

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Avaliação em larga escala do
Kit LeishFlow para o diagnóstico
sorológico da Leishmaniose
Visceral Canina**

Nathália Caroline Soares

Ouro Preto

2021



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação em larga escala do Kit LeishFlow para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina

NATHÁLIA CAROLINE SOARES

Ouro Preto, MG

Junho de 2021

NATHÁLIA CAROLINE SOARES

Avaliação em larga escala do Kit LeishFlow para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Ouro Preto na Área de concentração de Biotecnologia da saúde humana e animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Ouro Preto, MG

Junho de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S676a Soares, Nathália Caroline .
Avaliação em larga escala do Kit LeishFlow para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. [manuscrito] / Nathália Caroline Soares. - 2021.
103 f.: il.: color., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares.
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Leishmaniose visceral . 2. Sorodiagnóstico. 3. Citometria de fluxo.
I. Reis, Alexandre Barbosa . II. Soares, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:61

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
PRO-REITORIA DE PESQUISA, POS-GRADUACAO E
INOVACAO
NUCLEO DE PESQUISAS EM CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Caroline Soares

Avaliação em larga escala do Kit LeishFlow para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 25 de junho de 2021

Membros da banca

Doutor - Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Deborah Bittencourt Mothé Fraga - (Universidade Federal da Bahia)
Doutora - Mariangela Carneiro - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 18/08/2021



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/08/2021, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0186398** e o código CRC **3724B4DE**.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Lourdes e Pedro, por estarem presente em toda a minha formação pessoal e profissional, em pensamentos, orações, conselhos, suporte e pelo maior incentivo que é o exemplo de persistência.

Aos meus irmãos, Anderson e Pedro, e também as minhas cunhadas Ana e Renata e pelo apoio incondicional, acolhimento, conselhos, por sempre encorajarem em minha formação pessoal e profissional.

Aos meus sobrinhos, Maria Clara, Matheus e Gael, que são o motivo dos meus sorrisos, fazem parte do meu todo, e nos momentos de dificuldade foi aonde obtive o amor mais puro.

À minha avó Pilar e minha tia/madrinha Cristina pelas orações, abrigo e amparo durante toda a minha formação. Ao meu tio Gerficy por ser tão prestativo e zeloso nos momentos necessários.

A toda minha família, em especial a família Sabará - só quem é, pelos momentos de diversão, apoio, acolhimento, cuidado e carinho.

A todos os meus amigos, em especial Rah, Ju, Rodrigo, Tati, Chacon, Pris, Jeny, minha afilhada Gi e a todos os outros que estiveram presente neste momento, agradeço por toda a amizade, apoio e pelos momentos de diversão e alegria compartilhados.

Ao meu orientador Rodrigo Dian, por toda contribuição e dedicação para me ajudar nesse processo.

Ao meu coorientador Alexandre, pela oportunidade e por compartilhar da sua experiência e conhecimento.

A todos os membros do Laboratório de Imunopatologia - LIMP, por toda a união, conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de conviver e colaborar com tantos pesquisadores. Agradeço especialmente a todos os alunos de IC, pós graduação e funcionários do LIMP, em particular a Luciana, Thais, Miriã, Livia, Ana, Rodrigo, Gabriel e Rafael, por todo companheirismo e ajuda durante a construção esse projeto.

À Universidade Federal de Ouro Preto, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo ensino, estrutura de qualidade e pelo incentivo à pesquisa brasileira.

Às agências de fomento, CAPES, pela concessão da bolsa, e CNPq, FAPEMIG e PPSUS pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Gratidão a Deus!

Dr. Wendel Coura-Vital²,

Dr. Bruno Mendes Roatt^{1,2},

Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito¹

Dr. Olindo Assis Martins-Filho³

Dr. Andréa Teixeira de Carvalho³

Dr. Henrique Gama Ker⁴

Msc. Livia Mendes Carvalho¹,

Msc. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin¹,

Rodrigo da Costa Maia¹,

Gabriel José Lucas Moreira¹.

¹ Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

³ Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus São Mateus, Espírito Santo, Brasil.

Suporte Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PPSUS - Programa de Pesquisa para o SUS

Apoio:

Universidade Federal de Ouro Preto

“Ubuntu”

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose que apresenta grande distribuição mundial e integra o grupo de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde. No Brasil, o cão tem um papel importante na disseminação da LV e o diagnóstico preciso da doença canina é essencial para o controle da enfermidade. Atualmente, o protocolo de diagnóstico conta com dois principais testes, o TR-DPP® e EIE-LVC, que apresentam limitações, entre elas se destacam: reações cruzadas com outros patógenos caninos, baixa sensibilidade na detecção de cães assintomáticos e ocorrência de resultados falso-positivos em animais vacinados. Em consequência dessas limitações, há uma falha na rápida identificação de animais nas áreas endêmicas, comprometendo as medidas de controle. Em busca de melhorias no diagnóstico da doença canina, o uso de técnicas mais sensíveis, como a citometria de fluxo é uma opção, pois apresenta um alto desempenho e melhor detecção de animais com baixo título de anticorpos. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu nos últimos anos um protótipo de kit, denominado LeishFlow, para o diagnóstico sorológico por citometria de fluxo da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). em que obtivemos bons resultados iniciais. Para aprofundarmos e aprimorarmos o desenvolvimento biotecnológico do Kit LeishFlow, neste estudo produzimos e revalidamos um novo lote do Kit, avaliamos o desempenho do novo kit em larga escala e comparamos a eficácia do emprego do LeishFlow como teste único para o diagnóstico da LVC em paralelo aos testes preconizados pelo Ministério da Saúde (MS). Os testes foram realizados em uma ampla variedade de soros caninos (n = 1.546), estes coletados em uma área de alta endemicidade, desta forma, estabelecemos a concordância entre os testes diagnósticos e a prevalência mais realística da doença com um teste de melhor sensibilidade e especificidade. O uso do Kit LeishFlow sozinho resultou em melhora diagnóstica, ao analisarmos a prevalência da área endêmica estudada observamos que o TR-DPP® e EIE-LVC apresentaram um valor de 18,24%, já o LeishFlow apresentou uma prevalência de 29,43%. Nossos resultados mostram que o LeishFlow tem um alto potencial como teste diagnóstico único, e pode discriminar os animais infectados de não infectados para *L. infantum*, apresentando um valor de sensibilidade (88,3%) e especificidade (83,7%), quando referenciado pelos testes TR-DPP® e EIE-LVC, e uma concordância de 84,5%. Demonstrou bons resultados ao estratificar animais por sintomatologia, nos cálculos de sensibilidade (95,1%), especificidade (72,1%) e acurácia (85%) dos animais sintomáticos e para animais assintomáticos apresentou sensibilidade de 87,1% e especificidade de 84,7%, e acurácia de 82,3% quando utilizados os testes padrão de referência do MS. O LeishFlow, por ser mais sensível e específico, melhoraria a detecção de animais positivos nas áreas endêmicas, e por ser um teste único, diminuiria os custos operacionais, a rapidez no diagnóstico e assim nas ações de controle, o que torna essa metodologia uma alternativa para o diagnóstico sorológico da LVC. Além disso, mais opções de teste de diagnóstico é essencial para laboratórios privados e serviços veterinários no Brasil, dada a crescente demanda e impacto na saúde pública causado pela LVC.

Palavras-Chave: Leishmaniose Visceral canina; diagnóstico sorológico; citometro de fluxo; TR-DPP®, EIE-LVC, LeishFlow

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis that is widely distributed worldwide and is part of the neglected tropical diseases group of the World Health Organization. In Brazil, dogs play an important role in the dissemination of VL and the accurate diagnosis of canine disease. It is essential for the control of the disease. Currently, the diagnostic protocol has two main tests, the TR-DPP[®] and EIE-LVC, which have limitations, among which stand out cross-reactions with other canine pathogens, low sensitivity in the detection of asymptomatic dogs and occurrence of false-positive results in vaccinated animals. As a result of these limitations, there is a failure in the rapid identification of animals in endemic areas, compromising control measures. In search of improvements in the diagnosis of canine disease, the use of more sensitive techniques, such as flow cytometry is an option, as it presents a high performance and better detection of animals with low antibody titers. Our research group has developed in recent years a prototype kit, called LeishFlow, for the serological diagnosis by flow cytometry of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), where we got good initial results. In order to deepen and improve the biotechnological development of the LeishFlow Kit, in this study we produced and revalidated a new batch of the Kit, evaluated the performance of the new kit on a large scale and compared the effectiveness of using LeishFlow as a single test for the diagnosis of CVL in parallel to the tests recommended by the Ministry of Health (MS). The tests were carried out on a wide variety of canine sera (n = 1546), these collected in an area of high endemicity, in this way, we established the agreement between the diagnostic tests and the real prevalence of the disease with a test of better sensitivity and specificity. The use of the LeishFlow Kit alone resulted in diagnostic improvement, when analyzing the prevalence of the endemic area studied, we observed that the TR-DPP[®] and EIE-LVC presented a value of 18.24%, whereas LeishFlow presented a prevalence of 29.43%. Our results show that LeishFlow has a high diagnostic potential as a single diagnostic test, and can discriminate infected animals from non-infected to *L. infantum*, presenting a sensitivity value (88.3%) and specificity (83.7%), when referenced by the TR-DPP[®] and EIE-LVC tests, and an agreement of 84.5%. It demonstrated good results when stratifying animals by symptomatology, in calculations of sensitivity (95.1%), specificity (72.1%) and accuracy (85%) of symptomatic animals and for asymptomatic animals showed sensitivity of 87.1% and specificity of 84.7%, and accuracy of 82.3% when using the standard MS reference tests. LeishFlow, being more sensitive and specific, would improve the detection of positive animals in endemic areas, and because it is a unique test, it would decrease operating costs, speed of diagnosis and thus in control actions, which makes this methodology an alternative for the serological diagnosis of CVL. In addition, more diagnostic testing options are essential for private laboratories and veterinary services in Brazil, given the growing demand and impact on public health caused by CVL.

Key words: canine visceral leishmaniasis; serological diagnosis; flow cytometry; TR-DPP[®], EIE-LVC, LeishFlow.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA- Cães assintomáticos

CFMV- Conselho Federal de Medicina Veterinária

CS- Cães sintomáticos

DAT- *Direct Agglutination Test*

EIE-LVC- Kit de ELISA para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina- Bio-Manguinhos

ELISA- *Enzyme Lynked Immunosorbent Assay*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FSC - Tamanho

g / L – Gramas/Litro

° C – Graus Celsius

IgG- Imunoglobulina da classe G

INF – Cães Infectados

LC- Leishmaniose Cutânea

LIT- Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose*

LMC- Leishmaniose Mucocutânea

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Min - Minutos

mL- Mililitros

MS- Ministério da Saúde

NI- Cães não infectados

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde

PAHO-*Pan-American Health Orgazination*

PBS- *Phosphate Buffer Salin*

PCR- *Polimerase Chain Reaction*

PPFP – Porcentagem de Promastigotas Fluorescentes Positivas

PPFN – Porcentagem de Promastigotas Fluorescentes Negativas

pH- Potencial hidrogeniônico

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm- Rotação por minuto

SFB- Soro Fetal Bovino

SMF – Sistema monócito fagocitário

SSC – Granulosidade

TR-DPP®- Teste Rápido - *Dual Path Platform*/Bio-Manguinhos

VPN- Valor preditivo negativo

VPP- Valor preditivo positivo

WHO- *World Health Organization*

μL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Situação de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo.	19
Figura 2 - Distribuição dos bairros por setores (A a I) no município de Governador Valadares – MG.....	38
Figura 3 - Representação esquemática da sequência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	43
Figura 4 - Curvas de diluições de pool de soros de cães não infectados e infectados incubados com diferentes titulações do anticorpo anti-IgG caninos conjugado com FITC.....	50
Figura 5 - Fluxograma da estratégia experimental que descreve a população canina da área endêmica do estudo e os resultados obtidos pelos diferentes testes sorológicos (TR-DPP [®] , EIE-LVC e LeishFlow) aplicados para detecção da leishmaniose visceral canina.	52
Figura 6 - (A): Teste de diagnóstico sorológico por citometria de fluxo empregando LeishFlow em diferentes grupos. (B): Gráfico de intersecção dos resultados positivos nos testes TR-DPP [®] , EIE-LVC e LeishFlow.....	54
Figura 7 - Análise dos valores preditivos em diferentes cenários artificiais usando o teste de LeishFlow.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categorias de resultados do teste diagnóstico em uma população que inclui cães não infectados e cães infectados com <i>L. infantum</i>	47
Tabela 2 - Fórmulas para cálculos dos parâmetros estatísticos com base nos resultados apresentados na Tabela 1.....	48
Tabela 3 - Valores absolutos dos resultados dos testes de diagnóstico sorológico TR-DPP [®] , EIE-LVC. e LeishFlow de acordo com o padrão de referência estabelecido. Cálculo de valores de concordância (%) e índice <i>kappa</i> (IC 95%).....	56
Tabela 4 - Avaliação soroepidemiológica de acordo com o padrão de referência estabelecido. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo (VPP e VPN). 57	57
Tabela 5 - Avaliação soroepidemiológica com estratificação de animais em Sintomáticos e Assintomáticos. Cálculos de sensibilidade, especificidade, acurácia e índice <i>Kappa</i>	58
Tabela 6 - Valores de Razão de Verossimilhança Positivo e Negativo, de acordo com o padrão de referência estabelecido.....	58
Tabela 7 - Valores de prevalência na área endêmica de Governador Valadares/Minas Gerais, ao usar os testes preconizados pelo MS (TR-DPP [®] e EIE-LVC) e o LeishFlow.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos gerais das Leishmanioses	17
2.2 Leishmaniose visceral	18
2.3 Leishmaniose Visceral Canina	21
2.4 Controle, prevenção e Tratamento	23
2.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina	25
2.5.1 Métodos Parasitológicos	26
2.5.2 Métodos Moleculares	27
2.5.3 Métodos Sorológicos	27
2.5.4 Avanços e novas metodologias no diagnóstico da leishmaniose visceral.....	30
2.5.4.1 Citometria de fluxo.....	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material e métodos	36
4.2 Considerações éticas	36
4.3 Delineamento do estudo e amostras	36
4.4 Área de estudo	37
4.5 Ensaio sorológico preconizado pelo MS para o diagnóstico da LVC.....	39
4.5.1 Teste rápido de triagem para LVC: <i>Dual Path Plataform-DPP</i> [®]	39
4.5.2 Teste confirmatório para LVC: Ensaio de Imunoabsorção enzimática-EIE-LVC/ELISA	40
4.6 Kit LeishFlow	40
4.6.1 Ensaio sorológico empregando o Kit LeishFlow	40
4.6.2 Análise de dados por citometria de fluxo.....	41
4.6.3 Confeção e validação do Kit LeishFlow	44
4.6.3.1 Preparo do antígeno - formas promastigotas fixadas de <i>L. infantum</i> cepa MHOM/BR/1974/PP75	45
4.6.3.2 Validação da diluição ideal do soro e conjugado	46
4.7 Análises aplicadas à avaliação de desempenho diagnóstico do Kit Leishflow ...	46

5. RESULTADOS.....	49
5.1 Validação do novo lote do Kit LeishFlow para estabelecimento das condições metodológicas do estudo em larga escala.....	50
5.2 Testes sorológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: TR-DPP®, EIE-LVC e LeishFlow	51
5.3 Análise de concordância do teste LeishFlow em relação aos padrões de referência TR-DPP® e EIE-LVC versus LeishFlow ou TR-DPP® versus LeishFlow ...	53
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	72
8. PERSPECTIVAS	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
10. ANEXO A - BULA DO EIE-LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA/BIOMAGUINHOS	89
11. ANEXO B - BULA DO TR-DPP®-LESHMANIOSE VISCERAL CANINA/BIOMANGUINHOS	95
12. ANEXO C - BULA DO LEISHFLOW.....	100
13. ANEXO D – COMITÉ DE ÉTICA.....	103

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica, que integra o grupo de doenças negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020a). No Brasil é considerada uma zoonose de alta morbimortalidade, acometendo, sobretudo, seres humanos e cães domésticos. A LV é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e constitui uma enfermidade de grande problema para a saúde pública (ROSS, 1903).

O cão é um importante elo no ciclo urbano da doença como reservatório, apresentando um papel crucial na manutenção e disseminação da LV nas áreas endêmicas. Estudos indicam que a elevada taxa de infecção nestes animais está associada com maior risco de doença humana (BELO et al., 2013; LOPES et al., 2010; MARGONARI et al., 2006; MOLINA et al., 1994; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011). Em função disto, o controle da doença canina é considerado essencial, em razão da relevância do cão para a manutenção no ciclo de transmissão (BELO et al., 2013; COURA-VITAL et al., 2013a; LAURENTI et al., 2013).

À vista disto, é essencial que os testes diagnósticos para a detecção de cães infectados sejam assertivos, para que haja o emprego de medidas de controle e prevenção eficientes. Os testes diagnósticos sorológicos convencionais disponibilizados pelo Ministério da Saúde (MS) para a identificação de animais positivos para LVC são o TR-DPP[®] que é um teste imunocromatográfico rápido - *Dual Path Plattform*, utilizado como teste de triagem e o teste confirmatório kit EIE-LVC, que consiste em um ensaio imunoenzimático - *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA), ambos são produzidos pela Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os métodos de diagnósticos oficialmente recomendados pelo MS (TR-DPP[®], EIE-LVC) apresentam falhas, como reações cruzadas com outros patógenos caninos, baixa sensibilidade em animais assintomáticos e reações falso-positivas em animais vacinados (GRIMALDI et al., 2012a; MARCONDES et al., 2013). Essas falhas acarretam no diagnóstico inadequado de cães, levando até mesmo a eutanásias de animais saudáveis. Além disso, tais métodos não identificam assertivamente os animais com baixos títulos de anticorpos contra *Leishmania*, levando a permanência de animais positivos nas áreas endêmicas, o que induz a baixa eficiência no controle da Leishmaniose Visceral. Neste contexto, o desenvolvimento de novas tecnologias com elevado aprimoramento da detecção LVC se faz necessário.

A citometria de fluxo, nesse cenário, tem um papel promissor, apresenta uma metodologia bem estabelecida e um alto desempenho no diagnóstico sorológico de diferentes patologias em laboratórios clínicos (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999; MARTINS-FILHO et al., 1995; ROCHA et al., 2002). Por conter o emprego de microdiluições revela uma capacidade de

melhoria na sensibilidade e a capacidade de identificação de baixos títulos de anticorpos (ANDRADE et al., 2009; JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999; ROCHA et al., 2002). Por conseguinte, recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs um protótipo de diagnóstico sorológico por Citometria de Fluxo denominado LeishFlow (KER et al., 2013).

O kit LeishFlow tem elevado potencial diagnóstico, visto o alto desempenho e capacidade em distinguir animais positivos para LV de outras doenças caninas, diferenciar animais imunizados com vacinas comerciais e outros candidatos vacinais, e, além disso, apresentar melhor sensibilidade na detecção de cães assintomáticos (ANDRADE et al., 2007, 2009; CARVALHO NETA et al., 2006; GAMA KER et al., 2013b; KER et al., 2013).

Portanto, este estudo tem a finalidade de contribuir para a consolidação de uma nova perspectiva diagnóstica para leishmaniose visceral canina (LVC), com uso do kit LeishFlow. Temos como objetivo principal avaliar o potencial do Kit LeishFlow como diagnóstico sorológico da LVC em larga escala, empregando um grande número de amostras de área endêmica para LV, comparando-o com os testes sorológicos recomendados pelo MS (DPP[®] e EIE-LVC).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

As Leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias complexas e cosmopolitas com ampla distribuição geográfica e apresentação clínicas multifacetadas, vista como endêmica em 98 dos 200 países e territórios que reportam a Organização Mundial de Saúde (OMS). Com alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais é considerada uma enfermidade negligenciada, e está associada a populações em condição de vulnerabilidade ou estado de pobreza, má nutrição e, sem saneamento básico adequado. Estima-se que aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo encontram-se em risco de contrair leishmaniose e ocorra mais de 1 milhão de novos casos anualmente (WHO, 2020a).

Esse complexo de doenças é ocasionado por protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). São descritas mais de 20 espécies do gênero *Leishmania sp.* como agentes etiológicos das Leishmanioses (LAINSON; SHAW, 1987). Esses parasitos apresentam ciclo de vida heteroxênico, ou seja, vivem alternadamente entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Nos vertebrados multiplica-se no sistema monócito fagocitário (SMF) e apresenta a forma evolutiva denominada amastigota, no inseto vetor assume a forma promastigota, presente no meio extracelular do tubo digestivo do invertebrado (CECÍLIO et al., 2020; CHANG; FONG; BRAY, 1985; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; SERAFIM et al., 2018).

Os hospedeiros invertebrados são fêmeas de dípteros hematófagos da ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. No velho mundo pertencem aos gêneros *Phlebotomus*, no entanto, o gênero *Lutzomyia* é considerado o vetor responsável pela transmissão no Novo Mundo (LAINSON & SHAW, 1987). Conhecidos como flebotomíneos, estes insetos vetores são de pequeno porte, com tamanho aproximado de 2 a 4 milímetros, caracterizam-se por apresentar cor palha ou castanho claro e corpo com intensa pilosidade, apresentam hábitos de voo e repasto sanguíneo crepusculares e seu desenvolvimento ocorre em locais úmidos e ricos em matéria orgânica (LEWIS, 1974).

Os hospedeiros vertebrados são mamíferos de diferentes ordens, e estão presentes no ambiente silvestre ou urbano. Nas Américas, são identificados como reservatórios silvestres os marsupiais (*Didelphis spp.*), preguiças (*Choloepus spp.* e *Bradypus spp.*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), raposa-caranguejeira (*Cerdocyon thirty*), roedores (*Rattus spp.*, *Proechimys spp.*,

Nectomys spp., *Oryzomys spp.*, etc.), entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No meio urbano e rural, a doença já foi descrita em cães, considerado reservatório da doença, e gatos, equinos e suínos, sendo necessário mais estudos sobre a importância destes no ciclo epidemiológico (BRAZIL; NASCIMENTO; MACAU, 1987; PENNISI et al., 2015; SOARES et al., 2013)

As Leishmanioses abrangem diferentes formas clínicas, que depende principalmente, da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, além de outros variáveis de risco como: idade, ocupação laboral e insegurança alimentar com quadros de desnutrição graves. Segundo a OMS, são classificadas de acordo com a sintomatologia clínica, que são: a leishmaniose cutânea (LC), que ocasiona úlceras na pele; a leishmaniose mucocutânea (LMC), que provoca lesões na mucosa; e a leishmaniose visceral (LV), vista como a forma mais grave das leishmanioses por acarretar uma doença sistêmica que acomete órgãos importantes (WHO, 2017).

Nas Américas, as leishmanioses tem ampla distribuição geográfica e encontram-se entre as enfermidades que representam um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde são 18 países endêmicos para LC e LMC, e 13 países endêmicos para LV. O Brasil é um dos países com maior número de casos, o que o torna responsável pelo maior número de notificações (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020).

