

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS**

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO  
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) VISANDO A OTIMIZAÇÃO  
DO DIAGNÓSTICO EM INQUÉRITOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**Eduardo de Castro Ferreira**

**Ouro Preto – MG  
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS**

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO  
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) VISANDO A OTIMIZAÇÃO  
DO DIAGNÓSTICO EM INQUÉRITOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Ferreira Gontijo**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana**

**Ouro Preto – MG  
2005**

---

*“Deus não prometeu dias sem dor,  
risos sem sofrimento, sol sem chuva.  
Mas Ele prometeu força para o dia,  
conforto para as lágrimas e luz para o caminho.”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as pessoas maravilhosas que ele colocou em minha vida, com as quais eu aprendi, pude rir nos momentos de felicidade e que estavam ao meu lado também nos momentos difíceis.

Aos meus Pais, Antonio e Inês e aos meus irmãos Patrícia, Leonardo e Gustavo por todo amor, união e confiança em mim depositados, força indispensável para que eu chegasse até aqui, dedico este trabalho a vocês que são o meu orgulho e inspiração.

À Célia M. F. Gontijo, minha orientadora e amiga, mais do que isso, minha segunda mãe, que confiou na minha capacidade e me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Marta de Lana pela oportunidade e orientação no período em que estava cursando os créditos, e também pelo carinho e amizade com que me acolheu.

À coordenação do curso de Mestrado em Ciências Biológicas (NUPEB/ICEB II – UFOP/MG) e aos demais professores do curso pela oportunidade e pelo conhecimento transmitido.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho.

À Regional Nordeste da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e ao Centro de Controle de Zoonoses pela disponibilização de suas dependências e funcionários que facilitaram efetivamente a execução deste trabalho.

À Dra Mariângela Carneiro pela colaboração na elaboração da parte estatística do Projeto.

Às Professoras Terezinha Bahia e Marta de Lana, por terem cedido os soros de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Ao Professor Alexandre Barbosa Reis, por ter cedido os soros de cães não infectados de área não endêmica.

Ao Professor Eduardo Sérgio da Silva por ter introduzido a técnica do DAT no Laboratório de Leishmanioses do CPqRR.

Ao Professor Ricardo Vitor, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter cedido os soros de cães infectados com *Toxoplasma gondii*..

À Dra Simone Magela Moreira, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter cedido os soros de cães infectados com *Ehrlichia canis*.

À Dra Maria de Fátima Madeira, da Fundação Oswaldo Cruz, por ter cedido os soros de cães infectados com *Leishmania braziliensis*.

À Anna Carolina Lustosa Lima, do CPqRR, pelo apoio na análise estatística dos resultados.

À Dra Veterinária, Alcina Vieira de Carvalho Neta pela realização do exame clínico dos cães.

Ao Dr. Henk D.F.H. Shallig, Chefe do Departamento de Parasitologia do Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda, por ter cedido parte do antígeno utilizado na técnica do DAT.

À Cida, secretária do NUPEB, agradeço pelo modo gentil e carinhoso com que sempre me tratou e acima de tudo pela amizade.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Leishmanioses, pelo convívio e amizade; em especial a Dani, Sidney, Tina, Patrícia e Rafael companheiros de campo e de laboratório; Carina, Érika e Kenya, pelo apoio emocional.

Aos Motoristas, Cláudio e Toninho, por seus serviços prestados durante a coleta do material em campo.

Aos meus amigos e colegas do mestrado, com quem vivi valiosos momentos de estudo e também de descontração.

À minha amiga Michelle Barbi, por seu apoio e amizade.

À Sabrina e Helenita pela amizade incondicional, apoio e carinho. Por todos os momentos que passamos juntos eu só tenho a agradecer.

À Tathi, Tia Marlene, Tio Ademir, Anderson, Jú, Maria Geralda e Gilson pela torcida calorosa.

À Cíntia, pois “ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos sem amor eu nada seria”.

Aos amigos do Núcleo de Estudos Teatrais (NET).

Aos cães que foram sacrificados e à seus proprietários, pois sem o seu consentimento a realização deste trabalho não teria sido possível

Enfim, à todos aqueles que fazem ou fizeram parte da minha história meu muito obrigado, de coração.

## RESUMO

O presente estudo avaliou o desempenho de três métodos sorológicos diferentes (RIFI, ELISA e DAT) utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Foram avaliadas 234 amostras de soros de cães provenientes de Belo Horizonte, área endêmica para LV. Vinte soros de cães não infectados de área não endêmica e 20 soros de cães com outras doenças parasitárias, sendo sete soros de cães com *Trypanosoma cruzi*, cinco soros de cães com *Leishmania braziliensis*, cinco soros de cães com *Toxoplasma gondii* e três soros de cães com *Erichia canis*. foram incluídos neste estudo. A RIFI apresentou baixa sensibilidade (72%), especificidade (52%), e reação cruzada com soros de cães infectados com *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *E. canis*. O teste de ELISA apresentou elevada sensibilidade (95%) embora com especificidade baixa (64%), e reação cruzada com soros de cães infectados com *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *E. canis*. O DAT apresentou elevadas sensibilidade (93%), especificidade (96%), e reação cruzada apenas com uma amostra de *E. canis*. De acordo com o índice kappa, a RIFI apresentou uma reprodutibilidade regular, enquanto ELISA e DAT apresentaram reprodutibilidade perfeita. A concordância entre os testes realizados a partir de soros de cães de área endêmica foi ótima entre ELISA e DAT, boa entre ELISA e RIFI e regular entre RIFI e DAT. Essa concordância entre os testes foi variável de acordo com o grupo clínico analisado. Não foi observada correlação entre os títulos e/ou absorbância dos testes entre si, assim como não foi observada correlação entre título ou absorbância e gravidade da doença. Foram ainda analisadas 230 amostras de eluato de sangue dissecado em papel filtro de cães, dos 234 cães anteriormente analisados, pelas técnicas de RIFI e ELISA. A concordância entre amostras de soro e eluato foi boa para o ELISA e regular para a RIFI. Comparando os testes realizados com eluato a concordância foi regular. Quando foram comparados os testes ELISA e RIFI realizados com soro, a concordância foi boa. Este estudo confirmou que ainda não existe uma técnica de diagnóstico com 100% de especificidade e sensibilidade e que a escolha da técnica dependerá do objetivo do estudo. Tendo em vista a otimização do diagnóstico da LVC e baseado nos resultados deste estudo, sugerimos o incentivo por parte do Ministério da Saúde (MS) do desenvolvimento e produção de um antígeno a ser utilizado no DAT que poderá substituir os métodos usados atualmente.

## ABSTRACT

In the present investigation, three serological methods (IFAT, ELISA and DAT) used for canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis were assessed. A number of 234 canine serum samples were collected in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais state, an endemic area for VL. The number of 20 serum samples from non-infected dogs and 20 other serum samples from dogs with other parasitic diseases such as *Trypanosoma cruzi* (n=7), *Leishmania braziliensis* (n=5), *Toxoplasma gondii* (n= 5) and *Ehrlichia canis* (n=3) were included in the present study. Based on kappa indices, IFAT showed a low sensitivity (72%) and specificity (52%), besides a cross-reactivity with sera from dogs infected with *T. cruzi*, *L. braziliensis* and *E. canis*. ELISA showed a high sensitivity (95%), despite a low specificity (64%), and cross reaction with sera from dogs infected with *T. cruzi*, *L. braziliensis* and *E. canis*. DAT showed a high sensitivity (93%) and specificity (96%), with a cross reaction only with a sample from an *E. canis*-infected dog. IFAT has shown a regular reproducibility, whereas ELISA and DAT showed an accurate reproducibility. We observed a full agreement between ELISA and DAT, a medium agreement between ELISA and IFAT and, finally, a regular agreement between IFAT and DAT. The agreement between tests varied in accordance with the clinical group under analysis. There was no correlation between titers and or absorbance between the tests, nor a correlation between titers and absorbance and the disease severity. Yet, a number of 230 samples of eluate from dried blood collected on filter paper out of the 234 dogs mentioned above, were assessed through IFAT and ELISA, with a regular agreement between them. Agreement between serum and eluate results showed to be good for ELISA and regular for IFAT, whereas the serum sample results from ELISA and IFAT were in agreement. There is no VL diagnosis method with 100% specificity and sensitivity and its choice will depend on the investigation purposes. Aimed at a VL diagnosis optimization, and based on our results, we suggest the Brazilian Ministry of Health to develop and produce an antigen to be used in DAT, which would be useful in substituting the current VL diagnosis methods.

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Estimativas de amostra para o estudo seccional.....	23
Tabela II: Tabela de contingência 2 x 2.....	33
Tabela III: Cálculo do valor de kappa.....	35
Tabela IV Critérios para a interpretação do índice kappa.....	35
Tabela V: Resultados dos testes sorológicos (ELIA, DAT e RIFI) e parasitológico.....	38
TabelaVI: Resultados dos testes a partir de cães parasitologicamente positivos (VP), de cães não infectados de área endêmica (NIAE) e de cães não infectados de área não endêmica (NIANE).....	39
TabelaVII: Resultados dos testes sorológicos realizados com soros de cães com outras doenças e soros controle.....	39
Tabela VIII: Valores preditivos positivos de acordo com três prevalências estimadas da doença.....	40
Tabela IX: Valores preditivos negativos de acordo com três prevalências estimadas da doença.....	40
Tabela X: Reprodutibilidade do teste ELISA.....	41
Tabela XI: Reprodutibilidade do teste DAT.....	41
Tabela XII: Reprodutibilidade do teste RIFI.....	42

Tabela XIII: Distribuição dos títulos positivos dos diferentes testes diagnósticos utilizados nos diferentes grupos clínicos.....	43
Tabela XIV: Teste de reação cruzada.....	44
Tabela XV: Concordância entre os testes ELISA e DAT.....	45
Tabela XVI: Concordância entre os testes ELISA e RIFI.....	46
Tabela XVII: Concordância entre os testes RIFI e DAT.....	46
Tabela XVIII: Forma clínica e positividade dos testes ELISA, DAT e RIFI.....	47
Tabela XIX: Concordância entre os testes nos cães assintomáticos(n = 40).....	48
Tabela XX: Concordância dos testes nos cães oligossintomáticos (n = 134).....	48
Tabela XXI: Concordância dos testes nos cães sintomáticos (n = 25).....	48
Tabela XXII: Concordância dos testes nos cães não infectados de área endêmica (n = 35).....	49
Tabela XXIII: Concordância dos testes nos cães não infectados de área não endêmica (n = 35).....	49
Tabela XXIV: Resultados dos testes realizados no soro e no sangue coletado em papel filtro dos 230 cães.....	50
Tabela XXV: Resultado dos testes sorológicos dos cães parasitologicamente positivos (VP) e dos cães não infectados de área endêmica (NIAE) realizados com soro e eluato.....	50

Tabela XXVI: Concordância entre ELISA soro e ELISA eluato.....	51
Tabela XXVII: Concordância entre RIFI soro e RIFI eluato.....	51
Tabela XXVIII: Concordância entre ELISA soro e RIFI soro.....	51
Tabela XXIX: Concordância entre ELISA eluato e RIFI eluato.....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos da Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, área endêmica para a leishmaniose visceral.....	22
Figura 2: Antígeno liofilizado e congelado utilizado no Teste de Aglutinação Direta.....	29
Figura 3: Antígeno diluído para uso no Teste de Aglutinação Direta.....	29
Figura 4: Placa de DAT pronta para incubar.....	30
Figura 5: Placa após a incubação de 18 horas, pronta para a leitura.....	30
Figura 6: Gel de Agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando produtos amplificados com o par de iniciadores específico para <i>L. infantum/L.chagasi</i> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

CATT	Card Agglutination test (Teste de aglutinação em cartão)
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DAT	Direct Agglutination Test - (Teste de Aglutinação Direta)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)
ESPF	Eluato de sangue em papel filtro
FNS	Fundação Nacional de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
J	Índice youden
k	Índice kappa
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Tryptose - (Infusão de fígado triptose)
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MS	Ministério da Saúde
NIAE	Não infectados de área endêmica
NIANE	Não infectados de área não endêmica, nascidos e criados em canil de experimentação
NNN	Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle
PBS	Phosphate Buffer Solution - (Tampão salina fosfato)

Pb	pares de bases
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR	Polymerase chain reaction - (Reação em cadeia da polimerase)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rK39	Antígeno recombinante de <i>Leishmania chagasi</i>
rK 26	Antígeno recombinante de <i>Leishmania chagasi</i>
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
U	unidades
VN	Verdadeiros negativos
VP	Verdadeiros positivos
VPN	Valores preditivos negativos
VPP	Valores preditivos positivos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. As leishmanioses.....	2
1.2. Leishmaniose visceral.....	4
1.3. Leishmaniose visceral no Brasil.....	5
1.4. Leishmaniose visceral canina.....	8
1.5. Controle e profilaxia da leishmaniose visceral.....	10
1.6. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	12
1.6.1. Diagnóstico parasitológico.....	12
1.6.2. Diagnóstico sorológico.....	13
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1. Área de estudo.....	21
4.2. Estudo seccional.....	22
4.3. Animais.....	23
4.4. Rotina de campo.....	23
4.5. Rotina laboratorial.....	24
4.5.1. Exame parasitológico.....	24
4.5.1.1. Exame de lâminas.....	25
4.5.1.2. Mielocultura.....	25
4.5.2. Caracterização molecular dos parasitas.....	25
4.5.2.1. Visualização dos resultados.....	26
4.5.3. Diagnóstico sorológico.....	27
4.5.3.1. ELISA – ensaio imunoenzimático.....	27
4.5.3.2. DAT – direct agglutination test.....	29
4.5.3.3. RIFI – reação de imunofluorescência indireta.....	30
4.6. Critérios para a definição de verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros Negativos (VN).....	31
4.7. Reprodutibilidade dos testes.....	31
4.8. Critérios para a classificação dos cães em grupos clínicos.....	32
4.9. Teste de reações cruzadas.....	32
4.10. Análise estatística.....	32

---

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
5.1. Caracterização dos parasitas.....	37
5.2. Definição dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos.....	38
5.3. Valores preditivos positivos e negativos de acordo com três prevalências estimadas da doença.....	40
5.4. Avaliação da reprodutibilidade dos testes ELISA DAT e RIFI.....	41
5.5. Avaliação da distribuição dos títulos positivos dos diferentes testes diagnósticos utilizados nos diferentes grupos clínicos.....	42
5.6. Testes de reações cruzadas.....	43
5.7. Concordância entre os testes analisados 2 a 2.....	45
5.8. Concordância entre os testes nos diferentes grupos clínicos.....	46
5.9. Resultado do exame de cães através das técnicas ELISA e RIFI, utilizando Soro e sangue coletado em papel filtro.....	49
5.10. Concordância entre os testes RIFI e ELISA realizados com soro e eluato.....	50
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

# 1. Introdução

## 1.1. As Leishmanioses

As Leishmanioses compreendem um espectro de doenças que são largamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, variando em severidade desde formas com auto-cura, lesões na pele a severas mutilações na mucosa, ou infecções nas vísceras. São causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), (Kinetoplastida:Trypanosomatidae). Este gênero se constitui de um grupo de espécies biologicamente distintas e com características genéticas, bioquímicas e imunológicas diferenciadas. A estrutura do DNA extra nuclear do cinetoplasto (kDNA), presente nestes organismos, constitui uma característica marcante da ordem Kinetoplastida possuindo peculiaridades únicas e um mecanismo ímpar de replicação (Shlomai, 1994).

O gênero *Leishmania* apresenta em seu ciclo biológico as formas amastigotas, aflageladas com cinetoplasto visível em forma de bastão. Estas formas vivem e se multiplicam no interior de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado mamífero. No trato alimentar do inseto vetor são encontradas as formas flageladas promastigotas e paramastigotas (Chang et al., 1985; Walters, 1993). As formas promastigotas também são cultivadas em meios axênicos (Evans, 1987), como o LIT (Liver Infusion Tryptose) e o NNN (Novy Mc Nel e Nicolle). A multiplicação se faz por divisão binária em ambos os hospedeiros, vertebrados e invertebrados, embora algumas evidências não descartem a possibilidade de troca de material genético (Bastien et al., 1992).

A transmissão das leishmanioses entre os hospedeiros vertebrados ocorre pela picada de fêmeas de insetos pertencentes à ordem Díptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, (Martins et al., 1978), Diferentes espécies de *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão das muitas espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e da leishmaniose visceral (LV). Através do repasto sanguíneo, necessário para sua oviposição, ao picarem um animal parasitado podem, juntamente com o sangue, sugar formas amastigotas, que no interior de seu tubo digestivo, se transformam em promastigotas e aí se multiplicam. As promastigotas, após seu desenvolvimento, migram para as partes anteriores do tubo digestivo do

flebotomíneo, atingindo o aparelho picador sugador do inseto. O inseto infectado, ao realizar o repasto sanguíneo em outro animal poderá inocular as formas promastigotas metacíclicas. Estas formas poderão penetrar em células do SMF, transformando-se em amastigotas em seu interior e multiplicando-se (Chang, 1985).

As Leishmanioses permanecem como um severo problema de saúde, com prevalência global estimada em 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5 – 2 milhões de casos. Aproximadamente 1 – 1,5 milhões de casos são causados pelas leishmanioses cutâneas e 500.000 causados pelas formas viscerais da doença. Atualmente as leishmanioses apresentam claramente uma distribuição geográfica mais ampla do que antigamente, sendo agora reportadas em áreas onde não eram endêmicas (WHO, 2002).

O aumento dos fatores de risco, relacionado principalmente às mudanças no meio ambiente, sejam elas naturais ou causadas pelo homem, está fazendo com que muitos países se preocupem com as leishmanioses no que diz respeito à saúde pública. Um dos maiores fatores de risco é o fenômeno mundial da urbanização, estreitamente relacionado ao aumento das migrações (WHO, 2002). A migração de cães infectados, por espécies causadoras da leishmaniose visceral, de áreas endêmicas da doença pode promover a disseminação silenciosa da infecção entre os cães de uma nova área e eventualmente da infecção humana, estabelecendo assim, um novo foco de transmissão (Travi et al., 2002).

As leishmanioses do Novo Mundo são agrupadas basicamente em duas amplas categorias clínicas: a LTA e a LV. A LTA, causada pelas espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, incluindo um espectro de doenças comumente referidas por suas características clínico-patológicas em forma cutânea, cutânea-mucosa, cutânea-disseminada e cutânea-difusa ( Walton, 1987; WHO, 1990).

A LV é considerada uma enfermidade crônica (Deane e Deane, 1964) que evolui para hepato-esplenomegalia devido à multiplicação dos parasitas nos tecidos e órgãos ricos em células do SMF.

## 1.2. Leishmaniose Visceral

A LV é uma doença de caráter crônico, potencialmente fatal para o homem, tendo como agentes etiológicos as espécies do gênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. (Leishmania) donovani*, (Lainson e Shaw, 1987). São elas a *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ross, 1903) e *Leishmania (L.) infantum* (Nicole, 1908), presentes no Velho Mundo e *Leishmania (L.) chagasi*, (Cunha e Chagas, 1937), presente no Novo Mundo.

A leishmaniose visceral apresenta diferentes quadros epidemiológicos no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo. Pode apresentar-se como uma zoonose, como acontece no Brasil e no Mediterrâneo, tendo os canídeos como principais fontes de infecção para os vetores, e como antroponose, como ocorre na África, Bangladesh, Índia e Nepal, tendo o homem como fonte de infecção (WHO, 2003).

