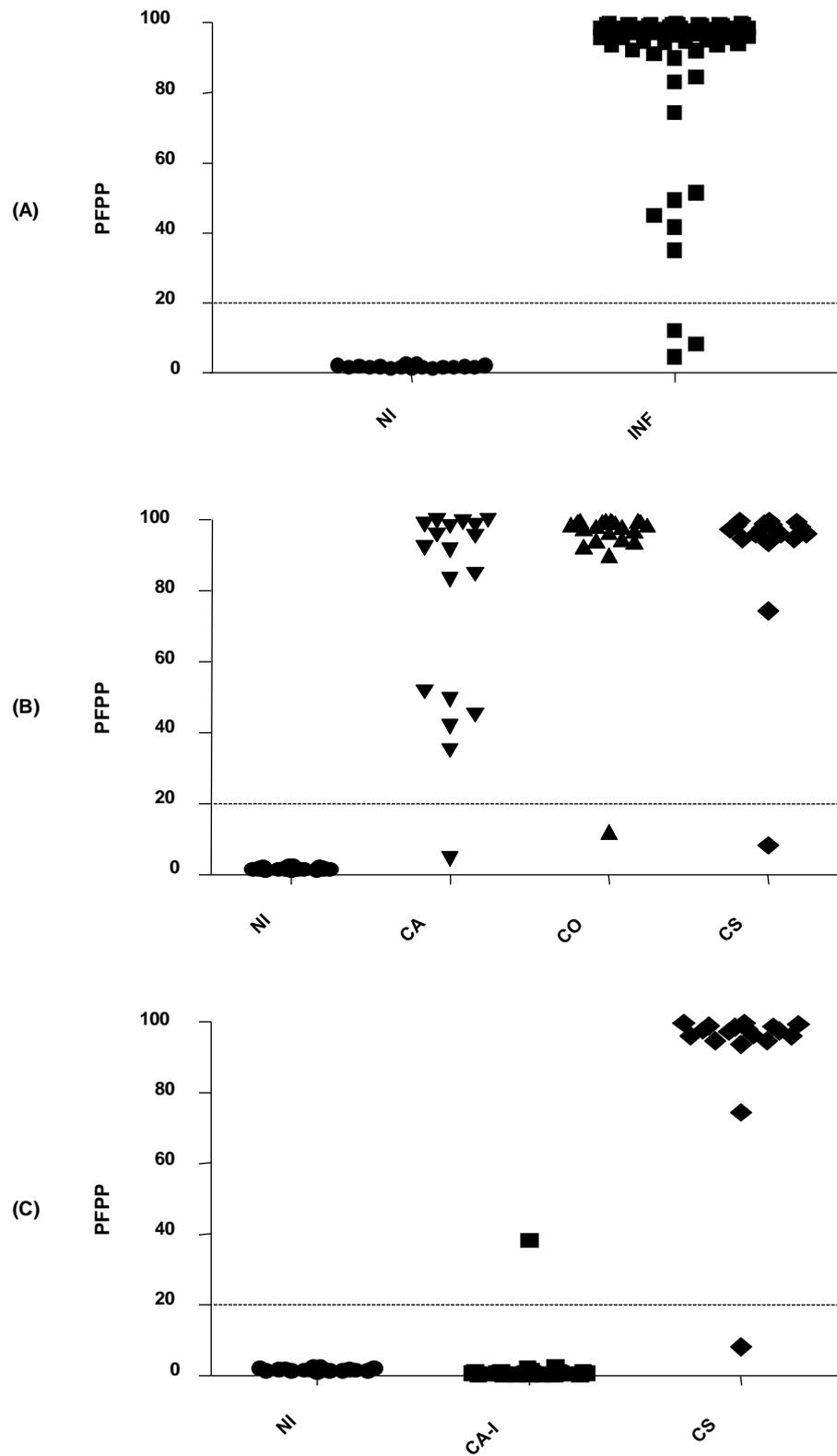
<b>KAPPA (IC 95%)</b>	<b>CONCORDÂNCIA (%)</b>
0,8978	95,05

**Tabela 7:** Valores de concordância *Kappa* entre resultados de ELISA (LZOON-PBH) e AAPF-IgG.

A Figura 11 mostra os resultados da pesquisa AAPF-IgG, expressos como valores de PFP, em amostras de soros individuais (soroteca II) classificados em NI e INF. A análise dos resultados demonstrou que este método é aplicável à identificação de casos de LVC, uma vez que permitiu distinguir 95% dos cães INF (57/60) como positivos e 100% (15/15) dos cães NI como negativos (Figura 10- A).

De modo a avaliar o desempenho do protótipo de *kit* em cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC, o grupo de cães INF foi estratificado em: cães assintomáticos (CA, n=18), cães oligossintomáticos (CO, n=22) e cães sintomáticos (CS, n=20) (Figura 10 - B). Os resultados demonstraram o excelente desempenho da pesquisa AAPF-IgG em nos diferentes grupos, permitindo diagnosticar como positivos 94,5% (17/18), 95,5% (21/22), 95% (19/20) dos cães INF da forma assintomática, oligossintomática e sintomática, respectivamente.