2.2 Leishmaniose visceral

A LV, também conhecida como calazar, é classificada pela OMS como uma das principais enfermidades parasitárias com potencial de surto e mortalidade. É uma doença sistêmica, que acomete órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, em humanos é caracterizada por episódios de febre, anemia, aumento do baço e fígado, e perda de peso. Apresenta uma alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento, pode chegar a 100% em 2 anos, se a doença não for tratada (WHO, 2020a).

Dos países que reportaram os dados a OMS mais de 90% dos casos globais de LV foram relatados no Brasil, África Oriental e na Índia (Figura 1). Estima-se que anualmente ocorram de 50.000 a 90.000 novos casos de LV em todo o mundo. Nas Américas, a LV compõe um grave problema de saúde pública, 65.934 novos casos foram registrados de 2001 a 2019, com uma média de 3.470 casos por ano tendo o Brasil o país com maior número de notificações. No Brasil, 5.995 casos humanos confirmados ocorreram por LV de 2017 a 2019 o que corresponde a 97% do total de casos de Leishmaniose Visceral nas Américas, há a disseminação gradual de casos por todos os estados, associado as más condições de vida (ALVAR et al., 2012; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020; WHO, 2020b).

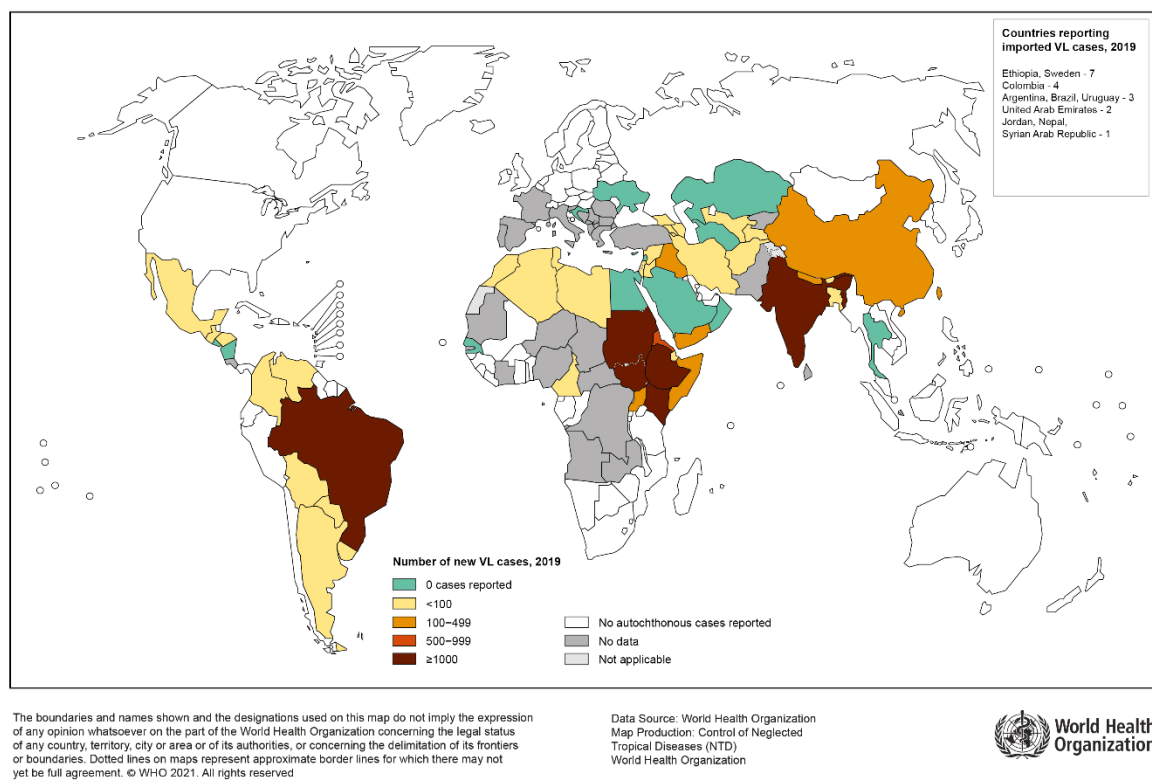


Figura 1 - Situação de endemidade da leishmaniose visceral no mundo.

A infecção apresenta duas formas distintas, clinicamente e epidemiologicamente, sendo descritas como LV antroponótica e LV zoonótica. A forma antroponótica é causada pela espécie *Leishmania (L.) donovani*, e está presente em Bangladesh, Índia e Nepal. Já no Oriente Médio, Ásia Central, China e Europa Mediterrânea, há o predomínio da forma zoonótica, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011), reconhecida como sinônimo de *L. chagasi* na América do Sul durante muitos anos, até que pesquisas bioquímicas,

moleculares e genéticas identificaram como uma única espécie geneticamente idêntica a *L. infantum* (LEBLOIS et al., 2011; MAURICIO et al., 1999) tendo o cão e/ou outros canídeos como reservatórios do parasito.

No Brasil, o agente etiológico causador da LV é a *Leishmania infantum*, e o inseto vetor responsável pela transmissão são os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (ROMERO; BOELAERT, 2010). O ciclo da LV consiste em duas etapas, uma no vetor e a outra no hospedeiro mamífero.

O estágio no vetor começa após o repasto sanguíneo sobre a derme vascularizada do hospedeiro vertebrado infectado, em que ocorre a ingestão de células do SMF infectadas por amastigotas. No tubo digestório do flebotomíneo as amastigotas se transformam em promastigotas e se desenvolvem até a forma infectante. A promastigota infectante gera um bloqueio no intestino do vetor, o que favorece o regurgitamento do parasito durante um novo repasto sanguíneo, e a inoculação das formas infecciosas em um novo hospedeiro mamífero (JERONIMO; PEARSON, 1992; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992).

No mamífero, após a inoculação das promastigotas pelo flebotomíneo, há uma resposta inflamatória, em que as células do SMF fagocitam o parasito como um mecanismo de defesa do sistema imune. No interior dessas células as promastigotas se multiplicam dentro de vacúolos parasitóforos e se transformam em amastigotas. Devido à grande multiplicação, as células se rompem liberando as amastigotas, que quando livres infectam novas células do SMF onde se multiplicam novamente até um novo repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado, fechando assim o ciclo do parasito (CHANG; FONG; BRAY, 1985; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

O cão doméstico tem sido implicado como um importante reservatório doméstico da LV, por apresentar elevado parasitismo cutâneo, comportando-se como fonte de infecção para os vetores e mantendo o ciclo urbano da doença (GRIMALDI et al., 2012b; ZOGHLAMI et al., 2014), além disso, trabalhos na literatura relatam que a ocorrência de casos caninos em geral antecede o desenvolvimento de casos humanos, esses achados foram relacionados também, ao estreito convívio do cão com o homem (BELO et al., 2013; LOPES et al., 2010; MARGONARI et al., 2006; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; THOMAZ SOCCOL et al., 2017).

2.3 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é descrita como uma doença crônica multisistêmica que afeta vários órgãos do animal (BANETH et al., 2008; RIBEIRO et al., 2018). Segundo Mancianti et al (1988), após avaliar a sintomatologia, os cães infectados e soropositivos podem ser classificados de acordo com o estado clínico, em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os animais assintomáticos são aqueles que apresentam ausência de sinais clínicos sugestivos para LVC; os oligossintomáticos manifestam até três sinais clínicos, e os sintomáticos exibem pelo menos mais de três sinais clínicos da doença (MANCIANTI; MECIANI, 1988)

A sintomatologia dos animais infectados pelo parasito pode ocorrer de forma visceral ou sistêmica, e um grande número de animais é acometido por alguma alteração cutânea. Os sinais clínicos mais comuns observados são: linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, onicogribose, alopecia, dermatites, úlceras de pele, lesões crostosas e ulcerativas, comumente, nas pontas de orelha e nariz, ceratoconjuntivite, apatia, edema de patas, hiperqueratose, doenças oftálmicas, digestivas e renais, hepatoesplenomegalia, perda progressiva de peso, epistaxe (MARCONDES; ROSSI, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; PALTRINIERI et al., 2010).

Os animais assintomáticos apresentam grande preocupação para as autoridades sanitárias e comunidade científica, estudos indicam que cerca de 20% desses animais apresentaram parasitismo cutâneo, baixos títulos de anticorpos e alta taxa de transmissão aos vetores, o que acarreta no favorecimento da disseminação do parasito, e na dificuldade de controle da doença. (BANETH et al., 2008; LAURENTI et al., 2013; MARZOCHI et al., 1985). Alguns autores estimam que em áreas endêmicas de 15 a 60% dos cães podem ser assintomáticos a depender do teste de diagnóstico empregado (sorológico ou molecular) (COURA-VITAL et al., 2011a; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A eficiência da resposta imune no cão é uma condição importante para o aparecimento da sintomatologia clínica e para a progressão da doença (RIBEIRO et al., 2018). As células imunes do reservatório canino quando entram em contato com a *Leishmania infantum*, o fagocita e produzem citocinas que moldam a resposta imune, podendo esta resposta ser protetora e

não acarretar sintomatologia clínica, ou prejudicial, ou seja, que promove a progressão da doença (ROSSI; FASEL, 2018).

Estudos apontam que a imunidade em cães assintomáticos é mediada por uma resposta imune celular do tipo 1, prevalecendo a produção das citocinas: interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estes por consequência são mecanismos nos quais reprime a multiplicação do parasito. No entanto, animais sintomáticos, ou seja, aqueles em que ocorre a progressão da doença há um aumento na produção das citocinas como, interleucina- 4 (IL-4) e/ou interleucina -10 (IL-10), que favorece a resposta imune do tipo 2, que estimula a resposta imune humoral, mediante a ativação dos linfócitos B que produzem anticorpos, como resultado há uma ataque sistêmico ao organismo pelo próprio sistema imune associado a multiplicação do parasito (BANETH et al., 2008; CARRILLO; MORENO, 2009; PINELLI et al., 1994; RIBEIRO et al., 2018). A partir desta resposta imune, é possível indicar níveis de IgG total de acordo com a evolução clínica da LVC, estudos demonstram que cães sintomáticos tem altos níveis de anticorpos da classe IgG total, IgG2, IgA e IgE, em contrapartida animais oligossintomáticos e assintomáticos apresentam níveis proeminentes apenas de IgG1 (COURA-VITAL et al., 2011b; NETO et al., 2010; REIS et al., 2006a, 2006b)

Diante da resposta imune do cão em contato com a *L. infantum* é sabido que a presença de sintomatologia clínica é proporcional a presença ou ausência de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* no soro, sendo assim, cães assintomáticos apresentam baixos títulos de anticorpos ou mesmo a ausência deles, em contrapartida cães sintomáticos geralmente possuem altos níveis de anticorpos no sangue (IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2020; MAIA; CAMPINO, 2018; PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2009). Esta característica de evasão do parasito conectado à resposta imune gera uma dificuldade para o diagnóstico e controle adequado da LVC. Os cães assintomáticos são um elemento comum nas áreas endêmicas e promovem o ressurgimento e permanente transmissão da doença (SEVÁ et al., 2016), assim o seu impacto em termos de proporção na população e papel na transmissão precisa ser mais bem determinado (ALVAR et al., 2020). Na ausência de outras ferramentas de controle, como vacinas ou tratamento precoce disponíveis para os cães, há uma necessidade de ferramentas diagnósticas mais eficazes para identificação precisa e rápida dos animais assintomáticos e assim favorecer as aplicações das medidas de controle contra a doença.

2.4 Controle, prevenção e Tratamento

Medidas de controle e vigilância contra a leishmaniose visceral foram adotadas nos últimos anos no Brasil, com o intuito de diminuir o número de casos humanos e caninos. Dessa forma, em 2006, o Ministério da Saúde lançou o primeiro Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, que se atualizou nos últimos anos e tem o intuito de implementar as ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Atualmente, as recomendações contidas no PVC-LV são embasadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, diagnóstico de cães e recomendação de eutanásia de animais positivos, educação em saúde, manejo ambiental e controle dos insetos vetores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Porém, mesmo com todas essas medidas é crescente o número de casos da doença e a efetividade dessas ações de controle é questionada.

Em 2008 o MS proibiu o uso de qualquer medicamento humano em cães para o tratamento da LV (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008), sendo assim, a medida de eutanásia de cães infectados tornou-se a mais utilizada para o controle da doença. O Brasil é um dos poucos países no mundo que empregam a eutanásia de cães como medida de controle da doença e tal medida não tem diminuído a incidência da doença a níveis satisfatórios (SEVÁ et al., 2016). Nesse sentido, sobre esse cenário, existem discordâncias sobre a eutanásia como método de controle da doença, tanto na comunidade científica bem como na sociedade civil (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016; MACHADO; SILVA; VILANI, 2016). Frente a essas divergências, diversos grupos de pesquisa buscam novos métodos de controle, como a imunoprofilaxia de cães (FERNANDES et al., 2008; REIS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2018), uso de coleiras e inseticidas para cães (COURA-VITAL et al., 2018; DAVID et al., 2001; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; WERNECK et al., 2014) e aprovação de uma medicação própria para o público canino (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019).

O desenvolvimento das vacinas contra LVC é considerada uma alternativa para frear a expansão da doença, com potencial para ser utilizado de forma profilática ou terapêutica (REIS et al., 2010). Apesar de não ser um método de controle até aqui recomendado pelo MS, atualmente no Brasil há uma única vacina disponível comercialmente, a Leish-Tec[®] (antiga Hertape

Calier Saúde Animal S/A, atualmente CEVA Saúde Animal Ltda) (FERNANDES et al., 2008). Esta vacina é composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina, no entanto, estudos indicam que esta vacina possui baixa eficácia protetora, apesar de alguns trabalhos demonstrarem uma eficácia de aproximadamente 71%, e estima-se que o uso desta vacina não tem impacto na redução da incidência de LVC em áreas com altas taxas de transmissão após os estudos de Fase III (RIBEIRO et al., 2018). Dessa forma, é necessário se investir na pesquisa e desenvolvimento de novos candidatos vacinais, para haver resultados promissores que incentivem os gastos públicos na utilização de vacinas como medida de prevenção e controle da LVC em âmbito de saúde pública.

Outra alternativa de controle é o uso de compostos com efeitos repelentes ou até mesmo inseticidas contra o inseto vetor, o composto mais utilizado atualmente é a base de piretróides (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Estudos apontam que o uso destes compostos promove o aumento da mortalidade de flebotomíneos, além de diminuir a prevalência e a incidência da infecção canina, apresentando boa eficácia (COURA-VITAL et al., 2018; DAVID et al., 2001; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; WERNECK, 2014). Após longos anos de estudos clínicos e multicêntricos em áreas endêmicas e análises do comitê técnico e científico que auxilia o MS nas tomadas de decisões e na revisão técnica do PCLV no Brasil o MS decidiu empregar o uso de coleiras impregnadas de inseticidas em cães de áreas endêmicas. A operacionalização desta medida deverá ser empregadas em breve e vem sendo debatida pelo MS a logística de seu emprego (COURA-VITAL et al., 2018; WERNECK et al., 2014).

Sevá et al. (2016) empregando modelos matemáticos compararam a eficácia de algumas das estratégias atualmente disponíveis com foco em cães para prevenir e controlar a LV. Os autores demonstraram com as simulações matemáticas que a eutanásia de cães soropositivos, o uso de coleiras impregnadas de inseticida e a vacinação de cães contribuem significativamente para reduzir a prevalência de infecção tanto em caninos quanto em humanos. Entretanto, o uso de coleiras impregnadas com inseticida apresentou o maior nível de eficácia, principalmente porque afetou diretamente a força de infecção e o contato vetor-cão. Além disso, quando usada em uma taxa de cobertura de 90%, a coleira impregnada com inseticida foi capaz de diminuir a prevalência de cães e humanos soropositivos para zero; ademais, pela facilidade de aplicação e aceitação pela população-alvo, esses colares podem ser considerados os mais viáveis para inclusão em políticas públicas entre as três medidas simuladas. Os autores quando compararam o uso de eutanásia e vacinação, nas coberturas de 70 e 90%, respectivamente, a proporção de

populações infectadas foi semelhante. No entanto, ao avaliar as implicações de ambos os métodos, particularmente os aspectos negativos do abate de cães e a proporção de animais protegidos pela vacinação, a última medida parece ser a melhor opção se o custo total não for significativamente mais alto (SEVÁ et al., 2016).

Uma outra medida de controle na doença seria o tratamento de cães infectados, principalmente ao analisarmos à falta de adesão por parte de proprietários e a forte pressão da comunidade contra eutanásia de cães. É importante destacar que frente a proibição do tratamento com medicação humana (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008), a opção de ter uma medicação própria para uso canino se faz necessária. Em 2016 a Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa autorizou o registro do produto Milteforan™ (miltefosine) da empresa Virbac Saúde Animal o qual, não é usado para o tratamento humano no Brasil. Dessa forma, o uso do Milteforan™ passou a ser uma opção de tratamento dos cães infectados, porém, esse medicamento apenas diminui a carga parasitária e consegue uma melhora clínica dos cães e não uma cura parasitológica (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019). No entanto, o Ministério da Saúde ainda não recomenda a utilização desse tratamento como método de controle e prevenção para LV em âmbito de saúde pública. Mesmo se tratando de um avanço, o uso tratamento com Milteforan™ é de caráter individual, e fica a cargo único e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal, sendo que o mesmo deve arcar com todos os custos e se responsabilizar pelo uso correto dessa forma de controle (CFMV, 2020).

Posto isso, ainda existem inúmeras críticas sobre os métodos de controle oficiais do PVC-LV, principalmente em consideração a eutanásia de animais, em razão da sua eficiência, questões éticas e morais e ainda a detecção pelo diagnóstico sorológico de maneira eficaz e correta de cães positivos para LVC. (DANTAS-TORRES et al., 2019; MACHADO; SILVA; VILANI, 2016; WERNECK, 2014; WERNECK et al., 2014).

2.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

A variedade de sintomas clínicos ou até mesmo a ausência deles, unido aos métodos de controle preconizados pelo MS para LV, denota a importância de um diagnóstico apropriado e principalmente com elevada acurácia na comprovação de um animal infectado (DE BRITO et

al., 2020; IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2020). Entretanto, ainda que ocorram pesquisas e avanços em busca de diagnósticos mais precisos e acurados, até então nenhum dos diagnósticos presentes no mercado apresentam elevada sensibilidade e especificidade, principalmente em assintomáticos, o que permite uma desconfiança nos testes empregados (DE BRITO et al., 2020; IBARRA-MENESES et al., 2019; IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2020).

O diagnóstico clínico para leishmaniose visceral é incerto, por apresentar a sintomatologia variada, os métodos laboratoriais são os únicos que podem conferir um diagnóstico conclusivo. Os métodos disponíveis compreendem métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (DE BRITO et al., 2020).

2.5.1 Métodos Parasitológicos

As técnicas parasitológicas consistem em encontrar as formas amastigotas de *Leishmania* em material proveniente dos aspirados ou *imprint/claps* de tecidos de interesse, que apresentam maior quantidade de parasito, como fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pele. Esse método é realizado a partir do esfregaço da amostra, corado por *Giemsa*, após esse procedimento é feito a leitura em microscópio óptico. Outra técnica utilizada para encontrar o parasito é o emprego do meio de cultura para o cultivo e isolamento das formas promastigotas presentes nos tecidos alvo (HERWALDT, 1999; PALTRINIERI et al., 2016).

Como alternativa para a otimização das técnicas citológicas e histológicas, a abordagem imunohistoquímica (IHC), como imunoperoxidase ou imunofluorescência direta de tecidos, tornou-se uma ferramenta suplementar. O intuito dessa técnica é confirmar e direcionar, através da ligação antígeno-anticorpo e o uso de cromógenos, a presença do parasito (BOURDOISEAU; MARCHAL; MAGNOL, 1997; FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004).

O diagnóstico parasitológico somente é positivo quando é identificado o protozoário na amostra coletada, é considerado um teste padrão ouro, porém, se não encontrado o parasito não se descarta a infecção. É importante ressaltar que o emprego dessas técnicas apresenta limitações, entre elas destacam a necessidade de profissional qualificado para análise (METTLER et al., 2005), além disso, há uma baixa sensibilidade do método, dependente do tecido utilizado

como amostra (BARROUIN-MELO et al., 2004; PALTRINIERI et al., 2016) e também do animal avaliado, pois em animais assintomáticos e oligossintomáticos usualmente não é encontrado o parasito, devido à baixa carga parasitária desses animais (OSMAN, KAGER, ZIJLS, 1997; REALE et al., 1999). Diante disso, em cães com essas características são necessários outros métodos de comprovação da infecção, sendo inviável a realização desses métodos em programas de saúde pública (ASHFORD et al., 1995; FARIA; ANDRADE, 2012; HERWALDT, 1999; SANTOS et al., 2014).

2.5.2 Métodos Moleculares

Testes moleculares se tornaram uma opção para detecção da infecção por *Leishmania*, hoje são descritos diversos métodos, entre eles se destaca a Reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações. (FARIA; ANDRADE, 2012; FISA et al., 2001; FRANCINO et al., 2006; QUARESMA et al., 2009). A PCR se baseia no isolamento e amplificação de uma região do DNA do parasito, pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos e baço, sangue e urina, e biópsias de pele (PALTRINIERI et al., 2016; QUARESMA et al., 2009; REIS et al., 2013).

Estes testes moleculares fornecem melhores resultados de sensibilidade e especificidade em comparação aos testes parasitológicos, e são capazes de identificar e quantificar as espécies de *Leishmania* de forma eficiente e relativamente rápida. Entretanto, são métodos de alto custo e a positividade dos animais pode variar de acordo com a amostra utilizada e bem como o iniciador utilizado (LACHAUD et al., 2002; QUARESMA et al., 2009; SANTOS et al., 2014).

2.5.3 Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos são bastante utilizados para o diagnóstico da LV canina, se baseiam em detectar anticorpos ou antígenos específicos de *Leishmania sp.*, sendo considerados testes diagnósticos indiretos. Existem diferentes técnicas sorológicas disponíveis, esses testes diferem em sua sensibilidade, especificidade, acurácia e precisão, e tem como principal vantagem o uso de métodos não invasivos para a coleta de material (FARIA; ANDRADE, 2012).

No Brasil, os principais métodos utilizados fundamentam-se nos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT), teste imunocromatográfico (TRALd, K39, LEISHK39, rK39) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (DE BRITO et al., 2020).