É endêmica em 87 países (21 no novo Mundo e 66 no velho Mundo), sendo que 90% dos casos de LV notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. No Novo Mundo ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México, e El Salvador (Lainson e Shaw, 1987; Shaw, 2002). No Brasil, são registrados 90% dos casos de LV que ocorrem em todo o continente americano. Existem casos de leishmanioses em 18 dos 27 estados da Federação, distribuídos em quatro das cinco regiões do país. Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando. No período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do país (MS, 2003). Recentemente, vêm sendo notificados casos humanos de LV no Estado do Paraná, região Sul (MS /CENEPI, 2000).

Existem divergências em relação à utilização do nome específico *L. chagasi* para designar o agente etiológico da LV no Novo Mundo. Estas controvérsias estão relacionadas com a origem da doença no Novo Mundo (Mauricio, 2000).

Duas hipóteses tentam explicar a origem da LV no continente Americano. A primeira sugere que a *Leishmania chagasi* é autóctone, tendo canídeos silvestres como

hospedeiros primários e fontes de infecção para o cão e o homem (Lainson et al., 1987;). Esta proposição ganha algum suporte a partir da bem equilibrada relação parasito-hospedeiro em *Cerdoconyon thous*, o que indica uma associação antiga quando comparada com a infecção fulminante e fatal no cão doméstico, esta sugestiva de uma associação parasito-hospedeiro mais recente. A outra hipótese considera que a LV é causada pela *L. infantum* que foi trazida para a América Latina pelos europeus e seus cães, ou pelos escravos. Esta afirmativa encontra amparo uma vez que técnicas bioquímicas (isoenzimas) sorológicas (anticorpos monoclonais) e de biologia molecular têm evidenciado similaridade entre *L. infantum* e *L. chagasi* (Killick-Kendrick et al., 1980; Grimaldi Jr et al., 1987; Maurício et al., 2000). Além disso, existem características comuns na epidemiologia da doença no Brasil e na região do Mediterrâneo tais como a existência de canídeos como reservatórios silvestres e domésticos, a prevalência maior em crianças e manifestações clínicas diversas.

Na LV, os parasitos, alcançando as células do SMF dos órgãos internos, principalmente, baço, fígado e medula óssea, provocam quadros cuja severidade depende do tempo de evolução clínica e da resposta imunológica do indivíduo parasitado, podendo originar casos assintomáticos, moderados e graves, inclusive com óbitos quando não adequadamente tratados (Tafari et al., 1989; Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Lainson, 1997; Santa Rosa e Oliveira, 1997).

### **1.3. Leishmaniose Visceral no Brasil**

A importância da leishmaniose visceral no Brasil reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas clínicas muito graves e às vezes fatais, apesar da existência de tratamento específico. Segundo dados do Ministério da Saúde ocorrem cerca de 4 mil casos anuais da doença (MS/CENEPI, 2000).

O primeiro caso de LV, possivelmente adquirido no Brasil, ocorreu no início do século XX em um paciente adulto italiano proveniente de Mato Grosso, que emigrara 14 anos antes para o Brasil, e diagnosticado no Paraguai (Migone, 1913). Acredita-se que a infecção ocorreu na região de Porto Esperança, Mato Grosso. Não obstante tratar-

se de um indivíduo oriundo do Mediterrâneo, o longo tempo decorrido desde que deixara a zona endêmica levou à suposição de que se tratava de um caso autóctone. No entanto, a comprovação definitiva da existência de calazar autóctone na América só ocorreu quando Mazza e Cornejo (1926) publicaram a observação de dois casos em crianças que nunca haviam deixado a Argentina. Em uma delas, ao realizarem punção esplênica, observaram a presença de *Leishmania* (Deane, 1956; Baruffa e Cury, 1973; Dias et al., 1977). Formas amastigotas foram encontradas em fígado de pacientes suspeitos de febre amarela em vários estados do Nordeste e no Pará (Penna, 1934), tendo sido o agente etiológico mais tarde denominado *L. chagasi* por Cunha e Chagas em 1937.

Chagas (1936) e Chagas et al. (1937) foram quem pela primeira vez suspeitaram da existência de um animal silvestre como reservatório de *L. chagasi* no Novo Mundo. Este fato foi confirmado pelos pesquisadores Deane e Deane (1954) e por Alencar (1961), no Ceará, quando estabeleceram a importância epidemiológica da raposa da espécie *Dusicyon vetulos* como fonte de infecção e manutenção da doença. Posteriormente, uma segunda espécie de raposa, *Cerdocyon thous*, foi encontrada naturalmente infectada por *L. chagasi* (Silveira et al., 1982; Lainson., 1985; Mello et al., 1988; e Silva et al., 2000).

No Brasil, a leishmaniose visceral ou calazar, é considerada uma zoonose que se estabeleceu inicialmente em áreas rurais e periurbanas. O número de casos vem aumentando consideravelmente, com o surgimento de focos da doença em áreas até então indenes. Estudos de casos humanos e caninos têm revelado a ocorrência da urbanização da LV nas grandes cidades brasileiras do Nordeste e mais recentemente do Sudeste (Badaró, 1988; Genaro et al., 1990; Marzochi et al., 1994; Mayward et al., 1996; Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2001).

No final da década de 80, a urbanização da endemia é intensificada em Terezina, PI e São Luís, MA. Na década de 90, a doença se estabelece em Montes Claros, MG, Camaçauá, BA e Recife, PE (Marzochi e Marzochi, 1994; Monteiro et al., 1994). Dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam periurbanização e urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro, RJ, Belo Horizonte, MG, Araçatuba, SP, Santarém, PA, Corumbá, MS, Teresina, PI, Natal, RN, São Luís, MA, Fortaleza, CE, Camaçari, BA e mais recentemente as epidemias ocorridas nos

municípios de Três Lagoas, MS, Campo Grande, MS, e Palmas, TO (MS, 2003). Neste contexto, os cães são considerados importantes reservatórios e talvez os responsáveis por essa mudança no perfil epidemiológico da doença (Marzochi et al., 1994), uma vez que os casos caninos precedem os humanos e devido a grande discrepância entre o número de cães infectados e o de casos humanos notificados.

O primeiro caso de leishmaniose visceral diagnosticado em Belo Horizonte e no Estado de Minas Gerais foi publicado por Versiani (1943). Tratava-se de um indivíduo de Alagoas que provavelmente se infectara fora de Minas Gerais, uma vez que veio de região endêmica da doença. O primeiro caso humano autóctone de LV em BH foi relatado no ano de 1959, em uma criança de um ano e dez meses, que nunca havia saído da cidade. Este fato tornou obscuro o modo pelo qual a criança contraiu a infecção (Rezende e Bastos, 1959). Em 1989, em Sabará, foi diagnosticado o segundo caso humano autóctone da doença na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Genaro et al., 1990). O primeiro caso da doença no cão, foi registrado na região nordeste de BH, em 1992. Inquéritos sorológicos realizados na área encontraram prevalência de 8,5 e 9,0% nos bairros Fernão Dias e São Paulo respectivamente (Dados da SMS de Belo Horizonte).

Nos últimos anos, o número de casos de leishmaniose visceral, tanto humana quanto canina, na RMBH aumentou de forma expressiva, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença nessa área (Silva et al., 2001).

Ao contrário da *L. donovani*, na cadeia de transmissão de *L. chagasi*, o homem serve apenas como uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos e a infecção depende largamente da presença de cães infectados na área (Lainson e Shaw, 1987). O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (Deane e Deane, 1954). É provável que existam outras fontes de infecção em algumas situações específicas, e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão (Nascimento et al., 1996; Badaró et al., 1994; Deane e Deane, 1955).

#### 1.4. Leishmaniose Visceral Canina

Desde a descoberta da leishmaniose visceral canina (LVC) em um inquérito canino na Tunísia, os cães têm sido implicados como importantes reservatórios da LV. De 145 cães examinados pelo método parasitológico utilizando material coletado através de punção na medula óssea, três animais mostraram-se positivos, ficando assim registrado o primeiro foco de calazar canino no mundo (Nicolle e Conte, 1908).

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas por Chagas et al. (1937 e 1938), na região Norte. Porém a doença só foi caracterizada quando estudada por Deane (1956) em área endêmica do Estado do Ceará. A LVC assim como a doença humana estão bastante difundidas no país e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência de LVC com a presença abundante do vetor (Vieira e Coelho, 1998).

A importância da infecção canina é conferida por várias razões, dentre as quais destacam-se: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem, vivendo no peridomicílio e em muitos casos, no próprio domicílio; o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta a *Leishmania chagasi*, além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (Killick-Kendrick et al., 1997).

O calazar canino é de início insidioso (Laveran e Havet, 1917) com acentuado emagrecimento. O sinal mais freqüente é geralmente apresentado na superfície cutânea, com grandes áreas de alopecia, eritema e descamação (Alencar, 1959). Porém, algumas vezes, os cães infectados apresentam aspecto aparentemente normal, mas com alto grau de parasitismo da pele e vísceras (Deane e Deane, 1955). O período de evolução da doença no cão pode ser bastante longo, podendo chegar a mais de um ano. O animal torna-se apático com pouca mobilidade, o que provoca um aumento acentuado das unhas (Alencar, 1959).

Clinicamente, os cães infectados com *L. infantum* foram classificados por Mancianti et al. (1988) em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais e sintomas clínicos característicos de infecção por *Leishmania*; nos oligossintomáticos ocorrem até três dos sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania*. Os cães sintomáticos são aqueles que

apresentam mais de três sinais clínicos característicos da infecção, entre eles alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pelo. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos.

Hasibeder et al. (1992) distinguiram dois tipos de evolução clínica para cães assintomáticos naturalmente infectados com a *L. infantum*. Um tipo A de cães que desenvolveram a doença após um período no qual eles eram assintomáticos, mas com sorologia positiva. Estes cães participaram na transmissão da doença até a morte. O tipo B eram cães que permaneceram assintomáticos, originalmente com sorologia positiva, que se tornaram sorologicamente negativos. Porém, os parasitas estavam presentes na pele e estes animais contribuíram para a transmissão, apesar de menos infectados do que o tipo A. Os cães do tipo B apresentaram um período de vida mais longo, devendo ser considerados quando se estima o índice de transmissão.

A importância do cão na transmissão da leishmaniose visceral tem sido investigada por vários autores. O cão tem sido apontado como o principal reservatório da LV em Belo Horizonte. Aparentemente, o papel do cão na introdução, dispersão e manutenção da LV tem valor relevante, uma vez que a epidemia canina precedeu a humana. Os distritos de Belo Horizonte com maiores incidências de calazar humano, sobrepuseram-se àqueles que apresentaram a doença canina no período de 1993 a 1997 (Belvilacqua et al., 2001). Utilizando a análise espacial Oliveira et al. (2001) observaram uma forte evidência de que os casos humanos de LV no município de BH no período de 1994 – 1997 ocorreram em áreas onde a taxa de prevalência em cães era alta.

A porcentagem de cães infectados apresentando as diferentes formas clínicas que vivem em área onde a leishmaniose canina é endêmica, tem importante implicação na saúde pública. Embora os cães assintomáticos sejam considerados por alguns autores com pouca ou nenhuma importância epidemiológica, Dye (1992) e Molina et al. (1994) demonstraram que as taxas de infecção dos vetores não está correlacionada com a condição clínica dos animais. Recentemente Guarga et al. (2000) realizaram o xenodiagnóstico direto em cães infectados com *L. infantum* e não observaram diferença estatisticamente significativa nas taxas de infecção das fêmeas de *Phlebotomus*

*perniciosus* quando analisados os diferentes grupos clínicos apresentados pelos animais. Entretanto, Michalsky (2004) ao estudar a infecção de *Lu. longipalpis* alimentadas em cães infectados com *L. chagasi* observou diferença entre as taxas de infecção quando o xenodiagnóstico foi realizado em animais assintomáticos (5,4%) ou sintomáticos (28,35%). Estes resultados suportam o ponto de vista de Molina et al. (1994) no qual apenas o sacrifício dos cães sintomáticos com sorologia positiva como estratégia para o controle da LV é insuficiente, devido a importância que os cães assintomáticos têm na epidemiologia da doença. Portanto, as medidas de controle devem ser direcionadas aos cães infectados, isto é, portadores de *Leishmania*, independentemente dos sinais clínicos que manifestem. Foi também demonstrado que cães infectados, mas assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos e conseqüentemente têm papel ativo na transmissão da *Leishmania*. Molina et al. (1994) mostraram que de cinco cães assintomáticos com sorologia positiva, três foram capazes de infectar flebotomíneos tão bem quanto os sintomáticos. Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por Adler e Theodor (1932) onde flebotomíneos alimentados em cães aparentemente saudáveis se infectaram. Conseqüentemente quando somente cães sintomáticos são considerados em estudos epidemiológicos, a prevalência da infecção é subestimada.

### **1.5. Controle e profilaxia da Leishmaniose Visceral**

As medidas de controle da LV envolvem fundamentalmente o que ficou conhecido como um “tripé” de ações: detecção ativa e passiva de casos humanos de LV e tratamento precoce dos mesmos, borrifação das casas e peridomicílio com inseticidas de ação residual, identificação e eliminação de cães com sorologia positiva (Deane e Deane, 1955; Passerat de Silans et al., 1998; Monteiro et al., 1994). Vários relatos e a própria experiência da MS têm demonstrado um declínio do número de casos humanos quando essas medidas são implementadas. Todavia, o grau de interferência de cada uma destas medidas, principalmente as relacionadas ao reservatório e ao vetor, deve ser melhor investigado através de estudos comparativos em áreas endêmicas.

A vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) que visa reduzir as taxas de letalidade e o grau de

morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como da diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e vetores (Gontijo e Melo, 2004). O novo enfoque do PCLV incorpora áreas sem ocorrência de casos humanos ou caninos de doença nas ações de vigilância e controle, objetivando evitar ou minimizar a expressão da doença (MS, 2003).

Teoricamente as estratégias de controle parecem adequadas, mas na prática a prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é bastante difícil. Ainda mais quando associada à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais, incluindo aspectos físicos de utilização do espaço habitado. O entendimento das alterações do meio ambiente urbano e dos flebotomíneos vetores constituem um pré-requisito para o desenvolvimento de ações apropriadas de prevenção e estratégias de controle (Gontijo e Melo, 2004). O inseticida de ação residual é aplicado no interior das casas e abrigos de animais, sendo essa medida considerada eficaz para reduzir a população de flebotomíneos e, conseqüentemente, os níveis de transmissão (Guerin et al., 2002).

Baseando-se em estudos epidemiológicos tem sido questionada a eliminação de cães infectados com *L. chagasi* como medida eficaz no controle da LV (Paranhos-Silva et al., 1996; Dietze et al., 1997; Ashford et al., 1998; Moreira Jr. Et al., 2004; Reithinger et al., 2004).

A aplicação de uma vacina anti- LVC é vista como importante e necessária medida de controle da endemia canina e humana. Vários estudos já foram realizados para o desenvolvimento de uma vacina contra LVC por Ogunkolade et al.(1988); Dunan et al. (1989); Mayrink et al. (1996) e Webb et al. (1996 e 1997). Alguns resultados importantes foram demonstrados. Entretanto nessas vacinas, a produção de anticorpos anti-*Leishmania* não foi capaz de controlar a infecção, sendo necessários maiores estudos para identificar o melhor candidato a antígeno para o controle da infecção canina.

Uma nova vacina desenvolvida na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e já testada em campo, foi capaz de proteger 92 – 95% dos cães vacinados contra LV (Borja Cabrera et al., 2002). Considerada uma vacina de segunda geração, a vacina FML, com o aval do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, está sendo industrializada e comercializada com o nome de Leishmune, pela Fort Dodge® Saúde

Animal desde maio de 2004. O MS não autoriza a utilização desta vacina como medida de controle da leishmaniose visceral no Brasil, por entender que os estudos até agora realizados referem-se à eficácia da vacina canina, e por não ter sido ainda realizado estudo com relação ao impacto na incidência da doença humana e canina, assim como estudos de custo/ efetividade e custo/ benefício (MS, 2004).

## **1.6. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Independentemente do enfoque principal que se dê às medidas de controle, o diagnóstico preciso da leishmaniose canina é extremamente importante, pois a taxa de infecção canina representa um termômetro, tanto para a ocorrência de epidemias quanto para o aumento do número de casos nas áreas endêmicas, onde normalmente a ocorrência do calazar canino precede a doença em humanos.

O diagnóstico do calazar canino é semelhante ao realizado na doença humana e diferentes técnicas podem ser utilizadas. As suspeitas iniciais baseiam-se na presença de sinais e sintomas clínicos, muitas vezes inespecíficos. O diagnóstico conclusivo depende do achado do parasita, o que é muito difícil, sendo assim, a detecção da presença de anticorpos anti - *Leishmania* ou antígenos do parasita, através de técnicas de imunodiagnóstico são mais utilizadas e podem ser confirmadas por técnicas de biologia molecular.

### **1.6.1. Diagnóstico Parasitológico**

São métodos diagnósticos utilizados para a demonstração do parasito, seja ela uma demonstração direta em lâminas fixadas ou após cultivo em meios artificiais, ou pela detecção do DNA do parasito.

A demonstração do parasito é feita através de material obtido de punção de medula óssea, pele, baço e fígado, tecidos mais intensamente parasitados. O material é examinado através de esfregaços corados pelo Giemsa. Quando os parasitas são

escassos podem ser cultivados em meio de cultura NNN/LIT ou inoculado em hamsters. O isolamento do parasito de animais com infecção confirmada geralmente é inferior a 80% (Schnur e Jacobson, 1987).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada no diagnóstico da LV humana e canina, e co-infecção com HIV (Howard et al., 1991; Ashford et al., 1995; Osman et al., 1997; Fisa et al., 2001; Pizzuto et al., 2001).

Embora a PCR seja uma reação altamente sensível e específica, seu emprego apresenta sérias limitações principalmente em inquéritos epidemiológicos, devido a pouca praticidade para as condições de campo. É um método que necessita de equipamentos e reagentes de custo elevado, além de pessoas treinadas para sua realização (Reed, 1996). Para a utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (Gontijo e Melo, 2004).

### **1.6.2. Diagnóstico Sorológico**

Tanto a imunidade celular como a humoral são acessadas no calazar, Isso faz com que os métodos sorológicos sejam de ampla utilização no seu diagnóstico. A resposta humoral específica presente na LVC, é muito intensa com altos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Por esta razão o diagnóstico sorológico é amplamente utilizado. Porém, é importante ressaltar que isto não ocorre até alguns meses após o estabelecimento da infecção por *Leishmania* em cães (Lamothe, 2002).

Na utilização da sorologia como diagnóstico da LVC está implícita a aceitação de que a maioria dos animais infectados desenvolve uma resposta imune específica que pode ser detectada pelos métodos disponíveis e que a soropositividade está relacionada à infecção. Entretanto, a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é incerta (Ashford et al., 1995). De maneira semelhante Lanotte et al. (1979) e Abranches et al. (1991) não encontraram correlação entre os títulos e a gravidade da doença. Estes achados sugerem que a sorologia convencional parece não ser um bom indicador da capacidade infectiva do cão para os vetores. Por outro lado, Pozio et al. (1981) verificaram associação entre a severidade da doença e os títulos de

anticorpos e Grandoni et al. (1988) sugeriram que o aumento da infectividade para vetores pode estar associada com o avanço da doença.