Buscando avaliar o desempenho da pesquisa AAPF-IgG no diagnóstico de cães do grupo CA-I (animais soronegativos e PCR+ segundo Coura-Vital, *et al.* 2011), a análise dos resultados mostraram que apenas uma amostra de soro teve valores de PFP  $\geq$  20% (Figura 10 - C).



**Figura 10:** Avaliação do desempenho da pesquisa de AAPF-IgG no diagnóstico da LVC medida através do PPFP utilizando antígenos de *L. infantum* conservados em Formol 0,5% e empregando a diluição dos soros de 1:4096 e conjugado 1:1000. (A) Cães portadores de diferentes formas clínicas; (B) Cães estratificados em diferentes formas clínicas; (C) Cães da forma clínica assintomático I.

## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral canina é endêmica em muitas regiões do Brasil. Nos últimos anos, várias cidades nas regiões sudeste, norte, nordeste e centro oeste, incluindo, Montes Claros e Belo Horizonte (Minas Gerais), Araçatuba e Bauru (São Paulo), Palmas (Tocantins), Teresina (Piauí), Salvador (Bahia), São Luís (Maranhão) e Campo Grande (Mato Grosso do Sul), têm registrado surtos desta zoonose e dessa forma, enfatizando o seu importante papel no contexto da saúde pública em âmbito nacional (Franca-Silva *et al.* 2005; Coura-Vital *et al.* 2011; Alves & Bevilacqua 2004; Costa *et al.* 1990; Mendes *et al.* 2002; Silva *et al.* 2008; Franke *et al.* 2002). A necessidade da eliminação dos cães infectados, dada a sua relevância como reservatórios domésticos da doença humana, traz um grande impacto social. Neste contexto, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública e representam também um desafio para a comunidade científica que buscam alternativas para suprir dificuldades na área de tratamento, vacinas e principalmente diagnóstico desta doença.

Os métodos de diagnóstico parasitológicos de demonstração direta do parasito por microscopia e isolamento do mesmo em cultura de aspirado de material biológico, constituem métodos diagnósticos de certeza. Entretanto, o emprego dessas técnicas na rotina de laboratórios clínicos apresenta limitações, principalmente devido à variabilidade e baixa sensibilidade (40-70% dependendo da forma clínica e do tecido avaliado) de tais procedimentos (Osman *et al.*, 1997; Reale *et al.*, 1999), somado ao alto custo e necessidade de profissionais qualificados (Mettler *et al.*, 2005).

Na última década a introdução de métodos moleculares baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR) contribuiu para o aumento da sensibilidade e especificidade que podem apresentar valores próximos a 100% (Harris, *et al.*1998). Entretanto, esses valores variam de acordo com a amostra biológica utilizada como sangue, papa de leucócitos, baço, fígado, pele, linfonodos e medula óssea (Quaresma, *et al.* 2009; Teixeira-Neto, *et al.* 2010).

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

praticidade. Os estudos que abordam a resposta imune humoral na LVC apresentam um consenso geral que os elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* desencadeados pela infecção não apresentam efeito protetor para o hospedeiro infectado, uma vez que maiores títulos de anticorpos estão geralmente associados com maior morbidade da infecção (Abranches *et al.*, 1991; Genaro *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1995; Slappendel & Ferrer, 1998; Borja-Cabrera *et al.*, 2002). No entanto, a presença de altos títulos de anticorpos, característicos da LVC, facilita consideravelmente o diagnóstico por testes sorológicos (Bray, 1980) e, neste panorama, as técnicas RIFI e ELISA constituem os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde e utilizados em inquéritos soro epidemiológicos em ações de monitoramento e vigilância da LV no Brasil (MS, 2006).

Apesar da ampla utilização das técnicas de RIFI e ELISA, a introdução da citometria de fluxo por pesquisadores de nosso grupo como método para análise sorológica traz uma nova perspectiva para os estudos da resposta imune humoral na leishmaniose. Esse método apresenta grande versatilidade, uma vez que permite o emprego de parasitos vivos ou fixados como suporte antigênico para a análise da reatividade de anticorpos em *pool* ou soros individuais (Rocha *et al.*, 2002; 2003; 2006; Carvalho-Neta *et al.*, 2006, Lemos *et al.*, 2007).

Estudos pioneiros empregando esta metodologia utilizando parasitos vivos de *L. braziliensis* como suporte antigênico para a identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana (LTA) mostraram a alta sensibilidade do teste, com valor igual a 94% (Rocha *et al.*, 2002). Ao analisar o desempenho deste método no diagnóstico da LTA empregando promastigotas fixadas de *L. amazonensis*, foi verificado valores de sensibilidade igual a 99% (Pissinate *et al.*, 2008). Diante disso, o uso de parasitos fixados torna-se uma alternativa viável para armazenar grandes volumes do suporte antigênico, além de diminuir os riscos de infecção acidental (Pissinate *et al.*, 2008).

Neste sentido, a fim de contribuir nesse campo de pesquisa, esse trabalho propôs avaliar a melhor forma para a fixação e acondicionamento do suporte antigênico composto por promastigotas de *L. infantum* para compor um

protótipo de *kit* diagnóstico da LVC baseado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de citometria de fluxo.