O teste de aglutinação (DAT), é considerado um teste simples e de fácil execução, devido a não necessidade de equipamentos específicos para sua realização. Consiste na capacidade dos anticorpos em reconhecer os antígenos da LVC, formando um produto final visível. Embora apresente valores considerados de sensibilidade, o teste tem um déficit na especificidade, além disso, não apresenta boa reprodutibilidade, devido a técnica ser de difícil padronização e também controle complexo da qualidade do antígeno (OSKAM et al., 1996; OZBEL et al., 2000).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi utilizada durante um período extenso como teste confirmatório nos inquéritos epidemiológicos recomendados pelo PVC-LV. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O método utilizado a partir da década de 60, se baseia na detecção de anticorpos circulantes, onde é realizado uma serie de diluições, e os títulos obtidos são considerados positivos quando iguais ou superiores a 1:40 (DUXBURY; SADUN, 1964; MANCIANTI; MECIANI, 1988; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Apesar de ter sido amplamente utilizado, a RIFI contém imperfeições, devido a sua baixa especificidade apresenta reações cruzadas com outros patógenos Tripanossomatídeos, como o da Doença de Chagas e os da Leishmaniose Tegumentar, apresentando resultados falso-positivos (GONTIJO; MELO, 2004). Além disso, a técnica possui grandes falhas na detecção de cães assintomáticos ou cães com baixa carga de anticorpos, negando um grande número de animais verdadeiramente positivos (ALVAR et al., 2004; BERRAHAL et al., 1996). Diante disso, a partir de 2012, houve a mudança de protocolo, e a RIFI deixou de ser usada como rastreamento de cães no PVC-LV, sendo substituído por um teste imunocromatográfico (TR-DPP® - *Dual Path Platform*) (COURA-VITAL et al., 2013b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Outro método utilizado no diagnóstico da LVC é o teste imunoenzimático - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), atualmente é um dos testes mais comumente feitos para a confirmação da infecção por LVC. O ELISA consiste no uso de uma placa de poliestireno com antígeno adsorvidos, durante a reação ocorre a interação dos anticorpos dos cães com o

antígeno e um anticorpo anti-imunoglobulina de cão ligada a uma enzima, essa reação em placa produz um composto, que em leitura representa o valor de densidade ótica. A amostra de soro é considerada positiva quando a densidade ótica for igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Este método tem vários pontos positivos, ele permite a realização do teste em um grande número de amostras, podendo permitir a determinação de títulos de anticorpos através da densidade ótica. Além disso, pode ser utilizado diferentes tipos de antígenos, ou a combinações deles, diminuindo as reações cruzadas com outros Tripanossomatídeos e melhorando a sensibilidade e especificidade da técnica. (ELMAHALLAWY et al., 2014; GONTIJO; MELO, 2004)

No entanto, a técnica também apresenta limitações, como o tempo empregado para a execução do teste, reações cruzadas com outros patógenos caninos filogeneticamente distante dos Tripanossomatídeos, e uma dificuldade de detecção de animais assintomáticos e com baixos títulos de anticorpos. Mesmo assim, é um teste preconizado pelo Ministério da Saúde, o EIE-LVC (Biomanguinhos), como teste confirmatório no PVC-LV (DA SILVA et al., 2020; LAURENTI et al., 2014; ZANETTE et al., 2014).

Em busca de uma técnica rápida, que não necessitasse de equipamentos rebuscados, os ensaios imunocromatográficos surgiram como uma tecnologia inovadora (GRIMALDI et al., 2012a). O método é baseado numa prova qualitativa feita a partir da reação antígeno anticorpo, utiliza antígenos recombinantes, que variam de acordo com o kit disponibilizado. Atualmente, no setor público, é feito o uso do TR-DPP[®] (Biomanguinhos) como teste de triagem, que é uma imunocromatografia rápida de duplo percurso que se utiliza de antígenos recombinantes rk9, rk26 e rk39 de *Leishmania infantum* (FIGUEIREDO et al., 2018).

O teste dispõe de uma execução e leitura rápida e permite o uso de apenas uma gota de sangue periférico, com a vantagem de poder ser usado em condições de campo. Mesmo havendo grandes vantagens no uso do TR-DPP[®] como teste de triagem, a técnica apresenta deficiências, há dificuldades na detecção de cães assintomáticos, reações cruzadas com outros patógenos caninos, e relatos de falso positivos, quando ocorre o aumento da prevalência da doença (FIGUEIREDO et al., 2018; LARSON et al., 2017).

Mediante o exposto, o diagnóstico preciso para LVC é indispensável para o controle da enfermidade. Em frente as limitações apontadas pelos métodos de diagnóstico disponíveis, há uma necessidade de aprimorar e elaborar novas ferramentas capazes de proporcionar um

diagnóstico seguro e efetivo para LVC (DE BRITO et al., 2020; IBARRA-MENESES; MORENO; CARRILLO, 2020).

2.5.4 Avanços e novas metodologias no diagnóstico da leishmaniose visceral

Através da prospecção de novas técnicas diagnósticas para LVC, houve o desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias, como a LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) que consiste em um novo método de amplificação do DNA. Considerado um teste rápido, eficiente, altamente específico e sensível, a metodologia baseia-se no uso de iniciadores associados com a enzima Bst DNA polimerase, é capaz de amplificar grandes quantidades de DNA, em pouco tempo a temperatura constante, usando equipamento básicos para a reação e visualização dos resultados, tornando-o de baixo custo (ADAMS et al., 2010; NOTOMI, 2000).

A detecção do DNA de *Leishmania sp.* em amostras de cães e humanos tem sido realizado através da técnica de LAMP em diversos trabalhos de pesquisa, dentre eles ressalta-se reações eficientes na amplificação de amostras de diferentes espécies de *Leishmania* (CHAOUCH et al., 2013; GAO et al., 2015). Gao et al. (2015) ao utilizar amostras de esfregaço conjuntival utilizando a técnica de LAMP, salientou que a técnica foi mais sensível na detecção da LVC do que a PCR, ELISA e a microscopia. Mais recentemente, Ibarra-Meneses et al (2018) avaliaram o desempenho de um kit LAMP *point-of-care*, usando dois fluorímetros em tempo real para amplificar o DNA de *Leishmania* obtido por protocolos de coluna de sílica e Boil & Spin. Os autores identificaram que as diferentes abordagens utilizadas para executar e interpretar as reações LAMP apresentaram desempenho equivalente ao PCR e PCR em tempo real, abrindo a possibilidade de usar um kit LAMP para o diagnóstico da leishmaniose no local de atendimento (IBARRA-MENESES et al., 2018).

Mais recentemente, os biossensores também tem tomado espaço como novas ferramentas analíticas por sua boa sensibilidade prometendo ocupar posição importante no portfólio futuro de testes de diagnósticos para doenças infecciosas e parasitárias. Baseiam-se na utilização de constituintes biológicos como elementos de reconhecimento de outras estruturas como anticorpos, antígenos, DNA e RNA entre outros, ao identificar essas estruturas ocorre a transdução e a conversão em um sinal químico ou físico mensurável. Na literatura científica já foram

descritos diferentes biossensores, classificados de acordo com o elemento biológico de reconhecimento e/ou transdutor (CHAMBERS et al., 2008).

Algo a se ressaltar são os imunossensores baseados numa reação imunológica, fundamenta-se na imobilização, na superfície no transdutor, do antígeno ou anticorpo. Já foram descritos diferentes tipos de imunossensores, construídos com diferentes tipos de transdutores (DE BRITO et al., 2020). Souto et al. (2013), ao avaliarem o imunossensor desenvolvido para o diagnóstico da LVC, concluíram que a tecnologia apresenta alta sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos em soros de cães infectados para *L. infantum*. O mesmo foi encontrado por Cordeiro et al. (2019), que destacaram a possibilidade do uso de imunossensores para aplicações clínicas e epidemiológicas.

2.5.4.1 Citometria de fluxo

Diante das novas ferramentas de diagnóstico sorológico e seus desafios para uma acurada detecção de LVC, a citometria de fluxo vem sendo aplicada em diversos grupos de pesquisa (DE BRITO et al., 2020). Desde 1995, diferentes pesquisadores obtiveram resultados promissores para abordagens sorológicas na detecção das Leishmanioses baseadas em citometria de fluxo (MARTINS-FILHO et al., 1995; ROCHA et al., 2002).

A citometria de fluxo é um método baseado em sistema de lasers, capazes de medir pequenas partículas biológicas até as células inteiras e suas organelas, o que permite a caracterização de partículas ou células numa amostra. A técnica permite um exame quantitativo e qualitativo dos constituintes da amostra marcados com os reagentes, como anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa iniciou estudos realizados para a produção de um teste diagnóstico para LV baseado em citometria de fluxo. Diferentes estudos publicados, demonstraram a eficiência do uso de um Anticorpo IgG Anti-Promastigota Fixada (AAPF-IgG) para a detecção de cães com LVC (ANDRADE et al., 2007, 2009; CARVALHO NETA et al., 2006; GAMA KER et al., 2013b). Diante disso, Ker et al.(2013) desenvolveu um teste sorológico, através da técnica de AAPF-IgG, empregando promastigotas de *L. infantum*, nomeado LeishFlow (GAMA KER et al., 2013b; KER et al., 2013). Neste estudo, Gama Ker et al. (2013b) propuseram estabelecer as melhores condições para preservação dos antígenos de

promastigotas de *Leishmania infantum* empregados na sorologia por citometria de fluxo. Os autores acompanharam durante 12 meses o perfil da reação sorológica e controle microbiológico do antígeno de promastigotas mantidos em diferentes conservantes (solução salina tampoadada com fosfato com soro fetal bovino a 3%, fenol 0,35%, timerosal 0,01% e formaldeído 0,5%) e armazenados a 3 temperaturas distintas (25 ° C, 4 ° C e -20 ° C). Os resultados indicaram que as melhores condições para preservação dos antígenos foi armazenamento em formaldeído a 4 ° C, mantendo o perfil morfológico e a estabilidade antigênica, capazes de manter também a adequada reatividade sorológica por um longo período de conservação (GAMA KER et al., 2013b).

Após a obtenção desses resultados, nosso grupo de pesquisa elaborou o protótipo de kit LeishFlow que teve sua patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BR 10 2012 0047420) sob título “*Protótipo de um kit de diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, empregando formas promastigotas fixadas pela técnica de citometria de fluxo*”. A técnica diagnóstica empregando o LeishFlow apresentou uma boa performance quando comparado a RIFI e ELISA em um baixo número de amostras de soro de cães (KER et al., 2013). Ker et al. (2013) obtiveram um diagnóstico acurado empregando o LeishFlow, em que conseguiram diferenciar cães vacinados de animais positivos, além de baixa reatividade cruzada com outros patógenos caninos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (KER et al., 2013). Os dados obtidos por nosso grupo de pesquisa reforçam o potencial do teste de protótipo para uso como um kit comercial e destacam seu excelente desempenho mesmo após armazenamento por 1 ano a 4 ° C.

Nesse sentido, o presente estudo visa contribuir com o desenvolvimento biotecnológico da sorologia por citometria de fluxo, ampliando os conhecimentos da reação sorológica pelo Kit LeishFlow. Para isso, nesse estudo, iremos realizar um detalhado estudo comparativo em larga escala do protótipo de kit LeishFlow com os testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde no Brasil (TR-DPP® e EIE-LVC).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar e validar o potencial do Kit LeishFlow como diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina em um grande número de amostras de área endêmica, comparando-o com os testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde no Brasil (TR-DPP® e EIE-LVC).

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir e revalidar um novo lote do Kit LeishFlow e determinar as melhores condições de reação para o uso no ensaio sorológico;
- Determinar a prevalência da infecção por *L. infantum* a partir do teste sorológico empregando o kit LeishFlow na área endêmica de Governador Valadares;
- Avaliar o desempenho e concordância do teste sorológico empregando o Kit LeishFlow em relação ao teste sorológico TR-DPP® como padrão de referência;
- Avaliar o desempenho e concordância do teste sorológico empregando o Kit LeishFlow em relação aos testes sorológicos combinados TR-DPP® e EIE-LVC como padrão de referência;
- Avaliar o desempenho e concordância do teste sorológico empregando o Kit LeishFlow em relação aos testes sorológicos combinados TR-DPP® e EIE-LVC como padrão de referência ao estratificarmos as amostras de acordo com as formas clínicas (assintomático e sintomático).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e métodos

Neste trabalho foi produzido um novo lote e realizada uma nova validação do Kit LeishFlow para estabelecimento das condições metodológicas do estudo em larga escala. Após a definição da metodologia foi realizado o ensaio sorológico comparando os testes recomendados pelo Ministério da Saúde no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (TR-DPP® e EIE-LVC) com o Kit LeishFlow em um grande número de amostras.

4.2 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2014/18). Todos os procedimentos seguiram as diretrizes definidas promovido pelo Colégio Experimental Animal Brasileiro (lei federal nº 11.794). Os donos de todos os cães participantes deste projeto foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram um formulário de consentimento antes de todos os procedimentos (LEAL et al., 2018).

4.3 Delineamento do estudo e amostras

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte de um banco de soros (soroteca) mantido no Laboratório de Pesquisa em Epidemiologia na Escola de Farmácia da Universidade Federal Ouro Preto (EFAR/UFOP) sob responsabilidade do Prof. Dr. Wendel Coura Vital, obtido durante o estudo de Leal et al. (2018). Os critérios para inclusão da amostra no presente estudo se basearam em ter material biológico (soro) suficiente disponível para a realização dos testes sorológicos e pertencer as amostras coletadas no estudo de Leal et al. (2018) na fase do estudo pertencente a linha de base. Assim foram incluídos neste estudo amostras de soro de 1546 cães, selecionados aleatoriamente da soroteca composta por 5.822 amostras.

No estudo realizado por Leal et al. (2018), foram coletadas amostras e dados por agentes de saúde durante o inquérito canino proposto no PVC - LV no período entre agosto de 2014 a dezembro de 2015, as amostras foram armazenadas a -20° C. Os soros empregados em nosso

estudo para realização do teste sorológico por citometria de fluxo pelo protótipo de kit LeishFlow foram coletadas para uma verificação inicial (linha de base), com o intuito de selecionar os cães soronegativos para fazer parte do estudo de Leal et al. (2018). Os animais foram triados por meio do teste sorológico *Dual Path Platform* (TR-DPP[®]) e os soropositivos foram avaliados com o teste confirmatório *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (EIE-LVC). O Ministério da Saúde recomenda a eutanásia de cães positivos para TR-DPP[®] e EIE-LVC e indica a realização do teste EIE-LVC apenas para cães soropositivos para o teste TR-DPP[®]. Para comparar o desempenho do LeishFlow, no presente estudo, cães que foram positivos por TR-DPP[®] e negativos por EIE-LVC também foram incluídos. Porém, seguindo o protocolo preconizado pelo MS, em que à condição de realizar o teste EIE-LVC apenas em amostras positivas previamente no TR-DPP[®], não temos um grupo de cães positivos no EIE-LVC, mas negativos no TR-DPP[®]. Devido a isso, no presente estudo, realizamos o teste sorológico com o protótipo de kit LeishFlow nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo TR-DPP[®] - : soro de cães que não apresentaram reatividade sorológica com o TR-DPP[®], ou seja, amostras consideradas negativas para LVC, segundo protocolo do MS.
- Grupo TR-DPP[®] + : soro de cães que apresentaram reatividade sorológica com o teste TR-DPP[®], ou seja, amostras dito positivas apenas no teste TR-DPP[®]. Essas amostras necessitam da confirmação da positividade sorológica por EIE-LVC para serem consideradas positivas para LVC.
 - Grupo TR-DPP[®] + EIE-LVC +: soro de cães que apresentaram reatividade sorológica em ambos os testes TR-DPP[®] e EIE-LVC, ou seja, amostras consideradas positivas para LVC, segundo protocolo do MS.
 - Grupo TR-DPP[®] + EIE-LVC - : soro de cães que apresentaram reatividade sorológica apenas no teste TR-DPP[®], não apresentando reatividade sorológica na EIE-LVC, ou seja, amostras consideradas negativas para LVC, de acordo com o protocolo do MS.

4.4 Área de estudo

As amostras utilizadas foram coletadas de cães que residiam no município de Governador Valadares (18°51'04'' S, 41°56'58'' W), localizada na região leste do estado de Minas Gerais, na região do Vale do Rio Doce, no sudeste do Brasil. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, a cidade de Governador Valadares/ MG durante a coleta para o estudo de Leal et al. (2018), apresentava aproximadamente 279.665 habitantes em mais de 100 bairros na região urbana e em mais de 10 distritos sitiados na zona rural (IBGE, 2017).



Figura 2 - Distribuição dos bairros por setores (A a I) no município de Governador Valadares – MG. Fonte: Leal et al. (2018) apud GEPI/DVS/SMS-GV

O município é endêmico para LV, apresenta alta prevalência e, é classificado como área de intensa transmissão pelo Ministério da Saúde do Brasil (BARATA et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Devido a isso e por apresentar o apoio da Secretaria de Saúde do município, a cidade foi selecionada para o estudo e dividida em 9 setores, de A a I, de acordo com o PVC-LV. Os soros utilizados neste estudo vieram dos setores A (Bairros: Altinópolis, Santo Antônio, Mãe de Deus, Palmeiras, Vila Ozanan, Planalto, Turmalina e adjacentes), B (Bairros: Santa Helena, Santa Efigênia, Carapina, Nossa Senhora das Graças, Monte Carmelo e adjacentes), G (Bairros: Nova Santa Rita, Santa Rita, Penha, Novo Horizonte, Castanheiras, Figueira do Rio Doce e adjacentes) e H (Bairros: Nova Vila Bretas, São José, São Cristóvão, Vila Império, Jardim Pérola, JK I, II e III, Jardim Alice, Fraternidade, Jardim Kennedy, Bela Vista, Vila Rica e adjacentes), locais que de acordo com o Centro de Controle de Zoonoses e Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares (CCZ/SMS-GV)

apresentaram elevadas prevalências de LVC e características ambientais semelhantes (Figura 2) (LEAL et al., 2018).

4.5 Ensaio sorológico preconizado pelo ministério da saúde para o diagnóstico da LVC

Os exames sorológicos que compunham o padrão de referência foram realizados no Laboratório de Sorologia do Centro de Controle de Zoonoses do Governo Valadares. Cada amostra foi testada usando o protocolo de diagnóstico estabelecido pelo Ministério da Saúde. Utilizou-se os testes sorológicos TR-DPP[®] (Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como teste de triagem e EIE-LVC (Ensaio Imunoenzimático para LVC / Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como um teste confirmatório. Os testes diagnósticos foram realizados com amostras de soro, seguindo as instruções do fabricante (Anexo A, B e C) (LEAL et al., 2018). O critério de infecção foi estabelecido conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (TR-DPP[®]+ e EIE-LVC +).

4.5.1 Teste rápido de triagem para LVC: *Dual Path Platform-DPP[®]*

Empregou-se o Kit *Dual Path Platform* para Leishmaniose Visceral Canina (TR-DPP[®]), produzido pela BioManguinhos/FIOCRUZ, o princípio do TR-DPP[®] baseia na reação de uma proteína sintética recombinante, que consiste da fusão dos antígenos K9, K26, K39 de *Leishmania infantum*, com anticorpo do cão. O método imunocromatográfico foi executado e interpretado conforme orientações informadas na bula do fabricante (Anexo A).

A execução consistiu na adição de 5 µL de soro do cão no poço intitulado “Amostra + Tampão”, seguido da adição de 2 gotas de solução tampão. Após 5 minutos houve a ocultação das linhas azuis, controle indicado como C e teste, demonstrado como T. Em sequência, adicionou-se 4 gotas da solução tampão no segundo poço denominado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada após 10 a 15 minutos da adição descrita anteriormente, o resultado positivo foi verificado quando houve o aparecimento de duas linhas vermelhas (T e C), e o negativo foi reconhecido com o aparecimento apenas da linha vermelha controle (C).

4.5.2 Teste confirmatório para LVC: Ensaio de Imunoabsorção enzimática-EIE-LVC/ELISA

Foi utilizado o kit EIE-LVC produzido por BioManguinhos/FIOCRUZ, que consiste na utilização de placa de microtitulação sensibilizada com antígenos solúveis purificados de *Leishmania major-like*. A execução e interpretação do teste seguiram as orientações informadas no manual de instruções do fabricante (Anexo B).

Em resumo, realizou-se a incubação da placa sensibilizada com a presença dos soros controle do teste e das amostras analisadas na diluição 1:100 a 37° C por 30 min. Após a incubação foi realizada a lavagem da placa (200 µL/poço) por seis vezes com o tampão de lavagem fornecido no kit. Na etapa seguinte, adicionou-se 100 µL/poço da anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase (conjugado) diluído a 1:100 e foi realizado uma nova incubação e lavagem da placa, conforme descrito anteriormente.

A reação foi evidenciada ao adicionar 100 µL/poço de Tetrametilbenzidina-TMB (cromógeno) que pela ação da peroxidase com peróxido de hidrogênio, forma um composto de coloração azul turquesa. Para interromper a reação, adicionou-se 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2 Molar. A reação passa a apresentar a coloração amarela em caso positivo e sem desenvolvimento de cor caracteriza-se uma reação negativa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro equipado com filtro de 450 nanômetros.

4.6 Kit LeishFlow

4.6.1 Ensaio sorológico empregando o Kit LeishFlow

O protótipo de kit LeishFlow avaliado neste estudo está inscrito no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil) sob o número da patente BR 1020120047420, depositada em 2 de março de 2012 e finalmente concedida em 2021. A metodologia para preparação do antígeno e das condições de reação foram realizadas conforme descrito anteriormente por Gama Ker et al. (2013b) e Ker et al. (2013).

Os ensaios sorológicos de citometria de fluxo foram realizados segundo protocolo descrito na bula do kit LeishFlow (Anexo C). Assim, o antígeno de *L. infantum* foi preservado em 0,5% de formaldeído e o anticorpo marcado com IgG foram armazenados a 4° C. Resumidamente, 50 µL das suspensões de antígeno ($5,0 \times 10^5$ parasitas / poço) foram incubados a 37 °C por 30 min na presença de 50 µL de amostras de soro diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com Soro Fetal Bovino (SFB) a 3%, em uma diluição de 1: 4096, usando uma placa de fundo em “U” de 96 poços (Linbro, ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio). Após a incubação, a suspensão do parasita foi lavada duas vezes com 150 µL de PBS com SFB a 3% e centrifugado a 2200 rpm por 10 min a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em vórtex e reincubado no escuro, por 30 min a 37 °C na presença de 50 µL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-IgG canina - anticorpo marcado (número de catálogo AAI32F; Lote nº 230215; BIO-RAD), previamente diluído a 1:1000 em PBS. Depois da incubação foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS com SFB a 3% através da centrifugação a 2200 rpm por 10 min a 4 °C. Os parasitas marcados foram ressuscitados em 250 µL de Solução fixadora - MFF (10 g / L de paraformaldeído, 10,2 g / L de acodilato de sódio e 6,65 g / L de cloreto de sódio, pH 7,2; Sigma ChemicalCorp., St. Louis, MO, EUA) e mantido por pelo menos 30 min a 4 °C no escuro antes da leitura no citômetro de fluxo. Para cada amostra foi feita a aquisição de vinte mil eventos no citômetro de fluxo conforme bula do kit LeishFlow.

4.6.2 Análise de dados por citometria de fluxo

A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson, San Diego) empregando o software Cell Quest (Becton Dickinson, San Diego). Na Figura 3 demonstra a análise dos dados realizada através do software FlowJo® (FlowJo, Ashland, Oregon, EUA). Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas ao tamanho (FSC - Forward Scatter), granulosidade ou complexidade interna (SSC - Side Scatter) e intensidade relativa de fluorescência dos parasitos incubados com anticorpos marcados com FITC que, quando excitados, emitem sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1-fluorescência verde). A reatividade foi expressa como a porcentagem de parasitas positivos para fluorescência. O valor de corte empregado no teste foi o mesmo utilizado e descrito por Ker et al. (2013), empregando o valor de 20% ponto de corte entre os resultados positivos (PPFP>20%) (Figura 3B) e negativos (PPFP≤20%) (Figura 3C). Assim,

utilizou-se a estratégia de análise *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para definição do melhor ponto de corte para o teste e avaliação da acurácia global da AAPF. (KER et al., 2013).