Várias técnicas sorológicas podem ser utilizadas para o diagnóstico do calazar, tais como a reação de fixação do complemento (Hockmeyer et al., 1984), hemaglutinação direta (Harith et al., 1986), hemaglutinação indireta (Bray e Lainson, 1967), teste de aglutinação direta (DAT) (Allain e Kagan, 1975; Harith et al., 1986), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Badaró et al., 1986), ensaio imunoenzimático (ELISA) (Ho et al., 1983; Badaró et al., 1986). Porém, as técnicas mais utilizadas no Brasil são a RIFI e o ELISA, devido à alta sensibilidade e especificidade das mesmas em comparação às demais (Badaró, 1983; Guimarães, et al., 1990). Em áreas endêmicas do Velho Mundo, o DAT vem sendo largamente utilizado tanto no diagnóstico do calazar humano quanto canino. As técnicas sorológicas convencionais apresentam algumas limitações. Geralmente são empregados como antígenos os parasitos totais ou extratos solúveis dos mesmos, o que torna a padronização das reações muito difícil.

A RIFI é considerada o padrão ouro dentre os testes sorológicos sendo muito utilizada na prática veterinária. É uma técnica muito útil do ponto de vista da clínica, mas subestima a taxa de infecção por *Leishmania* na população canina de áreas endêmicas (Alvar et al., 2004). Existem poucos kits de RIFI disponíveis comercialmente para serem usados no diagnóstico da LVC. No Brasil, o kit utilizado nas campanhas de controle é o produzido por biomanguinhos/FIOCRUZ/RJ. Alguns estudos têm mostrado que os antígenos preparados nos laboratórios de pesquisa proporcionam um melhor desempenho da reação (Rosário, 2005). Uma das limitações da RIFI é a ocorrência de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, o que limita sua aplicabilidade em regiões onde a LV ocorre simultaneamente com outras doenças tais como a LT e a Doença de Chagas. Outra limitação seria a necessidade de utilização do microscópio de imunofluorescência, o que dificulta a sua realização em algumas regiões, além de sua baixa sensibilidade e especificidade na detecção de casos assintomáticos (Alvar et al., 2004).

O ELISA tem sido usado como um valioso método no diagnóstico de várias doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose. É uma técnica altamente sensível mas a sua especificidade depende muito do antígeno empregado. Reações cruzadas com

outras infecções encontradas em cães, também são relatadas com esta técnica (Badaró et al., 1986; Mancianti et al., 1996). A utilização de antígenos recombinantes tem aumentado consideravelmente a especificidade da técnica (Burns et al., 1993). Embora seja grande o número de antígenos recombinantes testados no diagnóstico da LVC, somente um, o rK39, tem sido amplamente usado no ELISA (Scalone et al., 2002; Carvalho et al., 2003).

A utilização de reações sorológicas que necessitam de recursos laboratoriais mais sofisticados como a RIFI e o ELISA pode atrasar a utilização dos resultados na intervenção de controle, onde o animal infectado representa um risco como fonte de infecção para os flebotomíneos e conseqüentemente na transmissão para o homem.

O Teste de Aglutinação Direta (DAT) para LV foi primeiramente descrito por Allain e Kagan (1975). El Harith e colaboradores (1986 e 1988) adaptaram o método, a partir do teste de aglutinação em cartão (CATT) utilizado com antígenos para diagnóstico de tripanosomíasis (Magnus et al., 1978) e recomendaram para estudos clínicos em Hospitais e Centros de Saúde (El Harith et al., 1986), e inquéritos soropidemiológicos (El Harith et al., 1987). Muitos pesquisadores reportam a alta acurácia do teste para o diagnóstico da LV causado por *L. donovani* assim como por *L. infantum* (El Safi et al., 1989; Sinha e Sehgal, 1994; Korte et al., 1990). Oskam et al. (1996) avaliaram um teste de aglutinação (DAT) baseado em antígeno estável e liofilizado para a detecção de anticorpos anti-*leishmania* em soros caninos. Os resultados mostraram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,8%. A utilização deste antígeno torna este método mais simples, seguro e reprodutível. Além disso, entre os testes sorológicos recentemente desenvolvidos, o DAT parece ser o mais apropriado para o uso em campo (Sinha e Sehgal, 1994; Shiddo et al., 1995) devido às facilidades operacionais da técnica e seu baixo custo.

## 2. Justificativa

Considerando a importância da leishmaniose visceral canina no contexto da saúde pública e as dificuldades encontradas nas técnicas de diagnóstico convencionais, nos propomos a avaliar em campo a utilização de um teste que venha facilitar o diagnóstico e compará-lo com outras técnicas sorológicas. Para tal, este método deve apresentar algumas características básicas: não requerer o uso de equipamentos complexos e ser de simples leitura, fácil interpretação, rápido, além de específico e sensível. Como o teste DAT já foi testado no laboratório de Leishmanioses do CPqRR, utilizando-se soro e sangue em papel filtro de casos humanos provenientes de áreas endêmicas de Minas Gerais, e comprovada sua alta sensibilidade e especificidade, decidimos testá-lo com amostras de soro de cães, comparando-o com os métodos utilizados no PCLV.

Além da infecção canina variar fortemente de local para local, existe uma forte oposição à eliminação indiscriminada de cães. Sendo assim, a tentativa de controle da doença humana através da eliminação do reservatório doméstico, no caso o cão, requer a utilização de um método diagnóstico que não deixe dúvidas quanto à presença da infecção.

Portanto, é de suma importância a realização de pesquisas no sentido de conhecer com mais precisão qual a melhor, mais sensível e mais específica técnica de diagnóstico para a LVC, pois a infecção canina representa um risco tanto para a ocorrência de epidemias quanto para o aumento do número de casos nas áreas endêmicas, contribuindo assim com as medidas de controle.

## 3. Objetivos

### **3.1. Objetivo geral**

Comparar diferentes técnicas sorológicas no diagnóstico da LV em cães de área endêmica do Município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

### **3.2. Objetivos específicos:**

Determinar a sensibilidade e especificidade do método DAT em condições de campo.

Comparar a sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos ELISA, DAT e RIFI e , em amostras de soro de cães.

Avaliar a reprodutibilidade dos diferentes testes utilizados.

Avaliar a concordância do método DAT com os testes RIFI, ELISA, exame parasitológico e clínico.

Avaliar a aplicabilidade dos métodos utilizados, na distinção das diferentes formas clínicas da infecção.

## 4. Materiais e Métodos

#### 4.1. Área de estudo

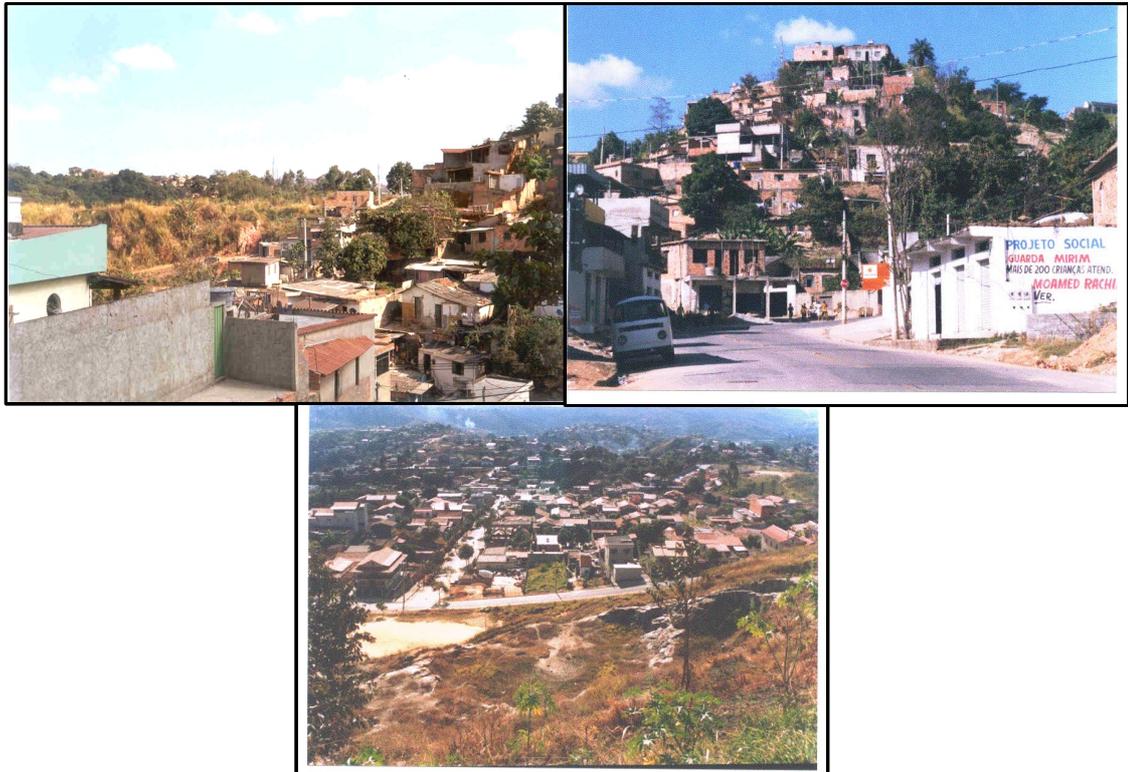
O estudo foi realizado em bairros da regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. A seleção do município foi feita baseada nos seguintes critérios: alta soroprevalência canina em vários anos consecutivos, presença de casos clínicos de leishmaniose visceral humana, apoio/colaboração do município, facilidades operacionais (recursos humanos e apoio logístico da SMS).

Belo Horizonte está localizada na zona metalúrgica de Minas Gerais e possui uma população estimada em 2.238.526 habitantes (IBGE, 2000). Limita-se, geograficamente, com os municípios de Sabará, Santa Luzia, Contagem, Nova Lima, Ribeirão das Neves, Ibirité, Brumadinho e Vespasiano. Administrativamente, está dividida em nove regionais e, no que se refere ao setor saúde, a partir de 1989 foram criados os distritos sanitários: Leste, Nordeste, Oeste, Barreiro, Centro - Sul, Venda Nova, Noroeste, Pampulha e Norte (SMS, Belo Horizonte/MG).

O surgimento da leishmaniose visceral em Belo Horizonte segue a mesma tendência de urbanização da doença observada a partir da década de 80 nas regiões brasileiras do Nordeste, onde era endêmica somente na zona rural, assim como da região Sudeste onde foram descritos casos humanos nas áreas urbanas das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro (Iverson et al., 1983; Marzochi et al., 1985; Marzochi et al., 1994).

No ano de 2004, foram notificados pela SMS 127 casos humanos de LV em BH, sendo 7,4% a prevalência de cães soropositivos. Na Regional Nordeste, a prevalência canina média foi de 5,02% e o número de casos humanos registrados nos anos de 2000 a 2004 foi: 16 casos em 2000, 15 em 2001, 17 em 2002, 12 em 2003 e 24 em 2004 (Dados da SMS de Belo Horizonte).

A prevalência de infecção canina na cidade de BH é altamente superior a infecção em humanos (Oliveira et al., 1997) fato observado em outras áreas endêmicas do Brasil (Alencar, 1959). Existe uma correlação entre a distribuição de casos caninos positivos na RMBH com a notificação de casos humanos, onde de 10 municípios com cães positivos seis tiveram casos humanos notificados (Silva, 1998).



**Figura 1: Fotos da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, área endêmica para leishmaniose visceral.**

#### **4.2. Estudo Seccional**

Para o cálculo da amostra de cães a serem trabalhados no estudo seccional, foram considerados os seguintes parâmetros:

- (1) prevalência esperada da infecção canina na área de estudo: utilizou-se estimativas das taxas prevalência que variavam entre 4 a 10%.
- (2) intervalo de confiança a 95%
- (3) amplitude do intervalo de confiança que se deseja encontrar

Considerando os vários cenários, a amostra necessária para o estudo foi calculada, utilizando o programa Epi-Info, versão 6.04:

**Tabela I. Estimativas de amostra para o estudo seccional**

Prevalência	Amostra de cães (Precisão na estimativa)		
10%	796 ( $\pm 0,02$ )	371 ( $\pm 0,03$ )	212 ( $\pm 0,04$ )
8%	661 ( $\pm 0,02$ )	305 ( $\pm 0,03$ )	174 ( $\pm 0,04$ )
6%	515 ( $\pm 0,02$ )	236 ( $\pm 0,03$ )	134 ( $\pm 0,04$ )
4%	356 ( $\pm 0,02$ )	162 ( $\pm 0,03$ )	92 ( $\pm 0,04$ )

Determinou-se, portanto, uma amostra de 236 cães para uma prevalência de 6% e precisão na estatística de 0,03 (Tabela I).

#### **4.3. Animais**

Foram coletadas amostras de sangue total periférico, sangue em papel filtro, medula óssea e fragmento de pele íntegra da face interna da orelha de 234 cães (*Canis familiaris*) de ambos os sexos e de idades e raças variadas domiciliados na Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, Minas Gerais Os cães receberam um número de identificação de acordo com a ordem de entrada na pesquisa. Os mesmos números foram utilizados para a identificação das amostras coletadas. A participação do cão no estudo foi condicionada ao consentimento dado pelo proprietário.

#### **4.4. Rotina de campo**

O procedimento empregado para a coleta do material canino foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido o projeto licenciado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - Fiocruz), em 20 de maio de 2002 sob a referência de número P0119-02 (Anexo 1).

Todo o procedimento de coleta do material foi acompanhado por um veterinário. Os animais foram anestesiados para garantir a ausência de dor e desconforto. Foram coletadas amostras de sangue total periférico para a obtenção de soro, por via endovenosa, especificamente na veia radial, e sangue em papel de filtro para a obtenção de eluato tiras de papel Klabin 80 de 15 x 6 cm, foram embebidas em sangue coletado da ponta da orelha dos cães através de um pequeno furo feito com uma lanceta descartável, estas amostras foram identificadas e secadas a temperatura ambiente, embaladas em papel celofane e conservadas a 4°C para a realização da sorologia. A sorologia a partir de eluato de sangue em papel filtro (ESPF) foi realizada em até três meses após a coleta do material. Também foi feita punção de medula óssea e biópsia de pele da orelha para a confirmação parasitológica e posteriores estudos biomoleculares.

No exame clínico, foi preenchida uma ficha clínica epidemiológica (Anexo 2), onde constam informações sobre a procedência do animal, raça, sexo, idade, possíveis viagens que o cão tenha feito ou outros endereços em que residiu com o proprietário, aspecto geral do animal, procurando por sinais da doença canina tais como, perda de pelo, presença de feridas no corpo, o número e região onde se encontravam, emagrecimento, onicogribose, descamação da pele e opacidade córnea. Nesta mesma ficha foram posteriormente preenchidos os campos referentes aos resultados dos diagnósticos parasitológicos e sorológicos.

#### **4.5. Rotina Laboratorial**

##### **4.5.1. Exame Parasitológico:**

Foi utilizado neste trabalho como padrão ouro para ser comparado com as técnicas sorológicas.

#### **4.5.1.1. Exame de lâminas**

Foram confeccionadas lâminas a partir de esfregaço de medula óssea e impressão por aposição do fragmento de pele de orelha. Estas lâminas foram fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa, para a demonstração de formas amastigotas de *Leishmania*. As leituras foram realizadas por dois leitores, considerando-se positivos os resultados em que pelo menos um dos leitores encontrou formas amastigotas.

#### **4.5.1.2. Mielocultura**

As amostras de medula óssea eram armazenadas em geladeira (4°C) durante 24 horas em solução salina com antibiótico (Estreptomicina 100µg/ml e Penicilina 500U/ml) e uma parte colocada em meio de cultura NNN (Novy e Mc Nel, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantido à 25° C ± 1°C. O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Se em prazo máximo de quatro semanas a cultura não positivasse o resultado era então considerado negativo. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, para posterior caracterização.

#### **4.5.2 Caracterização Molecular dos Parasitas**

As amostras isoladas de cães provenientes de Belo Horizonte foram caracterizadas através de análise isoenzimática como *Leishmania (Leishmania) chagasi* por Silva et al. (2001). A fim de confirmar que o parasita envolvido na infecção dos cães deste estudo fosse de fato *L. chagasi*, a caracterização molecular dos parasitos foi feita através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com DNA de *Leishmania* extraído das amostras isoladas a partir de medula óssea dos cães. Para o diagnóstico específico das amostras foram utilizados os iniciadores MC1: 5' GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG 3' e MC2: 5' CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG 3'

desenhados a partir do minicírculo da molécula de DNA do cinetoplasto de *L. infantum*, Cortes et al. (2004).

As reações foram realizadas utilizando-se o Kit puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences). Na reconstituição das “beads” em um volume final de 25µl a concentração de cada dNTP foi de 200µM em 10µM de Tris-HCl (pH 9.0), 50mM de KCl e 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, a concentração da puReTaqDNA polimerase foi de 2,5U e de 5 pmoles para cada iniciador. Finalmente eram adicionados 2,0µl de DNA na concentração de 1ng/µl.

A amplificação foi realizada em equipamento termociclador automático (perkin-elmer-geneampPCRSsystem 2400) em procedimento “Hot-Start”. O programa utilizado foi: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos para desnaturação, 60°C por 20 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão. A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos.

A cada conjunto de reações foi incluído um controle negativo, que continha todos os componentes da reação exceto o DNA e para controle positivo foi utilizado o DNA de *L. chagasi*.

As amostras cujos resultados fossem negativos na PCR específica para *L. infantum/L. chagasi* seriam novamente submetidas à PCR com os iniciadores B1: 5' GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3' e B2: 5' CTA ATT GTG CAC GGG GAG G 3' B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. brazilienses* (De Bruijn e Barker, 1992) e os iniciadores M1: 5' CCA GTT TCG AGC CCC GGA G 3' e M2: 5' GGT GTA AAA TAG GGG CGG ATG CTC TG 3' específicos para espécies do complexo *L. mexicana* (Eresh et al., 1994).

#### **4.5.2.1. Visualização dos resultados:**

Os produtos amplificados nas condições especificadas geram um fragmento de 447 pb de kDNA de *L. infantum / L. chagasi*. Estes fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O marcador de peso molecular usado foi o φx174, digerido por Hae III, com 11

fragmentos variando de 72 a 1357bp. Foram aplicados no gel 15µl de cada amostra. A corrida foi realizada durante 30 minutos a 100volts.

Os produtos amplificados foram visualizados através de luz ultravioleta e fotografados utilizando-se o “Eagle Eye System” (Stratagene, USA).

#### **4.5.3. Diagnóstico Sorológico**

Foram realizados os testes, ELISA, DAT e RIFI para a comparação da sensibilidade, especificidade, acurácia e reprodutibilidade.

Os testes RIFI e ELISA, foram também realizados tanto com soro, quanto com ESPF, para a comparação da eficiência das técnicas.

O Teste DAT foi realizado apenas com soro, devido ao fato de que o antígeno disponível não ter sido suficiente para a realização do teste com eluato de papel de filtro.

Na realização das técnicas sorológicas foram usados como controle os soros de 20 cães não infectados (sorologicamente e parasitologicamente negativos) nascidos e criados em canil de experimentação.