Nesse estudo, inicialmente foi avaliado um *pool* de soro (soroteca I) com intuito de selecionar as melhores condições reacionais a serem empregadas na pesquisa AAPF-IgG, tais como a concentração do anticorpo conjugado (FITC), bem como as melhores diluições de soro a serem utilizadas no teste. Dessa forma, os resultados mostraram que em todas as diluições do conjugado avaliado foi confirmado a reatividade sorológica diferencial entre os grupos NI e INF. As curvas de reatividade do *pool* de soros dos cães do grupo INF, em todas as diluições empregadas, evidenciam valores elevados de PFP nas diluições do conjugado de 1:500 e 1:1.000. Por outro lado, nestas mesmas condições, os valores de PFP dos cães do grupo NI variaram de acordo com a concentração do anticorpo. Entretanto, deve-se considerar que a reatividade de *pool* de soros NI representa o somatório da reatividade individual destes soros. Desta forma ocorre um reconhecimento de epítomos distintos do antígeno alvo e, os resultados positivos observados neste grupo, poderiam não estar presentes quando avaliados em amostras individuais.

A diluição do conjugado 1:2.000 pode, a princípio, parecer a de escolha para garantir a especificidade do método por apresentar resultados negativos para o *pool* de soros de cães do grupo NI desde a primeira diluição testada. Contudo, esta condição poderia contribuir para menor sensibilidade da técnica, uma vez que observou-se uma queda na reatividade do *pool* de soros do grupo INF para valores abaixo do *cut-off* (PFP $\leq$ 20%). Assim, nesta situação, animais portadores das formas clínicas assintomáticas da LVC (Reis, 2001) poderiam apresentar resultados negativos. Assim, a análise dos resultados conduziu a escolha da diluição do anticorpo 1:1.000, uma vez que associou boa sensibilidade com especificidade do método alcançada em títulos menores. Além disso, é relevante destacar que uma melhor reatividade diferencial entre *pool* de soros de cães do grupo NI e INF ocorreu nas diluições de 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 que apresentaram maior amplitude de segregação entre os grupos. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos em estudos anteriores de Andrade (2007).

Após avaliar as melhores condições reacionais, o presente trabalho buscou analisar a melhor forma para preservação do suporte antigênico

composto por promastigotas de *L. infantum* utilizando diferentes conservantes como PBS, Fenol, Thimerosal e Formol, em diferentes temperaturas de armazenagem, através da verificação do rendimento reacional medido pelos valores de PFP, análises morfológicas, bem como pelas análises microbiológicas. É importante mencionar que a análise do PFP das promastigotas de *L. infantum*, preservadas em diferentes conservantes e temperaturas de estoque, permitem, de forma geral, observar uma semelhança no comportamento das diferentes preparações quando testadas em *pool* e em amostras de soros individuais.

As promastigotas conservadas em PBS e Thimerosal, quando estocados à temperatura ambiente e de geladeira, apresentam elevados índices no PFP, com valores próximos a 95%. Quando armazenados em freezer, estes dois conservantes apresentam um perfil semelhante com uma oscilação na reatividade sorológica que, inicialmente, perde o rendimento da reação, e após o terceiro mês de avaliação, se estabiliza para valores em torno de 90% tanto para o *pool* de soros quanto a amostras individuais. Esta variação possivelmente está relacionada à temperatura de estoque associada ao conservante empregado. É importante mencionar ainda os resultados da conservação das promastigotas em PBS e temperatura freezer, promoveu uma queda acentuada na reatividade sorológica no quinto mês de avaliação em *pool* de soros de cães infectados. Esta alteração provavelmente está relacionada a fatores extrínsecos à reação de pesquisa AAPF, como algum erro do manipulador na titulação do soro ou conjugado.

Quando foi utilizado o conservante Fenol, os resultados apresentaram reatividade sorológica oscilante tanto em *pool* como em amostras individuais de soros. Na temperatura ambiente, os dados obtidos evidenciam um comportamento variável na sequência de meses avaliados que pode estar relacionada ao próprio meio conservante e, provavelmente à temperatura de armazenagem. Os resultados de temperatura geladeira apresentaram rendimento reacional de aproximadamente 90% no primeiro trimestre de avaliação tanto para o *pool* quanto em amostras individuais de soros, seguido de uma queda mais acentuada no quarto mês, mas que, posteriormente, retoma a valores de PFP próximos a 80%. Esta queda pontual da reatividade sorológica no quarto mês pode ser atribuída a algum erro do manipulador na

elaboração e execução do experimento. Além disso, apesar dos meses subsequentes haver uma melhora nestes índices, os valores de PFP se apresentam um pouco inferiores daqueles obtidos nos primeiros três meses de análise. Estes resultados indicam que esta redução pode estar relacionada às características intrínsecas ao conservante ou até mesmo à temperatura de estoque. Já na temperatura freezer, os resultados mostraram uma queda acentuada de cerca de 60% dos valores de PFP durante o seis meses avaliados. Esta redução acentuada na reatividade sorológica desde a primeira análise sugere que este baixo rendimento, pode estar relacionado ao próprio conservante e, principalmente à temperatura em que estas promastigotas foram armazenadas.