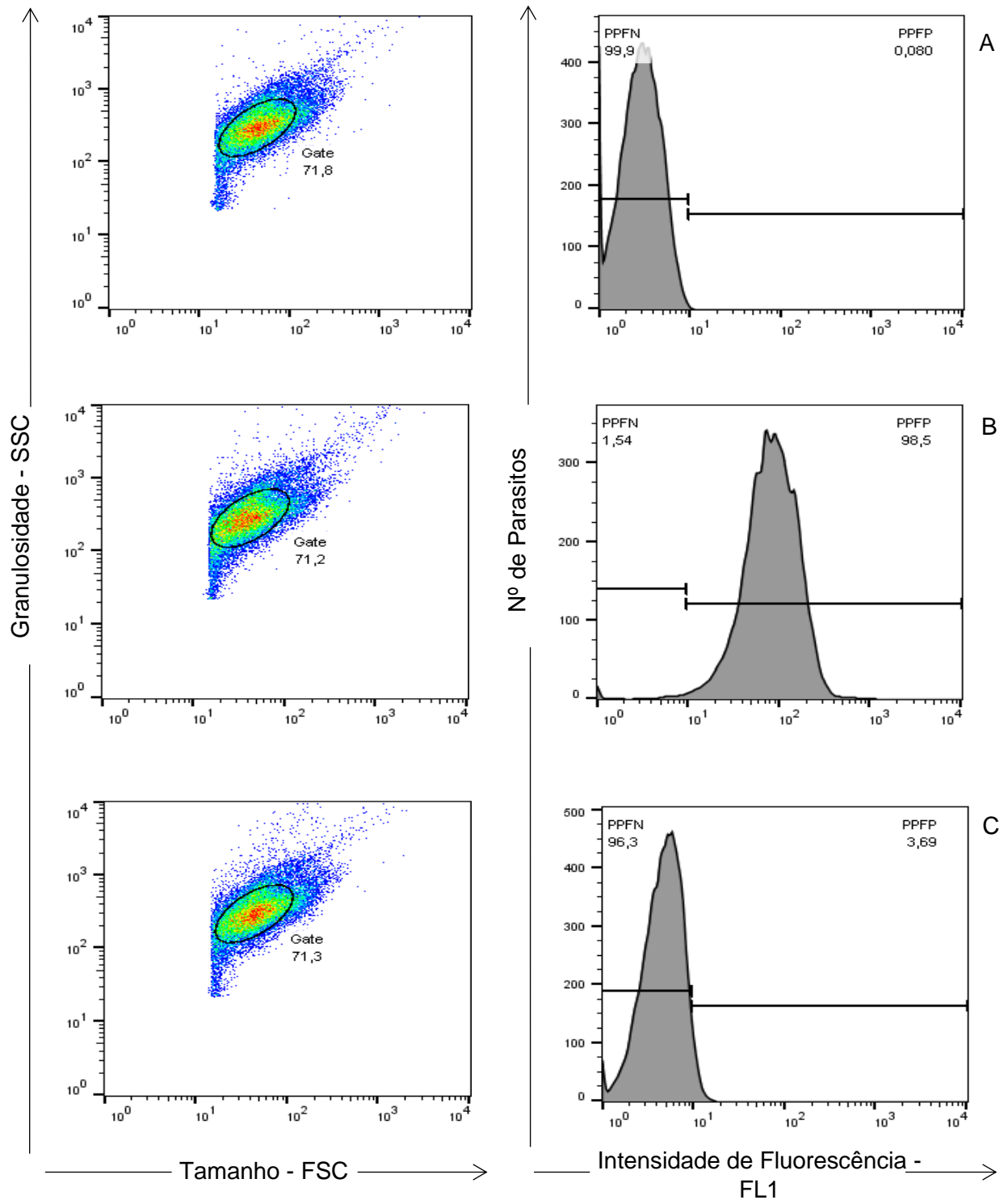


Figura 3 - Representação esquemática da sequência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. A primeira coluna representa a seleção de promastigotas de *L. infantum* utilizando parâmetro de tamanho (FSC) e Granulosidade (SSC). Segunda coluna são histogramas representando o percentual de promastigotas fluorescentes positivas (PPFP) e negativas (PPFN), de acordo com a Intensidade de Fluorescência (FL-1) e o número de parasitos. (A) controle do Conjugado, (B) cão Infectado, (C) cão não infectado.

A análise da reatividade de anticorpos presentes no soro anti-formas promastigotas de *L. infantum* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse por um “gate” no gráfico FSC x SCC (gráficos da primeira coluna da Figura 3). Para avaliar a intensidade média de fluorescência (FL1) da população selecionada (parasitos dentro do “gate”), histogramas foram construídos em função do número de parasitos (FL1 x N° de parasitos – gráficos da segunda coluna da figura 3). Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros e revelados com os anticorpos anti-IgG caninos marcados com FITC foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) e percentual de parasitos fluorescentes negativos (PPFN). O PPFP e PPFN para cada amostra de soro foi determinado através do estabelecimento de um marcador de reatividade (representado pela linha) em função da fluorescência obtida para o controle isotópico da reação (Figura 3A). O posicionamento do marcador (linha) para todas as amostras da placa seguiu sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. Desta forma, foi empregando a posição deste marcador (linha) em todas as amostras da placa, tendo como base o controle isotópico da reação (Figura 3A). Assim, se a PPFP for maior que 20% a amostra foi considerada positiva (Figura 3B) e se a PPFP for abaixo de 20% a amostra foi considerada negativa (Figura 3C).

Nesse sentido, para controle interno e monitoramento de ligações não específicas, bem como para definição o marcador para PPFP e PPFN, os parasitos foram incubados na ausência de soro de cão e presença do reagente secundário marcado com FITC -controle do conjugado (Figura 3A). Além disso, foram incluídos para todas as placas do experimento 2 controles positivos (parasitológico positivo – PCR da medula óssea; e sorológico duplo positivo no TR-DPP® e EIE-LVC), 4 controles negativos de canil (parasitológico negativo e sorológico duplo negativo no TR-DPP® e EIE-LVC) e 4 controles negativos de área endêmica (sorológico duplo negativo no TR-DPP® e EIE-LVC). Foi realizado também a repetição de 216 amostras (14%) para controle interno da reação por placa, em que cada placa continha replicatas escolhidas de forma aleatório.

4.6.3 Confeção e validação do Kit LeishFlow

Para ajustar e comprovar as determinações das condições ideais de reação sorológica propostas por Ker et al. (2013) e presentes na bula do Kit LeishFlow, realizou-se uma nova

confeção e validação de um novo lote do Kit LeishFlow. O objetivo foi definir e validar: (i) a nova preparação antigênica produzida e suas condições (armazenamento, conservação e fixação); (ii) a concentração apropriada do novo revelador/conjugado anti-imunoglobulina G canino marcado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC); (iii) a diluição adequada de soro, para separar as amostras de cães dos grupos infectados e não infectados. Para isso, primeiramente, foi produzido um novo lote do antígeno de formas promastigotas fixadas de *L. infantum* cepa PP75. No segundo momento, empregando esse novo lote de antígeno foi realizado a reação sorológico por citometria de fluxo (conforme descrito no item 4.6.1) empregando diluições seriadas (1:128 a 1:262.144) de um pool de soro positivo (5 amostras diferentes de cães infectados) e um pool de soro negativo (5 amostras diferentes de cães controle não infectados) em três diluições diferentes para o novo conjugado (1:500, 1:1.000 e 1:2.000).

4.6.3.1 Preparo do antígeno - formas promastigotas fixadas de *L. infantum* cepa MHOM/BR/1974/PP75

Os parasitos, no sexto dia de cultivo em LIT, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Diego), homogeneizados em vórtex a baixa rotação para dissolver os grumos de parasitos (Gomes, 2006). Em seguida, a suspensão celular foi submetida a uma centrifugação diferencial (25°C, 200rpm por 10 minutos) para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitos no sedimento. Para recuperação dos parasitos no sobrenadante, estes foram deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS contendo 3% de SFB, por duas vezes, por centrifugação a 4°C, 2.200rpm por 10 minutos. Os sedimentos formados foram homogeneizados cuidadosamente, ressuspendidos em 10 mL de PBS 3% de SFB e agrupados em um único volume. Posteriormente, uma alíquota de 10µL foi separada e diluída (1:10) para a realização da contagem do número de parasitos no aparelho BC-Vet 2800, Mindray[®]. Ao final das etapas de lavagem e contagem do número de parasitos, a suspensão celular foi ajustada para 5×10^7 promastigotas/mL na solução conservantes de Formol 0,5%. Posteriormente, a preparação antigênicas foi alíquotadas em frações de 1 mL em tubos de criopreservação estéreis e, em seguida, armazenadas na temperatura de: 4°C (geladeira) (GAMA KER et al., 2013b).

4.6.3.2 Validação da diluição ideal do soro e conjugado

Para a validação do novo Kit foram feitos dois pools de soros de amostras da soroteca do Laboratório de Imunopatologia (LIMP/NUPEB/UFOP) composto por:

- Pool de soros negativos: 5 soros de cães do grupo não infectados nascidos, criados e mantidos no canil do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP que apresentavam exames sorológicos (RIFI e EIE-LVC) negativos para LVC;
- Pool de soros positivos: 5 soros de cães do grupo infectado (2 assintomáticos, 1 oligosintomático e 2 sintomáticos) provenientes do município de Belo Horizonte fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (CCZ-BH) que apresentavam exames sorológicos (RIFI e EIE-LVC) positivos para LVC.

Os resultados da validação foram obtidos após a incubação dos pools de soros caninos com as formas promastigotas fixadas de *L. infantum*, previamente produzidas (conforme item 4.6.3.1), e realização do ensaio sorológico por citometria de fluxo (conforme descrito no item 4.6.1).

Para definir as concentrações apropriadas usamos como ponto de corte entre os animais infectados e não-infectados a reatividade das promastigotas fixadas expressos como percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), conforme descrito anteriormente (item 4.6.2).

4.7 Análises aplicadas à avaliação de desempenho diagnóstico do Kit Leishflow

Para avaliar o desempenho do Kit LeishFlow foram estabelecidos dois padrões de referência: (i) a combinação dos testes TR-DPP® e EIE-LVC ou (ii) apenas o teste TR-DPP®.

Para avaliar o desempenho do Kit LeishFlow foram utilizados índices de validade que se refere à quanto, em termos quantitativos ou qualitativos, um teste é útil para diagnosticar um evento. Para a realização das análises comparamos os resultados do LeishFlow com os testes considerados padrão ouro ou referência, testes estes preconizados pelo MS. Os cálculos foram realizados a partir dos resultados das quatro categorias de acordo com a presença ou ausência da infecção. As categorias descritas na Tabela 1 foram definidas da seguinte forma:

“verdadeiro-positivo” [(a)] = presença de infecção e teste positivo; “falso-positivo” [(b)] = ausência de infecção e teste positivo; “falso-negativo” [(c)] = presença de infecção e teste negativo e “verdadeiro-negativo” [(d)] = ausência de infecção e teste negativo. De acordo com a Tabela 1, a tabela similar foi preenchida com base no número de ocorrências de cada uma das categorias. (a, b, c, e d).

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

		Teste analisado		
		Positivo	Negativo	Total
Padrão de referência	Infectado	a	c	a + c
	Não Infectado	b	d	b + d
Total		a + b	c + d	a+b+c+d

As análises de dados foram conduzidas usando o software Stata (versão 11.0; Stata Corporation, College Station, TX), e a performance da sorologia de citometria de fluxo foi avaliado por porcentagens. Os dados e gráficos apresentados foram processados com GraphPad Prism, versão 5.0 (La Jolla, CA, EUA).

O desempenho do LeishFlow foi avaliado por sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positivo (RV+), razão de verossimilhança negativo (RV-) e concordância/acurácia, utilizando os resultados dos testes sorológicos TR-DPP® e EIE-LVC como padrões de referência (intervalo de confiança de 95%). Os resultados do desempenho do LeishFlow seguiram as fórmulas descritas na tabela 2, tendo como base os resultados obtidos na tabela 1 (GREENHALGH, 1997; KER et al., 2013).

Pelo software Stata foi avaliado também a prevalência quando utilizado o Kit LeishFlow e quando utilizado o padrão de referência. Além disso, calculou-se também a concordância e índice Kappa entre o protótipo LeishFlow e o padrão de referência (TR-DPP® e EIE-LVC). Para estimar a concordância entre a positividade e a negatividade dos testes sorológicos utilizou-se o Índice *Kappa*, que foi interpretado de acordo com a seguinte categorização: (1) $\kappa < 0,01$, sem concordância; (2) $0,01 \leq \kappa \leq 0,20$, concordância ruim; (3) $0,21 \leq \kappa \leq 0,40$,

concordância fraca; (4) $0,41 \leq \kappa \leq 0,60$, concordância moderada; (5) $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$, boa concordância; e (6) $\kappa > 0,81$, concordância excelente (LANDIS; KOCH, 1977).

Tabela 2 - Fórmulas para cálculos dos parâmetros estatísticos com base nos resultados apresentados na Tabela 1

	Resultados
Sensibilidade	$a/a+b$
Especificidade	$d/c+d$
VPN	$d/b+d$
VPP	$a/a+c$
Acurácia	$a+d/a+b+c+d$

5. RESULTADOS

5.1 Validação do novo lote do Kit LeishFlow para estabelecimento das condições metodológicas do estudo em larga escala

A análise da validação do novo lote antigênico de promastigotas fixadas de *L.infantum*, conservadas em formaldeído 0,5% em temperatura de geladeira foi feita com amostras de pool de soros positivos e negativos e seus resultados se encontram na Figura 4.

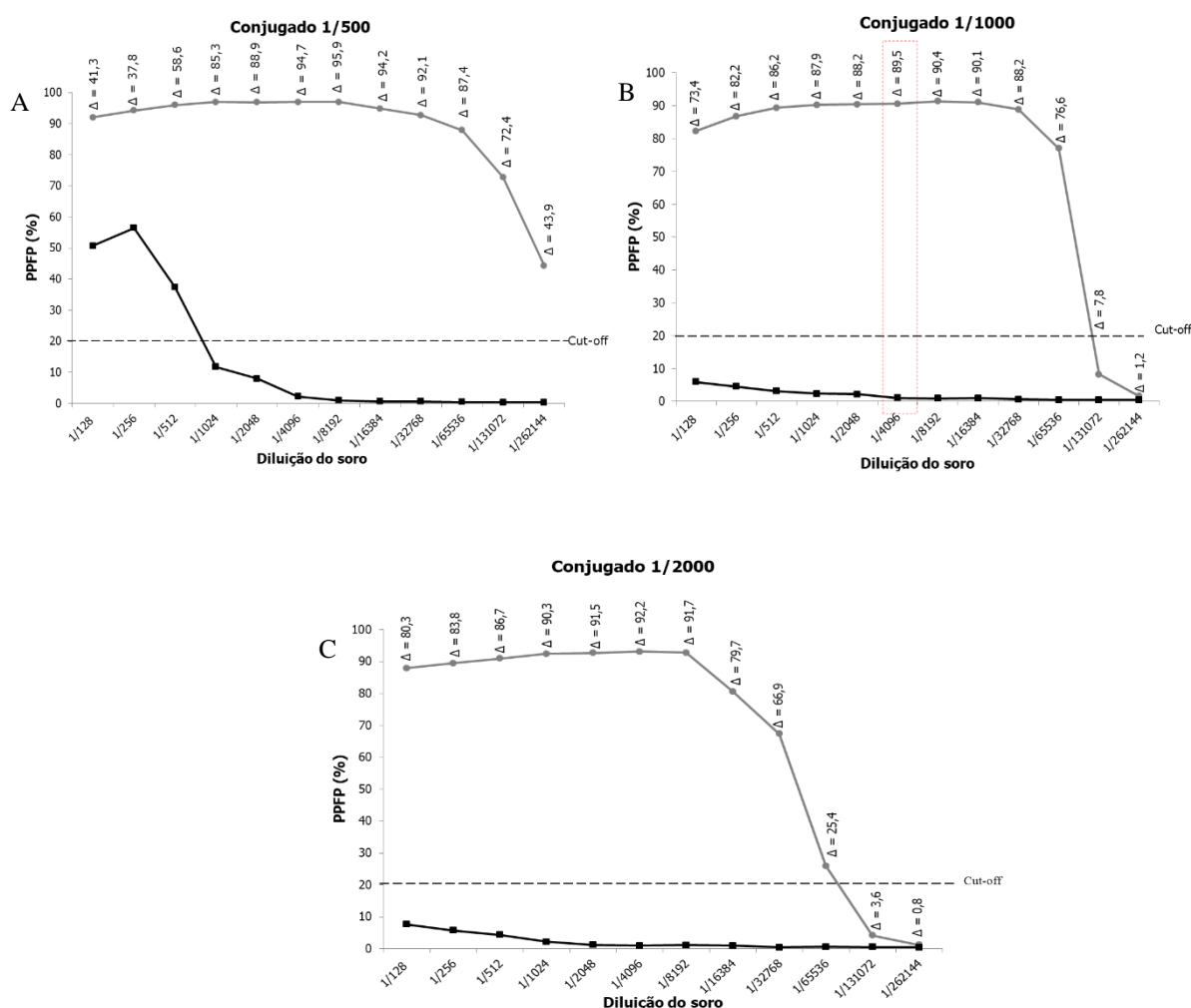


Figura 4 - Curvas de diluições (1/128 a 1/262177) de pool de soros de cães não infectados (NI = ■) e infectados (INF = ◆) incubados com diferentes titulações do anticorpo anti-IgG caninos conjugado com FITC (A) 1:500, (B) 1:1000 e (C) 1:2000. O cut-off $\geq 20\%$ PPFP foi estabelecido conforme Ker et.al (2013). A linha pontilhada em vermelho corresponde a diluição escolhida do soro e do conjugado.

A validação constatou que em pool de soros positivos de cães infectados, os valores de PPFP da diluição 1/128 até a 1/262.144 para a titulação 1:500 do anticorpo, apresentaram-se

acima de 20% de PPF e assim foram considerados positivos em todas as diluições do soro, bem como para as diluições de 1/128 até 1/65538 para as titulações 1:1000 e 1:2000 (Figura 4A, 4B e 4C). No entanto, nas titulações do conjugado de 1:1.000 e 1:2000, as diluições do soro de cães infectados em 1:131.072 e 1:262.144 apresentaram abaixo do ponto de corte de 20% de PPF (Figura 4B e 4C).

Ao avaliar as curvas de titulação de anticorpos dos animais não infectados, os valores PPF da diluição do soro 1/128 até 1/512 na titulação do conjugado 1:500 foram positivos, ou seja, apresentaram-se acima do ponto de corte (Figura 4A). Em contrapartida, quando o anti-corpo foi titulado 1:1000 e 1:2.000, os valores de PPF iniciam negativos na diluição 1:128 e permanecem negativos até 1/262144 (Figura 4A, 4B e 4C).

Considerando os resultados da reatividade das PPF na validação do novo lote do kit LeishFlow observamos resultados semelhantes ao estudo realizado por Ker et.al (2013) e que são preconizados na bula do Kit LeishFlow. Nesse sentido, a escolha da diluição ideal do soro bem como da diluição do conjugado para as análises subsequentes do ensaio sorológico foram 1:4096 e 1:1000, respectivamente (retângulo tracejado em vermelho, Figura 4B), uma vez que observa boa amplitude diagnóstica na segregação dos animais infectados dos não infectados.

A seleção das condições ideais seguiram o mesmo critério estabelecido para o teste por citometria de fluxo proposto por Gama Ker et al.(2013b), em que determina que um ponto ótimo da curva de titulação deve corresponder a um título de soro que se encontra entre dois outros títulos que apresentem excelente diferenciação de reatividade entre NI e INF. Isto é, esta região da curva de titulação deve apresentar diferenciação da reatividade sorológica entre os pool de soro NI e INF com uma amplitude de variação no PPF superior a 85% ($\Delta\text{PPF} \geq 85$).

5.2 Testes sorológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: TR-DPP®, EIE-LVC e LeishFlow

Para compor este estudo sorológico, foram utilizadas 1.546 amostras de soro de cães da cidade de Governador Valadares no estado de Minas Gerais, Brasil, uma área endêmica de leishmaniose visceral. Desses animais, 1.013 (65,5%) foram soronegativos e 533 (34,5%) soropositivos para TR-DPP®. Do total de animais TR-DPP® positivos, 251 (16,24%) apresentaram resultados negativos e 282 (18,24%) positivos no teste de EIE-LVC. Utilizando o padrão

de referência, que consiste nos parâmetros do Ministério da Saúde, nos quais para afirmar que o animal é positivo, ele deve ser sorologicamente duplo-positivo (TR-DPP® e EIE-LVC), assim, 18,24% (282 / 1.546) dos animais foram considerados verdadeiramente positivos no estudo. O LeishFlow apresentou 1.091 (70,6%) dos animais negativos e 455 (29,4%) positivos. A Figura 5 representa um fluxograma com informações detalhadas sobre a população canina avaliada no estudo de acordo com os resultados sorológicos para o diagnóstico da LVC nas diferentes metodologias avaliadas (TR-DPP®, EIE-LVC e LeishFlow). Realizamos o controle interno da reação do kit LeishFlow executando duplicatas das placas (14% das amostras analisadas na placa). Nessas análises encontramos a concordância entre as duplicatas de 98,1% com Kappa de 0,96.

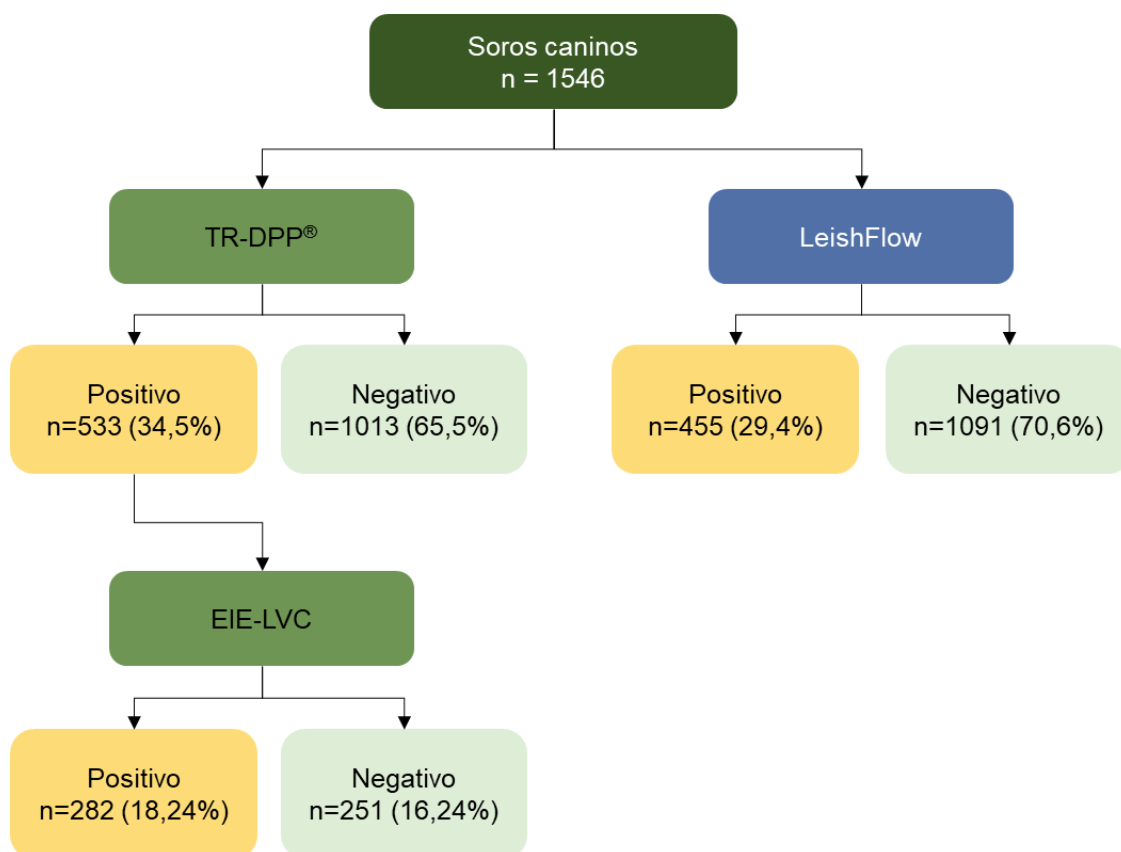


Figura 5 - Fluxograma da estratégia experimental que descreve a população canina da área endêmica do estudo e os resultados obtidos pelos diferentes testes sorológicos (TR-DPP®, EIE-LVC e LeishFlow) aplicados para detecção da leishmaniose visceral canina.