Todas as amostras usadas no estudo, antes de processadas, foram codificadas para que os testes fossem realizados em ensaios mascarados.

##### **4.5.3.1. ELISA - Ensaio Imunoenzimático**

Este método permite a determinação de um resultado quantitativo pela detecção de imunoglobulinas da classe IgG (anti – *Leishmania* sp.), presentes no soro canino, utilizando-se conjugado marcado com peroxidase, produzindo uma coloração cuja absorbância (densidade óptica - DO) é lida através do leitor de ELISA (“Stat Fax – 2100” / Awareness Technology INC) com um filtro de 450 nm.

Foi utilizado o Kit EIE-LEISHMANIOSE CANINA - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/RJ.

O antígeno utilizado, fixado no fundo das placas são parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*.

Cinco µl das amostras de soro e dos controles positivo e negativo foram diluídas (diluição de 1:100) em tubos descontaminados, limpos e secos, e homogeneizadas em 500µl do diluente de amostra/conjugado. Com as amostras em papel filtro, foram feitos picotes de seis mm foram colocados em tubos descontaminados, limpos e secos (um picote por tubo), adicionados de 500µl de diluente da amostra/conjugado. Estes tubos foram agitados por uma hora em um agitador, para que ocorresse a eluição das amostras, seguindo especificações do fabricante.

Após a diluição ou eluição das amostras, 100µl destas foram distribuídos da seguinte maneira em cada placa: coluna 1 “A” e “B” controles positivos, “C” e “D” controles negativos, “E” e “F” sem soro (Branco da reação) e no restante da placa, amostras a serem testadas. Todas as amostras foram processadas em duplicata. As placas foram seladas com folhas adesivas e incubadas a 37°C por 30 minutos. Durante esse intervalo, o tampão de lavagem foi diluído. Após os 30 minutos, as folhas foram removidas, o conteúdo das placas foi despejado e as placas foram lavadas 6 vezes com o tampão de lavagem. Em seguida adicionou-se 100 µl do conjugado, diluído e homogeneizado de acordo com instruções do fabricante, foram distribuídos em cada poço da placa. Após seladas com folhas adesivas as placas foram incubadas novamente à 37°C por 30 minutos. Ao fim deste período as folhas foram descoladas, o conteúdo das placas removido e as placas lavadas como anteriormente. O substrato foi diluído segundo instruções do fabricante e distribuído rapidamente, 100µl em cada orifício da placa. Após ter sido incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos, a reação foi bloqueada adicionando-se 50µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida procedeu-se a leitura no leitor de ELISA, da marca “Stat Fax – 2100” / Awareness Technology INC, utilizando-se um filtro de 450 nm.

O estabelecimento do ponto de corte foi feito através de um experimento realizado com 20 amostras de cães não infectados de área não endêmica, processadas em duplicata. A partir desse resultado foi feito o cálculo da média e do desvio padrão das absorvâncias apresentadas e o ponto de corte resultante foi obtido pelo cálculo da média de absorvância dos soros negativos somada ao dobro do desvio

padrão. O ponto de corte utilizado em todos os experimentos posteriores, utilizando-se kits do mesmo lote, foi então igual a 0,05 nm.

#### 4.5.3.2. DAT - Direct Agglutination Test

Para a execução do teste de aglutinação direta (DAT) foi utilizado o protocolo descrito por Harith et al (1988) e Meredith et al (1995). As amostras foram diluídas em salina fisiológica (0,9% NaCl) contendo 1,56% de  $\beta$  - mercaptoetanol. Diluições seriadas dos soros foram feitas a partir de 1:100 até a diluição máxima de 1:102.400, ficando a última coluna das placas para os controles positivo e negativo. Em todas as reações foi utilizado o antígeno liofilizado e congelado (figura 2) produzido pelo Royal Tropical Institute (KIT – Amsterdã, Holanda) e gentilmente cedido pelo Dr. Henk Schallig. Cinquenta microlitros do antígeno (concentração de  $5 \times 10^7$  promastigotas por ml), diluído em 5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% acrescido de 50 $\mu$ l de soro fetal bovino inativado (figura 3), foram adicionados a cada poço da placa contendo 50 $\mu$ l do soro diluído.



**Figura 2: Antígeno liofilizado e congelado utilizado no Teste de Aglutinação Direta.**



**Figura 3: Antígeno diluído para uso no Teste de Aglutinação Direta.**

As placas foram cobertas e agitadas levemente. A leitura dos resultados foi feita após 18 horas de incubação à temperatura ambiente, conforme visualizado nas figuras 4 e 5.

O ponto de corte da reação para soros de cães, estabelecido em estudos prévios, foi de 1:400 (Oskam et al., 1996; Özbel et al., 2000; Schallig et al., (2002). Soros reativos à diluição > 1:400 foram considerados positivos.

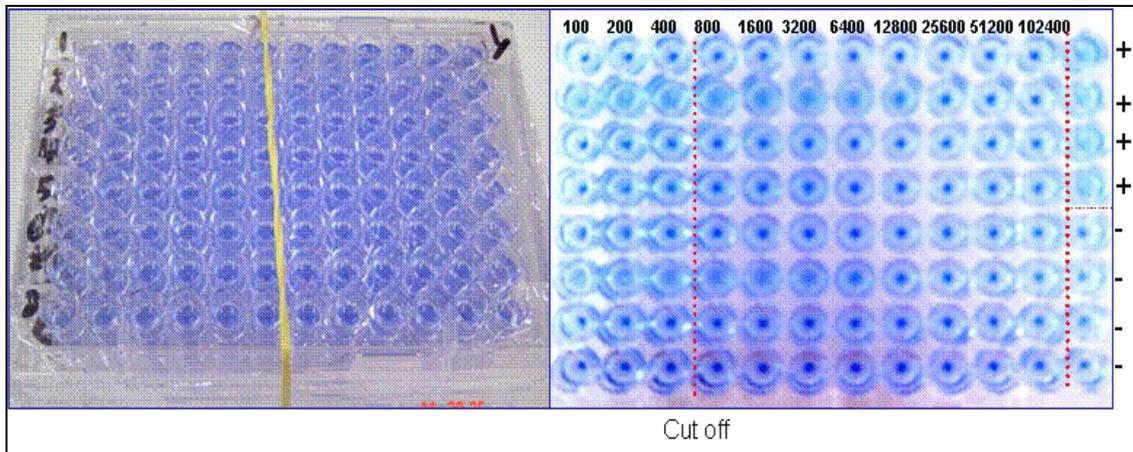


Figura 4: Placa de DAT pronta para incubar.

Figura 5: Placa após a incubação de 18 horas pronta para a leitura.

#### 4.5.3.3. RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta:

Foi realizada utilizando o kit produzido pelo laboratório de Biomanguinhos/FIOCRUZ/RJ. Os soros foram diluídos a partir de 1:40 até 1:640 em PBS. Em seguida, 10 µl de cada diluição foram transferidos para as lâminas já previamente preparadas com o antígeno de *Leishmania chagasi* e incubadas a 37 °C por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e após a secagem, cobertas com o conjugado fluorescente, diluído 1:100 em PBS contendo 1mg de Azul de Evans. E novamente incubados em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas duas vezes com PBS e uma com água destilada. Depois de secas as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e recobertas com lamínulas 24x50 mm para a leitura em microscópio de fluorescência utilizando objetiva de 40x.

Para as amostras em papel filtro, foram feitos picotes de seis mm dos papéis contendo as amostras e colocados em placas de ELISA de poliestireno de fundo chato,

devidamente identificadas, as amostras ficavam incubadas em geladeira “overnight” com 200µl de PBS diluído, para que ocorresse a eluição. O eluato foi então aplicado nas lâminas que ficavam incubadas em câmara úmida por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e após a secagem cobertas com o conjugado fluorescente, diluído 1:100 em PBS contendo 1mg de Azul de Evans, e novamente incubadas em câmara úmida à  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas duas vezes com PBS e em seguida uma vez com água destilada. Depois de secas as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e recobertas com lamínulas 24x50 mm para a leitura em microscópio de fluorescência utilizando objetiva de 40x.

O ponto de corte da RIFI para as amostras processadas em soro foi o título 1:40 a partir do qual os resultados foram considerados positivos. No caso das amostras processadas em papel filtro, não foi feita diluição seriada, sendo o resultado considerado positivo quando a fluorescência era observada.

#### **4.6. Critérios para a definição de verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN)**

Foram considerados verdadeiros positivos (VP) aqueles cães cujo resultado parasitológico, por qualquer um dos métodos usados, foi positivo.

Os cães verdadeiros negativos (VN) foram aqueles com resultados dos exames parasitológicos negativos associados ao resultado negativo em todas as técnicas sorológicas (ELISA, DAT e RIFI).

#### **4.7. Reprodutibilidade dos testes**

Para testar a reprodutibilidade dos testes, 10% das amostras foram processadas em duplicata. Deste modo, 23 de 234 amostras foram aleatoriamente selecionadas recebendo um outro número de identificação e todo o procedimento de diagnóstico foi realizado. Como descrito anteriormente, os resultados dos exames em duplicata foram

então comparados através de testes de concordância com os resultados das amostras correspondentes.

#### **4.8. Critério para a classificação dos cães em grupos clínicos**

Os critérios utilizados para a classificação dos cães em grupos clínicos, foram aqueles descritos por Mancianti et al. (1988), que separa os cães em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Foram considerados assintomáticos todos os cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos aqueles cães que apresentaram até três dos sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania*; e sintomáticos aqueles cães que apresentaram mais de três sinais clínicos característicos da infecção, entre eles alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pelo.

#### **4.9. Teste de reações cruzadas**

Os experimentos foram realizados para a verificação da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre os métodos avaliados (ELISA, DAT e RIFI) com soros de cães infectados com outras patologias e estabelecer um ponto de corte seguro para a detecção apenas de LV, verificando a especificidade dos testes.

Foram utilizadas amostras de soro de cães naturalmente infectados com outras parasitoses mais comuns no Brasil: doença de Chagas (sete), leishmaniose tegumentar (cinco), toxoplasmose (cinco) e erlichiose (três), além de controle positivo para leishmaniose visceral (cinco) e controle negativo (cães não infectados nascidos e criados no canil da UFOP, área não endêmica) (cinco).

#### **4.10. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico STATA, versão

6.0, de acordo com as seguintes etapas através da distribuição cruzada dos resultados das reações positivas e negativas numa tabela de contingência (2x2) (Tabela II).

Tabela II. Tabela de contingência 2 x 2

VP	VN	Total
a	b	a + b
c	d	c + d
a + c	b + d	a + b + c + d = N

Legenda: VP verdadeiros positivos; VN verdadeiros negativos

(1) As diferenças das frequências de positividade em cada teste e em cada grupo clínico foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) sendo que aqueles que apresentaram P-valor  $< 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

(2) Comparações entre os testes sorológicos, ELISA, DAT e RIFI nos grupos de cães verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, calculando-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e validade ou acurácia.

a) cálculo da sensibilidade com intervalo de confiança:

Sensibilidade é a capacidade que o teste apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes.

$$S = a/a+c$$

b) cálculo da especificidade com intervalo de confiança:

Especificidade é a capacidade que o teste tem de detectar os casos verdadeiramente negativos, isto é de diagnosticar corretamente os indivíduos com ausência da doença.

$$E = d/b+d$$

c) estimativa dos VPP e VPN dos testes:

VPP é a proporção de casos verdadeiramente doentes entre os positivos pelo teste considerado.

$$VPP = a/a+b$$

VPN é a proporção de casos verdadeiramente sadios ou sem a doença, entre os negativos pelo teste considerado. O VPN expressa a probabilidade de um cão com resultado negativo realmente não estar infectado.

$$VPN = d/c+d$$

d) Validade ou acurácia:

Refere-se ao grau em que o exame é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido, ou seja, revela se os resultados representam a verdade ou o quanto se afastam dela.

$$A = a+ d/ N$$

(3) Concordância do teste DAT com os testes de rotina – RIFI e ELISA:

Foi realizada utilizando os métodos de concordância Kappa (intervalo de confiança a 95%) (Tabelas III e IV) e teste de Youlden (intervalo de confiança a 95%). O valor do índice de Youlden é calculado através da fórmula

$$J = ( a / a + c ) + ( d / b + d ) - 1 .$$

(4) Análise da reprodutibilidade dos métodos:

Foi feita através da análise das duplicatas, utilizando o teste de concordância Kappa (intervalo de confiança a 95%).

**Tabela III. Para calcular o valor de kappa**

Teste 1		
Positivo	Negativo	Total
a	b	a + b
c	d	c + d
a + c	b + d	a + b + c + d

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Po : Proporção de concordâncias observadas

Pe : Proporção de concordâncias esperada

$$Po = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

$$Pe = \frac{\{(a+b)(a+c)\} + \{(c+d)(b+d)\}}{(a + b + c + d)^2}$$

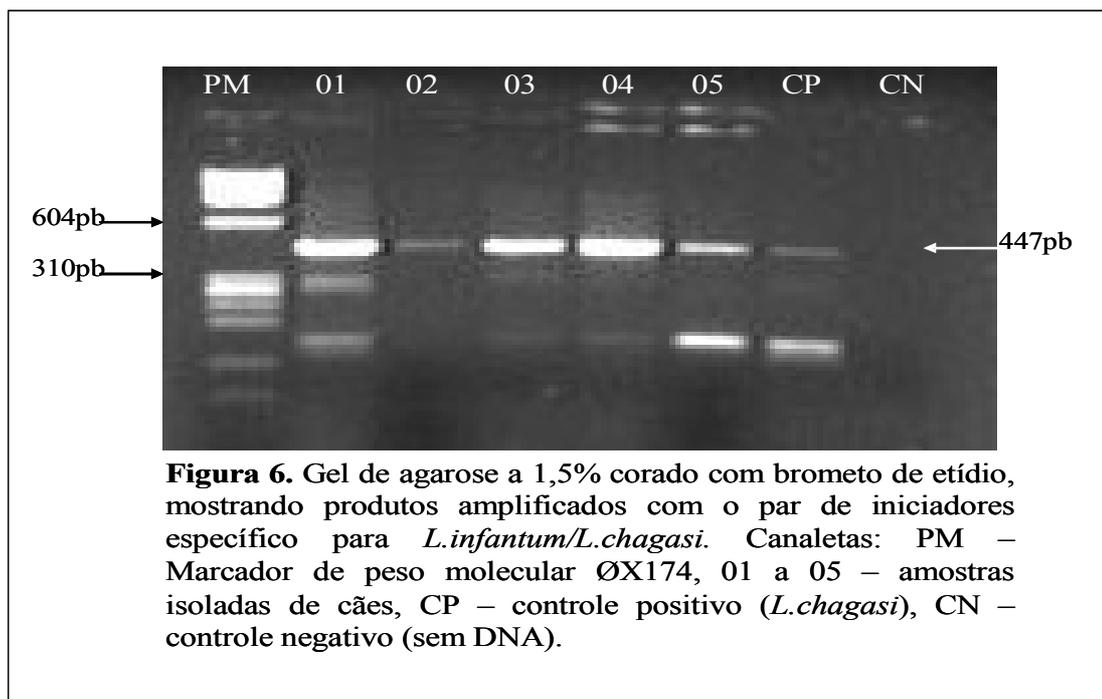
**Tabela IV. Critérios para a interpretação do índice kappa**

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

## 5. Resultados

## 5.1. Caracterização dos parasitas

Das amostras de *Leishmania* que foram isoladas, cinco foram selecionadas aleatoriamente para a extração de DNA, que foi utilizado na técnica de PCR específico. Todas as amostras apresentaram-se positivas utilizando-se os iniciadores MC1/MC2 específicos para *L. infantum/L. chagasi* (Figura 6). Este resultado, aliado aos registros de casos humanos de LV na área, nos deu maior segurança em afirmar que os cães utilizados no estudo estavam infectados com *L. chagasi*, agente causador da LV no Brasil.



### Definição de casos verdadeiros positivos (VP) e casos verdadeiros negativos (VN)

De um total de 234 amostras de soros de cães analisadas, foram obtidos os seguintes resultados: 148 positivos no ELISA, 138 positivos no DAT, 121 positivos na RIFI e 112 parasitologicamente positivos (Tabela V). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos testes ELISA e DAT e nem entre DAT e RIFI e entre RIFI e Parasitológico. O mesmo não pode ser dito quando

analisados os resultados de ELISA e RIFI ou de ELISA x parasitológico, DAT x Parasitológico, que apresentaram diferenças significativas.

**Tabela V – Resultados dos exames sorológicos (ELISA, DAT e RIFI) e parasitológico.**

	<b>Elisa (%)</b>	<b>DAT (%)</b>	<b>RIFI (%)</b>	<b>Parasitológico (%)</b>
<b>Positivo</b>	148 <sup>a</sup> (63%)	138 <sup>a,b</sup> (59%)	121 <sup>b,c</sup> (52%)	112 <sup>c</sup> (48%)
<b>Negativo</b>	86	96	113	122
<b>Total</b>	234	234	234	234

Legenda: a, b, c; valores estatisticamente semelhantes

Os 112 cães parasitologicamente positivos foram tomados como os verdadeiros positivos e os resultados de sorologia positiva foram 108 (96%) positivos no ELISA, 104 (93%) positivos no DAT e 81 (72%) positivos na RIFI (Tabela VI). Os verdadeiros negativos que aqui foram também chamados de cães *não infectados de área endêmica* (NIAE), foram todos aqueles cujos resultados tanto parasitológico quanto sorológico nos três testes foram negativos (NIAE = 35).

Para os cálculos de especificidade e sensibilidade dos testes, foram também utilizadas 20 amostras de soro de cães *não infectados de área não endêmica* (NIANE), nascidos e criados em canil de experimentação.

A tabela VI apresenta também os resultados dos três testes sorológicos realizados com os casos VP e os casos VN (NIAE e NIANE) e os respectivos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia de cada um dos testes.

**Tabela VI. Resultado dos exames sorológicos dos cães parasitologicamente positivos (VP), dos cães não infectados de área endêmica (NIAE) e cães não infectados de área não endêmica (NIANE)**

	<b>ELISA</b>		<b>DAT</b>		<b>RIFI</b>	
	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>VP (n = 112)</b>	108	04	104	08	81	31
<b>NIAE (n = 35)</b>	0	35	0	35	0	35
<b>NIANE (n = 20)</b>	0	20	0	20	0	20
<b>Especificidade</b>	100% (100-100)		100% (100-100)		100% (100-100)	
<b>Sensibilidade</b>	96% (92-99)		93% (89-97)		72% (65-80)	
<b>Acurácia</b>	97% (93-100)		95% (90-98)		79% (69-84)	
<b>Youlden</b>	0,95 (0,92-0,99)		0,92 (0,89-0,97)		0,72 (0,65-0,80)	
<b>IC 95%</b>						

A especificidade dos testes, quando utilizadas amostras de soros de cães com outras doenças e os soros controle positivo e negativo foi, ELISA (60%), DAT (95%) e RIFI (45%), conforme demonstrado na Tabela VII.