Os resultados da conservação das promastigotas de *L. infantum* em Formol apresentaram um excelente rendimento do PFP quando armazenados à temperatura ambiente e geladeira. Entretanto, a reatividade do suporte antigênico estocado à temperatura de geladeira apresentou um rendimento superior àqueles armazenados em temperatura ambiente, principalmente nas amostras de soros individuais. Ao considerarmos o armazenamento em temperatura de freezer, observou-se uma queda isolada na reatividade sorológica no quarto mês de avaliação. Esta redução pode estar envolvida a algum erro do manipulador durante a realização da reação ou alguma alteração inerente aos ajustes do citômetro durante a aquisição dos dados.

De posse dos resultados obtidos pela análise da reatividade sorológica por PFP, para todos os conservantes empregados quando armazenados à temperatura de freezer, nota-se uma queda de rendimento reacional em relação aos valores observados quando as diferentes preparações antigênicas foram estocadas em temperatura ambiente e geladeira. Diante disso, seria considerável que para os antígenos estocados em freezer, fosse utilizado algum criopreservante. Entretanto, em estudo empregando a técnica de pesquisa de anticorpos anti-trypanomastigotas vivas de *Trypanosoma cruzi* por citometria de fluxo (FC-ALTA), nenhuma diferença na reatividade sorológica foi encontrada entre as amostras dos antígenos diretamente congelados em relação àqueles preservados em glicerol (Martins-Filho *et al.*, 2002).

Em estudos que buscaram avaliar a eficiência da conservação do Thimerosal e Fenol para antígenos do Teste Intradérmico de Montenegro e de

uma vacina para LTA, observou-se que após um ano de armazenamento em geladeira houve uma intensa degradação de proteínas da maioria dos componentes antigênicos avaliados nas duas preparações (Mayrink *et al.*, 2006; Mayrink *et al.*, 2010). Neste sentido, a queda de rendimento da reatividade sorológica em promastigotas preservadas por estes dois conservantes, pode se acentuar ainda mais, principalmente quando estes antígenos estiverem armazenados sob temperatura de freezer, em que uma maior degradação das proteínas é observada.

Após verificar o efeito dos conservantes e da temperatura de estocagem por meio dos índices de reatividade medidos pelo PFP, podemos apontar o Formol como o conservante que mostrou maior estabilidade no rendimento das reações em todas as três temperaturas avaliadas. Contudo, vale ressaltar que antígenos de promastigotas de *L. infantum* conservados em PBS e Thimerosal e estocados em temperatura de geladeira também obtiveram bons resultados. Desta forma, outras abordagens foram realizadas para aferir a qualidade das diferentes composições, dentre elas, a avaliação morfológica por meio de fotomicrografias em lâminas coradas pelo *Giemsa*, a análise morfológica por gráficos em *dot plot* de FSC versus SSC, seguido da análise individual destes dois parâmetros por histogramas e por fim através da análise microbiológica das diferentes preparações.

Ao avaliarmos os resultados obtidos pelas análises morfológicas para as diferentes condições de preservação, observa-se que apenas o Formol não apresentou alterações nos aspectos morfológicos obtidos pela microscopia ótica considerando os parâmetros avaliados de integridade e visualização de estruturas celulares (flagelo e kinetoplasto). Em concordância com estes resultados, os parâmetros de tamanho e granulosidade também apontam o Formol como o melhor conservante, pois o perfil da distribuição da população de promastigotas, em gráficos de *dot plot* de FSC versus SSC, mostra que as promastigotas acondicionadas nesta condição apresentam um perfil mais homogêneo quando comparado aos demais conservantes.

Já os resultados obtidos pelas análises microbiológicas revelaram que houve contaminação por fungos em apenas uma das preparações, correspondente àquela conservada em Fenol e armazenada em freezer. De forma interessante, ao analisarmos os aspectos morfológicos desta mesma

preparação, verifica-se que as promastigotas de *L. infantum* apresentam uma perda das características morfológicas originais do parasito. Além disso, esta condição de preservação evidencia um perfil de distribuição da população celular bastante alterado visualizado em gráficos de *dot plot*, bem como pelo aumento acentuado nos índices de FSC e SCC. Assim, possivelmente, a conservação dos antígenos em Fenol combinada à baixa temperatura de freezer contribui de forma considerável à degradação completa das *Leishmanias*. Esta deterioração provavelmente pode estar relacionada ao fornecimento de substratos que favorecem o crescimento de microorganismos, tais como carboidratos e proteínas presentes no interior dos parasitos.

Dessa forma, os resultados mostraram que promastigotas conservadas em Formol 0,5% à temperatura de geladeira foram o melhor suporte antigênico aplicado ao teste diagnóstico. Os resultados mostraram que as promastigotas conservadas em Formol obtiveram o melhor desempenho tanto no rendimento reacional (valores de PFP), quanto nas análises morfológicas. Somando-se a estes fatos, as análises microbiológicas também revelaram um excelente desempenho deste conservante uma vez que nenhuma contaminação foi verificada nesse antígeno nas três temperaturas avaliadas.