5.3 Análise de concordância do teste diagnóstico sorológico LeishFlow em relação aos padrões de referência TR-DPP® e EIE-LVC versus LeishFlow ou TR-DPP® versus LeishFlow

Após o ensaio sorológico, realizamos uma avaliação mais detalhada da concordância e desempenho do teste LeishFlow em larga escala em comparação com os testes TR-DPP® e EIE-LVC. O desempenho do LeishFlow é demonstrado na figura 6A, através da distribuição da reatividade IgG das formas promastigotas de *Leishmania infantum* estratificadas por grupos: TR-DPP® negativo (n = 1.013) onde LeishFlow foi positivo em 125 (12,3%) amostras; grupo TR-DPP® positivo (n = 533) no qual 330 (62,1%) amostras foram positivas no LeishFlow; grupo duplo-positivo TR-DPP® e EIE-LVC (n = 282) com 249 (88,3%) soropositivos no teste LeishFlow; e grupo TR-DPP® positivo e EIE-LVC negativo (n = 251) em que LeishFlow foi positivo em 81 (32,3%) das amostras de soro.

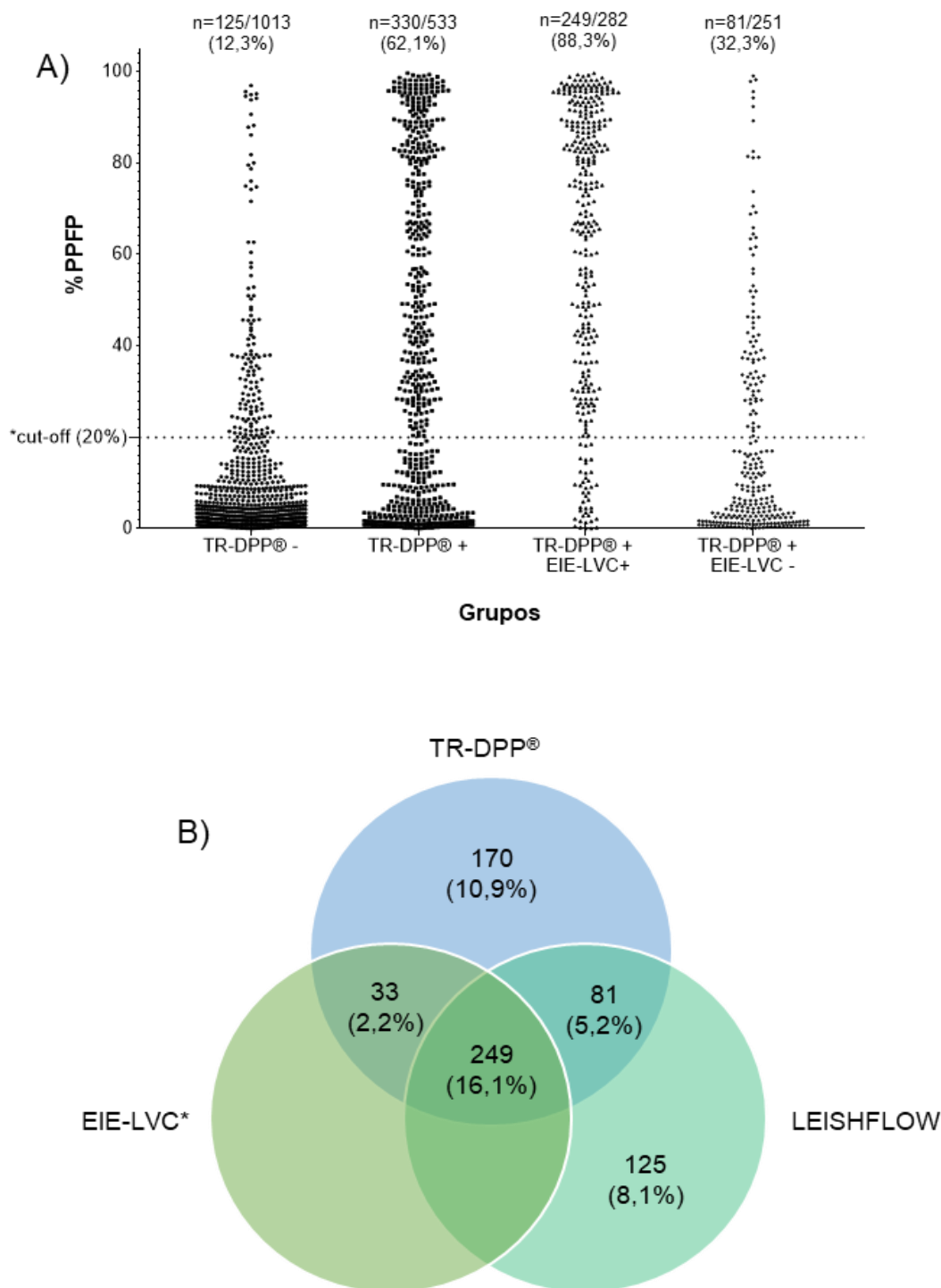


Figura 6 - (A): Teste de diagnóstico sorológico por citometria de fluxo empregando LeishFlow em diferentes grupos. Os resultados são expressos como porcentagens de parasitas fluorescentes positivos (PFP) para amostras individuais em cada grupo: TR-DPP® negativo (●) n = 1013, TR-DPP® positivo (■) n = 533, TR-DPP® positivo e EIE-LVC (▲) n = 282, positivo TR-DPP® e EIE-LVC negativo (◆) n = 251. Os valores percentuais correspondem aos valores positivos nos testes de LeishFlow em comparação com o número total de cada grupo. As amostras acima do cut-off (PFP de 20%) são consideradas positivas no teste LeishFlow. **(B):** Gráfico de interseção dos resultados positivos nos testes TR-DPP®, EIE-LVC* e LeishFlow. Os valores percentuais correspondem aos valores positivos em relação ao número total de amostras do estudo. *Não há resultados em algumas interseções com o teste EIE-LVC, uma vez que os resultados do EIE-LVC só são realizados/obtidos em cães com resultados TR-DPP® positivos.

A figura 6B representa uma análise gráfica da intersecção das amostras com resultados positivos nos testes TR-DPP[®], EIE-LVC e LeishFlow. Ao analisar as 1546 amostras de soro, encontramos 249 amostras (16,1%) positivas nos três testes utilizados (Figura 6B). Na avaliação dos animais positivos tanto no teste TR-DPP[®] quanto no teste EIE-LVC (n total=249+33=282), testes padrão de referência do Ministério da Saúde, apenas 33 (2,2%) foram negativos no LeishFlow (ou seja, 249 de 282 amostras foram positivas nos três testes) (Figura 6B). É importante salientar que 1264 amostras foram consideradas negativas nos testes padrão de referência, sendo que destas, 1058 amostras (68,4%) foram negativas nos três testes sorológicos (TR-DPP[®], EIE-LVC e LeishFlow), e 206 amostras (13,3%) foram negativas nos dois testes TR-DPP[®] e EIE-LVC, mas positivas no LeishFlow.

Quando analisamos como padrão de referência sorológica apenas o TR-DPP[®], dos animais TR-DPP[®] positivos (n total= 533), 170 animais foram positivos apenas no TR-DPP[®], sendo negativas na EIE-LVC quanto no LeishFlow. Houve a concordância de 330 amostras positivas no TR-DPP[®] e LeishFlow (Tabela 3). Entretanto, 81 amostras (5,2%) das 330 amostras foram positivas no TR-DPP[®] e LeishFlow, mas negativas na EIE-LVC (Figura 6B). Enquanto que 203 amostras (170 + 33) (10,9% + 2,2%= 13,1%) foram negativas no LeishFlow, mas positivas no TR-DPP[®] (sendo 170 positivas apenas no TR-DPP[®] e 33 positivas no TR-DPP[®] e EIE-LVC). É importante salientar que 125 amostras (8,1%) foram positivas apenas no teste sorológico pelo LeishFlow, sendo negativas no TR-DPP[®]. É importa frisar sobre estas 125 amostras, que não podemos afirmar se são também negativas na EIE-LVC, pois só foi feito EIE-LVC nas amostras positivas para o TR-DPP[®] (Figura 6B e Tabela 3). Houve a concordância de 888 amostras duplo negativas no TR-DPP[®] e LeishFlow (Tabela 3).

Na tabela 3, analisamos também a concordância entre o TR-DPP[®] e a EIE-LVC, salientando que só realizamos os testes de EIE-LVC nas amostras positivas para o TR-DPP[®] (n Total= 533). Assim observamos a concordância de 282 amostras (18,2%) duplo positivas, enquanto que 251 amostras (16,2%) foram positivas apenas no TR-DPP[®], mas negativas na EIE-LVC.

Tabela 3 - Valores absolutos dos resultados dos testes de diagnóstico sorológico TR-DPP[®], EIE-LVC. e LeishFlow de acordo com o padrão de referência estabelecido. Cálculo de valores de concordância (%) e índice *kappa* (IC 95%)

Padrão de Referência		LeishFlow			Concordância (%)	Kappa
		Positivo	Negativo	Total		
TR-DPP [®]	Positivo	330	203	533	78,8	0,51
	Negativo	125	888	1013		
	Total	455	1091	1546		
TR-DPP [®] e EIE-LVC	Positivo	249	33	282	84,5	0,58
	Negativo	206	1058	1264		
	Total	455	1091	1546		
EIE-LVC						
TR-DPP [®]	Positivo	282	251	533	52,9*	
	Negativo	0	1013	1013		
	Total	282	1264	1546		

* Resultados concordantes de positivos nos dois testes, visto que se faz EIE-LVC apenas das amostras TR-DPP[®] positivo

Na Tabela 3, podemos observar os valores absolutos dos resultados descritos acima, além disso, calculamos a concordância e índice *kappa* entre os testes TR-DPP[®] + EIE-LVC + versus LeishFlow, TR-DPP[®] + versus LeishFlow e, TR-DPP[®] + versus EIE-LVC. Nos resultados podemos observar um valor de 84,5% para concordância e 0,58, para índice *kappa*, quando comparamos animais duplo positivos (TR-DPP[®] e EIE-LVC) ao LeishFlow. Porém, quando comparamos os dados de TR-DPP[®] + e LeishFlow há uma diminuição do valor de concordância e do índice *kappa*, com valores de 78,8% e 0,51, respectivamente. É importante salientar que quando avaliamos a concordância entres os testes TR-DPP[®] e EIE-LVC não acrescentamos os resultados concordantes de negativos nos dois testes, visto que se faz EIE-LVC apenas dos TR-DPP[®] positivo, dessa forma, a concordância entre os testes foi de 52,9%, e não há possibilidade de cálculo para índice *kappa*.

5.4 Análise do desempenho do teste sorológico LeishFlow em relação aos padrões de referência: TR-DPP[®] e EIE-LVC versus LeishFlow ou TR-DPP[®] versus LeishFlow

Para as análises soroepidemiológicas, considerou-se o padrão de referência pré-estabelecido pelo Ministério da Saúde, que considera TR-DPP[®] e EIE-LVC como testes sorológicos.

A Tabela 4 mostra detalhadamente os parâmetros como: sensibilidade, especificidade, bem como, valores preditivos negativo e positivo, com seus respectivos valores de intervalo de confiança (95%) dos imunoenaios com base no padrão de referência estipulado (TR-DPP® e EIE-LVC ou apenas TR-DPP®).

Tabela 4 - Avaliação soroepidemiológica de acordo com o padrão de referência estabelecido. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo (VPP e VPN).

Padrão de Referência	% (IC 95%)			
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
TR-DPP® + EIE-LVC +	88,3 (84,0 - 91,5)	83,7 (81,6 - 85,6)	54,7 (50,1 - 59,2)	96,97 (95,8 - 97,8)
TR-DPP® +	61,9 (57,7 - 65,9)	87,7 (85,5 - 89,5)	72,5 (68,2 - 76,4)	81,4 (78,9 - 83,6)

O LeishFlow mostrou uma sensibilidade de 88,3% e especificidade de 83,7%, VPN de 96,97% e VPP de 54,7%, quando relacionado ao padrão de referência preconizado pelo Ministério da Saúde (TR-DPP® e EIE-LVC) (Tabela 4).

Ao considerarmos como padrão de referência estabelecido apenas os resultados do teste sorológico TR-DPP® para realização da análise de desempenho do teste LeishFlow, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 61,9% e 87,7%, respectivamente, o VPN de 72,5% e VPP de 81,4% (Tabela 4).

Para constataremos o desempenho do LeishFlow com relação a sintomatologia clínica dos animais, realizou-se a avaliação soroepidemiológica estratificando animais assintomáticos e sintomáticos (Tabela 5). Dessa forma, o LeishFlow quando equiparado ao TR-DPP® e EIE-LVC) em animais assintomáticos mostrou uma sensibilidade de 87,1% e especificidade de 84,7%, a acurácia foi de 85%, e 0,56 de índice *Kappa*. Considerando apenas animais sintomáticos e a utilização do mesmo padrão de referência, o teste LeishFlow obteve os valores de sensibilidade e especificidade de 95,1% e 72,7%, respectivamente, enquanto a acurácia foi de 82,3%, e o índice *Kappa* foi de 0,49.

Tabela 5 - Avaliação soropidemiológica com estratificação de animais em Sintomáticos e Assintomáticos. Cálculos de sensibilidade, especificidade, acurácia e índice *Kappa*.

Padrão de referência	% (CI 95%)			<i>Kappa</i>
	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	
TR-DPP®/EIE-LVC+	87,1	84,7	85,0	0,56
CA	(82,3–90,7)	(82,6–86,6)	(83,2–86,8)	
TR-DPP®/EIE-LVC +	95,1	72,7	82,3	0,49
CS	(83,9–98,6)	(59,8–82,7)	(73,5–88,6)	

CA = cães assintomáticos; CS = cães sintomáticos

Com o intuito de melhor avaliar o desempenho do LeishFlow, além das análises descritas, realizou-se também as razões de verossimilhança (Tabela 6). As razões de verossimilhança expressam quantas vezes é mais provável (ou menos) de encontrar um resultado de um teste diagnóstico. As razões de verossimilhança positiva e negativa em comparação ao padrão de referência (TR-DPP® e EIE-LVC) foi de 5,42 e 0,13, respectivamente. As razões de verossimilhança positiva e negativa em comparação ao TR-DPP® revelou valores de 5,02 e 0,43, respectivamente.

Tabela 6 - Valores de Razão de Verossimilhança Positivo e Negativo, de acordo com o padrão de referência estabelecido.

Padrão de Referência	Razão de Verossimilhança Positivo	Razão de Verossimilhança Negativo
TR-DPP® e EIE-LVC	5,42	0,13
TR-DPP®	5,02	0,43

5.5 . Análise da prevalência da área endêmica em relação a sorologia pelos imunoen- saio: TR-DPP® associado a EIE-LVC ou LeishFlow sozinho

A prevalência de infecção na área endêmica, que se refere ao número de casos existentes de uma doença em um dado momento, foi determinada a partir dos resultados duplo-positivos, TR-DPP® associado a EIE-LVC, e também a partir dos resultados obtidos pelo LeishFlow. A prevalência do padrão de referência (TR-DPP® associado a EIE-LVC) foi de 18,24% (IC95% 16,4 - 20,24) e o LeishFlow obteve prevalência de 29,43% (IC95% 27,21 - 31,75) (Tabela 7). Para o teste sorológico empregando o LeishFlow, foi realizada uma avaliação usando diferentes cenários de prevalência artificial e os dados para esta avaliação são apresentados na Figura 7 (pagina seguinte). O valor preditivo negativo do teste de LeishFlow tende a cair ligeiramente em prevalências acima de 20%. Por outro lado, o Valor Preditivo Positivo mostra um ligeiro aumento à medida que a prevalência sobe para níveis acima de 25%.

Tabela 7 - Valores de prevalência na área endêmica de Governador Valadares/Minas Gerais, ao usar os testes preconizados pelo MS (TR-DPP® e EIE-LVC) e o LeishFlow.

Teste Diagnóstico	Prevalência (%)	Intervalo de confiança (IC95%)
TR-DPP® e EIE-LVC	18,24	16,4 - 20,24
LeishFlow	29,43	27,21 - 31,75

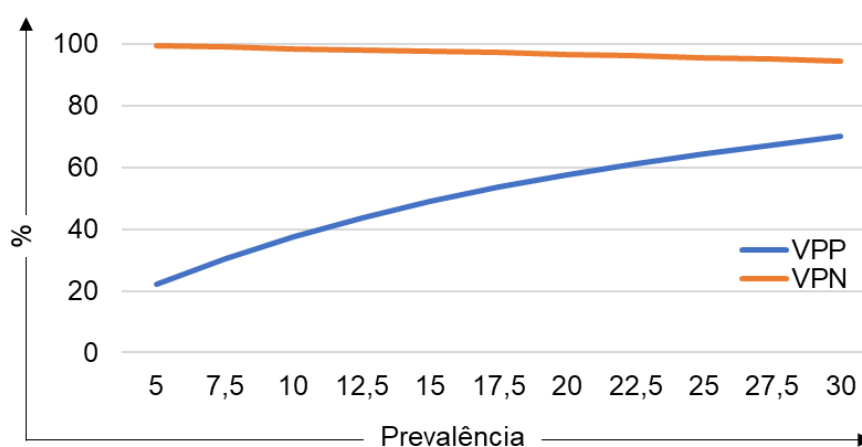


Figura 7 - Análise dos valores preditivos em diferentes cenários artificiais usando o teste de LeishFlow: VPP – Valores preditivos positivos (—); VPN = Valores preditivos negativos (—).

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da LVC é imprescindível para a vigilância, controle e prevenção da LV em áreas endêmicas. Os testes *Dual Path Platform* (TR-DPP®) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (EIE-LVC), ambos fabricados pela Biomanguinhos, Fiocruz, RJ/Brasil são recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de cães em inquéritos caninos e estudos epidemiológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados atualmente pelo poder público no Brasil para avaliar a LVC no campo, tem sido questionado devido à sua acurácia imperfeita que, conseqüentemente, impacta na eficácia de medidas de controle (COSTA et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2019; PESSOA-E-SILVA et al., 2019).

No contexto diagnóstico, a citometria de fluxo é uma técnica imprescindível dentro dos laboratórios de análise clínica pela sua capacidade e eficiência diagnóstica pelos métodos de imunofenotipagem. Nos últimos anos, a citometria de fluxo vem também se destacando pelo seu potencial no diagnóstico sorológico em doenças infecto-parasitárias (CARVALHO NETA et al., 2006; MARTINS-FILHO et al., 1995; MATOS et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; PISSINATE et al., 2008). Nesse sentido, a investigação realizada no presente estudo refere-se à validação em larga escala de um Kit sorológico para LVC baseado em citometria de fluxo, denominado LeishFlow, e a avaliação do seu desempenho frente aos métodos de diagnóstico sorológico para LVC preconizados pelo Ministério da Saúde (TR-DPP® e EIE-LVC).

A primeira etapa do nosso estudo consistiu na confecção de um novo lote do kit LeishFlow e sua validação em um *pool* de soros não infectado (NI) e outro infectado (INF), com intuito de selecionar/chechar as melhores condições da reação a serem empregadas na pesquisa, tais como: a concentração do anticorpo conjugado (FITC) e as melhores diluições de soro a serem utilizadas na reação sorológica conjuntamente com o antígeno (promastigotas fixadas de *Leishmania infantum*) recém produzido. Dessa forma, a análise da validação do novo lote antigênico mostrou que houve reatividade sorológica diferencial entre grupo de animais infectados e não infectados, em todas as titulações de anticorpos, como demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que visaram o desenvolvimento biotecnológico do kit LeishFlow e, assim, a padronização da técnica e as melhores condições sororreativas, bem como as condições de conservação e preservação antigênica (GAMA KER et al., 2013b; KER et al., 2013).

Na nova validação do kit LeishFlow as curvas de reatividade do pool de soros de cães do grupo não infectado (NI), em todas as diluições aplicadas, denotam valores baixos de PFP nas diluições do conjugado de 1:1000 e 1:2000, o que indica uma especificidade excelente da técnica empregada. Por outro lado, nas diluições do conjugado 1:500 no grupo NI houve a variação dos valores de PFP relacionados as diluições mais baixas do pool de soro, inclusive há a positividade de algumas diluições, é importante ponderar que o pool de soros NI reflete o somatório da reatividade individual de cada soro aplicado. Portanto, a positividade advém da interação de epítomos semelhantes ao antígeno alvo e, quando avaliado as amostras individuais, os resultados positivos decerto não estariam presentes. Além disso, ao diluir mais o pool de soros, observamos que essa interação diminui consideravelmente, o que acarreta na queda de ligações inespecíficas.

Ao observar a reatividade do pool de soros de cães do grupo infectado (INF), presenciase, em todas as diluições dos conjugados, valores elevados de PFP na maior parte das diluições de soro empregadas. É notável a queda nos valores de PFP com a intensificação da diluição das amostras, condição essa esperada em consequência da diluição promover uma redução do número de anticorpos presentes para a interação da reação sorológica, e assim não há a formação do complexo antígeno-anticorpo. A técnica de citometria de fluxo se baseia em variações na dispersão da luz produzidas por lasers que interceptam as partículas em suspensão (nesse caso, o antígeno composto por promastigotas totais), além de anticorpos marcados com fluorocromos específicos para identificação das amostras positivas. Um dos ganhos do kit LeishFlow é exatamente relacionado a metodologia empregada, que possui elevada sensibilidade, pois permite analisarmos as amostras de soro em microdiluições, muito abaixo dos limites de detecção em outras técnicas diagnósticas, que faz com que tenhamos um ganho na diminuição do número de ligações inespecíficas entre os anticorpos presentes no soro e os antígenos empregados (GAMA KER et al., 2013b; KER et al., 2013).