**Tabela VII. Resultados dos exames sorológicos realizados com soros de cães com outras doenças e controles**

Patógeno (n)	ELISA		DAT		RIFI	
	+	-	+	-	+	-
<i>Trypanosoma cruzi</i> (07)	04	03	0	07	07	0
<i>Leishmania braziliensis</i> (05)	03	02	0	05	02	03
<i>Toxoplasma gondi</i> (05)	0	05	0	05	0	05
<i>Ehrlichia canis</i> (03)	01	02	01	02	02	01
Cães não infectados	01	04	0	05	01	04
<i>Leishmania chagasi</i> (05)	05	0	05	0	04	1
<b>Especificidade</b>	60% (39-82)		95% (85-100)		45% (23-67)	

## 5.2. Valores preditivos positivos e negativos de acordo com três prevalências estimadas da doença.

Na Tabela VIII são apresentados os resultados dos valores de predição positiva para a RIFI o ELISA em amostras de soro e ESPF e para o DAT em amostras de soro, considerando-se três prevalências estimadas da doença canina. Deve-se salientar que quando o VPP de um teste é baixo, grande parte dos cães com resultado positivo consiste na realidade em falso-positivos. Os testes de ELISA soro e DAT foram os que apresentaram os VPPs mais elevados, principalmente quando considerada a prevalência de 5%, que é aquela mais próxima da prevalência da região de onde os cães deste estudo se originaram.

**Tabela VIII. Valores preditivos positivos de acordo com três prevalências estimadas da doença**

PE	ELISA (S)	ELISA (E)	DAT(S)	RIFI (S)	RIFI (E)
5%	83%	27%	83%	79%	55%
10%	91%	43%	91%	89%	72%
20%	96%	63%	96%	95%	85%

Legenda: PE = prevalência estimada; (S) = soro; (E) = eluato

Os VPNs para a RIFI, o ELISA em amostras de soro e ESPF e para o DAT em amostras de soro, considerando-se três prevalências estimadas da doença canina estão apresentados na Tabela IX. Estes resultados sugerem que a possibilidade da existência de falsos negativos no grupo estudado é baixa, principalmente quando considerada a prevalência de 5 % onde os VPNs foram de 98% ou 99% nos diferentes testes utilizados.

**Tabela IX. Valores preditivos negativos de acordo com três prevalências estimadas da doença**

<b>PE</b>	<b>ELISA (S)</b>	<b>ELISA (E)</b>	<b>DAT(S)</b>	<b>RIFI (S)</b>	<b>RIFI (E)</b>
<b>5%</b>	99%	99%	99%	98%	98%
<b>10%</b>	99%	99%	99%	97%	96%
<b>20%</b>	98%	99%	98%	93%	92%

Legenda: PE = prevalência estimada; (S) = soro; (E) = eluato

#### **5.4. Avaliação da Reprodutibilidade dos testes ELISA, DAT e RIFI**

A reprodutibilidade dos testes de ELISA, DAT e RIFI foi avaliada em ensaio mascarado. Foram testadas 23 (10%) amostras em duplicata em todos os testes.

As análises comparativas entre as repetições e as amostras encontram-se nas Tabelas X, XI e XII. Os testes ELISA e DAT mostraram-se reprodutíveis com uma concordância perfeita entre as repetições e o soro teste ( $k = 1,0$ ) (Tabelas X e XI). O teste de RIFI apresentou uma reprodutibilidade inferior aos demais com uma concordância regular ( $k = 0,49$ ) (Tabela XII).

**Tabela X. Reprodutibilidade do teste ELISA**

Amostra	Duplicata		Total
	+	-	
+	14	0	14
-	0	9	9
<b>Total</b>	14	9	23
<b>K = 1,00 (1,00-1,00)</b>		<b>Concordância Perfeita</b>	

IC 95%

**Tabela XI. Reprodutibilidade do teste DAT**

Amostra	Duplicata		Total
	+	-	
+	14	0	14
-	0	9	9
<b>Total</b>	14	9	23
<b>K = 1,00 (1,00-1,00)</b>		<b>Concordância Perfeita</b>	

IC 95%

**Tabela XII. Reprodutibilidade do teste RIFI**

Amostra	Duplicata		Total
	+	-	
+	9	2	11
-	4	8	12
<b>Total</b>	13	10	23
<b>K = 0,49 (0,13-0,83)</b>		<b>Concordância Regular</b>	

IC 95%

### 5.5. Avaliação da distribuição dos títulos positivos dos diferentes testes diagnósticos utilizados nos diferentes grupos clínicos

Quando avaliada a distribuição dos títulos sorologicamente positivos dos diferentes testes foi observado que no teste de ELISA não houve diferença estatística significativa na distribuição dos títulos em nenhum dos três grupos clínicos. Com o teste de RIFI, houve diferença estatística significativa de distribuição dos títulos sorológicos no grupo dos oligossintomáticos com uma frequência maior do título 640. O mesmo não foi observado para os assintomáticos e sintomáticos. Com o teste DAT houve diferença estatística significativa na distribuição dos títulos nos grupos assintomáticos e oligossintomáticos sendo o título 51200 observado com maior frequência (Tabela XIII).

**Tabela XIII. Distribuição dos títulos positivos dos diferentes testes diagnósticos utilizados nos diferentes grupos clínicos**

	TESTES					
	ELISA (OD) n (%)		DAT(Título) n (%)		RIF (Título) n (%)	
ASSINTOMÁTICOS	<b>0,05-0,30</b>	4 (11,8)	<b>800</b>	1 (3,3)	<b>40</b>	5 (14,7)
	<b>0,31-0,60</b>	9 (26,4)	<b>1600</b>	2 (6,6)	<b>80</b>	8 (23,6)
	<b>0,61-0,90</b>	10 (29,4)	<b>3200</b>	- (-)	<b>160</b>	6 (17,6)
	<b>0,91-1,20</b>	3 (8,8)	<b>6400</b>	5 (16,7)	<b>320</b>	9 (26,5)
	<b>1,21-1,50</b>	4 (11,8)	<b>12800</b>	2 (6,6)	<b>640</b>	6 (17,6)
	<b>1,51-...</b>	4 (11,8)	<b>25600</b>	7 (23,4)		
			<b>51200</b>	8 (26,7)		
		<b>102400</b>	5 (16,7)			
OLIGOSSINTOMÁTICOS	<b>0,05-0,30</b>	11 (11,2)	<b>800</b>	3 (3,4)	<b>40</b>	6 (8,5)
	<b>0,31-0,60</b>	19 (19,4)	<b>1600</b>	4 (4,5)	<b>80</b>	11 (15,5)
	<b>0,61-0,90</b>	20 (20,4)	<b>3200</b>	5 (5,7)	<b>160</b>	15 (21,1)
	<b>0,91-1,20</b>	19 (19,4)	<b>6400</b>	14 (16,0)	<b>320</b>	17 (23,9)
	<b>1,21-1,50</b>	17 (17,4)	<b>12800</b>	15 (17,0)	<b>640</b>	22 (31,0)
	<b>1,51-...</b>	12 (12,2)	<b>25600</b>	12 (13,6)		
			<b>51200</b>	21 (23,8)		
		<b>102400</b>	14 (16,0)			
SINTOMÁTICOS	<b>0,05-0,30</b>	1 (5,3)	<b>800</b>	- (-)	<b>40</b>	2 (12,5)
	<b>0,31-0,60</b>	3 (15,8)	<b>1600</b>	- (-)	<b>80</b>	2 (12,5)
	<b>0,61-0,90</b>	5 (26,3)	<b>3200</b>	3 (15,8)	<b>160</b>	4 (25,0)
	<b>0,91-1,20</b>	4 (21,0)	<b>6400</b>	4 (21,0)	<b>320</b>	4 (25,0)
	<b>1,21-1,50</b>	3 (15,8)	<b>12800</b>	3 (15,8)	<b>640</b>	4 (25,0)
	<b>1,51-...</b>	3 (15,8)	<b>25600</b>	1 (5,3)		
			<b>51200</b>	5 (26,3)		
		<b>102400</b>	3 (15,8)			

## 5.6. Testes de reações cruzadas.

Os testes de reações cruzadas foram realizados em exames cegos com 30 amostras de soro de cães: sete infectados com *T. cruzi*, cinco infectados com *L. braziliensis*, cinco infectados com *T. gondii*, três infectados com *E. canis*, além de cinco controles positivo, infectados com *L. chagasi* e 5 controles negativo, NIANE, com resultados apresentados na Tabela XIV.

**Tabela XIV: Teste de reação cruzada.**

PATOGENO	ELISA	DAT	RIFI
<i>L. chagasi</i>	0,72	1:12800	1:40
<i>L. chagasi</i>	1,15	1:12800	1:80
<i>L. chagasi</i>	0,49	1:6400	NR
<i>L. chagasi</i>	1,69	1:25600	1:40
<i>L. chagasi</i>	0,58	1:25600	1:160
<i>L. braziliensis</i>	0,32	NR	NR
<i>L. braziliensis</i>	0,36	NR	NR
<i>L. braziliensis</i>	0,33	NR	1:160
<i>L. braziliensis</i>	0,42	NR	1:160
<i>L. braziliensis</i>	0,39	NR	NR
<i>T. cruzi</i>	0,31	NR	1:40
<i>T. cruzi</i>	0,37	NR	1:320
<i>T. cruzi</i>	0,37	NR	1:160
<i>T. cruzi</i>	0,37	NR	1:320
<i>T. cruzi</i>	0,32	NR	1:80
<i>T. cruzi</i>	0,29	NR	1:40
<i>T. cruzi</i>	0,42	NR	1:640
<i>E. canis</i>	0,31	NR	NR
<i>E. canis</i>	0,29	NR	1:40
<i>E. canis</i>	0,66	1:3200	1:320
<i>T. gondii</i>	0,29	NR	NR
<i>T. gondii</i>	0,34	NR	NR
<i>T. gondii</i>	0,32	NR	NR
<i>T. gondii</i>	0,30	NR	NR
<i>T. gondii</i>	0,30	NR	NR
NI	0,36	NR	NR
NI	0,32	NR	NR
NI	0,35	NR	NR
NI	0,32	NR	NR
NI	0,31	NR	1:40

**Legenda:** Conforme o esperado; Falso positivo; Falso negativo; Reação cruzada  
ELISA, valores de absorbância. DAT e RIFI, diluição.

Dos 20 soros de cães infectados com outras doenças, o teste de RIFI apresentou reação cruzada em 12, ELISA em 9 e o DAT em 1, este um soro de cão infectado com *E. canis*.

No teste de ELISA dos 9 positivos, 4/7 eram infectados com *T. cruzi*, 3/5 infectados com *L. braziliensis* e 1/3 infectado com *E. canis*. Dos 12 resultados positivos na RIFI, 7/7 infectados com *T. cruzi*, 2/5 infectados com *L. braziliensis* e 2/3 infectados com *E. canis*. Nenhum dos testes realizados apresentou reação cruzada para soros de cães infectados com *T. gondii*.

O soro do mesmo cão infectado com *E. canis*, apresentou reação cruzada com os três testes em diluições elevadas do soro.

Dos 5 soros de cães não infectados, um apresentou resultado positivo no teste de ELISA e um apresentou resultado positivo no teste de RIFI.

Dos 5 soros de cães infectados com *L. chagasi* ( controle positivo ), um apresentou resultado negativo no teste de RIFI.

### 5.7. Concordância entre os testes analisados 2 a 2

Os testes sorológicos, quando analisados 2 a 2, apresentaram as seguintes concordâncias: ELISA X DAT (94 %), concordância ótima,  $K = 0,87$  (Tabela XV), ELISA X RIFI (81%), concordância boa,  $K = 0,62$  (Tabela XVI) e RIFI X DAT (80%) , concordância regular,  $K = 0,60$  (Tabela XVII).

**Tabela XV. Concordância entre os testes ELISA e DAT**

ELISA	DAT		Total
	+	-	
+	137	13	150
-	1	83	84
<b>Total</b>	138	96	234
<b>K = 0,87</b>	<b>Concordância Ótima</b>		
<b>J = 0,857</b>			

**Tabela XVI. Concordância entre os testes ELISA e RIFI**

ELISA	RIFI		Total
	+	-	
+	113	37	150
-	7	77	84
<b>Total</b>	120	114	234
<b>K = 0,62</b>		<b>Concordância Boa</b>	
<b>J = 0,617</b>			

**Tabela XVII. Concordância entre os testes RIFI e DAT**

RIFI	DAT		Total
	+	-	
+	106	14	120
-	32	82	114
<b>Total</b>	138	96	234
<b>K = 0,60</b>		<b>Concordância Regular</b>	
<b>J = 0,622</b>			

### 5.8. Concordância entre os testes nos diferentes grupos clínicos

Após o exame clínico, os cães foram classificados nos grupos clínicos de acordo com a presença ou ausência de sintomas em assintomáticos (CA, n = 40 /234; 17,09%) (com ausência de sinais clínicos característicos da doença e pelo menos um dos testes sorológicos e/ou parasitológico positivo), oligossintomáticos (CO, n = 134/234 ; 57,26%) (cães que apresentavam de um a três sinais da doença), sintomáticos (CS, n = 25/234 ; 10,69%) (todos aqueles cães que apresentavam mais de três dos sinais característicos da doença). Foram classificados como cães não infectados de área endêmica (NIAE, n = 35/234; 14,96%) aqueles que além de não apresentarem sinais da doença, os resultados dos testes sorológicos e do exame parasitológico foram negativos.

**Tabela XVIII. Forma clínica e positividade dos testes de ELISA, RIFI e DAT**

Forma clínica	Total de Soros	Positividade			
		ELISA(%)	DAT(%)	RIFI(%)	Parasitológico(%)
Assintomático	40	34 <sup>a</sup> (85%)	30 <sup>a</sup> (75%)	34 <sup>a</sup> (85%)	19 <sup>b</sup> (48%)
Oligossintomático	134	95 <sup>c</sup> (71%)	89 <sup>c</sup> (66%)	71 <sup>d</sup> (53%)	76 <sup>d</sup> (57%)
Sintomático	25	19 <sup>e</sup> (76%)	19 <sup>e</sup> (76%)	16 <sup>e</sup> (64%)	17 <sup>e</sup> (68%)
NIAE	35	0	0	0	0
NINAE	20	0	0	0	0

Legenda: a,b,c,d,e; valores estatisticamente semelhantes

Os cães não infectados de área não endêmica (NIANE, n = 20) foram utilizados como controle. A Tabela XVIII apresenta o resultado da positividade dos testes utilizados nas diferentes formas clínicas.

No grupo dos assintomáticos não houve diferença estatística significativa na frequência de positivos nos diferentes testes sorológicos aplicados. Os três testes apresentaram positividade superiores ao exame parasitológico. No grupo dos oligossintomáticos, não houve diferença estatística significativa de positividade entre ELISA e DAT nem entre RIFI e exame parasitológico. Os resultados dos testes ELISA e DAT foram considerados iguais, e superiores aos métodos RIFI e parasitológico. No grupo dos sintomáticos todos os métodos realizados (sorológicos e parasitológico) apresentaram desempenhos iguais, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Quando avaliada as concordâncias entre os testes, dentro dos grupos clínicos os resultados obtidos foram: Cães assintomáticos: concordância regular ( $k = 0,54$ ) entre ELISA e DAT, concordância ruim ( $k = - 0,18$ ) entre ELISA e RIFI e concordância ruim ( $k = - 0,08$ ) entre RIFI e DAT (Tabela XIX); Cães oligossintomáticos: concordância ótima ( $k = 0,89$ ) entre ELISA e DAT, concordância regular ( $k = 0,57$ ) entre ELISA e RIFI, concordância regular ( $k = 0,54$ ) entre RIFI e DAT (Tabela XX); Cães sintomáticos: concordância perfeita ( $k = 1,00$ ) entre ELISA e DAT, concordância boa ( $k = 0,72$ ) entre ELISA e RIFI, concordância boa ( $k = 0,72$ ) entre RIFI e DAT (Tabela XXI). Os dois grupos de cães não infectados (NIAE e NIANE) apresentaram concordância perfeita ( $k = 1,00$ ) entre todos os testes (Tabelas XXII e XXIII).

**Tabela XIX. Concordância dos testes nos cães Assintomáticos (n = 40)**

ELISA	DAT		ELISA	RIFI		RIFI	DAT	
	+	-		+	-		+	-
+	29	5	+	28	6	+	25	9
-	1	5	-	6	0	-	5	1
<b>% concordância</b>	85%			70%			65%	
<b>Kappa</b>	0,54			- 0,18			- 0,08	
<b>Concordância</b>	Regular			Ruim			Ruim	

**Tabela XX. Concordância dos testes nos cães Oligossintomáticos (n = 134)**

ELISA	DAT		ELISA	RIFI		RIFI	DAT	
	+	-		+	-		+	-
+	89	6	+	69	26	+	65	6
-	0	39	-	2	37	-	24	39
<b>% concordância</b>	96%			79%			78%	
<b>Kappa</b>	0,89			0,57			0,54	
<b>Concordância</b>	Ótima			Regular			Regular	

**Tabela XXI. Concordância dos testes nos cães Sintomáticos (n =25)**

ELISA	DAT		ELISA	RIFI		RIFI	DAT	
	+	-		+	-		+	-
+	19	0	+	16	3	+	16	0
-	0	6	-	0	6	-	3	6
<b>% concordância</b>	100%			88%			88%	
<b>Kappa</b>	1,00			0,72			0,72	
<b>Concordância</b>	Perfeita			Boa			Boa	

**Tabela XXII. Concordância dos testes nos cães NIAE (n=35)**

ELISA	DAT		ELISA	RIFI		RIFI	DAT	
	+	-		+	-		+	-
+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	0	35	-	0	35	-	0	35
<b>% concordância</b>	100%		100%		100%		100%	
<b>Kappa</b>	1,00		1,00		1,00		1,00	
<b>Concordância</b>	Perfeita		Perfeita		Perfeita		Perfeita	

**Tabela XXIII. Concordância dos testes nos cães NIANE (n=20)**

ELISA	DAT		ELISA	RIFI		RIFI	DAT	
	+	-		+	-		+	-
+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	0	20	-	0	20	-	0	20
<b>% concordância</b>	100%		100%		100%		100%	
<b>Kappa</b>	1,00		1,00		1,00		1,00	
<b>Concordância</b>	Perfeita		Perfeita		Perfeita		Perfeita	

### **5.9 Resultado do exame de cães através das técnicas ELISA e RIFI, utilizando soro e sangue coletado em papel filtro.**

Para esta comparação foi analisado o material colhido de 230 cães provenientes de área endêmica. Destes, 109 foram positivos no exame parasitológico, 119 positivos na RIFI realizada com soro, 105 positivos na RIFI realizada em papel, 144 no ELISA realizada em soro e 164 no ELISA realizada em papel filtro (Tabela XXIV).

**Tabela XXIV. Resultados dos exames realizados no soro e no sangue coletado em papel filtro dos 230 cães.**

<b>Parasitológico</b>	<b>RIFI Soro</b>	<b>RIFI Papel</b>	<b>ELISA Soro</b>	<b>ELISA Papel</b>
109	119	105	144	164
121	111	125	86	66
<b>230</b>	<b>230</b>	<b>230</b>	<b>230</b>	<b>230</b>

Dos 109 cães parasitologicamente positivos, 80 (73%) foram positivos na RIFI em soro e 75 (69%) foram positivos na RIFI em eluato; 104 (95%) foram positivos na ELISA em soro e 106 (97%) na ELISA em eluato. A análise estatística dos dados não mostrou diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os testes RIFI feitos no soro ou papel filtro. O mesmo foi observado para o método ELISA. O teste de ELISA foi estaticamente superior à RIFI na detecção de cães positivos tanto na utilização do soro quanto em eluato (Tabela XXV).