Com intuito de prosseguir com o estudo e verificar o potencial diagnóstico do protótipo do *kit*, amostras de soros estendidas (soroteca II), foram empregadas.

Na análise dos índices de desempenho do teste foram empregados diferentes parâmetros que caracterizam a qualidade intrínseca ao método, incluindo a sensibilidade e especificidade, bem como parâmetros que refletem a contribuição do teste para decisões clínicas corretas como o valor preditivo positivo e negativo.

No estudo da curva ROC, a área sob a curva alcançada revela a elevada acurácia do teste (valor muito próximo de 1). Além disso, a confirmação do ponto de corte pela curva a 20% de PFP, assim como observados em estudos anteriores de Carvalho-Neta *et al.* 2006 e Andrade *et al.* 2007, indicou que este limiar de reatividade oferece um bom balanço de sensibilidade e especificidade, dando maior segurança ao teste.

A análise dos índices de desempenho mostrou que a sensibilidade da AAPF-IgG encontrada indica uma taxa de falso negativos de apenas 5% e o

valor de especificidade para o teste é de 100%. Esses achados reforçam a excelente capacidade de reprodutibilidade da técnica uma vez que estes resultados estão muito próximos daqueles encontrados por Carvalho-Neta *et al.* 2006 e Andrade *et al.* 2007 onde nestes trabalhos verificou-se índices de sensibilidade e especificidade de 96%/100%, e 97%/100% , respectivamente.

Os dados referentes aos valores preditivos são variáveis dependentes da prevalência da doença em uma determinada região. Sendo assim, esses valores foram calculados com dados referentes a prevalência da LVC no município de Belo Horizonte - MG no ano de 2010. Os resultados obtidos neste estudo apontam uma predição positiva e negativa de 88,9% e 99,5% respectivamente. Deste modo, estes índices sugerem uma boa capacidade da AAPF-IgG na confirmação de cães com teste positivo que apresentam LVC assim como a proporção de cães com teste negativo que não apresentam a doença. Em estudos de Carvalho-Neta *et al.* (2006) e Andrade *et al.* (2007) que avaliaram AAPF-IgG em soros de cães com LVC apontaram valores de 83,5%/99,7% e 94%/100% respectivamente.

O percentual obtido na avaliação da acurácia que consiste no cálculo da proporção de resultados corretos do teste mostrou-se elevado (96%), demonstrando o bom desempenho do método. Em diferentes trabalhos da literatura que avaliaram o potencial deste método no diagnóstico da LVC, os valores de acurácia variam entre 96-98% (Carvalho-Neta *et al.* 2006; Andrade *et al.* 2007).

Os cálculos das razões de verossimilhança (RV) demonstram para um resultado positivo, que um valor de PFP na faixa de alta reatividade é cerca de quinze vezes mais provável de ser encontrado em um cão LVC do que em um cão sem infecção. Para um resultado negativo, a RV indica uma chance mínima de 0,05 de um resultado positivo advir de um cão infectado. A literatura indica que valores de RVs superiores a 10 praticamente confirmam a presença da doença, enquanto que valores inferiores a 0,1 provavelmente a excluem.

A avaliação da concordância dos testes pelo índice *kappa* observados na AAPF-IgG e ELISA obtidas pelo Laboratório de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, revelaram uma ótima concordância entre estes dois testes conforme a interpretação descrita em Material e Métodos.

Segundo Andrade *et al.* (2007; 2009) que avaliou o perfil sorológico de cães com LVC através da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por citometria de fluxo, verificou-se que empregando a diluição de 1:2.048, o teste apresentou o melhor desempenho (sensibilidade de 95% e especificidade de 100%). Em contrapartida, a avaliação dos resultados na diluição do soro 1:8.192 favorece a especificidade do teste, permitindo de forma mais confiável a diferenciação de cães soropositivos para *Leishmania* daqueles portadores de outras doenças infecto parasitárias, bem como dos animais vacinados pela Leishimune<sup>®</sup>. Dessa forma, estes autores sugeriram que uma boa estratégia seria a avaliação dos resultados nas duas diluições do soro (1:2.048 e 1:8.192) para fornecer interpretação dos resultados individuais com maior segurança, minimizando resultados falso negativos e falso positivos.

Neste contexto, verificou-se no presente trabalho que a diluição do conjugado de 1:1.000 e do soro de 1:4.096 utilizando a preparação antigênica escolhida, está relacionada a valores de PFP de alta reatividade com 95% dos cães infectados caracterizados como positivos, e a ausência de infecção relacionada a valores de PFP de baixa reatividade, com 100% dos cães deste grupo caracterizados como negativos.

Vale ainda ressaltar, que os três cães do grupo infectado que apresentaram valores de PFP $\leq$ 20% possuíam baixos títulos de anticorpos tanto na técnica RIFI (< 1:160) como na de ELISA. Segundo Ferrer *et al.* 1995, animais com diagnóstico confirmado pela pesquisa de parasitos na medula apresentaram títulos de anticorpos, utilizando a técnica de RIFI, acima de 1:160, fato que pondera a realização da eutanásia de animais somente com títulos iguais ou superiores a este valor em alguns países do velho mundo.