A escolha do ponto a ser utilizado na metodologia se baseou na curva mais estável de diluição do conjugado e soro, inicialmente a diluição do conjugado 1:2000 poderia ser a de escolha, por apresentar valores mais altos de PFP no grupo INF e negatividade em todas as titulações do pool de soros NI. Porém, ao observar a reatividade da curva há uma instabilidade na reação em diluições mais altas do soro, o que pode levar em uma falha durante a realização da metodologia, caso ocorram erros na diluição do soro. Portanto, preferimos selecionar a diluição do anticorpo 1:1000 e do soro 1:4096 uma vez que apresentou maior amplitude de

segregação entre os grupos (INF e NI) e exibiu uma boa associação entre sensibilidade e especificidade. Esta conclusão está em concordância com os resultados obtidos em estudos anteriores por Ker et al., (2013) e Gama – Ker et al., (2013) e presentes na bula do Kit LeishFlow, o que demonstra a reprodutibilidade das condições reacionais da técnica no novo lote do antígeno produzido. Uma das necessidades fundamentais de um kit diagnóstico para produção em larga escala é sua reprodutibilidade lote a lote das condições reacionais (BANOO et al., 2006).

Após confirmar as melhores condições reacionais conforme preconizadas na bula do kit LeishFlow, o presente trabalho buscou analisar o kit LeishFlow em um grande número de amostras (1546) de soro canino, o que permitiu uma verificação robusta do desempenho do kit. Além disso, em todas as reações sorológicas do estudo empregando o kit LeishFlow usamos um controle interno de duplicatas das placas (14% das amostras analisadas na placa). Nessas análises encontramos a concordância entre as duplicatas de 98,1% com Kappa de 0,96. Esses achados reforçam o grande potencial para replicação do teste, de acordo com Landis e Koch (1977) há uma concordância ótima quando o Índice *Kappa* está entre 0,81-0,99. Portanto, a metodologia empregada nesse ensaio sorológico obteve consistência, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) tem suas ações direcionadas para a queda da morbidade e letalidade, controle do reservatório e dos vetores e na educação em saúde. Os cães são considerados o principal reservatório da LV, e há a indicação de eutanásia para aqueles animais sorologicamente positivos, sendo esse o principal ponto crítico do PVC-LV. São descritas dificuldades para a realização das recomendações contidas no programa e descontinuidade das ações, além disso, há o questionamento advindo da grande expansão da doença nos últimos anos, em consequência do insucesso das medidas preconizadas (COURTENAY et al., 2002; GONTIJO; MELO, 2004; GRIMALDI et al., 2012b; ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Entre as dificuldades na execução das ações preconizadas pelo PVC-LV, destacam-se a resistência da população para a entrada dos técnicos nas residências para busca ativa de animais positivos para LV; atrasos para a detecção e eliminação de cães infectados, uma vez que há a dificuldade da logística para realizações de exames; e o custo alto para manutenção das ações, visto que o investimento advindo pelo poder público é insuficiente (COURA-VITAL et al., 2014; ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Além disso, podemos ressaltar que o insucesso das

medidas de controle podem ser atribuídas também a baixa sensibilidade dos métodos sorológicos (TR-DPP® e EIE-LVC) recomendados (PESSOA-E-SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2011).

O sorodiagnóstico para LVC utilizado pelas autoridades brasileiras em áreas endêmicas não consegue detectar os animais verdadeiramente positivos, ou seja, apresentam baixa sensibilidade, e apresentam uma baixa acurácia, dessa forma não identifica os cães realmente infectados por *L. infantum*, e subestima a prevalência das áreas endêmicas, dificultando o sucesso do controle da doença (LAURENTI et al., 2014; PESSOA-E-SILVA et al., 2019). Ao analisar a prevalência da área endêmica estudada, podemos observar que o LeishFlow por ser um teste mais sensível detecta mais animais verdadeiramente positivos, por conseguinte há um cálculo mais assertivo e um valor de prevalência mais alto de 29,43% (CI95% 27,21 - 31,75) em comparação aos testes TR-DPP® e EIE-LVC que apresentaram um valor de prevalência de 18,24% (CI95% 16,4 - 20,24). Esses resultados obtidos corroboram com o encontrado em outras pesquisas que sinalizam que a prevalência em áreas endêmicas está subestimada quando usados os testes prescritos pelo MS (LAURENTI et al., 2014; PESSOA-E-SILVA et al., 2019).

Variando os valores de prevalência ocorre a alteração do VPP e VPN, podemos perceber que o LeishFlow aumenta sua probabilidade de detectar animais verdadeiramente positivos assim que aumenta a prevalência da área endêmica, o que valida a utilização do teste na melhoria de detecção de animais positivos em área endêmica. DE ARRUDA et al., (2013) ao avaliar a precisão e reprodutibilidade do teste de EIE-LVC - Biomanguinhos® afirmaram que a prevalência da doença está diretamente ligada aos valores preditivos do teste EIE-LVC. Nesse estudo, na amostra estudada observaram que em uma prevalência de 6,9% o VPN apresentou 99,28%, indicando excelente sensibilidade do teste, porém, o VPP encontrado foi de 29,61%. DE ARRUDA et al., (2013) enfatizaram que esses resultados poderiam eliminar pelo menos três cães com resultado falso-positivo por cada animal verdadeiramente infectado, dependendo da prevalência da região estudada. Já DE MENDONÇA et al., (2017) em seu estudo concluíram que em áreas de alta transmissão, os testes TR-DPP® e EIE-LVC não discriminam adequadamente cães infectados ou não infectados para *L. infantum*.

Em coerência com o encontrado nos cálculos de prevalência, ao analisar os resultados obtidos nos ensaios sorológicos preconizados pelo MS (TR-DPP® e EIE-LVC), observamos que dos animais participantes 282 (18,24%) cães foram considerados positivos em ambos os

testes, valores estes menores do que encontramos no nosso Kit, que positivou 455 amostras. Apesar do TR-DPP® e EIE-LVC serem o diagnóstico padrão de referência do MS, foi demonstrado, em estudos anteriores, a dificuldade na detecção de cães verdadeiramente positivos por estes testes. RIBEIRO et al., (2015) ao analisarem os testes pareados (TR-DPP® e EIE-LVC) obteve um valor de 65% de sensibilidade. Em estudo semelhante, Laurenti et al. (2014) relataram valores de 82,1% de sensibilidade quando os testes foram utilizados em sequência. Dessa forma, constatamos a dificuldade de detecção de cães verdadeiramente positivos, quando empregado os testes do PVC – LV, fato também encontrado em outros estudos que avaliam esses métodos diagnósticos (PESSOA-E-SILVA et al., 2019). Em contrapartida, o LeishFlow apresentou resultados promissores de sensibilidade em estudos anteriores (ANDRADE *et al.*, 2007, 2009; CARVALHO NETA *et al.*, 2006; KER *et al.*, 2013).que desenvolveram e padronizaram as condições reacionais do protótipo LeishFlow, em que obteve valores de 100% para sensibilidade, por conseguinte esclarecendo o maior número de resultados positivos na amostra avaliada nesse trabalho.

Embora o TR-DPP® e EIE-LVC sejam os testes diagnósticos preconizado pelas autoridades brasileiras, ao avaliar ambos vemos uma discordância sobre a efetividade entre os testes na detecção de animais positivos e negativos para LVC. Portanto, apesar de utilizar os testes preconizados do MS para constituir nosso padrão de referência, necessita-se de atenção com os resultados obtidos no estudo, visto que podem estar levemente enviesados em consequência das limitações na sensibilidade e especificidade conhecidas dos testes empregados. É importante salientar que, neste estudo foi seguido o protocolo do MS, em que somente é feito EIE-LVC em animais que se apresentaram positividade sorológica no TR-DPP® (BRASIL, 2014). Os testes parasitológicos, são usados como teste ouro na avaliação de novos testes diagnósticos, pois se isolarmos ou visualizarmos o parasito na lesão é confirmado a presença da infecção. Porém para nosso estudo, devido ao grande número de amostras, essa confirmação parasitológica é inviável. Sendo assim baseamos no que foi encontrado por Ker et al. (2013) em que o kit LeishFlow apresentou 100% de sensibilidade, quando utilizado o padrão ouro parasitológico e a positividade nos testes sorológicos referência da época (RIFI e EIE-LVC). Diante disso, nosso trabalho focou em realizar um estudo comparativo com os testes sorológicos fornecidos pelo MS (TR-DPP® e EIE-LVC).

Com o intuito de melhor avaliar o desempenho do LeishFlow e identificar os cães que não foram detectados pelos testes preconizados pelo Ministério da Saúde, separamos os animais

de acordo com suas características clínicas. A acurácia dos testes sorológicos pode variar com o estado clínico dos cães infectados e de acordo com o estágio da infecção ou status imunológico do hospedeiro (DE ARRUDA et al., 2013). Compreende-se que a sintomatologia dos animais é influenciada com a eficiência da resposta imune no cão e estudos apontam que cães sintomáticos tem altos níveis de anticorpos, em contrapartida animais assintomáticos apresentam títulos quase indetectáveis de anticorpos (COURA-VITAL et al., 2011b; NETO et al., 2010; REIS et al., 2006a, 2006b). Os testes preconizados pelo MS apresentam baixa detecção de animais assintomáticos (DE CARVALHO et al., 2018; GRIMALDI et al., 2012a), em consequência, o resultado falso negativo pode causar a manutenção de cães infectados na população da área endêmica e, assim, causar a ineficiência dos métodos de prevenção e controle. Lopes et al., (2017) ao pesquisarem em área endêmica os métodos sorológicos preconizados pelo MS e compará-los a um teste molecular para LVC, observou que em cada 5 cães soronegativos nos testes TR-DPP[®] e EIE-LVC, um está infectado, ou seja, o PVC-LV não está identificando 20% dos animais verdadeiramente infectados na região endêmica. Na literatura científica discute-se há a possibilidade desses animais positivados no PCR, após um certo tempo, em um novo inquérito canino apresentar resultados positivos na sorologia (COURA-VITAL et al., 2013b). O mesmo raciocínio é válido e acontece nos inquéritos sorológicos empregados pelo MS, uma vez que se utiliza a EIE-LVC, que é um teste de menor sensibilidade e especificidade, como confirmatória da positividade no TR-DPP[®] (empregado no *screening*). Muitos animais que são positivos no teste inicial pelo TR-DPP[®], ao serem analisados pelo teste confirmatório EIE-LVC, são negativos, entretanto, meses depois soroconverterão na EIE-LVC, causando: permanência de animais positivos por maior tempo nas áreas endêmicas, o que dificultará as ações do PVC-LV, além de aumentar os gastos financeiros (COURA-VITAL et al., 2014).

A sorologia para LVC por citometria de fluxo se destaca na detecção de animais assintomáticos (baixo título de anticorpos) (ANDRADE *et al.*, 2007, 2009; CARVALHO NETA *et al.*, 2006; KER *et al.*, 2013)., devido ao seu sistema de microdiluição. Ker *et al.*, (2013), ao avaliarem o LeishFlow, estratificou os animais em assintomáticos I (animais negativos para RIFI e EIE-LVC) e assintomáticos II (animais positivos para RIFI e EIE-LVC), o LeishFlow apresentou eficiência equivalente aos testes preconizados pelo MS. No estudo atual, 206 animais, que foram negativos no padrão de referência (TR-DPP[®] + e EIE-LVC +), foram positivos para o LeishFlow, sendo que 191 (97,2%) desses animais não apresentavam sintomas para LVC. É importante ressaltar que o EIE-LVC negativou 251 animais positivos para TR-DPP[®]

+, apresentando uma concordância entre positivos de 52,9%, sendo que desses animais, 81 (12,3%) foram positivos no LeishFlow, ou seja, cães potencialmente positivos (falso negativos pelos testes TR-DPP[®] + e EIE-LVC +), com baixos títulos de anticorpos e que permaneceram em área endêmica e não foram avaliados por outra sorologia. O que se observa na prática, é que esses cães, possivelmente, estão no início da infecção e após um período de tempo há a soroconversão desse animal no teste EIE-LVC, que no primeiro momento havia dado negativo e assim não concordante com o resultado positivo do TR-DPP[®] (COURA-VITAL et al., 2013b). Ou seja, esses animais já estão infectados, e contribuem para o insucesso do PVC-LV, uma vez que favorecem a perpetuação da infecção (COURA-VITAL et al., 2014; LAURENTI et al., 2014). Situação essa que poderia ser evitada ao utilizar um teste mais sensível e específico, como LeishFlow, o que diminui gastos com deslocamento, equipamentos e recursos humanos para um novo exame desse cão, ademais, abaixa os riscos de dispersão da doença em humanos e animais presentes no domicílio e nas proximidades.

Nos cálculos de validade do teste, ao segmentar animais sintomáticos e assintomáticos, identificamos um aumento na sensibilidade da técnica nos animais sintomáticos (95,1%) e uma queda na especificidade (72,7%), isso ocorre devido ao LeishFlow apresentar uma sensibilidade elevada em comparação aos testes padrão de referência (TR-DPP[®] + e EIE-LVC +), detectando os verdadeiramente positivos. Porém, a queda na especificidade (72,7%) é explicada devido ao LeishFlow conseguir diferenciar melhor os animais que apresentam alguma outra enfermidade, como por exemplo a Babesiose, diferentemente dos testes padrão de referência utilizados, aos quais apresentam reações cruzadas com outros patógenos caninos (com por exemplo: Erliquiose, Babesiose, Anaplamose, leishmaniose tegumentar canina, doença de chagas, entre outras) (ALVAR et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; LAURENTI et al., 2014; ZANETTE et al., 2014). Sendo assim, quando se realiza os cálculos soropidemiológicos do LeishFlow em comparação aos testes preconizados pelo MS, há uma variação desses valores, uma vez que alguns animais ditos positivos para LVC no padrão de referência foram negativos no LeishFlow. Em função da melhor especificidade do LeishFlow é possivelmente que estes animais sejam falso-positivos para LVC, por apresentarem reações cruzadas com outros patógenos caninos que não são discriminados pelo TR-DPP[®] + e EIE-LVC +. É importante destacar que, os animais assintomáticos são maioria em nosso estudo, e observamos valores aproximados de sensibilidade, especificidade e acurácia nesse subgrupo clínico em comparação aos cálculos do total de amostras (1546), isso ocorre devido ao n amostral ser composto por 93,8% cães assintomáticos.

Nesse sentido, quando relacionamos os dados de animais positivos no padrão de referência, os resultados demonstram que 210/282 cães são assintomáticos.

Os resultados soroepidemiológicos do nosso protótipo apresentou, bons valores de sensibilidade, especificidade e VPN, apesar dos valores apresentados não serem 100%, o padrão de referência empregado não dispõe de valores altos de sensibilidade e especificidade quando utilizados em sequência, pareados ou separadamente (LAURENTI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). RIBEIRO *et al.*, (2019) avaliaram diferentes testes sorológicos para LVC, entre eles TR-DPP® (Bio-Manguinhos) e EIE-LVC (Bio-Manguinhos) e destacaram que nenhum dos testes obteve 100% de sensibilidade e especificidade, e ainda ressaltam que o EIE - LVC apresentou especificidade inferior, o que pode gerar reações falso-positivas e, assim, levar à morte errônea de animais saudáveis.

No contexto da imperfeição dos testes utilizados como padrão de referência, constatou-se que apenas 33 (2,2%) animais positivos em ambos os testes (TR-DPP® e EIE-LVC) foram identificados como resultados negativos no Kit LeishFlow. Acreditamos que este pequeno número de animais é falso-positivo no TR-DPP® e EIE-LVC. Diversos estudos descritos apontam a ocorrência de resultados falso-positivos quando utilizados os testes sorológicos preconizados pelo MS (PESSOA-E-SILVA et al., 2019). As patologias caninas disseminadas por vetores, como erliquiose e babesiose, são amplamente disseminadas no Brasil. De acordo com a literatura, várias regiões são endêmicas para essas hemoparasitoses e a semelhança entre esses patógenos com a *Leishmania spp.*, levam ao compartilhamento de epítomos antigênicos e acarretam em reatividade cruzada com alguns métodos sorológicos (KRAWCZAK et al., 2015; LABARTHE et al., 2003). Por exemplo, sabe-se que o gene HSP70, região conservada entre as espécies de *Leishmania*, está presente no gênero *Babesia* e são importantes para a sobrevivência do parasito de *Leishmania*, o que pode gerar reatividade cruzada com certos epítomos específicos compartilhados entre esses microrganismos (YAMASAKI et al., 2007). Embora não haja evidências concretas de homologia genômica entre os microrganismos do gênero *Ehrlichia* e *Leishmania*, há indicações claras de que infecções caninas com *E. canis* e *B. canis* podem levar a reatividade cruzada em testes sorológicos de leishmaniose (LAURENTI et al., 2014; LIRA et al., 2006; ZANETTE et al., 2014). É sabido que os testes do MS apresentam reações cruzadas com outros patógenos caninos, como *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (ALVAR et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; LAURENTI et al., 2014; ZANETTE et al., 2014). Em contrapartida, o LeishFlow demonstrou 93,3% e 100% de especificidade quando realizado o teste com animais

infectados com *E. canis* e *B. canis*, respectivamente, portanto esses achados expõem que o emprego do LeishFlow como teste para LVC, diminuiria a possibilidade da eutanásia de animais falsos positivos.

Na análise de desempenho, tendo como padrão de referência apenas o teste TR-DPP® em comparação ao LeishFlow, notamos um índice alto de positividade. Dos animais avaliados, 533 foram positivos para o TR-DPP® sendo que desses, 330 se positivaram no LeishFlow. Dessa forma, vemos que 203 animais foram falso-positivos no teste de triagem, se considerarmos os resultados do LeishFlow como corretos, por ser um teste mais específico que o TR-DPP® (KER et al., 2013). Esses resultados estão de acordo ao encontrado por outros pesquisadores, que ao avaliar o TR-DPP® notaram a presença de resultados falsos positivos (GRIMALDI et al., 2012a; LAURENTI et al., 2014), incriminados como positivos cães infectados por outras doenças, devido a reações cruzadas com outros patógenos caninos (principalmente, com *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*) (LAURENTI et al., 2014). Ao discriminar os animais negativos no TR-DPP®, identificou-se que dos 1013 animais negativos, 125 foram positivos para o LeishFlow dos quais, 115 eram assintomáticos. Grimald *et al.*, (2012a) ao avaliarem o TR-DPP® obteve em seus resultados uma decrescimento gradual da sensibilidade da técnica associado a redução da sintomatologia clínica dos animais, destacou ainda que o teste rápido é insuficientemente sensível para identificar portadores assintomático de *L. infantum*. Esses trabalhos científicos reforçam nossos achados, em que notamos que o TR-DPP® não foi capaz de detectar suficientemente os animais verdadeiramente positivos (tendo como base os nossos resultados de 125 animais positivos no LeishFlow, mas negativos no TR-DPP®). Essa dificuldade encontrada no TR-DPP® reflete nos resultados de validade do teste LeishFlow, uma vez que a sorologia por citometria de fluxo é uma técnica mais sensível, dessa forma, ocorre uma variação dos cálculos soropidemiológicos, há uma queda na concordância, índice Kappa e sensibilidade, devido ao padrão de referência (TR-DPP®) utilizado. Figueiredo *et al.* (2018) ao avaliar o TR-DPP®, usando cultura parasitológica, imunohistoquímica e histopatologia como padrão de referência, constatou que o teste TR-DPP® no conjunto de amostras obteve valores de 89% de sensibilidade e 70% de especificidade. No mesmo estudo, subdividiu os animais com base na sintomatologia, e os pesquisadores encontrarem que em cães assintomáticos o TR-DPP® teve uma sensibilidade de 75% (IC95% 42,8 - 94,5) e especificidade de 72,9% (IC95% 68,5 - 77,1) em comparação com a sensibilidade de 93,8% (IC95% 82,8 - 98,7) e especificidade de 56,4% (IC95% 46,2% - 66,3%) em cães sintomáticos (FIGUEIREDO et al., 2018).

Em diferentes trabalhos científicos os testes preconizados pelo MS (TR-DPP® e EIE-LVC) e utilizados como padrão de referência nesse estudo apresentam valores variados de sensibilidade e especificidade (DE CARVALHO et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2018; LAURENTI et al., 2014; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015; SILVA et al., 2016). De acordo com as informações contidas na bula do fabricante dos Kits (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) ao utilizar soro canino, em comparação ao padrão ouro utilizado por eles para o cálculo, o EIE-LVC apresenta valores de 94,54% e 91,76%, para sensibilidade e especificidade, respectivamente, e o TR-DPP® revela uma sensibilidade de 89,7% – 93,1%, e especificidade de 93,8% – 97,9%. Esses valores descritos nas bulas são refutados por diferentes grupos de pesquisa (DE CARVALHO et al., 2018; DE MENDONÇA et al., 2017b; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015; SILVA et al., 2016). Peixoto *et al.* (2015) ao realizarem uma meta-análise da qualidade dos testes empregados para o diagnóstico da LVC nas Américas, estimaram para TR-DPP® uma sensibilidade de 83,5% (IC95% 78,3 - 87,9) e uma especificidade de 72,9% (IC95% 70,5 - 75,2), e uma sensibilidade de 89 % (IC95% 86,9 - 90,9) e especificidade de 87% (IC95% 85,6 a 88,3) para o teste de ELISA com antígenos totais. Neste mesmo estudo, Peixoto *et al.* (2015) destacam que houve uma variação ampla na sensibilidade (8,0% -100%) e especificidade (60% - 100%) do teste de ELISA com antígenos totais de *Leishmania*.

A análise da razão de verossimilhança (RV), constitui a probabilidade de uma doença estar presente depois de um teste diagnóstico, a interpretação desse dado nos permite saber a precisão diagnóstica. Conforme Jaeschke *et al.* (1994), quanto mais distante de 1 for os valores de RV positivos maior a chance de confirmação da presença da doença, em contrapartida, valores mais próximos de 0 maior a chance de confirmar a ausência de doença. Visto isto, nos cálculos de RV quando comparamos o teste LeishFlow aos testes padrão de referência do MS (TR-DPP® e EIE-LVC), podemos interpretar que para um resultado negativo no LeishFlow, a RV indica uma chance mínima de 0,13 de um resultado positivo advir de um cão infectado, enquanto que para um resultado positivo, a RV aponta uma chance de 5,42 a mais de se encontrar um resultado positivo em um cão com LVC do que em um cão sem infecção. Adicionalmente, realizamos o cálculo de RV utilizando o TR-DPP® como padrão de referência, os resultados obtidos constataram que ao usar o TR-DPP® como referência as chances de encontrar resultados errôneos utilizando o LeishFlow aumentam. Assim, o uso do LeishFlow proporciona um diagnóstico seguro, visto que a elevada RV Positiva (5,42) indica que um resultado positivo é mais provável de ser verdadeiro positivo do que falso-positivo. Além disso, a RV Negativa

bem próxima do valor 0 (0,13) sugere que um resultado negativo é mais provável de ser um verdadeiro negativo do que um falso-negativo.