**Tabela XXV. Resultado dos exames sorológicos dos cães parasitologicamente positivos (VP) e dos cães NIAE realizados com soro e eluato**

	RIFI Soro		RIFI Eluato		ELISA Soro		ELISA Eluato	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>VP (n= 109)</b>	80 <sup>a</sup>	29	75 <sup>a</sup>	34	104 <sup>b</sup>	05	106 <sup>b</sup>	03
<b>NIAE (n=35)</b>	0	35	01	34	0	35	05	30
<b>Especificidade</b>	100%		97%		100%		86%	
<b>Sensibilidade</b>	73%		69%		95%		97%	
<b>Acurácia</b>	79%		76%		97%		94%	

### 5.10 Concordância entre os testes RIFI e ELISA realizados com soro e eluato

A concordância entre os testes, avaliada pelo índice kappa, quando comparado soro e eluato foi boa para o teste de ELISA ( $k = 0,78$ ) (Tabela XXVI) e regular para RIFI ( $k = 0,45$ ) (Tabela XXVII). Ao utilizar amostras de soro a concordância entre ELISA e RIFI foi boa ( $k = 0,64$ ) (Tabela XXVIII) e regular ( $k = 0,46$ ) (Tabela XXIX) com as amostras de sangue em papel filtro analisados por estes métodos.

**Tabela XXVI. Concordância entre ELISA Soro e ELISA Eluato**

<b>ELISA Soro</b>	<b>ELISA Eluato</b>		<b>Total</b>
	<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>+</b>	143	1	144
<b>-</b>	21	65	86
<b>Total</b>	164	66	230
<b>K = 0,78</b>		<b>Concordância Boa</b>	
<b>J = 0,857</b>			

**Tabela XXVII. Concordância entre RIFI Soro e RIFI Eluato**

<b>RIFI Soro</b>	<b>RIFI Eluato</b>		<b>Total</b>
	<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>+</b>	80	39	119
<b>-</b>	25	86	111
<b>Total</b>	105	125	230
<b>K = 0,45</b>		<b>Concordância Regular</b>	
<b>J = 0,45</b>			

**Tabela XXVIII. Concordância entre ELISA Soro e RIFI Soro**

<b>ELISA Soro</b>	<b>RIFI Soro</b>		<b>Total</b>
	<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>+</b>	111	33	144
<b>-</b>	08	78	86
<b>Total</b>	119	111	230
<b>K = 0,64</b>		<b>Concordância Boa</b>	
<b>J = 0,636</b>			

**Tabela XXIX. Concordância entre ELISA Eluato e RIFI Eluato**

<b>ELISA Eluato</b>	<b>RIFI Eluato</b>		<b>Total</b>
	<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>+</b>	103	61	164
<b>-</b>	2	64	66
<b>Total</b>	105	125	230
<b>K = 0,46</b>		<b>Concordância Regular</b>	
<b>J = 0,493</b>			

## 6. Discussão

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. O diagnóstico clínico da LVC é muitas vezes um problema para os veterinários. Há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença, sendo uma característica importante a permanência por períodos prolongados da infecção inaparente.

O diagnóstico parasitológico para leishmaniose visceral pode ser realizado por diversos métodos: isolamento em meios de cultura, inoculação em hamsters, pesquisa de formas amastigotas em esfregaços corados de órgãos, ou em cortes histológicos. A especificidade destes métodos é de 100% mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (Gontijo e Melo, 2004). Embora os exames parasitológicos constituam o diagnóstico de certeza, não são métodos de escolha pois não apresentaram aplicabilidade nos programas de controle da doença, principalmente em trabalhos de campo. Os métodos parasitológicos são considerados procedimentos invasivos, exigem ambientes apropriados para a coleta, apresentam baixa sensibilidade além de serem trabalhosos, de liberação de resultados demorada (Brener, 1957; Marsdem e Jones, 1985; Mohammed et al. 1986; Genaro et al., 1988; Sundar e Raí, 2002). No caso do cultivo do material em meios de cultura ainda existe o risco de contaminação com fungos e bactérias o que muitas vezes inviabiliza a obtenção do resultado.

Durante a execução deste trabalho, todas as dificuldades inerentes ao exame parasitológico mencionadas puderam ser observadas. O exame de lâminas exige muita experiência do microscopista e o grande número de lâminas a serem avaliadas torna o trabalho extremamente cansativo e demorado. O inóculo do material em cultura e principalmente a sua manutenção exigem uma infra-estrutura de laboratório só existente em laboratórios de pesquisa. Este procedimento para ser feito como rotina, demandaria muito tempo o que, além do custo elevado, inviabiliza o diagnóstico em larga escala como o necessário durante levantamentos ou inquéritos epidemiológicos.

O maior problema para a validação de um novo teste de diagnóstico é a ausência de um padrão ouro realmente confiável, uma vez que os testes parasitológicos,

diagnósticos de certeza, apresentam baixa sensibilidade e os testes sorológicos, embora mais sensíveis estão sujeitos a apresentar reações cruzadas com outras doenças (Boelaert, 1999 a). Sendo assim, a avaliação de qualquer método diagnóstico deve considerar estas dificuldades para que se tenha mais segurança na análise dos resultados obtidos.

Considerando estas dificuldades foi estabelecido um critério para definirmos os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos dentro do total de cães cujas amostras foram coletadas. Com relação aos verdadeiros positivos não há margem para dúvidas uma vez que o critério utilizado foi o exame parasitológico positivo, o que nos dá a certeza do cão estar realmente infectado. Com relação à seleção dos verdadeiros negativos, o critério utilizado, (exame parasitológico negativo e os testes RIFI, ELISA e DAT, realizados em soro, negativos) aumenta a probabilidade de serem realmente negativos, embora não dê a mesma certeza que o critério utilizado para os verdadeiros positivos. A utilização de vários testes diminui a probabilidade de erro uma vez que foram selecionados como verdadeiros negativos apenas aqueles negativos para todos os testes realizados.

Mais recentemente tem-se utilizado métodos moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral, entre eles a PCR que apresenta elevada sensibilidade e especificidade (Ashford et al., 1995; Osman et al., 1997). Porém, estes métodos são inviáveis para o diagnóstico em massa realizado em inquéritos epidemiológicos, por apresentarem custos elevados além de pouca praticidade e aplicabilidade em campo (Reed, 1996). Para a utilização em larga escala a PCR necessita de um ajuste para se tornar mais simples e com custos operacionais mais baixos (Gontijo e Melo, 2004). No presente trabalho a técnica da PCR foi utilizada apenas para a caracterização específica dos parasitas das amostras isoladas de cães provenientes da área de estudo. Todas as amostras selecionadas foram identificadas como *L. chagasi* (*L. infantum*), o que nos deu maior segurança de que trabalhávamos com material de cães infectados com *L. chagasi*.

Neste contexto, os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da LV são ferramentas fundamentais para auxiliar tanto no diagnóstico clínico quanto nos estudos epidemiológicos. Estes métodos apresentam como vantagens principais o fato de não serem invasivos, possibilitarem trabalhar com número maior de amostras permitindo um grande número de resultados em curto prazo (Rosário, 2005). As diversas técnicas

sorológicas existentes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os clínicos e os epidemiologistas sempre solicitam exames sorológicos para confirmar a suspeita clínica e esperam que os resultados sejam confiáveis, sendo a especificidade e sensibilidade dos testes características essenciais para isto (Gontijo e Melo, 2004). Além disso, é também importante que um teste diagnóstico apresente alta acurácia e altos valores preditivos positivo e negativo para reduzir a probabilidade de resultados falsos. A acurácia de um método diagnóstico é criticamente dependente da determinação do ponto de corte a ser adotado (Boelaert et al., 1999 b).

A maioria dos estudos publicados sobre leishmaniose canina foi baseada na sorologia, principalmente utilizando os métodos de RIFI, ELISA e DAT (Gradoni, 1999). A sorologia detecta a maioria dos cães sintomáticos (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999) e uma proporção dos cães assintomáticos, que representam em torno de 50% da população canina soropositiva (Lanotte et al., 1979; Gradoni et al., 1980; Pozio et al., 1981; Mancianti et al., 1986; Abranches et al., 1991; Fisa et al., 1999; Sideris et al., 1999). Entretanto, estes métodos falham em detectar cães infectados no período pré-patente da infecção e antes de sua soroconversão, aqueles que nunca vão soroconverter e os cães soropositivos que convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados (Dye et al., 1992; Dye et al., 1993; Pinelli et al., 1994; Quinell et al., 1997). Grande parte da população canina residente em área endêmica é infectada por *Leishmania* e não é detectada pela sorologia. Leontides et al. (2002) compararam a PCR e RIFI e obtiveram na PCR prevalência de 61,9% e incidência de 41,7% enquanto que na RIFI estes valores foram 14,% e 17,6% respectivamente. Isso reforça a necessidade de se buscar técnicas de diagnóstico sorológico mais efetivas e explica, pelo menos em parte, o porque das ações de controle baseadas na eliminação dos cães soropositivos não ser suficiente, uma vez que é grande o número de cães infectados e não detectados pelas técnicas sorológicas empregadas.

Como a prevalência da LC é comumente determinada pelos inquéritos soroepidemiológicos nos deparamos basicamente com duas situações problema, decorrentes das limitações dos métodos utilizados atualmente: 1ª - A subestimativa da prevalência pode ocorrer devido à sensibilidade limitada das técnicas empregadas visto que de 5 a 10% dos cães não desenvolvem níveis de anticorpos detectáveis por estas

técnicas ou porque os cães, mesmo infectados, ainda não apresentam a soroconversão; 2ª - A superestimativa da prevalência também é possível devido aos casos falso positivos decorrentes da baixa especificidade das técnicas tradicionais como consequência de reações cruzadas com outras infecções, além da ocorrência de infecções transitórias que são eliminadas naturalmente pelos animais.

Atualmente são usados no diagnóstico da LVC os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Estas técnicas utilizam antígenos brutos e são limitadas em termos de especificidade e reprodutibilidade (Sundar e Rai, 2002). No Brasil os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo e Melo, 2004).

Durante muito tempo a RIFI foi a técnica mais utilizada para o diagnóstico da LV, embora não seja eficiente para analisar um grande número de amostras. A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Atualmente o teste de ELISA vem sendo mais utilizado para o diagnóstico da LV, uma vez que a leitura do resultado é feita rapidamente e não sofre influência do observador, e adaptado para analisar grande número de amostras em menos tempo (Nurit et al., 1988). ELISA é um teste de fácil execução e leitura quando comparado com a RIFI, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, entretanto esta técnica é pouco precisa na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (Almeida et al., 2005).

A maior ou menor especificidade dos métodos depende da preparação e do tipo de antígeno utilizado na reação. O DAT é muito utilizado para o diagnóstico da LV humana e canina em áreas endêmicas de diversos países do Velho Mundo, apresentando altas taxas de sensibilidade e de especificidade. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença (Boelaert et al., 1999 a). Em 1995, foi desenvolvido um antígeno liofilizado que permanece estável por períodos superiores a 18 meses à 56°C, o que facilita seu uso em

condições de campo (Meredith et al., 1995) sendo este utilizado em nossos experimentos.

No presente estudo os testes de ELISA, DAT e RIFI, realizados com amostras de soro apresentaram uma especificidade de 100% quando analisadas apenas amostras de cães parasitologicamente positivos e cães negativos de área endêmica e não endêmica. Quando analisadas amostras de soros de cães infectados com outras doenças e soros controle, o DAT foi o teste que apresentou a maior especificidade, não havendo diferença estatística significativa entre os resultados de ELISA RIFI. Estes resultados indicam que estes métodos são altamente específicos dentro do universo restrito de animais com leishmaniose e que apresentam exame parasitológico positivo. Porém, cabe ressaltar que o DAT permaneceu com um alto índice de especificidade (95%) mesmo quando soros de animais com outras patologias foram acrescentados na análise.

Os resultados de sensibilidade obtidos com os testes DAT e ELISA foram estatisticamente superiores aos resultados observados com a RIFI. Outros estudos já registraram resultados semelhantes. (Paranhos Silva et al., 1996) em Jequié, BA, quando compararam os testes de ELISA e RIFI para detecção da infecção por *Leishmania* em soro de cães, encontraram 98% e 78% de sensibilidade para ELISA e RIFI respectivamente.

Edrissian e Darabian (1979) trabalhando com sorodiagnóstico de leishmanioses cutânea e visceral no Iram, observaram que o ELISA foi mais sensível que a RIFI, mas que a RIFI foi mais específica e concluíram que o ELISA foi tão bom quanto a RIFI, sendo que a primeira é mais prática que a segunda para ser utilizada em inquéritos populacionais.

Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último mostrou ser tão sensível e específico quanto a RIFI, quando não eram incluídos soros com tripanossomíases. Quando os mesmos eram incluídos, o resultado do DAT ficava mais semelhante ao ELISA e ambos menos específicos que a RIFI (Harith et al., 1987). El Safi e Evans (1989) demonstraram que o DAT é pelo menos tão bom quanto o ELISA no diagnóstico da LV e Andrade et al. (1987) mostraram que o DAT tem um desempenho no diagnóstico igual ao da RIFI. Estes resultados com o DAT foram obtidos com a utilização do antígeno aquoso, precursor do antígeno liofilizado utilizado em nosso trabalho. O Dog-DAT , como é conhecido o kit contendo o antígeno

liofilizado, foi avaliado por Oskam et al. (1996) que obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 98,8% estudando 291 amostras de soros de diferentes grupos de cães. Outras grandes vantagens do DAT em relação aos demais testes estão na sua simplicidade de execução e baixo custo (Alves e Bevilacqua, 2004). Para Sundar e Rai (2002) a especificidade de um método depende mais do tipo de antígeno utilizado do que o protocolo adotado, enquanto a sensibilidade é influenciada principalmente pela metodologia.

Os VPPs e VPNs dos três testes utilizados foram calculados a partir de três prevalências estimadas da doença.

Quando considerada a prevalência de 5%, mais próxima da prevalência da área de estudo, os testes ELISA soro e DAT apresentaram os VPPs mais elevados. Rosário (2002) ao calcular o VPP dos testes ELISA e RIFI, a uma prevalência de 5%, obteve para o ELISA (soro e eluato) valores altos muito semelhantes aos encontrados por nós. Já em relação à RIFI, os resultados foram discordantes, sendo o VPP da RIFI em nosso estudo, maior que o obtido por Rosário, quando analisando amostras de soro, e o VPP obtido a partir da RIFI realizada em eluato de menor valor.

Os VPNs do presente trabalho, quando considerada a prevalência de 5% foi de 98% para RIFI (soro e eluato) e 99% para ELISA (soro e eluato) e DAT. Isso indica que os nossos resultados negativos obtidos com qualquer um destes testes têm grande chance de serem realmente negativos, sobretudo naquelas amostras que foram negativas para mais de um deles, aumentando a confiança no critério adotado para definirmos os verdadeiros negativos.

Ao analisarmos a reprodutibilidade dos diferentes testes o resultado obtido foi que os testes ELISA e DAT apresentaram uma reprodutibilidade perfeita enquanto a RIFI apresentou uma reprodutibilidade regular. Isto reforça a idéia de que a RIFI apresenta falhas em relação aos outros dois testes comparados, uma vez que quanto maior a reprodutibilidade do teste maior é a confiança que se pode ter em relação aos resultados.

São raros na literatura científica artigos que avaliem a reprodutibilidade destes testes. Porém, a discrepância em relação aos níveis de sensibilidade e especificidade,

principalmente na RIFI, observada nos trabalhos publicados, mostra a grande dificuldade em se analisar comparativamente os resultados dos diferentes estudos devido a diferenças metodológicas, o que certamente tem um impacto na reprodutibilidade dos testes. Mais uma vez, emerge a necessidade da padronização dos métodos com a produção de “kits” que possam ser utilizados em larga escala nos programas de controle da doença.

Rosário (2002) ao analisar a reprodutibilidade das reações sorológicas, observou que a RIFI apresentou concordância perfeita tanto em amostras de soro quanto nas amostras de eluato e o ELISA apresentou uma concordância boa em amostras de soro e eluato. Deste modo, tanto a RIFI quanto o ELISA foram considerados reprodutíveis nas condições empregadas.

A leishmaniose visceral induz altos títulos de anticorpos, o que facilita o seu diagnóstico por testes sorológicos (Bray, 1980). Assim, métodos sorológicos são utilizados em inquéritos epidemiológicos no intuito de detectar animais infectados.

Em nosso estudo observamos que os três métodos avaliados não apresentam correlação entre a forma clínica do cão e o título de anticorpos detectados na sorologia, sugerindo então que outros fatores, além da carga parasitária, estariam atuando na resposta imunológica do cão à presença do parasita.

Silva e colaboradores (2001) em um estudo clínico epidemiológico em cães de BH/MG, observaram que entre os cães positivos na sorologia realizada pela RIFI, 26,5% apresentaram títulos igual a 1:640, mostrando que altos títulos de anticorpos ocorrem em animais infectados, mesmo assintomáticos. Em avaliação multicêntrica de um kit para ELISA, realizada por pesquisadores italianos (Scalone et al., 2002), também não foi observada correlação entre os valores da absorbância no ELISA e títulos na RIFI, com a severidade da doença nos cães.

Segundo Oliva et al. (1995), o DAT tem o potencial de detectar a infecção em seus estágios iniciais, embora os títulos da sorologia não sejam estreitamente correlacionados com o aumento da carga parasitária. Nos trabalhos de Lanotte et al. (1979) e Abranches et al. (1991) também não foi evidenciada a correlação entre os títulos e a gravidade da doença. Estes achados sugerem que a sorologia convencional parece não ser um bom indicador da forma clínica ou mesmo da evolução da doença.

Entretanto, Pozio et al. (1981) mostraram uma associação entre a severidade da doença e os títulos de anticorpos, assim como também observado por Mancianti et al. (1994) através dos métodos de RIFI e ELISA.

Outro aspecto analisado em nosso estudo foi a correlação entre a intensidade dos resultados nos diferentes métodos usados. Não foi observada correlação entre os títulos da RIFI e DAT ou absorbância no ELISA, sendo que um resultado fortemente positivo em um dos testes pode ser fracamente positivo em um dos outros ou até mesmo negativo.

Em outros trabalhos também já foram constatadas a ausência de correlação, Rachamim et al. (1991), ou uma baixa correlação na intensidade das reações entre RIFI e ELISA mesmo quando o mesmo antígeno foi utilizado (Gottstein et al., 1988).

As razões para a baixa correlação entre os títulos da RIFI e do DAT e a intensidade do ELISA ainda não são claras. Sabe-se que nos resultados de qualquer prova sorológica intervêm inúmeros fatores, alguns embora conhecidos são de difícil ou impossível controle. Estão vinculados em parte, a estabilidade e especificidade do antígeno, a estabilidade dos reagentes e a possibilidade de uma leitura visual dependente da qualificação e experiência dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico (MS, 1999). Estudos com leishmaniose visceral humana demonstraram que diferenças entre cepas de *L. donovani* também podem afetar a acurácia do diagnóstico sorológico (Badaró et al., 1986).

O diagnóstico sorológico da LV no Brasil é feito principalmente através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) e pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). De um modo geral estes métodos imunológicos são considerados de valor limitado, devido aos altos níveis de reatividade cruzada entre as diversas espécies de *Leishmania*, bem como com o *Trypanosoma cruzi* (Camargo e Rebonato, 1969; Badaró et al., 1986; Reed et al., 1987; Vexanat et al., 1996).

Em nosso estudo, assim como descrito na literatura, os testes de RIFI e ELISA apresentaram reações cruzadas em amostras de soro de cães infectados com outros tripanosomatídeos como *T. cruzi* e *L. braziliensis*, além de terem apresentado também reação cruzada em amostra de soro de cão infectado com *E. canis*. Costa et al. (1991)

utilizando a RIFI, detectaram reações cruzadas com leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com doença de Chagas canina em 83% dos casos. O ELISA também demonstrou ser reativo com soros humanos e caninos acometidos de outras doenças bacterianas e parasitárias, principalmente com o *T. cruzi* (Roffi et al., 1980; Badaró et al., 1986; Mancianti et al., 1996).

Uma das principais limitações da RIFI para o diagnóstico da LVC é justamente a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas, o que dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição destas três doenças em certas regiões (Gontijo e Melo, 2004).

Devido à estas limitações, vários estudos vêm tentando identificar quais são os antígenos responsáveis por estas reatividades cruzadas e assim otimizar as técnicas de imunodiagnóstico utilizando antígenos espécie- específicos que consigam diferenciar casos de leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar e doença de Chagas (Reed et al., 1987; Vexanat et al., 1996;). Entre os candidatos a serem utilizados na tentativa de se otimizar as técnicas sorológicas estão os antígenos recombinantes tais como o rK39 e o rK26 que mostraram-se altamente específicos não reagindo com soros de cães com outras parasitoses (Rosário, 2002).

O DAT apresentou reação cruzada apenas com uma amostra de soro de cão infectado com *E. canis*, esta mesma amostra apresentou-se positiva nos outros dois testes realizados. No trabalho que avaliou a utilização do DAT no sorodiagnóstico da LVC foram incluídos soros de cães com outras doenças infecciosas (babesiose, leptospirose) e não foram observadas reações cruzadas (Oskan et al., 1996). Nosso trabalho é o único empregando o DAT em que foi utilizado um número significativo de amostras de soro de cães infectados com diferentes patógenos, comumente encontrados no Brasil, no teste de reação cruzada.

O DAT foi avaliado utilizando-se amostras de soro de pacientes parasitologicamente positivos para LV de diferentes origens geográficas, soros controles de indivíduos de áreas não endêmicas e soros de pacientes com outras doenças que poderiam dar reação cruzada tais como malária, tuberculose, lepra, e tripanosomíase. Os soros de pacientes com tripanosomíase foram os únicos que apresentaram reação cruzada significativa com o DAT (Harith et al., 1986; Sinha e

Sehgal, 1994), diferente do que foi observado em nosso estudo em que nenhum dos soros de cães infectados com *T. cruzi* apresentou reação cruzada com o DAT.

Andrade et al. (1987) em um estudo da reação cruzada do DAT em soros de humanos com outras doenças tais como doença de Chagas, esquistossomose, filariose, malária, leishmaniose mucocutânea e hanseníase, sugerem que o DAT possa ser um diagnóstico de valor para a LV, até mesmo em áreas endêmicas para chagas, utilizando o “cut-off” de 1: 400 e considerando o “cut-off” de 1:1600, diferencial para leishmaniose mucocutânea. No presente estudo, mesmo mantendo um “cut-off” de 1:400 não houve reação cruzada com os soros de cães infectados com *L. braziliensis*.

Quando feita a comparação dos resultados dos testes sorológicos analisando os 234 soros de cães de área endêmica, foi obtida uma concordância ótima entre ELISA e DAT, uma concordância boa entre ELISA e RIFI e uma concordância regular entre RIFI e DAT.

Esta concordância mostrou-se variável de acordo com o grupo clínico analisado. Sendo assim, quando avaliado o grupo dos cães assintomáticos, a concordância foi regular entre ELISA e DAT, ruim entre ELISA e RIFI e também ruim entre RIFI e DAT. No grupo dos cães oligossintomáticos a concordância foi ótima entre ELISA e DAT e regular entre ELISA e RIFI assim como entre RIFI e DAT. Para os cães sintomáticos a concordância foi perfeita entre ELISA e DAT e boa para ELISA e RIFI e também para RIFI e DAT. Entre os cães não infectados de área endêmica assim como entre os cães não infectados de área não endêmica a concordância foi perfeita em todas as comparações realizadas.

Segundo Dye et al. (1993) mesmo utilizando um método sorológico eficiente perdem-se mais de 20% de animais na fase inicial ainda não estabelecida, pois os animais podem estar em um período de incubação ou de soro conversão, o que ajuda a entender a menor concordância entre os testes quando analisado o grupo dos cães assintomáticos.

Ao compararmos os resultados utilizando as técnicas RIFI e ELISA em amostras de soro ou de eluato a partir de sangue em papel filtro, observamos que a sensibilidade do ELISA foi superior à da RIFI. A concordância observada entre soro e eluato foi

regular para o teste de RIFI e boa para o teste de ELISA. A concordância observada entre soro e eluato foi regular para o teste de RIFI e boa para o teste de ELISA. Não foi possível realizar a comparação da eficácia do DAT entre soro e eluato, pois o antígeno cedido pelo Royal Tropical Institute - Kit não foi suficiente. Entretanto, Cardoso et al. (2004) empregando o DAT em amostras em soro e eluato de 205 cães, obtiveram uma concordância ótima (97,6%;  $k = 0,83$ ), indicando a possibilidade de uso do DAT no diagnóstico da LVC com qualquer um dos tipos de amostras (soro ou ESPF).

Diferente do que foi observado em nosso estudo, Rosário (2005) observou uma concordância ótima entre as reações com soro e eluato de RIFI e ELISA, considerando que tanto o soro quanto o eluato podem ser utilizados no diagnóstico da LVC. As discordâncias observadas entre os resultados provavelmente se devem ao fato de que foram utilizados protocolos, reagentes e principalmente antígenos diferentes nos dois estudos. E como já foi discutido anteriormente estes fatores são determinantes no desempenho de um teste.

Na maioria dos estudos sobre epidemias de LVH tem-se encontrado cães positivos, e ainda mais, não existe nenhum relato na literatura brasileira de epidemias de LVH sem a presença de cães positivos. Em BH/MG e Araçatuba/SP, locais onde não existia LVH, foi possível observar primeiro a introdução da doença canina e depois a doença humana. A LVC não parece ser causa suficiente, mas sim causa necessária para a ocorrência da LVH (MS, 2002).

Courtenay et al. (2002) em seus resultados mostram que a raposa (*Cerdocyon thous*), considerada importante fonte de infecção, não é capaz de manter um ciclo de transmissão independente do cão doméstico. Isso aumenta a responsabilidade do cão na manutenção da doença em áreas endêmicas assim como reforça a sua importância na introdução da doença em áreas não endêmicas, principalmente urbanas.

O programa de controle da leishmaniose adotado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) não tem conseguido reduzir a níveis aceitáveis a incidência do calazar humano, ainda que importantes avanços tenham sido alcançados na redução da letalidade. A longa permanência do cão infectado, em média 80 dias após a coleta do material para exame, e a baixa sensibilidade do diagnóstico utilizado, RIFI em ESPF, são indicados como fatores importantes para esta falha. Braga et al. (1998) comparando

o programa de controle do calazar adotado pela FUNASA a uma estratégia baseada na identificação dos cães infectados por ELISA e a eliminação dos cães positivos dentro de um prazo máximo de sete dias, em duas áreas diferentes, observaram 9% de decréscimo na prevalência canina quando usado o método da FUNASA e um decréscimo de 27% quando usado o método alternativo, sendo esta diferença significativa.

A erradicação da infecção por *Leishmania* em cães não será alcançada sem o emprego de medidas de controle efetivas, levando-se em conta inclusive os cães assintomáticos (Cardoso et al., 2004). O método de ELISA consome menos tempo e é mais reprodutível que a RIFI, por isso tem sido preferido em extensas investigações epidemiológicas (Mancianti et al., 1994).

A utilização da RIFI pode comprometer a efetividade do programa de controle do calazar por estar deixando de detectar e sacrificar animais infectados (falsos negativos) e por outro lado, poderia estar recomendando o sacrifício de animais não infectados (falsos positivos). Essas incertezas já geraram atitudes como a não indicação do sacrifício de animais positivos e a recomendação de tratamento desses animais por parte de clínicos veterinários (Alves e Bevilacqua, 2004).

O Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MS,2003) sugere que em inquéritos soropidemiológicos sejam empregados dois métodos sorodiagnósticos, o ELISA para uma triagem dos cães soronegativos e a RIFI para a confirmação dos cães soropositivos. Entretanto, diante dos resultados observados no presente trabalho, sugerimos como métodos de escolha o ELISA e o DAT que além de apresentarem maiores sensibilidade e especificidade em relação à RIFI, se mostraram altamente reprodutíveis e de maior facilidade na sua execução.

O ELISA permaneceria como um teste de triagem devido a sua alta sensibilidade e o DAT substituiria a RIFI na confirmação dos casos positivos principalmente por não apresentar reações cruzadas eliminando assim a maioria dos falsos positivos.

É inegável a importância do cão no contexto da LV, principalmente no que diz respeito ao controle, sendo fundamental a realização de diagnóstico onde a possibilidade de erro seja baixa.

Nossos resultados mostram de forma clara, a superioridade dos testes de ELISA e DAT em relação à RIFI, dentro das condições empregadas no presente estudo, sendo que o DAT deve ser preferido em áreas onde ocorram a sobreposição de leishmaniose

visceral, leishmaniose tegumentar e doença de Chagas. Ressaltando mais uma vez que a escolha de um método diagnóstico deve se basear em suas vantagens, desvantagens, facilidades e sobretudo na finalidade de suas aplicações.

Atualmente, o que dificulta a utilização do DAT no Brasil, é o fato de que o antígeno utilizado na técnica é produzido somente pelo Royal Tropical Institute (Amsterdã/Holanda), o que o torna mais caro, devido à necessidade de sua importação. Diante disso, e aliado ao excelente desempenho do DAT em relação aos testes ELISA e RIFI, dentro das condições de nosso estudo, sugerimos o investimento em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de um antígeno Nacional, para o DAT, a partir de *L. chagasi*.

## 7. Conclusão

- As técnicas sorológicas ELISA, DAT e RIFI, realizadas com amostras de soro apresentaram uma especificidade de 100% quando analisadas apenas amostras de cães parasitologicamente positivos e cães negativos de área endêmica e não endêmica, indicando que estes métodos são altamente específicos dentro do universo restrito de animais com leishmaniose e que apresentam exame parasitológico positivo.
- O DAT foi o teste que apresentou a melhor especificidade, quando analisadas amostras de soros de cães infectados com outras doenças e soros controle, sendo indicado o seu uso em regiões onde ocorram simultaneamente LV, LT e/ou Doença de Chagas.
- A RIFI foi o método que apresentou a menor sensibilidade comparada ao DAT e ELISA.
- Os testes de ELISA soro e DAT apresentaram os VPPs elevados na prevalência estimada de 5%, enquanto o VPP da RIFI apresentou-se mais baixo. Os VPNs dos três testes foi elevado, indicando que os resultados negativos obtidos com qualquer um destes testes têm grande chance de serem realmente negativos.
- Nos casos em que forem necessárias mais de uma técnica de diagnóstico deve-se optar pelo DAT e o ELISA que além de apresentarem maiores sensibilidade e especificidade em relação à RIFI, se mostraram altamente reprodutíveis. Quando utilizado apenas um método a opção deve ser pelo DAT, devido ao alto desempenho além da maior facilidade na sua execução.

- A concordância entre os testes sorológicos é variável de acordo com o grupo clínico analisado. Sendo que ela é perfeita no grupo dos cães não infectados, alta no grupo dos cães sintomáticos, intermediária no grupo dos cães oligossintomáticos e baixa no grupo dos cães assintomáticos.
- A forma clínica do cão não influenciou nos títulos de anticorpos detectados ou absorvâncias observadas nos métodos sorológicos avaliados.
- Não foi observada correlação entre os títulos da RIFI e DAT com a absorvância no ELISA sendo que um resultado fortemente positivo em um dos testes pode ser fracamente positivo em um dos outros ou até mesmo negativo.
- A concordância observada entre soro e eluato foi regular para o teste de RIFI e boa para o teste de ELISA, sendo que a sensibilidade do ELISA tanto em soro como em eluato é superior à da RIFI.

## 8. Referências Bibliográficas

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

Adler, S. e Theodor, O. (1932). Investigation on Mediterranean Kala-azar. VI canine visceral leishmaniasis. *Proc.R.Soc* 110, 402-412.

Alencar, J. E. (1959). Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese de Livre Docência. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

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

Allain, D. S. e Kagan, I. G. (1975). A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 24, 232-236.

Almeida, M.A.O., Jesus, E.E.V., Sousa-Atta, M.L.B., Alves, L.C., Berne, M.E.A., Atta, A.M. (2005). Clinical and sorological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet.Parasitol.* 127, 227 – 232.

Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57.1 – 87.

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

Andrade, C. R., Silva, O. A., Andrade, P. P., Kolk, A. H. J., e Harith, A. E. (1987). A Direct Agglutination Test discriminative toward chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in brazil: preliminary results. *Ann.Inst.Pasteur/Immunol.* 138, 457-459.

Ashford, D. A, Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., Euládio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degrave, W., Barker Jr, R. H., Badaró, R., e David, J. R. (1995). Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Sorology for the Detection of Canine Leishmaniasis. *Am.Soc.Trop.Med.Hyg* 58, 251-255.

Ashford, D. A, David, J. R, Freire, M., David, R., Sherlock, I., Eulálio, M. C., Sampaio, D. P., e Badaró, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis impact of dog control on canine an human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia. Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 59, 53-57.

Badaró, R., Lourenço, R., Carvalho, E. M., Teixeira, R., Cerf, B., e Jones, T. C. (1983). Estudo Longitudinal soro epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em áreas endêmicas de Jacobina-BA. Reunião Anual sobre Doença de Chagas 10.

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

Badaró, R. (1988). Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1939. *Rev.Soc.Bras.Méd.Trop.* 21, 159-164.

Badaró, R., Nakatani, M., Chun, P., e Reed, S. G. (1994). Novo teste rápido (30') para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral.. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 30.

Baruffa, G. e Cury, P. (1973). Contribuição ao estudo do Calazar em Mato Grosso. *Rev.Pat.Trop.* 3, 345-361.

Bastien, P., Blaineau, C., e PAGES, M. (1992). Leishmaniasis: Sex, Lies and Karyototipe. *Parasitol.Today.* 8, 174-176.

Bevilacqua, P. D, Paixão, H. H., Modena, C. M., et al. (2001). Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.* 53, 1-8.

Boelaert, M., El Safi, S., Jacquet, D., Muynck, A., Stuyft, P. V., e Ray, D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 60, 126-134.

Boelaert, M., El Safi, S., Mousa, H., Githuri, J., Mbatia, P., e Gurubacharya, V. (1999). Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop.Med.Int.Health* 4, 31-37.

Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., e Palatnik de Sousa, C. B. (2002). Long lasting protection against canine Kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-3284.

Braga, M. D. M., Coêlho, I. C. B., Pompeu, M. M. L., Evans, T. G., Macaullife, I. T., Teixeira, M. J., e Lima, J. W. O. (1998). Controle do Calazar Canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev.Soc.Bras.Méd.Trop.* 31, 419-424.

Bray, R. S. e Lainson, R. (1967). Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V.the use of particles as vehicles in passive agglutination tests. *Trans.R.Soc.Med.Hyg.* 61, 490-505.

Bray, R. S. Leishmaniasis. (1980). In Immunological Investigations of Tropical Parasitic Diseases, (Houba V.,ed). Churchie Livingstone, Edinburg, 65-83.

Brener, Z. (1957). Calazar canino em Minas Gerais. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Burns, J. M., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., BADARÓ, R., e Reed, S. G. (1993). 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.

Camargo, M. E. e Rebonato, C. (1969). Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A single inhibition procedure to ensure specific results. Am.J.Trop.Med.Hyg. 18.

Cardoso, L., Schallig, H. D. F. H., Francisco Neto, Kroom, N., e Rodrigues, M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination test (FAST). Acta Tropica 91, 95-100.

Carvalho, S.F., Lemos, E.M., Corey, R., Dietze, R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am. J. Med. Hyg. 68, 321 – 324.

Chagas, E. (1936). Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. Brasil-Médico 11, 221-222.

Chagas, E., Cunha, A. M., Castro, G. O., e Ferreira, L. C. (1937). Leishmaniose visceral americana:relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 32, 321-390.

Chagas, E., Cunha, A. M., Ferreira, L. C., Deane, L., Deane, G., Guimarães, F. N., Von Paumgarten, M. J., e Sá, B. (1938). Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). Mem.Inst.Oswaldo Cruz 33, 89-229.

Chang, K. P., Fong, D., e Bray, R. S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds Leishmaniasis, elsevier London , 1-30.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., e Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet.Rec. 141, 539-543.

Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., e Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using

*Leishmania donovani*.l. - specific kinetoplastide primers.  
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 98, 12-17.

Costa, C. A., Genaro, O., Lana, M., Magalhães, P. A., Dias, M., e Michalick, M. S. M. (1991). Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev.Soc.Bras.Méd.Trop. 21-25.

Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., e Dye, C. (2002). Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology 125, 407-414.

Cunha, A. M. e Chagas, E. (1937). Estudos sobre o parasito. Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida no homem na América do Sul. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 32, 329-337.

de Bruijn, M. e Barker, D. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of Kinetoplast DNA. Acta.Trop. 52, 45-48.

de Korte, P. M., Harith, A. E., Dereure, J., Huigen, E., Faucherre, V., e Van Der Kay, H. J. (1990). Introduction of an improved DAT for the detection of *Leishmania infantum* infection in southern France. Parasitol.Res. 76, 526-530.

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

Deane, L. M. (1956). Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Leishmaniose Visceral no Brasil.. Ministério de Educação e Saúde 162 p.

Deane, L. M. e Deane, M. P. (1964). Leishmaniose visceral na América do Sul e Central. Arq.Hig.Saúde Publ. 29, 89-94.

Deane, M. P. e Deane, L. M. (1954). Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulos*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. O Hospital 46, 651-653.

Dias, M., Mayrink, W., Deane, L. M., Costa, C. A., Magalhães, P. A., Melo, M. N., Batista, S. M., Araujo, F. G., Coelho, M. V., e Williams, P. (1977). Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I - Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo 19, 403-410.

Dietze, R., Barros, G. B., Teixeira, L., Harris, J., Michelson, K., Falqueto, A. et al. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin.Infect.Dis. 25, 1240-1242.

Dunan, S., Frommel, D., Monjour, L., Ogunkolade, R. W., Cruz, A., e Quilici, M. (1989). The phocean veterinary study group on visceral leishmaniasis.

Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 11, 397-402.

Dye, C., Killick-Kendrick, R., Vitutia, M. M., Walton, R., Killick-Kendrick, M., Harith, A. E., Guy, M. W., Canavate, M. C., e Hasibeder, G. (1992). Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105, 35-41.

Dye, C., Vidor, E., e Dereure, J. (1993). Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol.Infect.* 103, 647-656.

Edrissian, H. G. e Darabian, P. (1979). A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 73, 289-292.

El Safi, S. H. e Evans, D. A. (1989). A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis in the sudan. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83, 334-337.

Eresh, S., McCallum, S. M., e Barker, D. C. (1994). Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 109, 423-433.

Evans, D. A. (1987). Leishmania. In *vitro* Methods for Parasite Cultivation (ed. Taylor, A.E.R. & Baker, J.R.). London: Academic Press, 52-75.

Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, M. J., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J., e Portus, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the priorat focus. *Vet.Parasitol.* 83, 87-97.

Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., e Portus, M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymphonod and bone marrow aspirates. *Vet.Parasitol* 99, 105-111.

Galati, E. A. B., Nunes, V. B. L., e Rego, F. A. (1997). Estudo de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev.Saúde Pública* 31, 378-390.

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

Genaro, O., Costa, C. A., Williams, P., Silva, J. E., Rocha, N. M., Lima, S. L., e Mayrink, W. (1990). Occurrence of Kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev.Soc.Bras.Méd.Trop.* 23, 121.

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

Gottstein, B., Deplazes, P., Arnold, P., Mehlitz, D., Reiter, I., Eckert, J. (1988). Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot. Schweiz Arch Tierheilkd.130 (5), 249-262.

Gradoni, L., Pozio, E., Bettini, S., e Gramiccia, M. (1980). Leishmaniosis in Tuscany (Italy). Part III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto province. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 74, 421-422.

Gradoni, L., Gramiccia, M., Mancianti, F., e Pieri, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control.2 Effectiveness of control measure against canine leishmaniasis in the isle Elba, Italy. Trans.R.Soc.Trop.Med. 82, 568-571.

Gradoni, L. (1999). Epizootiology of canine leishmaniosis in Southern Europe. In Killick-Kendrick, R (ed) **Canine leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet.Wiesbaden. 339-342.

Grimaldi Jr, G., David, Jr., e McMahon-Pratt, D. (1987). Identification of New World: *Leishmania* species characterization by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am.J.Trop.Med.Hyg. 36, 270-287.

Grimaldi Jr, G. e Tesh, R. B. (1993). Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Reviews , 230-250.

Guarga, J. L., Lucientes, J., Peribáñez, M. A., Molina, R., Garcia, M. J., e Castillo, J. A. (2000). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. Acta Tropica 77, 203-207.

Guerrin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., and Bryceson, A. D. M. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. Infectious Disease 2.

Guimarães, M. C., Celeste, B. J., e Franco, E. L. (1990). Diagnóstico performance índices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. Bull.World Helth Organ 68, 39-43.

Harith, A. E., Kolk, A. H., Kager, P. A., Leeuwenburg, J., Mugai, R., Kiugu, S., e Laarman, J. J. (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 80, 583-586.

Harith, A. E., Kolk, A. H. J., Kager, P. A., Leeuwenburg, J., Faber, F. J., Muigai, R., Kiugu, S., e Laarman, J. J. (1987). Evaluation of a newly developed direct

agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 81, 603-606.

Harith, A. E., Kolk, A., Leeuwenburg, J. et al. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J.Clin.Microbiol.* 26, 1321-1325.

Hasibeder, G., Dye, C., e Carpenter, J. (1992). Mathematical modeling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. *Parasitology* 105, 43-53.

Hockmeyer, W. T., Welled, B. T., Sabwa, C. L., Smith, D. H., Rees, P. H., e Kager, P. A. (1984). A complement fixation test test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 78, 489-493.

Howard, M. K., Kelly, J. M., Lane, R. P., e Miles, M. A. A. (1991). A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as a epidemiological and diagnostic reagent. *Molecular.Biochemical Parasitol* 44, 63-72.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2000.

Iversson, L. B., Camargo, M. E., Villanova, A., Reichmann, M. L. A. B., andrade, E. A., e Tolezano, J. E. (1983). Inquérito sorológico para a pesquisa de Leishmaniose visceral em população canina urbana no município de São Paulo-Brasil (1979-1982). *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo* 25, 310-317.

Killick-Kendrick, R., Molineau, D. H., Rioux, J. A., Lanotte, G., e Leaney, A. J. (1980). Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74, 563-565.

Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Foucheaux, C., Delure, J., Puech, M. P., e Cadiergues, M. C. (1997). Controle da Leishmaniose canina - proteção de cães contra picadas de mosquitos do gênero flebotomos com coleiras de deltametrina. *Medical and Veterinary Entomology* 11, 105-111.

Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., e plevraki, K. J. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis (CVL) in Greece: a retrospective study of 158 spontaneous cases. *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.* 35, 376-383.

Lainson, R. (1985). Our present knowledge of ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. *Rev.Soc.Bras.Méd.Trop.* 18, 47-56.

Lainson, R. e Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press Inc. 1, 1-120.

Lainson, R. (1997). *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Rev Paraense Medicina 11, 29-40.

Lamothe, J. (2002). La Leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques. Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie. 37, 55-59.

Lanotte, G., Rioux, J. A., Perieres, J., e Vollhardt, Y. (1979). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie à finalité épidémiologique. Ann.Parasitologie 54, 277-295.

Laveran, A. e Havet, J. (1917). Contribution a l'étude de la leishmaniose viscérale naturelle du chien. Bull.Soc.Path.Exot. 10, 386-392.

Leontides, L. S., Saridomichelakis, M. N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., e Mylonakis, M. E. (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Veterinary Parasitology 109, 19-27.

Magnus, E., Vervoort, T., e Van Meirvenne, N. (1978). A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. Ann.Soc.Belg.Med.Trop. 58, 169-176.

Mancianti, F., Gradoni, L., Gramiccia, M., Pieri, S., e Marconcini, A. (1986). Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. Trop.Med.Parasitol. 37, 110-112.

Mancianti, F., Falcone, M. L., Giannelli, C., e Poli, A. (1994). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology 59, 13-21.

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

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

Marsden, P. D. e Jones, T. C. (1985). Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. CHANG, K. P. and BRAY, R. S. Leishmaniasis.Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands , 183-198.

- Martins, A. V., Williams, P., e Falcão, A. L. (1978). American Sandflies (Diptera): Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 195p.
- Marzochi, M. C. A., Coutinho, S. G., Souza, W. et al. (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 80, 349-357.
- Marzochi, M. C. A., Marzochi, K. B. F., e Carvalho, R. W. (1994). Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitology Today 10, 34-37.
- Marzochi, M. C. A., Marzochi, K. B. F. (1997). Leishmanioses em áreas urbanas. Rev.Soc.Bras.Méd.Trop. 30, 162 – 165.
- Maurício, I. L., Stohard, J. R., e Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol.Today. 16, 188-199.
- Mayrink, W., Genaro, O., França-Silva, J. C., Costa, R. T., Tafuri, W. L., Rotondo, A. S., Reis, A. B., Williams, P., e Costa, C. A. (1996). Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 80, 695-697.
- Mayward, P. G., Machado, M. I., Costa, J. M., e Gonçalves, M. R. F. (1996). Leishmaniose tegumentar visceral e doenças de chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Cad.Saúde Pública 12, 321-328.
- Mazza, S. e Cornejo, A. J. (1926). Primeiros casos autoctones de Kala-azar infantil comprovados en el Norte de la Republica. Bol.Inst.Clin.Quir. 11, 140-144.
- Mello, D. A., Rego Jr, F. A., Oshiro, E. T., e Nunes, V. L. B. (1988). *Cerdocyon thous* (L) (Carnivora,Canidae) Naturally Infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha e Chagas1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). Mem.Inst.Oswaldo Cruz 83, 259.
- Meredith, S. E. O., Kroom, N. C. M., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M. G. A., Van Ingen, C. W., Oosting, H., Schoone, G. J., Terpstra, W. J., e Oskam, L. (1995). *Leish*-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. J.Clin.Microbiol. 33, 1742-1745.
- Michalsky, E.M. (2004). Aspectos entomológicos associados à transmissão de leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais. Tese de Mestrado.Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 148p.
- Migone, L. E. (1913). Un caso de Kala-azar a Assuncion (Paraguay). Bull.Soc.Path.Exot. 6, 118-120.

Ministério da Saúde. (1999). Controle, Diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.

Ministério da Saúde do Brasil. Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional de Saúde (CENEPI/ FUNASA). (2000). Boletim Epidemiológico, Ano V, Nº 1.

Ministério da Saúde do Brasil. Centro Nacional de Epidemiologia/ Fundação Nacional de Saúde. (CENEPI/FUNASA). (2002). Boletim eletrônico Epidemiológico, Ano 02, Nº 06.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. (2003). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2004). Nota Técnica sobre vacina anti-leishmaniose visceral canina. Brasília.

Mohammed, A. R., Wright, E. P., Abdel Rahman, A. M., Kolk, A., Laarman, J. J., e Pondman, K. W. (1986). Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 80, 271-274.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San Andres, M., Gonzales, F., Castillo, J. A., Lucientes, J., e Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans.R.Soc.Med.Hyg.* 88, 491-493.

Monteiro, S. P., Lacerda, M. M., e Arias, J. R. (1994). Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Rev.Soc.Bras.Méd.Trop.* 29, 67-72.

Moreira Jr, E.D., Souza, V.M.M., Sreenivasan, M., Nascimento, E.G., Carvalho, L.P.(2004) Assessment of an optimized dog- culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet. Parasitol.* 122, 245-252.

Nascimento, M. D. S. B., Costa, J. M. L., Fiori, B. I. P., Viana, G. M. C., Filho, M. S. G., Alvim, A. C., Bastos, O. C., Nakatani, M., Reed, S., Badaró, R., Silva, A. R., e Burattini, M. N. (1996). Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão - Brasil. *Ver.Soc.Brás..Méd.Trop.* 29, 233-240.

Nicolle, C e Comte, D. (1908). Origine Canine Du Kalazar. *Bull.Soc.Path.Exot.* 1, 299-301.

Nicolle, C. (1908). Isolament et culture des corps de Leishman. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 3, 55-56.

Novy, F.G. e McNeal, W.J. (1903). The cultivation of *Trypanosoma brucei* : A preliminary note. *J. Amer. Med. Ass.* 41, 1266-1268.

- Nurit-Rachamin, S. e Jaffe, C. L. (1988). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 85, 503-508.
- Ogunkolade, B. V., Vouldoukis, I., Frommel, D., Davoust, B., Rhodes-Feuillette, A., e Monjour, L. (1988). Immunization of dogs with a *Leishmania infantum* - derived vaccine. *Vet.Parasitol* 28, 33-41.
- Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., De Luna, R., Cortese, L., Orsini, S., Davidson, R. N., e Persechino, A. (1995). Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J.Antimicrob.Chemother* 36, 772-777.
- Oliveira, C. L., Cosenza, G. W., e Gesteira, S. M. (1997). A epidemia de leishmaniose visceral em Belo Horizonte, de 1993 a 1996. XXXIII Cong.Soc.Bras.Med.Trop., Resumo, 81.
- Oliveira, C. L., Assunção, M., Reis, I. A., e Proietti, F. A. (2001). Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994 - 1997.. *Cad.Saúde Pública* 17, 1231-1239.
- Oskam, L., Slappendel, R. J., Beijer, E. G. M., Kroon, N. C. M., Van Ingen, C. W., Ozensoy, S., Özbel, Y., e Terpstra, W. J. (1996). Dog-DAT: direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 235-239.
- Osman, O. F., Oskam, L., Zijlstra, E. E., Kroon, N. C. M., Shoone, G. J., Khalil, T. A. G., El-Hassan, A. M., e Kager, P. A. (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J.Clin.Microbiol.* 35, 2454-2457.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L. A. R., Santos, W. C., Grimaldi Jr, G., Pontes-de-Carvalho, L. C., e OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 55, 39-44. 1996.
- Passerat de Silans, Dedet, J. P., e Arias, J. R. (1998). Field monitoring of cipermetrin residual effect on the mortality rates of the plebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis* in the state of Paraíba, Brasil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 93, 339-344.
- Penna, H. A. (1934). Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico* , 949-950.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., e Ruitenber, J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect.Immun.* 62, 229-235.

Pizzuto, M. (2001). Role of PCR in diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J.Clin.Microbiol.* 357-361.

Pozio, E., Gradoni, S., Bettini, M., e Gramiccia, M. (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica* 38, 383-393.

Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L., e Dye, C. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115, 143-156.

Rachamin, N., Jaffe, C. L., Abranches, P., Silva Pereira, M. C. D., Schnur, L. F., e Jacobson, R. I. (1991). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 85, 503-508.

Reed, S. G., Badaró, R., e Cheri-Lloyd, R. M. (1987). Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J.Immunol.* 138.

Reed, S. G. (1996). Diagnosis of leishmaniasis. *Clinics in dermatology* 14, 471-478.

Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B. Vieira, E.P., Assis, G., Davies, C.R. (2004) Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil?. *International Journal for Parasitology.*34, 55-62.

Rezende, C. L. e Bastos, O. (1959). Calazar infantil. Relato de 1 caso ocorrido em Belo Horizonte. *Jornal de Pediatria* 24, 323-331.

Roffi, J., Dedet, J. P., Desjeux, P., e Garré, M. T. (1980). Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29, 183-189.

Rosário, E. Y., Genaro, O., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. (2005). 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.

Ross, R. (1903). (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan (2) Further notes on leishman's bodies. *Brit.Med.J.* 2, 1261-1401.

Santa Rosa, I. C. A e Oliveira, I. C. S. (1997). Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária* 2, 24-28.

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., e Gradoni, L. (2002). 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.

Schnur, L. E. e Jacobson, L. R. (1987). *Parasitological Techniques*. Peters, W. Killick-Kendrick r. Eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Parasitological Techniques. 1, 499-542.

Shiddo, S. A., Mohammed, A. A., Huldt, G., Loftenius, A., Nilsson, L., Jonsson, J., Ouchterlony, O., e Thorstensson, R. (1995). Visceral leishmaniasis in Somalia. Circulating antibodies as measured by DAT, immunofluorescence and ELISA. *Trop.Geogr.Med.* 47, 68-73.

Shlomai, J. (1994). The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitology Today* 10, 341-346.

Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., e Karagouni, E. (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur.J.Epidemiol.* 15, 271-276.

Silva, E.S. (1998) Leishmaniose visceral canina na RMBH, MG, Brasil. Diagnóstico, aspectos clínicos e caracterização molecular de amostras de *Leishmania* isolada de casos humanos e caninos. 153p. Tese Mestrado.

Silva, E. S., Pirmez, C., Gontijo, C. M. F., Fernandes, O., e Brazil, R. P. (2000). Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *The Veterinary Record* 147, 421-422.

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

Silveira, F. T., Lainson, R., Shaw, J. J., e Pova, M. N. (1982). Leishmaniasis in Brazil: XVIII Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 830-832.

Sinha, R. e Sehgal, S. (1994). Comparative evaluation of serological tests in Indian Kala-azar. *J.Trop.Med.Hyg* 97, 333-340.

Sundar, S. e Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 951-958.

Tafuri, W. L., Michalick, M. S. M., Dias, M., Genaro, O., Leittr, V. H. R., Barbosa, A. J. A, Bampirra, E. A., Costa, C. A., Melo, M. N., e Mayrink, W. (1989). Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e

experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.  
Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo 31, 139-145.

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

Travi, B. L., Ferro, C., Cadena, H., Montoya-Lerma, J., e Adler, G. H. (2002).  
Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic  
areas. Research in Veterinary Science 72, 83-86.

Versiani, O. (1943). Leishmaniose visceral americana. Brasil-Médico 57, 268-  
271.

VEXENAT, A de C., SANTANA, J. M., e TEIXEIRA, A. R. (1996). Cross-  
reactivity of antibodies in human infectious by the kinetoplastid protozoa  
*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*.  
Rev.Inst.Trop.São Paulo 38 (3), 177-185.

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

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

Walton, B.C. (1987). American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In:  
The Leishmaniasis. London Peters, W. & Killick-Kendrick, R. v2, p.637 – 664.

Ward, R. D. (1985). Vector biology and control. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds  
Leishmaniasis, elsevier London , 199-212.

Webb, J. R., Kaufmann, D., Campos-Neto, A., e Reed, S. G. (1996). Molecular  
cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent  
immune response in experimental murine leishmaniasis. J.Immunol. 157, 5034-  
5041.

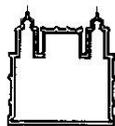
Webb, J. R., Campos-Neto, A., Skeiky, Y. A. W., e Reed, S. G. (1997).  
Molecular characterization of the heat-inducible LmSTII protein of *Leishmania  
major*. Molecular.Biochemical Parasitol 89, 179-193.

World Health Organization. (2002). Weekly epidemiological record. Annual  
subscription 44, 365-372.

World Health Organization. (2003). Dados obtidos via internet no endereço:  
<http://www.who.int/>

Young, D. G. e Arias, J. R. (1992). Flebotomos: vectores de leishmaniasis en  
Las Americas. Pan American Health Organization: Cuaderno Técnico n.33 Pan  
American Health Organization, Washington, D.C., USA .

## 9. Anexos



Comissão de Ética no Uso de Animais  
Fundação Oswaldo Cruz - CEUA-FIOCRUZ

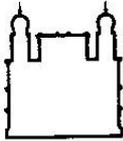
## CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº P0119-02, intitulado "Aplicação em campos dos testes de Aglutinação Direta (DAT – Direct Agglutination Test e FAST Agglutination Screening Test) para leishmaniose visceral canina no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais" sob a responsabilidade da **Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR, Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em reunião de **20/05/2002**. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até **28/08/2006**.

Rio de Janeiro, 28 de agosto de 2002.

**Marco Aurélio Martins**  
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

Av. Brasil, nº 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil  
Tel: (+55) 21.2598-4395 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: mmartins@ioc.fiocruz.br



Ministério da Saúde  
 FIOCRUZ  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisas René Rachou  
 Laboratório de Leishmanioses  
 AV. AUGUSTO DE LIMA, 1715-BARRO PRETO-BELO HORIZONTE-MG  
 CEP 30.190-002-CX POSTAL 1743-BRASIL  
 FAX N.º (55-31) 3295-3115 – TEL.: (55-31) 3295-3566 RAMAL 157.

**FICHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA (CANINA)**

DATA \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

N.º \_\_\_\_\_

NOME DO CÃO: \_\_\_\_\_  
 RAÇA \_\_\_\_\_ SEXO \_\_\_\_\_ IDADE \_\_\_\_\_ COR \_\_\_\_\_  
 PROPRIETÁRIO \_\_\_\_\_  
 ENDEREÇO \_\_\_\_\_  
 TIPO DE RESIDÊNCIA \_\_\_\_\_  
 OUTRAS LOCALIDADES ONDE RESIDIU \_\_\_\_\_  
 LOCAL \_\_\_\_\_ TEMPO \_\_\_\_\_  
 LOCAL \_\_\_\_\_ TEMPO \_\_\_\_\_

ASPECTOS CLÍNICOS \_\_\_\_\_

LESÕES \_\_\_\_\_ NÚMERO \_\_\_\_\_ REGIÃO DO CORPO \_\_\_\_\_

CÃO VIAJOU NOS ÚLTIMOS SEIS MESES (SÍTIO,ETC) \_\_\_\_\_  
 ORIGEM DO CÃO \_\_\_\_\_

EXAMES:	
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO: MIELOGRAMA _____	MIELOCULTURA _____
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO:	
RIFI _____	ELISA _____ DAT _____
DIAGNÓSTICO MOLECULAR: PELE _____ SANGUE _____	
MEDULA ÓSSEA _____	
OBS _____	
_____	
_____	
_____	