Ao verificar o comportamento de reatividade sorológica frente à pesquisa AAPF-IgG em cães do grupo assintomático I (CA-I) (Coura-Vital, *et al.* 2011a) observou-se que apenas um cão apresentou resultados de PFP>20%, enquanto que cães do grupo sintomático (CS) apresentaram um perfil de reatividade elevado (95% dos casos com PFP>20%). Esse resultado sugere que cães CA-I estão em fase inicial da LVC em que a produção de anticorpos ainda não fora estabelecida. Por outro lado, cães do grupo sintomático são incapazes de controlar o parasitismo e, desta forma, observa-se uma intensa ativação policlonal nestes cães resultando em uma larga produção de

anticorpos (Reis *et al.*, 2006a; Teixeira Neto *et al.*, 2010; Coura-Vital, *et al.* 2011a).

Em resumo, os resultados deste trabalho mostram que a pesquisa AAPF-IgG é uma metodologia alternativa para o diagnóstico sorológico da LVC que vem obtendo resultados promissores nos últimos anos. O enfoque do presente trabalho refere-se à busca de uma preparação antigênica estável e confiável, uma vez que, em trabalhos anteriores, a fixação das promastigotas ocorre momentos antes da realização da reação. Neste contexto, a análise geral dos resultados apresentados neste estudo sugere que a conservação de antígenos em Formol 0,5% e acondicionados a temperatura de geladeira pode ser de grande utilidade para a aplicabilidade deste teste em larga escala, e assim poder auxiliar em estudos epidemiológicos.

## 7. CONCLUSÃO

Considerando o conjunto de dados obtidos nos diferentes experimentos realizados neste estudo podemos concluir que:

- Formas promastigotas de *L. infantum* conservados em Formol 0.5% e estocados na temperatura de geladeira constituem a condição ideal de preservação do suporte antigênico a ser utilizado em um protótipo de *kit* empregando a pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *L. infantum* (AAPF-IgG) por citometria de fluxo;
- Estas condições conferiram ao protótipo de *kit* elevado desempenho no diagnóstico da LVC, sendo capaz de distinguir 95% de cães infectados como positivos e 100% de cães não infectados como negativos;
- Os métodos de controle de qualidade empregados na avaliação das diferentes preparações antigênicas revelaram que a preservação pelo formol e o condicionamento em temperatura de geladeira mantiveram por seis meses, uma elevada capacidade de reatividade sorológica, manutenção da integridade morfológica bem como esterilidade da preparação antigênica frente a microorganismos;
- Este protótipo demonstrou elevada reprodutibilidade interlaboratorial considerando resultados dos índices de desempenho expressos em porcentagem (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia) e expressos em chance (razão de verossimilhança) obtidos em diferentes estudos prévios. Além disso, foi demonstrado que valores de PFP>20% contribuem para confirmação do diagnóstico da LVC e que valores de PFP≤20% praticamente excluem o diagnóstico da doença.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches, P.; Santos-Gomes, G. M.; Rachamin, N.; Campino, L.; Schnur, L. F. & Jaffe, C.L.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 13, 537-550, 1991.
- Alencar, J. E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342, 1959.
- Allain, D. S. E Kagan, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 24, 232-236, 1975.
- Alvar, J.; Canavate, C.; Molina, R.; Moreno, J.; Nieto, J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57.1 – 87, 2004.
- Alvar, J.; Molina, R.; San Andrés, M.; Tesouro, M.; Nieto, J.; Vitutia, M.; González, F.; San Andrés, M. D.; Boggio, J.; Rodriguez, F.; Sainz, A.; Escacena, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88, 371-8, 1994.
- Alves, W. A.; Bevilacqua, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública*. 20, 259-265, 2004.
- Andrade, A.M.; Queiroz, L.H.; Nunes, G.R.; Perri, S.H.; Nunes, C.M. [Dog replacement in an área endemic for visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 594-595, 2007.
- Andrade, R. A.; Reis, A. B.; Gontijo, C. M.; Braga, L. B.; Rocha, R. D.; Araújo, M. S.; Vianna, L. R.; Martins-Filho, O. A. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 116, 85-97, 2007.

- Andrade, R.A., Araújo, M.S.S., Reis, A.B., Gontijo, C.M.F., Vianna, L.R., Mayrink, W., Martins-Filho, O.A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Vet Immunol and Immunopathol*, 128, 79–86, 2009.
- Ashford, D. A; Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., Euládio, C., Lopes, U., Fernades, O. , Degrave, W. Barker Jr., R. H., Badaró, R.; David, J. R. Comparison of The Polymerase Chain Reaction and Serology for the Detection of Canine Leishmaniasis. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58, 251-255, 1995.
- Ashford, 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* 59: 53-57, 1998.
- Badaró, R.; Benson, D.; Eulálio, Mc.; Freire, M.; Cunha, S.; Netto, E. M.; Pedral-Sampaio, D.; Madureira, C.; Burns, J. M.; Houghton, R. L.; David, J. R.; Reed, S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 173, 758-761, 1996.
- Badaró, R.; Jones, T. C.; Carvalho, E. M.; Sampaio, D.; Reed, S. G.; Barral, A.; Teixeira, R.; Jonhnsen, W. D. Jr. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 166, 1124-1132, 1986.
- Baneth, G.; Shaw, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 106, 315-324, 2002.
- Berrahal, F.; Mary, C.; Roze, M. Berenger, A.; Escoffier, K.; Lamouroux, D.; Dunan, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55, 273-277, 1996.
- Braga, M.D.; Coelho, I.C.; Pompeu, M.M.; Evans, T.G.; MacAullife, I.T.; Teixeira, M.J.; Lima, J.W. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive

- dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 419-424, 1998.
- Brandonisio, O.; Carelli, G.; Ceci, L.; Consenti, B.; Fasanella, A.; Puccini, V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur. J. Epidemiol.*, 8, 273-276, 1992.
- Bray, R. S. Leishmaniasis. In *Immunological investigations of Tropical Parasitic Diseases* (Houba V., ed) Churchill Livingstone, Edinburg, 65-83, 1980.
- Brito M. E.; Mendonca M. G.; Gomes Y. M.; Jardim M. L. & Abath F. G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 7, 318-321, 2000.
- Burns, J. M.; Shreffler, W. G.; Benson, D. R.; Ghalib, H. W.; Badaró, R. E Reed, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90, 775-779, 1993.
- Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12, 93-100, 1964.
- Cardoso, L.; Schallig, H.D.; Cordeiro-da-Silva, A.; Cabral, M.; Alunda, J.M.; Rodrigues, M. Anti- *Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 35-41, 2007.
- Carvalho, S. F.; Lemos, E. M.; Corey, R.; Dietze, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Med. Hyg.*, 68, 321 – 324, 2003.
- Carvalho-Neta, A.V.; Rocha, R. D. R; Gontijo, C. M. F; Reis, A. B.; Martinsfilho, O. A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

- Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 480-488, 2006.
- Chang, K. P. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *International Review of Cytology Supplement*, 14, 267-305, 1983.
- Coura-Vital, W. Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Teixeira-Carvalho, A., Moreira, N.D., Vitoriano-Souza, J., Vieira, P.M., Carneiro, C.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Carneiro, M., Reis, A.B. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection *Vet J.*;190, 43-47, 2011b.
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D.O., Reis, L.E.S., Braga, S.L., MORAIS, M.H.F., Reis, A.B., Carneiro, M. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Negl Trop Dis* 5(8): e1291. doi:10.1371/journal.pntd.0001291, 2011a.
- da Silva, E.S.; van der Meide, W.F.; Schoone, G.J.; Gontijo, C.M.; Schallig, H.D.; Brazil, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 30: 637-643, 2006.
- Deane L.M. & Deane M.P. (1955) Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. *Hospital XLVIII*: 79-97.

- Deane, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, 1956.
- Deplazes, P.; Arnold, P.; Skaggs, J.; Gessler, M. Parasitological and immunological progress control during and after chemotherapy of canine leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 134, 85-93, 1992.
- Deplazes, P.; Smith, N. C.; Arnold, P.; Lutz, H.; Eckert, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *P. Immunol.*, 17, 451-458, 1995.
- Dunan, S.; Fromel, D.; Monjour, L.; Ogunkolade, B. W.; Cruz, A.; Quilici, M. & The Phoccean Veterinary Study Group On Visceral Leishmaniasis. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 11, 397-492, 1989.
- Dye, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55: 125-130, 1996.
- el Safi, S.H.; Evans, D.A. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 334-337, 1989.
- 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 serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42: 118-123, 1990.
- Fernandes, A. P., M. M. Costa, *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26, 5888–5895, 2008.
- Ferrer, L.; Aisa, M. J.; Roura, X.; Portús, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* 136, 514-516, 1995.

- Ferrer, L.; Rabanal, R.; Fondevila, D.; Ramos, J. A.; Domingo, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381-388, 1988.
- Gaeta, G.B.; Gradoni, L.; Gramiccia, M.; di Martino, L.; Pizzuti, R.; Pempinello, R.; Scotti, S.; Maisto, A. Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recenti Prog Med.* 85(6):340-7, Review, 1994.
- Gomes, I. T. Desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi*, por citometria de fluxo, na monitoração de cura na leishmaniose visceral humana. Dissertação de mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2006.
- Gottstein, B.; Deplazes, P.; Arnold, P.; Mehlitz, D.; Reiter, I.; Eckert, J. Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 130, 249-262, 1988.
- Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Orsini, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86, 613-20, 1992.
- Harris, E.; Kropp, G.; Belli, A.; Rodriguez, B.; Agabian, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1989-1995, 1998.
- Hockmeyer, W. T.; Welled, B. T.; Sabwa, C. L.; Smith, D. H.; Rees, P. H.; Kager, P. A. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, 78, 489-493, 1984.
- Hommel M., Jaffe C.L. & Travi B. & M.G. Experimental model for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 86: 55-73, 1995.