Os testes sorológicos padrão de referência do Ministério da Saúde apresentam valores variados de sensibilidade e especificidade, dificultando as ações de controle da doença em regiões endêmicas do Brasil. Dessa forma, vemos a necessidade de substituição dos imunodiagnósticos hoje empregados, por testes sorológicos mais sensíveis e específicos. Os resultados apresentados neste estudo demonstram que o LeishFlow tem um alto potencial diagnóstico, e pode discriminar os animais infectados de não infectados para *L. infantum*. Além disso, em análise de custos conduzida no Laboratório de Pesquisas Clínicas da UFOP, o valor unitário da reação por citometria de fluxo para diagnóstico da LVC é de R\$ 5,94. Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, o teste para rastreamento de amostras positivas (TR-DPP®) tem custo por unidade de reação de R\$6,30, enquanto no teste confirmatório de EIE-LVC o valor é de R\$3,78. Neste sentido, o ensaio sorológico por citometria de fluxo apresenta forte potencial, pois além de apresentar valor unitário de reação próximos daqueles atualmente disponibilizados em campanhas de controle da LV, é uma metodologia diagnóstica capaz de fornecer um diagnóstico mais acurado para a LVC (GAMA KER et al., 2013b; KER et al., 2013).

Baseado nas informações geradas no presente estudo, podemos inferir que o teste LeishFlow permitiu uma análise diagnóstica superior ao encontrado nos métodos recomendados pelo MS, em uma plataforma única de ensaio sorológico. Além de tudo, demonstrou ser uma potente ferramenta biotecnológica, podendo ser utilizada em outros modelos metodológicos, como o LeishPlex, outro protótipo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que obteve ótimos resultados para o diagnóstico da LVC (KER et al., 2019). Diante desses resultados e a partir da ascensão da citometria de fluxo como alternativa para o estabelecimento de testes sorológicos mais assertivos e refinados, anseia-se a possibilidade do kit LeishFlow compor um novo protocolo de diagnóstico da LVC. Além disso, uma gama mais abrangente de opções de teste de diagnóstico é essencial para laboratórios privados e serviços veterinários no Brasil, dada a crescente demanda e impacto na saúde pública causado pela LVC.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, concluímos que o Kit LeishFlow apresenta um bom desempenho diagnóstico para LVC, com elevada reprodutibilidade diagnóstica e manteve as condições reacionais no novo lote produzido. Ao compararmos com os dois testes sorológicos disponibilizados pelo MS para LVC com o LeishFlow, inferimos que nosso kit apresentou índices consideráveis de desempenho (sensibilidade, especificidade, VPN). Dessa forma, demonstrou ser uma boa ferramenta biotecnológica para o diagnóstico sorológico da LVC. Diante desses resultados confirmamos que a citometria de fluxo proporciona um aumento na qualidade e segurança do diagnóstico da LVC, podendo ser empregada como teste diagnóstico único na LVC, e contribuir como uma nova técnica sorológica para melhorar as ações de controle voltadas para LV.

8. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos com este projeto, confirmamos o potencial diagnóstico do Kit LeishFlow como uma nova tecnologia diagnóstica disponível para ser empregada em campanhas de controle da LV e/ou médicos veterinários em busca de um diagnóstico mais acurado e sensível. Futuramente, há a intenção de realizar um ensaio sorológico multicêntrico, utilizando o protocolo descrito neste estudo em diferentes laboratórios em distintas instituições do Estado de Minas Gerais e do Brasil. Dessa forma, pretendemos avaliar a aplicabilidade do teste em diferentes locais, bem como por diferentes técnicos e citômetros de fluxo, e assim seríamos capazes de confirmar o potencial biotecnológico do kit em diferentes situações comuns e inerentes aos laboratórios clínicos. Durante este estudo, elaboramos um Pitch para disponibilizar o LeishFlow ao mercado, ademais, há a intenção incluir o kit na Incultec (Centro de Referência em Incubação de Empresas e Projetos de Ouro Preto) e apresentá-lo a Startups, através da criação de um plano de negócios, e assim viabilizar o kit como alternativa para o diagnóstico da LVC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E. R. et al. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Leishmania parasites in clinical samples. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591–6, 1 abr. 2010.
- ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. In: [s.l.: s.n.]. p. 1–88.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ALVAR, J. et al. Implications of asymptomatic infection for the natural history of selected parasitic tropical diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 3, p. 231–246, 18 jun. 2020.
- ANDRADE, R. A. DE et al. Clinical value of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 1–2, p. 85–97, 2007.
- ANDRADE, R. A. et al. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 79–86, 2009.
- ASHFORD, D. A. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 3, p. 251–5, 1 set. 1995.
- BANETH, G. et al. **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one** **Trends in Parasitology**, 2008.
- BANOO, S. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 9 Suppl, p. S21-31, set. 2006.
- BARATA, R. A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of Leishmania chagasi infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195–197, mar. 2004.
- BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2182, 25 abr. 2013.
- BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–7, 1 set. 1996.
- BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.-P. Immunohistochemical Detection of

Leishmania Infantum in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections of Canine Skin and Lymph Nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 4, p. 439–440, 25 out. 1997.

BRAZIL, R. P.; NASCIMENTO, M. DO D. S. B.; MACAU, R. P. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por leishmania em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luis, Maranhão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 145–145, mar. 1987.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 15 mar. 2009.

CARVALHO NETA, A. V. et al. Flow cytometry used in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 480–488, 2006.

CECÍLIO, P. et al. Exploring *Lutzomyia longipalpis* Sand Fly Vector Competence for *Leishmania major* Parasites. **The Journal of infectious diseases**, v. 222, n. 7, p. 1199–1203, 1 set. 2020.

CFMV, C. F. D. M. V. GUIA DE BOLSO LEISHMANIOSE VISCERAL. **Sistema CFMV/CRMVs**, v. 1, p. 194, 2020.

CHAMBERS, J. P. et al. Biosensor recognition elements. **Current issues in molecular biology**, v. 10, n. 1–2, p. 1–12, 2008.

CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: **Leishmaniasis. (Human Parasitic Diseases Vol.1)**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1985. p. 1–30.

CHAOUCH, M. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1–2, p. 78–84, nov. 2013.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327–332, abr. 2019.

COSTA, D. N. C. C. et al. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 8, p. e2355, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 16 ago. 2011a.

COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. e43–e47, nov. 2011b.

COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for

infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 411–417, 2013a.

COURA-VITAL, W. et al. Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71833, 22 ago. 2013b.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–6, 7 mar. 2014.

COURA-VITAL, W. et al. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 2018.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, nov. 2002.

DA SILVA, T. B. F. et al. Reactivity of purified and axenic amastigotes as a source of antigens to be used in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 79, n. October 2019, p. 102177, 2020.

DANTAS-TORRES, F. et al. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, fev. 2019.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 43–55, jan. 2016.

DAVID, J. R. et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839–847, ago. 2001.

DE ARRUDA, M. M. et al. Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 8–13, 2013.

DE BRITO, R. C. F. et al. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 19, p. 8105–8116, 2020.

DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 5, p. 571–576, 26 abr. 2018.

DE MENDONÇA, I. L. et al. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 483–488, 2017a.

DE MENDONÇA, I. L. et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Revista do Instituto de**

Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 59, n. September 2016, 2017b.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 79, 8 dez. 2019.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 4, p. 525–529, 1 jul. 1964.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961–972, 13 ago. 2014.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, jun. 2012.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, out. 2008.

FERREIRA, E. DE C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3–4, p. 235–241, maio 2007.

FERRER, L. et al. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v. 44, n. 2, p. 194–196, mar. 1988.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. e180260, 2018.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105–111, ago. 2001.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, abr. 2006.

GAMA KER, H. et al. **Effect of the preservative and temperature conditions on the stability of *Leishmania infantum* promastigotes antigens applied in a flow cytometry diagnostic method for canine visceral leishmaniasis** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013a.

GAMA KER, H. et al. Effect of the preservative and temperature conditions on the stability of *Leishmania infantum* promastigotes antigens applied in a flow cytometry diagnostic method for canine visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 470–476, ago. 2013b.

- GAO, C. et al. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 370, 15 dez. 2015.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 2–3, p. 100–107, 2006.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.
- GREENHALGH, T. How to read a paper. Papers that report diagnostic or screening tests. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 315, n. 7107, p. 540–3, 30 ago. 1997.
- GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012a.
- GRIMALDI, G. et al. The Effect of Removing Potentially Infectious Dogs on the Numbers of Canine *Leishmania infantum* Infections in an Endemic Area with High Transmission Rates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966–971, 1 jun. 2012b.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, out. 1999.
- IBARRA-MENESES, A. V. et al. Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection and associated risk factors, after an outbreak in the south-western Madrid region, Spain, 2015. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 22, 30 maio 2019.
- IBARRA-MENESES, A. V. et al. Evaluation of fluorimetry and direct visualization to interpret results of a loop-mediated isothermal amplification kit to detect *Leishmania* DNA. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 250, 17 dez. 2018.
- IBARRA-MENESES, A. V.; MORENO, J.; CARRILLO, E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 29–38, jan. 2020.
- JAESCHKE, R. Users' Guides to the Medical Literature. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 703, 2 mar. 1994.
- JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 37–53, fev. 1999.
- JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. The *Leishmania*. In: [s.l: s.n.]. p. 1–37.
- KER, H. G. et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 12, p. 1792–1798, 2013.
- KER, H. G. et al. Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral

leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 8179–8190, 2019.

KRAWCZAK, F. DA S. et al. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–68, 2015.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 4, n. 1, p. 67–75, 2003.

LACHAUD, L. et al. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 1 jan. 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution**. [s.l.: s.n.]. v. 4

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159, mar. 1977.

LARSON, M. et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 381–390, 31 jan. 2017.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, 2014.

LEAL, G. G. DE A. et al. Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 150, p. 1–7, fev. 2018.

LEBLOIS, R. et al. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 1091–1095, jul. 2011.

LEWIS, D. J. The Biology of Phlebotomidae in Relation to Leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, v. 19, n. 1, p. 363–384, jan. 1974.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 11–16, 2006.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017.

- LOPES, E. G. P. et al. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1062–1071, out. 2010.
- MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 25, n. 1, p. 247–258, mar. 2016.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2018.
- MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 8, p. 1409–11, ago. 1988.
- MAPA. Nota Técnica N° 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa. 2016.
- MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 15–19, 2011.
- MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 649–652, nov. 2013.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341, 29 out. 2014.
- MARGONARI, C. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31–38, fev. 2006.
- MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 5, p. 569–73, set. 1995.
- MARZOCHI, M. C. DE A. et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p. 432–446, dez. 1985.
- MATOS, C. S. et al. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemotherapeutic treatment of Chagas disease. **Journal of Immunological Methods**, v. 369, n. 1–2, p. 22–32, jun. 2011.
- MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237–246, 1 set. 1999.
- METTLER, M. et al. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an

Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, 1 nov. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 1st edn.** Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA INTERMINISTERIAL N° 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** [s.l.: s.n.].

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491–493, 1994.

NETO, R. G. T. et al. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3–4, p. 248–257, maio 2010.

NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e – 63, 15 jun. 2000.

O. F. OSMAN, P. A. KAGER, E. E. ZIJLS, B. Use of PCR on lymph node samples as test of cure of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine And Parasitology**, v. 91, n. 7, p. 845–850, 1 out. 1997.

OSKAM, L. et al. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 16, n. 3–4, p. 235–239, dez. 1996.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345, jul. 2013.

OZBEL, Y. et al. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. **Acta Tropica**, v. 74, n. 1, p. 1–6, jan. 2000.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 197, 10 dez. 2011.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–91, 1 jun. 2010.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552–578, dez. 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Epidemiological Report in

the Americas. 2020.

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

PENNISI, M.-G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 302, 4 dez. 2015.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania* (Viannia) braziliensis promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 292–298, nov. 2012.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. November 2018, p. 9–16, 2019.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–35, jan. 1994.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 336, n. 2, p. 193–202, 31 jul. 2008.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–294, set. 2009.

REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931–5, set. 1999.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, ago. 2006a.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, ago. 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, mar. 2009.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–349, jul. 2010.

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative

study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 2013.

RIBEIRO, R. A. N. N. et al. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and Leishmune®-vaccinated dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 39, n. 2, p. 87–95, 11 jun. 2015.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

RIBEIRO, V. M. et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, n. April, p. 108920, 2019.

ROCHA, R. D. R. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 551–562, dez. 2002.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 19 jan. 2010.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SANTOS, T. R. et al. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 140, p. 137–140, dez. 2014.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9944–9948, 15 out. 1992.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, 19 maio 2018.

SEVÁ, A. P. et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 29 jul. 2016.

SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1–3, p. 257–261, 2011.

SILVA, R. B. S. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625–629, jul. 2016.

- SOARES, I. R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 665–669, nov. 2013.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, out. 2009.
- SOUSA, S. et al. Development of a Fluorescent Based Immunosensor for the Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis Combining Immunomagnetic Separation and Flow Cytometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2013.
- SOUTO, D. E. P. et al. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 22–29, ago. 2013.
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, 2004.
- THOMAZ SOCCOL, V. et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189182, 12 dez. 2017.
- WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851–856, out. 2014.
- WERNECK, G. L. et al. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3172, 30 out. 2014.
- WHO. **Integrating Neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. [s.l.: s.n.].
- WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 30 mar. 2021a.
- WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020b.
- YAMASAKI, M. et al. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 217–27, 30 abr. 2007.
- ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.

ZOGLAMI, Z. et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. **Acta Tropica**, v. 139, p. 32–38, nov. 2014.

ZUBEN, A. P. B. VON; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.

10. ANEXO A - BULA DO EIE-LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA/BIOMANGUINHOS

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

INDICAÇÃO DE USO
O kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* livre, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE
O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* livre obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida. Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB). A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

ESQUEMA DO TESTE

Reagente

FASE SÓLIDA  = **REAÇÃO COLORIDA**

ANTÍGENO + AMOSTRA POSITIVA + CONJUGADO + SUBSTRATO + CROMÓGENO

Não Reagente

FASE SÓLIDA  = **AUSÊNCIA DE COLORAÇÃO**

ANTÍGENO + AMOSTRA NEGATIVA + CONJUGADO + SUBSTRATO + CROMÓGENO

MATERIAL FORNECIDO

Dilúente Amostras/ Conjugado [5X]	2 frascos com 45mL
Lectina de leite	1 saco - 10g
Tampão de lavagem [20X]	2 frascos com 60mL
Dilúente do Substrato	1 frasco com 60mL
Cromógeno (TMB)	1 frasco com 0,7mL
Substrato H ₂ O ₂	1 frasco com 0,2mL
Ácido Sulfúrico 2M	1 frasco com 30mL
Controle Positivo	1 frasco com 0,25mL
Controle Negativo	1 frasco com 0,25mL
Conjugado	1 frasco com 0,4mL
Molduras com 6 "strips" dupla sensibilidade	4 molduras
Folhas adesivas	8 folhas
Manual de Instrução de Uso	1 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37°C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm;
- Balança semi-analítica;
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

Manter entre 2°C e 8°C: Dilúente de amostra/conjugado [5X], Lectina de leite, Tampão de lavagem [20X], Dilúente do Substrato, Cromógeno (TMB), Substrato H₂O₂, Ácido Sulfúrico 2M.

Manter a -20°C: Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado, "Strip" Sensibilizada.

Todos os componentes do kit devem ser conservados nas respectivas temperaturas indicadas em seus rótulos, desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico "In vitro".
Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.
A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas laboratoriais, tais como:

- As amostras e os controles devem ser manipulados com cuidado;
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Aconselha-se só utilizar componentes do mesmo conjunto.
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte interna dos strips;
- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- Soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Os componentes do kit armazenados na temperatura de 2°C a 8°C, assim como os componentes armazenados na temperatura de -20°C, soros controles e as strips sensibilizadas, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retomando-os à temperatura logo após o uso.

Importante: Retirar apenas a quantidade de "Strips" a serem utilizadas no teste.

O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retomando para conservação imediatamente, após seu uso.

Importante: Este insumo não tolera variações de temperatura, evitar prolongar sua permanência fora da temperatura de -20°C.

1. Preparo do diluente de amostras/conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lectina de Leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2. Diluir em tubos, 5 µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

3. Distribuir na placa sensibilizada, 100 µL dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma: na coluna 1 fileiras "A" e "B" o controle positivo; na "C", "D" e "E" o controle negativo; "F" e "G" sem soro (controle do conjugado - SS). Nos demais orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 2	Amostra 16	Amostra 18	Amostra 20	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 59	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 10	Amostra 27	Amostra 25	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 60	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 23	Amostra 28	Amostra 30	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 78	Amostra 86
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 24	Amostra 29	Amostra 31	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 79	Amostra 87
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 25	Amostra 30	Amostra 32	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 80	Amostra 88
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 26	Amostra 31	Amostra 33	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 81	Amostra 89
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 27	Amostra 32	Amostra 34	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 82	Amostra 90
H	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 28	Amostra 33	Amostra 35	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 83	Amostra 91

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

SS - Sem Soro

4. Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

5. Preparo do tampão de lavagem:

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

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

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	até 16	2 mL	38 mL
02	até 32	3 mL	57 mL
03	até 48	4 mL	76 mL
04	até 64	5 mL	95 mL
05	até 80	7 mL	133 mL
06	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

n° STRIPS duplas	n° PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
até 03	1/2	20 mL	380 mL
até 06	1	25 mL	475 mL
até 09	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

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

7. Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	até 16	5 mL	5 µL
02	até 32	5 mL	5 µL
03	até 48	10 mL	10 µL
04	até 64	10 mL	10 µL
05	até 80	15 mL	15 µL
06	até 96	15 mL	15 µL

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

9. Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1°C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10. Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

11. Preparo do substrato:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluíente do Substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato H ₂ O ₂
01	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

12. Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min

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

LEITURA

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

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

Para o cálculo do cut-off deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

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

Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO

Controle Negativo: $\geq 0,090 \leq 0,120$ de DO

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

Cálculo do Cut-Off (CO)

$CO = XCN \times 2$

XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade ótica

CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO CN 1 = 0,100

DO CN 2 = 0,098

DO CN 3 = 0,101

$CO = XCN \times 2$

$0,099 \times 2 = 0,199$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

Exemplo 2:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,090

DO CN 3 = 0,131 → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$CO = XCN \times 2$

$0,100 \times 2 = 0,200$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

Exemplo 3:

DO CN 1 = 0,110

DO CN 2 = 0,080

DO CN 3 = 0,040 → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$CO = XCN \times 2$

$0,095 \times 2 = 0,190$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

$FC = CO \times 1,2$

Exemplo: $CO = 0,322$

$FC = CO \times 1,2$

$FC = 0,322 \times 1,2$

$FC = 0,386$

CO

AMOSTRAS NÃO REATIVAS

FAIXA CINZA

AMOSTRAS REATIVAS

RESULTADOS

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

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

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o Cut-Off e a faixa cinza.

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

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

Obs. 3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO

1. Preparo do diluíente de amostras/conjugado:

n° STRIPS duplas	n° REAÇÕES	Diluíente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lecitina de Leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

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

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

4. Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar eluir durante a noite na geladeira ou agitar 1 hora no agitador, rotação de 50 Rpm a 125 Rpm.

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

6. Distribuir na placa sensibilizada 100 μ L dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A", "B", o soro controle positivo, na "C", "D", "E" o controle negativo, na "F" e "G", somente o diluente da amostra/conjugado (sem soro). Nos outros orifícios, distribuir 100 μ L das amostras teste já eluídas, seguindo o protocolo abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
H	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

SS - Sem Soro

7. Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C \pm 1°C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

8. Preparo do tampão de lavagem:

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

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

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	até 16	2 mL	38 mL
02	até 32	3 mL	57 mL
03	até 48	4 mL	76 mL
04	até 64	5 mL	95 mL
05	até 80	7 mL	133 mL
06	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº STRIPS duplas	nº PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
até 03	1/2	20 mL	380 mL
até 06	1	25 mL	475 mL
até 09	1 1/2	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

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

10. Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	até 16	5 mL	5 μ L
02	até 32	5 mL	5 μ L
03	até 48	10 mL	10 μ L
04	até 64	10 mL	10 μ L
05	até 80	15 mL	15 μ L
06	até 96	15 mL	15 μ L

11. Homogeneizar e distribuir 100 μ L da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

12. Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C \pm 1°C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13. Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz)

14. Preparo do substrato:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente do Substrato	Cromógeno TMB	Substrato H ₂ O ₂
01	até 16	2,5 mL	25 μ L	5 μ L
02	até 32	4 mL	40 μ L	8 μ L
03	até 48	6 mL	60 μ L	12 μ L
04	até 64	8 mL	80 μ L	16 μ L
05	até 80	10 mL	100 μ L	20 μ L
06	até 96	12 mL	120 μ L	24 μ L

15. Distribuir 100 μ L do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

17. Bloquear a reação adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceda a leitura das microplacas.

LEITURA

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

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

Para o cálculo do cut-off deve-se calcular a média das densidades óticas dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

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

Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO

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

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

Cálculo do Cut-Off (CO)

$$CO = XCN \times 3$$

XCN = Média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade óptica

CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

$$DO\ CN\ 1 = 0,100$$

$$DO\ CN\ 2 = 0,098$$

$$DO\ CN\ 3 = 0,101$$

$$CO = XCN \times 3$$

$$0,099 \times 3 = 0,297$$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

Exemplo 2:

$$DO\ CN\ 1 = 0,110$$

$$DO\ CN\ 2 = 0,090$$

$$CO = XCN \times 3$$

$$0,100 \times 3 = 0,300$$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

~~0,090~~ → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$$CO = XCN \times 3$$

$$0,100 \times 3 = 0,300$$

Exemplo 3:

$$DO\ CN\ 1 = 0,110$$

$$DO\ CN\ 2 = 0,080$$

$$CO = XCN \times 3$$

$$0,095 \times 3 = 0,285$$

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

~~0,080~~ → Fora da faixa de validação do teste = descartar

$$CO = XCN \times 3$$

$$0,095 \times 3 = 0,285$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

$$FC = CO \times 1,2$$

$$\text{Exemplo: } CO = 0,322$$

$$FC = CO \times 1,2$$

$$FC = 0,322 \times 1,2$$

$$FC = 0,386$$

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

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

RESULTADOS

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade óptica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade óptica inferior ao Cut-Off.

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade óptica entre o Cut-Off e a faixa cinza.

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

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

Obs. 3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

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

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período mínimo de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad.S.Pub. RJ*; 2004; 20(1)jan-fev: 259-265.
2. ASFORD, D.A., BADARÓ, R., EGILALJO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FASTEI) for fi eld diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Amer.J.Trop.Med.Hyg.* 1993; Jan; 48(1):1-8.
3. BADARÓ, R., DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2ed. 2002; 1254-79.
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye biding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72.
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A., CHAREST, H., TAVARES, C.A.P. Et Al. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diag. Microb. And Infect. Disease*. 2002; 43: 289-295.
7. CUBA, C.A., MARSDEN, P.H.D., BARRETO, A. C., ROCHA, R., SAMPINO, R.R., PATZIANF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param.* 1980; 89: 95-208.
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. *Epidemiologia*. 2003. Cap 18, p 259-270.
9. MONTOVA, A., CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labellled Immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. *J. Immun. Meth.* 1978; 99: 13-20.
10. MORENO, J. ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(9): 399-405.
11. NAKANE, P.K., KAWAMI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 1974; 22(12):1084-1091.
12. PAPPAS, M.G., HAJDOWSKI, R., HOCHMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol.Method.* 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R., DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(7): 289-290.