- Iniesta, L.; Gallego, M.; Portus, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 103: 77-81, 2005.
- Laison, R. & Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick-Dendrick. The Leishmaniasis in Biology and Medicine; London, *Academic Press*, 1, 1-20, 1987.
- Lira, R. A.O.; Cavalcanti, M. P.O.; Nakazawa, M.O.; Ferreira, A. G. O.; Silva, E. D. O.; Abath, F. G. O.; Alves, L. C.; Souza, W. V.; Gomes Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.*, 137, 11-16, 2006.
- Mancianti, F.; Gradoni, L.; Gramiccia, M.; Pieri, S.; Marconcini, A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasitol.*, 37, 110-112, 1986.
- Mancianti, F.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 566-567, 1988.
- Mancianti, F.; Pedonese, F.; Poli, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, 65, 1-9, 1996.
- Martins-Filho, O. A.; Pereira, M. E. S.; Carvalho, J. F.; Cançado, J. R.; Brener, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy treatment in human Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2, 569-573, 1995.
- Marzochi, M. C. A.; Coutinho, S. G.; Souza, W. J. S.; Toledo, L. M.; Grimald, Jr.; Momen, H.; Pacheco, R. S.; Sabroza, P. C.; Souza, M. A.; Rangel, Jr. F. B. & Tramontano, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and

- Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80, 349-357, 1985.
- Mettler, M.; Grimm, F.; Capelli, G.; Camp, H.; Deplazes, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5515-5519, 2005.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, *Secretaria de vigilância em saúde, Brasília, Brasil*. 120p, 2006.
- Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J.; San-Andres, M.; Gonzalez, F.; Castillo, J.A.; Lucientes, J.; Alvar, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 491-493, 1994.
- Moll, H.; Ritter, U.; Flohe, S.; Erb, K.; Bauer, C.; Blank C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.*, 184, 163-168, 1996.
- Moritz, A.; Steuber, S.; Greiner, M. Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniosis. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 23, 279-283, 1999.
- Mullis, K. H.; Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase – catalysed chain reaction. *Method Enzymology*. v.155, p.335-350, 1987.
- Nicolle, C. Nouvelles acquisition sur le Kala-azar culture; inoculation auchien; etiologie – C. R. Hedd. *Sciences et Acad Sci*; 146, 498-9, 1908.
- Novy, F. G.; Mcneal, W. J. The cultivation of *Trypanosoma brucei*; a preliminary note. *J. American Med. Assoc.*, 41, 266-268, 1903.
- Palatnik-de-Sousa, C.B.; dos Santos, W.R.; Franca-Silva, J.C.; da Costa, R.T.; Reis, A.B.; Palatnik, M.; Mayrink, W.; Genaro, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 65: 510-517, 2001.

- Quaresma, P.F., Murta, S.M.F., Castro-Ferreira, E., Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P., Gontijo, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111, 289-294, 2009.
- Reis, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores das diferentes formas clínicas da infecção. Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.
- Reis, A. B.; Carneiro, C. M.; Carvalho, M. G.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 103, 173-85, 2005.
- Reis, A.B.; Giunchetti, R.C.; Coura-Vital, W. Antígeno solúvel aplicado ao diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina através da reação imunoenzimática (ELISA). In UFOP, *Instituto Nacional de Tecnologia*, Brasil, p. 84, 2006b.
- Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M.G.; Mayrink, W.; Franca-Silva, J.C.; Giunchetti, R.C.; Genaro, O.; Correa-Oliveira, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81: 68-75. 2006a.
- Riera, C.; Valladares, J. .E; Gállego, M.; Aisa, M. J.; Castillejo, S.; Fisa, R.; Ribas, N.; Carrió, J.; Alberola, J.; Arboix, M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33-47, 1999.
- Rocha, R. D.; Gontijo, C. M.; Eloi-Santos, S. M.; Carvalho, A. T.; Correa-Oliveira, R.; Marques, M. J.; Genaro, O.; Mayrink, W.; Martins Filho, O.

- A. Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, 35, 551-562, 2002.
- Rosario, E.Y.; Genaro, O.; Franca-Silva, J.C.; da Costa, R.T.; Mayrink, W.; Reis, A.B.; Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 197-203, 2005.
- Ross, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan (2) Further notes on leishman's bodies. *Brit. Med. J.*, 2, 1261-1401, 1903.
- Scalone, A.; De Luna, R.; Oliva, G.; Baldi, L.; Satta, G.; Vesco, G.; Mignone, W.; Turilli, C.; Mondesire, R. R.; Simpson, D.; Donoghue, A. R.; Frank, G. R.; Gradoni, L. Evaluation of *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, 104, 275-285, 2002.
- Slappendel, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q.* 10(1):1-16, 1988.
- Tapparo, A. F. Substituição do uso do soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabriciús. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- Teixeira Neto, R.G., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W., Coura-Vital, W., Quaresma, P.F., Ker, H.G., de Melo, L.A., Gontijo, C.M., Reis, A.B. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 169: 248-257, 2010.

Vieira, J.B.; Coelho, G.E. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 85-92, 1998.

World Health Organization (2005). Leishmaniasis Seventeenth Programme Report Progress 2003-2004. Consultado em 06/2010 [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis.pdf>>.