Licenciado no Ministério da Agricultura sob o nº 8968/04, em 22/09/2004.

Responsável Técnico: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055.00015-30
 SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
 Indústria Brasileira

Aprovação da Arte: dezembro|11 Arte: BM-BUL-030-02-R-14810 Texto: MI_EIE_LVC_07

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
 MODELO DE PROTOCOLO: SORO

Produto: Partida n°: Vencimento:/...../.....
 Seção: EIE n°: Data:/...../.....
 Início:hmin Término:hmin

Disposição das Amostras

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

Densidade Ótica das Amostras

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

Cálculo do Cut-Off (CO)
 CO = XCN x 2
 XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO.
 DO = Densidade ótica.
 CN = Controle Negativo.

$$CO = \frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} = XCN = X$$

 CO = X x 2 =

Técnico Responsável:
 Observações:

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
 MODELO DE PROTOCOLO: FILTRO

Produto: Partida n°: Vencimento:/...../.....
 Seção: EIE n°: Data:/...../.....
 Início:hmin Término:hmin

Disposição das Amostras

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

Densidade Ótica das Amostras

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

Cálculo do Cut-Off (CO)
 CO = XCN x 3
 XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO.
 DO = Densidade ótica.
 CN = Controle Negativo.

$$CO = \frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} = XCN = X$$

 CO = X x 2 =

Técnico Responsável:
 Observações:



EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos

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



11. ANEXO B - BULA DO TR-DPP®-LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA/BIO-MANGUINHOS

TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA LEISHMANIA
(material fornecido para 20 determinações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total venoso.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A *Leishmania* está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1984 a 1999, 37.294 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV, algumas vezes referida como Kalazar é uma doença crônica e potencialmente letal se não tratada antes do aparecimento de sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no baço, fígado e gânglios linfáticos¹.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotômios através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimônio pentavalente ou estibogluconato de sódio¹.

A LV é uma zoonose na qual os cães têm sido implicados como importantes reservatórios para o parasita^{4,5}. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebotomo fêmea infectado. Programas de controle para LV incluem a eutanásia de cães infectados identificados através de teste sorológico. Este procedimento tem provado ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil⁵.

Vários ensaios como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para este diagnóstico^{6,7} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem, imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania*, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2 a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania*. Em seqüência, reage com antígenos recombinantes de *Leishmania* ligados a uma membrana (fase sólida).

A amostra é aplicada ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPÃO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania* produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Supportes DPP® contendo Antígenos de <i>Leishmania</i> e o Conjugado de Ouro Coloidal adsorvidos em Membranas Especiais	20 unidades
Tampão de Corrida	01 frasco (6 mL)
Alças Coletoras Descartáveis (5 µL)	20 unidades
Lancetas Estéreis Descartáveis	20 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Cronômetro ou relógio
- Micropipeta calibrada para 5 µL. (como alternativa à alça coletora)
- Luvas descartáveis

- Recipiente seguro para descarte de material biológico
- Álcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. Não congele o kit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso em diagnóstico *In vitro*.

Somente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observar as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde, segundo as instruções contidas neste manual;
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados;
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso;
- As amostras de sangue não testadas imediatamente após a coleta, devem ser refrigeradas entre 2 e 8°C, podendo ser usadas em até 3 dias;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2 e 8°C por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro deste período, as amostras devem ser congeladas (-20°C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Componentes de kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, separe o Kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os kits;
- Não pingar sangue diretamente no suporte de teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações abaixo (ver Procedimento do Teste);
- Cuidado ao adicionar a amostra: a alça deve ser mantida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste;
- Cuidado ao adicionar o tampão de corrida: o frasco deve ser mantido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser dispensadas ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste onde se encontra a amostra;
- Aguardar cinco minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar quatro gotas do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO);

ATENÇÃO: Alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

- Após o uso, suportes, ponteiros, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartadas em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfeito funcionamento do teste, usar 5 µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

Sangue total

Utilizar a lanceta para obter sangue a partir da orelha, patas ou rabo do animal. Para teste imediato utilizar as alças coletoras.

Sangue Total Venoso

Coletar o sangue assepticamente nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Certifique-se que o tubo de sangue foi bem misturado antes da amostragem. Siga corretamente o procedimento do teste

Soro

obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma

Coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS

1. Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retirar o número necessário de componentes do TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam a temperatura ambiente no momento do uso.



3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.



4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

5. Encostar a alça coletora de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.



6. Segurar a alça coletora na posição vertical e tocar na área de aplicação da amostra, poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte para liberar 5 µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste.



7. Virar o frasco de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO). Adicionar 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO).



8. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.



9. Virar o frasco de tampão e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 2 (TAMPÃO). Adicionar 4 (quatro) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 2 (TAMPÃO).



10. Deixar o teste correr por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos, descartar o teste.

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

Leitura Visual

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50 cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de testes.

Leitura com Equipamento - Leitor de Testes DPP®

Alternativamente pode-se fazer a leitura dos testes DPP® com equipamento específico. Seguir as instruções de uso do equipamento para obtenção do resultado.

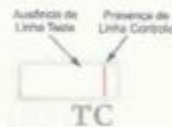
ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser interpretados tanto visualmente ou com a ajuda de um leitor DPP®. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

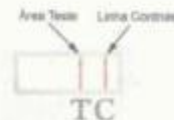
Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.



Resultado REAGENTE

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para *Leishmania* foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.



Resultado INVÁLIDO

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C). Independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE

Após término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.

Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.

- Proceda a leitura do teste em, no máximo, 25 minutos.

- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.

- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para leishmaniose na amostra testada.

- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição a leishmaniose ou infecção por leishmaniose.

Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.

- Um animal infectado com Leishmaniose que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade para Leishmaniose foram determinadas pela avaliação da capacidade do teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos de detectar anticorpos específicos para Leishmaniose em amostras clínicas de cães. Comparado ao teste parasitológico, para estas amostras, o teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 98,3% (167/171), sendo 1 amostra indeterminada. Quando comparado ao Teste EIE (Bio-Manguinhos), para amostras de cães sem suspeita de leishmaniose, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou uma especificidade de 97,4% (175/186), sendo 6 amostras indeterminadas.

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a simplicidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a evidência da infecção por Leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm, 2004.
3. PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. Impact of Canine Control of the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 65: 510-517, 2001.
4. ASHFORD, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., da Conceicao Eulalio, M., Sampaio, D.P., Badaro, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57, 1998.
5. REITHINGER, R., Quinell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of Leishmania infantum Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356, 2002.
6. DO ROSARIO, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 197-203, 2005.
7. PORROZZI, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 544-548, 2007.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ

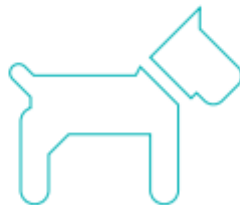
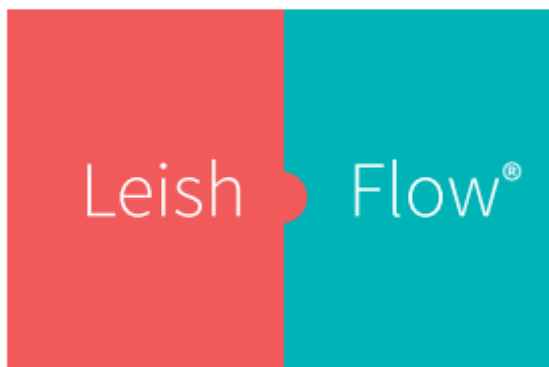
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.025/0001-35

SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br

Indústria Brasileira

12. ANEXO C - BULA DO LEISHFLOW

www.leishflow.com



INDICAÇÃO DE USO

Kit reagente para ensaio de imunossorológico por citometria de fluxo aplicada na determinação de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em soro ou plasma canino.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose visceral (LV) encontra-se em franca expansão em centros urbanos sendo importante destacar o papel dos cães como reservatório da doença (Ashford et al., 1998; Reis et al., 2009; Coura-Vital et al., 2011). A importância dos cães como fonte de infecção de *L. infantum* fica mais evidente quando se observa, em diversas partes do mundo, que a maioria dos focos de LV humana está diretamente relacionada às áreas onde se encontram altos índices de soro-prevalência caninos (Faye et al., 2010; Nunes et al., 2010; Giorgobiani et al., 2011). No Brasil, a soro-reatividade é empregada como critério para indicar a eutanásia dos cães, como medida de controle da LV, segundo normas do Ministério da Saúde (MS, 2011). A iniciativa de introduzir a pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo para análise sorológica em doenças parasitárias abriu novas perspectivas para o estabelecimento de técnicas diagnósticas empregando parasitos fixados como suporte antigênico (Martins-Filho et al., 1995; Carvalho-Neta et al., 2006; Andrade et al., 2009). Promastigotas de *L. infantum* conservados em Formol 0.5% e estocados na temperatura de 2-8°C constituem a condição ideal de preservação do suporte antigênico a ser utilizado no ensaio sorológico por citometria de fluxo (Fier et al., 2013). O teste diagnóstico LeishFlow® é baseado na pesquisa de anticorpos caninos anti-*Leishmania infantum* e utiliza o citometria de fluxo como equipamento de leitura e análise dos resultados.

FUNDAMENTOS DO TESTE

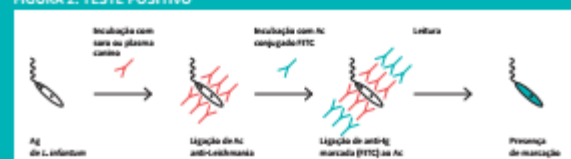
A técnica de sorologia por citometria de fluxo fundamenta-se na reação dos anticorpos presentes nas amostras de soro ou plasma de cães com antígenos fixados de *Leishmania infantum* obtidos a partir de cultura in vitro. O teste LeishFlow® é dividido em duas etapas. Na primeira etapa, adiciona-se o controle positivo, controle negativo e amostras de soro ou plasma devidamente diluídas (1:4096) em contato com o suporte antigênico. Se os anticorpos estiverem presentes no soro, estes se ligam ao antígeno (promastigotas fixadas), formando um complexo antígeno-anticorpo. Se o soro testado não contém anticorpos dirigidos contra o antígeno em particular, não se formará o complexo antígeno-anticorpo e os componentes que não se ligaram serão eliminados nas etapas de lavagem. Na segunda etapa, adiciona-se uma anti-*immunoglobulina* canina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação da anti-*immunoglobulina* marcada (FITC) aos mesmos. Caso não se forme o complexo de ligação, os componentes que não se ligaram serão eliminados nas etapas de lavagem. As reações são avaliadas em citômetro de fluxo que utiliza um sistema óptico eletrônico e permite a mensuração da emissão de fluorescência. Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros são expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual.

ESQUEMA DO TESTE

FIGURA 1: TESTE NEGATIVO



FIGURA 2: TESTE POSITIVO



MATERIAL FORNECIDO

Placa de Microtitulação (fundo em "U")	04 unidades
Tampão de Diluição e Lavagem (D&L)	04 unidades
Antígeno de <i>Leishmania infantum</i>	02 unidades
Controle Negativo	02 unidades
Controle Positivo	02 unidades
Conjugado	01 unidade
Manual de instruções de uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

Micropipetas multicanal e monocanal ajustáveis
Ponteiros descartáveis
Placas de Microtitulação 96 poços para diluição das amostras
Equipamentos de proteção individual (EPI)
Barquetes ou reservatórios
Estufa a 37°C
Centrífuga
Citômetro de Fluxo

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

Todos os componentes do kit devem ser conservados na temperatura indicada de 2-8°C. Os kits reagentes são estáveis até data de validade marcada na embalagem.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

A qualidade dos resultados obtidos neste conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas laboratoriais, tais como:

- ▶ Caso a necessidade de conduzir ensaios que não contemplem o número total de amostras por placa, o técnico responsável pelo ensaio deverá cumprir boas práticas laboratoriais de forma a garantir a qualidade microbiológica dos reagentes. Nestes casos, o frasco do tampão de diluição e lavagem deverá ser manipulado em local estéril, ou então, ser novamente filtrado em filtro microbiológico de 0,22 µm. Os demais reagentes presentes no kit podem ser abertos sobre a bancada, entretanto, é recomendado que os mesmos não permaneçam abertos e expostos por um período de tempo prolongado. Caso o tubo contendo antígeno de *Leishmania* fique exposto por mais de 24 horas, o teste deverá ser invalidado;
- ▶ Homogeneizar todos os componentes do kit antes de usar;
- ▶ Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) em todas as etapas do teste;
- ▶ Desprezar os materiais utilizados no ensaio em solução de hipoclorito de sódio 1,0%;
- ▶ Não usar os componentes após a data de vencimento;
- ▶ Utilizar os componentes não fornecidos (placas de Microtitulação 96 poços para diluição das amostras; e barquetes ou reservatórios) devidamente limpos para evitar interferências na reação;
- ▶ Cada componente do teste deve ser retirado da temperatura de conservação apenas momentos antes da sua utilização, retornando-os à temperatura indicada logo após o uso.

PROCEDIMENTOS

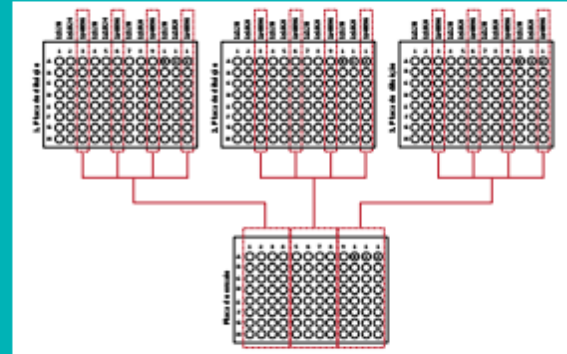
Diluição das amostras e montagem das placas para ensaio sorológico

1. Em uma placa de microtitulação de 96 poços (não fornecida no kit), adicionar 128 µL do Tampão D&L em todos os poços localizados nas canaletas 1, 4, 7, 10.
2. Adicionar 140µL do Tampão D&L em todos os poços localizados nas canaletas 2, 5, 8 e 11 da mesma placa;
3. Adicionar 150µL Tampão D&L em todos os poços localizados nas canaletas 3, 6, 9 e 12 da mesma placa;
4. Adicionar 1µL dos controles e amostras de soros ou plasma nas canaletas 1, 4, 7, 10;
5. Transferir 20µL das amostras diluídas nas canaletas 1, 4, 7, 10 para as canaletas 2, 5, 8 e 11 respectivamente, na mesma ordem. Em seguida, transferir 50µL das amostras diluídas presente nas canaletas 2, 5, 8 e 11 para as canaletas 3, 6, 9 e 12 respectivamente, na mesma ordem;

IMPORTANTE: Para garantir a qualidade do ensaio sorológico, durante as etapas de transferência descritas no item 5, deve-se homogeneizar as amostras antes da diluição das mesmas nos poços indicados, com o auxílio da própria pipeta multicanal;

6. Transferir 50µL da diluição das amostras contidas nas canaletas 3, 6, 9 e 12 (placa não fornecida pelo kit) para, respectivamente, as canaletas 1, 2, 3 e 4 da placa do ensaio sorológico (fornecida pelo kit). Este procedimento deverá ser repetido transferindo amostras das canaletas 3, 6, 9 e 12 (placa não fornecida pelo kit) para as canaletas subsequentes da placa de ensaio sorológico;

FIGURA 2: ESQUEMA PARA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS.



OBSERVAÇÃO: Cada placa de ensaio sorológico (fornecida no kit) deverá conter o controle conjugado (CC), controle negativo (CN), controle positivo (CP).

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA PLACA DE ENSAIO SOROLÓGICO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CC-1	Amostra 8	Amostra 11	Amostra 28	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 45	Amostra 51	Amostra 58	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 81	
CC-2	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 26	Amostra 26	Amostra 36	Amostra 46	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 69	Amostra 76	Amostra 83	
CN-1	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 28	Amostra 27	Amostra 45	Amostra 55	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85	
CN-2	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 87	
CP-1	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 80	Amostra 88	
CP-2	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 81	Amostra 89	
Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 82	Amostra 90	
Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 83	Amostra 91	

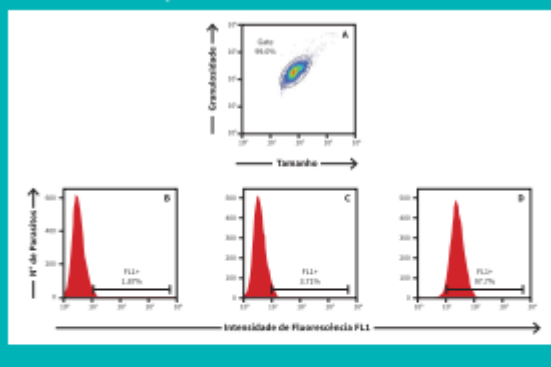
Ensaio sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum*

1. Adicionar 10 µL do Antígeno de *Leishmania infantum* em cada poço da placa do ensaio sorológico;
2. Incubar a(s) placa(s), montada(s) previamente, a 37°C por 30 minutos;
3. Lavar a(s) placa(s) adicionando 150 µL do tampão de diluição e lavagem por poço e, em seguida, centrifugar a 4°C, 2.200rpm por 10min;
4. Descartar o sobrenadante;
5. Repetir o procedimento de lavagem descrito no item 3;
6. Descartar o sobrenadante;
7. Aplicar 50 µL do anticorpo conjugado com título de 1:1000 previamente diluído em Tampão D&L;
8. Repetir o procedimento 2 e 3;
9. Repetir os procedimentos 4, 5 e 6;
10. Adicionar 150 µL do Tampão de D&L;
11. Realizar a leitura no Citômetro de Fluxo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para cada amostra individual serão coletadas informações relativas ao tamanho, granulocidade e intensidade relativa de fluorescência dos antígenos incubados com anti-anticorpos marcados com FITC que, quando excitados, emitem sinais luminosos correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1-fluorescência verde). A análise da reatividade é feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 4A). Para avaliar a intensidade média de fluorescência (FL1) da população selecionada, e medir o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), são construídos histogramas em função do número de parasitos (Figuras 4B, 4C e 4D). O PPFP para cada amostra de soro é determinado através do estabelecimento de um marcador de reatividade (FL1+) em função da fluorescência obtida para o controle conjugado da reação (Figura 4B). O posicionamento do FL1+ deve seguir o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. Empregando-se o mesmo marcador FL1+, são obtidos os valores de PPFP para controle negativo (Figura 4C), controle positivo (Figura 4D) e amostras individuais. Para cada placa de ensaio, um novo marcador é posicionado empregando-se o controle do conjugado.

FIGURA 4: INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS



ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os índices de desempenho do teste LeishFlow® Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foram determinados (em intervalo de confiança de 95%) usando métodos parasitológicos como teste de referência (gold standard). Foram empregados cães controle não infectados e cães infectados por *L. infantum* e o teste apresentou sensibilidade de 100.0% (90.4-100.0) e especificidade de 100.0% (88.6-100.0). Cães infectados com outros agentes patogênicos (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*) foram usados para os cálculos individuais de especificidade. A especificidade observada nas amostras de *T. cruzi* foi de 55.6% (33.7-75.5), 80.0%

(62.7-90.5) para o grupo *L. braziliensis*, 93.3% (78.7-98.2) e 100.0% (70.1-100.0) para os grupos infectados com *E. canis* e *B. canis* respectivamente. Adicionalmente, amostras de soros de 40 cães imunizados com diferentes vacinas anti-LVC (Leishmune®, Leish-Tec®, LBSap) não apresentaram reatividade sorológica no teste.

ESTABILIDADE

Se a temperatura de estocagem for mantida, os reagentes contidos no kit reagente são estáveis até a data de validade impressa nos rótulos internos e externos, não podendo ser utilizados após esta data.

PRECAUÇÕES

1. Não usar os reagentes contidos no kit reagente após a data de validade impressa na embalagem;
2. Todas as incubações devem ser realizadas com as placas envoltas em papel alumínio;
3. Recomenda-se utilizar na descontaminação do material, solução de hipoclorito de sódio a 1%.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. O teste LeishFlow® deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando a obtenção de resultados confiáveis;
2. Somente utilizar o kit se o lacre de segurança não estiver violado;
3. A leitura do teste deverá ser realizada no mesmo dia após o término do protocolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1] Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalia MC, Sampaio DP, Sadoro R (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jaco-bina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59:53-57.
- 2] Reis AB, Martins-Filho AD, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri W, Comila-Oliveira R (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128:87-95.
- 3] Couza-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Souares RD, Reis LE, et al. (2013). Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2191.
- 4] Faye B, Barak AL, Bucheton B, Dieme MM, Basvanaganam O, Hide M, Demoue J, Chey M, Ndoye JL, Konate O, Claire M, Senghor MII, Faye MN, Sy I, Niang AA, Moller JF, Victor K, Marty P, Delvaux P, Kwecht R, Mellul S, Dierckx S, Gaye O (2010). Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? *Microbes Infect* 12(14-15):1219-25.
- 5] Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SH (2010). Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* 170:133-135.
- 6] Giorgobiani E, Chitadze N, Chanturia G, Grzebelidze M, Jochim RC, Machabishvili A, Tushishvili T, Zedgirdze Y, Manjgaladze MK, Iashvili N, Malkhanadze MP, Zakaraya T, Nikalishvili K, Markishvili I, Badashvili G, Daranelidze T, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D. (2011). Epidemiologic Aspects of an Emerging Focus of Visceral Leishmaniasis in Tbilisi, Georgia. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1415.
- 7] Ministério da Saúde (2011). Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico 286 da leishmaniose visceral canina; Nota técnica conjunta nº01/2011 - CDD/287 CGLAB/DE-VIS/5/MS.
- 8] Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Campado JR, Brener J (1995). Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypanostigote antibodies and monitor the efficacy treatment in human Chagas disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2:569-573.
- 9] Flow cytometry used in canine visceral leishmaniasis diagnosis Carvalho-Neta AI, Rocha RDR, Gontijo CMF, Reis AB, Martins-Filho AD (2008). *Arq Bras Med Vet Zootec*, 58:480-488.
- 10] Andrade RA, Silva Araujo MS, Reis AB, Gontijo CM, Vianna LR, Mayrink W, Martins-Filho OA (2008). Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 128:79-86.
- 11] Kir HG, Aguiar-Souares RDO, Roatt BM, Moreira ND, Couza-Vital W, Carneiro CM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Giunchetti RC, da Silveira-Lemos O, Reis AB (2013). Effect of the preservative and temperature conditions on the stability of *Leishmania infantum* promastigotes antigens applied in a flow cytometry diagnostic method for canine visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect* 76:470-476.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Laboratório de Pesquisas Clínicas/Escola de Farmácia/Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas/Campus Morro do Cruzeiro/Sala 1
Caixa Postal: 35400-000, Ouro Preto - MG

E-mail: atendimento@leishflow.com.br

Telefones: (31)3559-1694

(31)3559-1036

"SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO"

Conservar entre +2 e +8°C.



13. ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/18, intitulado "Avaliação da eficácia do emprego concomitante de vacinação e coleiras impregnadas com deltametrina no controle da Leishmaniose Visceral Canina", que tem como responsável o/a Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 30/06/2019.

Ouro Preto, 22 de julho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP

