

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LÍLIAN DIAS NASCIMENTO

**ACURÁCIA E CONFIABILIDADE DO
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PRODUZIDO
POR BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ
PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Rio de Janeiro

2012

TESE DP/CDI-IP/EC L.D.NASCIMENTO 2012

Acurácia e confiabilidade do ensaio imunoenzimático
produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o
diagnóstico da leishmaniose visceral canina

LÍLIAN DIAS NASCIMENTO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Sonia Regina Lambert Passos

Co-orientadora: Dra. Eliame Mouta Confort

Rio de Janeiro

2012

LÍLIAN DIAS NASCIMENTO

Acurácia e confiabilidade do ensaio imunoenzimático
produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o
diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Sonia Regina Lambert Passos

Co-orientadora: Dra. Eliame Mouta Confort

Banca Examinadora

Dra. Maria de Fátima Madeira
Doutora em Biologia Parasitária
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Dr. Carlos Augusto Ferreira de Andrade
Doutor em Saúde Pública
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Dra. Claudia Tereza Vieira de Souza
Doutora em Saúde Pública
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Dr. Rafael de Oliveira Resende
Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Dra. Luciana Tricai Cavalini
Doutora em Saúde Coletiva
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Dr. Sandro Antonio Pereira (Suplente)
Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Sonia Regina Lambert Passos, pela orientação, incentivo, muita paciência e dedicação durante a realização deste trabalho;

À minha co-orientadora, Dra. Eliame Mouta Confort por todos os ensinamentos, apoio, amizade, incentivo e confiança sempre a mim dispensada;

À Dra. Maria de Fátima Madeira e sua equipe pela realização das culturas e subtipagem das amostras;

Ao LAPCLIN-DERMZOO, em especial Marina e Daniela, que realizaram o trabalho em campo, apesar de todas as dificuldades;

À Dra. Raquel Pacheco e sua equipe pela realização da PCR das amostras;

Ao Serviço de Epidemiologia, em especial Liliane, João e Yara que contribuíram para a realização deste trabalho;

A todos do Serviço de Parasitologia - IPEC, pelo constante apoio e amizade ao longo de tantos anos, em especial Andréia, Flávia, Patrícia, Elaine, Jamyra, Cíntia, Ana Paula e Tatiana;

À Coordenação de Pós-Graduação, em especial a Priscilla e Marcelo, pela atenção, competência, estando sempre disponíveis a ajudar;

Ao Fabiano, por toda ajuda, amor, incentivo e paciência.....muita paciência;

A minha filhota Lara e daqui a pouco Felipe que mesmo sem saber sempre alegam minha vida;

Aos meus queridos amigos de Bio-Manguinhos, Marta, Chris, Bruna, Leila, Roberto, Keila, Elaine, Danielle, Alan, Claudio e Regina por todo incentivo, companheirismo e estarem sempre torcendo por mim;

À minha chefe Claudia Barroso pelo apoio, amizade e por permitir que esse trabalho fosse concluído sem problemas.

Nascimento, LD. **Acurácia e confiabilidade do ensaio imunoenzimático produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** Rio de Janeiro, 2012. 117 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Em decorrência da importância que o cão doméstico exerce frente à manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral (LV), uma das estratégias de controle da doença é a eliminação de cães soropositivos. No entanto, até o início deste trabalho, ainda não havia sido realizado um estudo de acurácia diagnóstica com tamanho amostral expressivo do ensaio imunoenzimático (EIE) disponível no Brasil para diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC). Neste estudo foi avaliada a acurácia, reprodutibilidade e a validação do EIE para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (EIE-LVC) produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). Foram incluídos 802 cães de áreas endêmicas captados por vigilância ativa e em Centros de Controle de Zoonoses (CCZ). Para o estudo de confiabilidade toda a amostra foi analisada de forma mascarada e em duplicata e 167 amostras foram repetidas também em outro laboratório (CCZ-Belo Horizonte). Foram considerados cães com LVC os que apresentaram diagnóstico parasitológico positivo com isolamento de *Leishmania (Leishmania) chagasi* ou imunofluorescência indireta (IFI) e reação em cadeia da polimerase (PCR) positivos. A confiabilidade das observações intraobservador foi excelente, com coeficiente de correlação intraclassa (CCI) de 0,98 (Intervalo de Confiança - IC 95% 0,98;0,99) para toda amostra e excelentes coeficientes de correlação de concordância de Lin. Para a confiabilidade entreobservadores, o resultado também foi excelente. Os parâmetros de acurácia calculados para as duas aferições realizadas com toda amostra (N=802) indicaram sensibilidade de 89,9% (IC 95% 86,5;92,7) e 87,6% (IC 95% 83,9;90,7) para a 1ª e 2ª aferições, respectivamente, e especificidade de 89,4% (IC 95% 86,0;92,2) e 91,6% (IC 95% 88,5;94,1). A acurácia foi alta independente da condição clínica do cão com áreas sobre a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) grandes variando de 0,94 a 0,92, e como esperado, os valores preditivos positivos aumentaram com a piora da condição clínica do cão. O desempenho do teste EIE-LVC o credencia para o diagnóstico em população de cães suspeitos de LVC.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose visceral. 2. Cão. 3. Estudos diagnósticos. 4. Sensibilidade e Especificidade. 5. Reprodutibilidade de testes.

Nascimento, LD. **Accuracy and reliability of enzyme immunoassay produced by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2012. 117 p. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas Institute of Clinical Research.

ABSTRACT

Due to the importance of domestic dog carries forward to the maintenance of the cycle transmission of visceral leishmaniasis, one of the strategies of disease control is the elimination of seropositive dogs. However, until the beginning of this work, had not been a study of diagnostic accuracy with expressive sample size available in Brazil for an enzyme immunoassay (EIA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL). We evaluated the accuracy, reproducibility and validation of EIA for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (EIE-LVC) produced by the Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos). We included 802 dogs from endemic areas captured by active surveillance and Zoonosis Control Centers (ZCC). For the study of reliability, tests were performed in duplicate and masked for entire sample and 167 samples were also repeated in another laboratory (ZCC-Belo Horizonte). We considered those dogs with CVL showed positive parasitological diagnosis with isolation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* or indirect immunofluorescence and polymerase chain reaction positive. The reliability of intraobserver was excellent, with intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.98 (confidence interval - 95% CI 0.98, 0.99) for the entire sample and excellent Lin's concordance correlation coefficients. The reliability between observers was still excellent. Accuracy parameters calculated for the two measurements taken with all serum sample (N = 802) showed a sensitivity of 89.9% (95% CI 86.5,92.7) and 87.6% (95% CI 83.9,90.7) for the 1st and 2nd measurements, respectively, and a specificity of 89.4% (95% CI 86.0,92.2) and 91.6% (95% CI 88.5,94.1). Accuracy was high regardless of the clinical condition of the dog with areas under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve ranging from 0.94 to 0.92, and as expected the positive predictive values increased with worsening clinical condition of the dog. The performance EIE-LVC enable the diagnosis in a population of dogs suspected of CVL.

Keywords: 1. Visceral leishmaniasis. 2. Dog. 3. Diagnostic studies. 4. Sensitivity and specificity. 5. Reproducibility of tests.

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
Tabela 1. Características clínicas dos cães com LVC e controles.	42
Tabela 2. Prevalência de características dos cães com diagnóstico positivo para LVC e cães controles.	43
Tabela 3. Coeficiente de correlação de concordância de Lin para toda a amostra de cães (N=802) em análises intraobservador comparado a resultados entre laboratórios de 167 amostras – EIE-LVC Bio-Manguinhos.	45
Tabela 4. Confiabilidade do ensaio imunoenzimático considerado como variável categórica para leishmaniose visceral canina em duas aferições independentes pelo mesmo profissional treinado (N=802) e em dois laboratórios distintos (N=167).	49
Tabela 5. AUCs do teste EIE-LVC para toda a amostra (N=802) e segundo estado geral do cão.	55
Tabela 6. Melhor ponto de corte para EIE-LVC segundo estado geral do cão e parâmetros de acurácia: Sensibilidade, Especificidade e Razões de Verossimilhança Positivas e Negativas com respectivos IC de 95%.	55

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1: Operacionalização do “padrão de referência”	31
Figura 2. Fluxograma das amostras dos animais utilizados para avaliação do EIE-LVC desde a seleção até a definição cães com LVC e cães controles.	41
Figura 3. Diagrama de dispersão para duas aferições do EIE-LVC (N= 802) no mesmo laboratório em momentos distintos.	45
Figura 4. Gráfico Bland-Altman do EIE-LVC (N=802).	46
Figura 5: Gráfico Bland-Altman EIE-LVC (N=167).	47
Figura 6. Distribuição das diferenças entre as densidades ópticas (DO) com relação ao estado geral do cão.	48
Figura 7. Gráfico de Youden com resultados da análise (intraobservador) do EIE-LVC (N=802).	50
Figura 8. Gráfico de Youden com resultados de EIE-LVC da análise entreobservadores de 167 amostras realizadas em laboratórios do Rio de Janeiro (IPEC) e de Belo Horizonte (CCZ).	50
Figura 9. Gráfico Dot plot das três aferições para a primeira leitura da densidade óptica (DO1) e segunda leitura (DO2) realizadas no IPEC-RJ e a densidade óptica EIE-BH realizada no CCZ-BH (N=167).	51

Figuras	Páginas
Figura 10. Distribuição das densidades ópticas (DO) nas duas aferições no EIE-LVC nos dois grupos - LVC (N= 395) e controles (N=407).	52
Figura 11. Gráfico Dot Plot para (A) pontos de corte de toda amostra (N=802) e segundo estado geral do cão: (B) bom (N=631), (C) regular (N=102) e (D) ruim (N=69).	53
Figura 12. Curvas ROC e parâmetros de acurácia (A) para toda amostra (N=802) e segundo estado geral do cão: (B) bom (N=631), (C) regular (N=102) e (D) ruim (N=69).	54

SIGLAS E ABREVIATURAS

- 6PGDH** – 6-phosphogluconate dehydrogenase
- AUC** – *Area under curve* (área sob a curva)
- BH** – Belo Horizonte
- Bio-Manguinhos** – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
- CCI** – Coeficiente de Correlação Intraclasse
- CCZ** – Centro de Controle de Zoonoses
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – Desoxinucleosídeo trifosfato
- DO** – Densidade Óptica
- DP** – Desvio Padrão
- DPP** – *Dual Path Platform*
- DPP-TR-LVC** – *Dual Path platform*-Teste Rápido-Leishmaniose Visceral Canina
- EDTA** – Ácido etilendiamino tetra-acético
- EIE** – Ensaio Imunoenzimático
- EIE-LVC** – Ensaio Imunoenzimático-Leishmaniose Visceral Canina
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- G6PDH** – Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- GPI** – Glucose phosphate isomerase
- IC 95%** – Intervalo de 95% de confiança
- IFI** – Imunofluorescência Indireta
- IFI-LVC** – Imunofluorescência Indireta- Leishmaniose Visceral Canina
- IIQ** – Intervalo Interquartil
- IPEC** – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- K** – Índice Kappa de Cohen
- kDNA** – DNA do cinetoplasto
- Kg** – quilograma
- LT** – Leishmaniose Tegumentar
- LV** – Leishmaniose Visceral
- LVA** – Leishmaniose Visceral Americana

LVC – Leishmaniose Visceral Canina
 μ – Média
 μg – micrograma
M – Molar
mg – miligrama
MG – Minas Gerais
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
MLEE – *Multi-locus enzyme electrophoresis*
MS – Ministério da Saúde
ng – nanograma
NH – Nucleosidase
NNN – Novy, McNeal e Nicolle
OMS – Organização Mundial de Saúde
 ρc – Coeficiente de concordância de Lin
 ρ – Coeficiente de correlação de Pearson
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
Pe – Proporção de concordância esperada pelo acaso
PGM – Phosphoglucomutase
pH – Potencial hidrogeniônico
pmol – picomol
Pneg – Proporção de Concordância em negativos
Po – Proporção de concordância observada
Ppos – Proporção concordância em positivos
RJ – Rio de Janeiro
rK 9 – Antígeno recombinante 9
rK 26 – Antígeno recombinante 26
rK 39 – Antígeno recombinante 39
RNAse – Ribonuclease
ROC – *Receiver Operating Characteristic*
RV+ – Razão de Verossimilhança Positiva
RV- – Razão de Verossimilhança Negativa
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

STARD – *Standards for Accurate Report of Diagnostic Studies*

TAD – Teste de Aglutinação Direta

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB – Tetrametilbenzidina

U – Unidade

UI – Unidades Internacionais

V – Volts

V_b – Variância entre indivíduos

V_e – Variância não esperada

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

V_t – Variância total

WHO – World Health Organization

σ – Variância

SUMÁRIO

	Páginas
Introdução	
1. As leishmanioses	1
2. Etiologia e ciclo de transmissão da LV	2
3. Reservatórios	3
4. Manifestações Clínicas da LVC	5
5. Diagnóstico Laboratorial e Controle da LVC	6
6. Validação de Métodos Diagnósticos	13
Justificativa	22
Objetivos	
1. Objetivo geral	23
2. Objetivos específicos	23
Metodologia	
1. Delineamento do estudo	24
2. População Alvo: Amostragem de cães	24
3. Critérios de elegibilidade	25
3.1. <i>Inclusão</i>	25
3.2. <i>Exclusão</i>	25
4. Tamanho amostral	25
4.1. <i>Validação</i>	25
4.2. <i>Confiabilidade</i>	26
5. Manejo dos animais e exame clínico	27
6. Coleta de fragmentos cutâneos	28
7. Coleta de sangue	29
8. Variáveis de interesse	29
9. Confiabilidade e Reprodutibilidade	29
10. Teste de referência	30
11. Cultura para <i>Leishmania</i>	31
12. Caracterização dos parasitas isolados	32
13. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
14. Imunofluorescência Indireta	34
15. Teste em investigação – EIE-LVC	34

	Páginas
16. Mascaramento	35
17. Resultados indeterminados e por espectro de gravidade	36
18. Análise estatística	37
19. Aspectos éticos	39
Resultados	
1. Dados gerais e clínicos	40
2. Reprodutibilidade do EIE-LVC (Bio-Manguinhos)	44
3. Acurácia do EIE-LVC (Bio-Manguinhos)	51
Discussão	56
Conclusões	61
Referências	63
Anexos	
Anexo A – Manual de Instruções (IFI-LVC Bio-Manguinhos)	77
Anexo B – Manual de Instruções (EIE-LVC Bio-Manguinhos)	85
Anexo C – Aprovação no CEUA-FIOCRUZ	95
Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96
Anexo E – Formulários	97

INTRODUÇÃO

1. As leishmanioses

As leishmanioses representam um conjunto de enfermidades parasitárias de distribuição mundial que podem apresentar patogenicidade e alterações clínicas distintas entre si, com comprometimento de pele e mucosas na leishmaniose tegumentar (LT) e de vísceras na leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2010).

São causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*, parasitas com ciclo de vida heteroxênico, cujo ciclo biológico alterna entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (Deane & Deane, 1962; Marzochi & Marzochi, 1994; WHO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu as leishmanioses entre as doenças tropicais definidas como doenças em expansão, para as quais não se dispõe de instrumentos adequados para controle (WHO, 2010). Estima-se que 350 milhões de pessoas em 88 países distribuídos por quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) estão expostas à transmissão de pelo menos uma das trinta espécies de *Leishmania*, com a incidência anual estimada de 1,5 milhões de casos para LT e de 500 mil para LV (Desjeux, 2004; WHO, 2010).

A LV humana é endêmica em diversas áreas tropicais e subtropicais estendendo-se pelas Américas do Sul e Central, norte da África, leste e oeste da região subsaariana, sul da Europa e sudoeste da Ásia e China (WHO, 2010). No Brasil, a LV, também conhecida como calazar, constitui um grave problema de saúde pública, devido à sua ampla distribuição no país e expansão geográfica para regiões consideradas indenes, bem como, pela gravidade das suas formas clínicas podendo levar o indivíduo à morte caso não tenha tratamento adequado e oportuno. Há

registros de casos humanos em 21 unidades da federação, com média anual de casos 3.156 infectados humanos nos últimos dez anos e incidência aproximada de dois casos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2010).

2. Etiologia e ciclo de transmissão da LV

Os agentes etiológicos responsáveis pela LV pertencem ao subgênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*. Na África e Ásia, *Leishmania (Leishmania) donovani*, na África, Ásia e Europa, *Leishmania (L.) infantum*, e no continente americano *Leishmania (L.) chagasi* (Lainson & Shaw, 1987). A nomenclatura utilizada para o agente no novo mundo foi proposta devido a variações bioquímicas encontradas entre os parasitas no continente europeu e americano. Porém, com o aprimoramento das técnicas taxonômicas sejam por isoenzimas (Cupolillo *et al.*, 1994) ou por biologia molecular (Mauricio *et al.* 1999; Mauricio *et al.*, 2001; Ochsenreither *et al.*, 2006) concluiu-se que não há distinção entre as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*.

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de insetos fêmeas infectadas, dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo. Nos flebotomíneos, as leishmanias vivem no meio extracelular na luz do trato digestivo, onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas promastigotas (flageladas), que são posteriormente inoculadas na pele dos hospedeiros mamíferos durante a picada (Desjeux, 1996; Ministério da Saúde, 2006).

O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies distribuídas do Canadá à Argentina. No Brasil, *Lu.*

longipalpis é descrito como o principal vetor na sua transmissão, entretanto outras espécies podem atuar como transmissor em diferentes regiões, como *Lu. cruzi* descrito no Estado do Mato Grosso do Sul (Santos *et al.*, 1998; Pita-Pereira *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre seus criadouros, encontrando-se as formas imaturas em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas e também nas forquilhas das árvores em tocas de animais, ou seja, em solo úmido e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (Basano & Camargo, 2004; Ministério da Saúde, 2006).

O padrão epidemiológico de transmissão sofreu mudanças nas últimas décadas no Brasil. Inicialmente apresentava-se predominantemente rural e periurbano, mas se expandiu para as áreas urbanas de médio e grande porte. Fatores como a urbanização e destruição de ecótopos silvestres, a oferta de fontes alimentares como os animais domésticos, a arborização abundante em quintais, as péssimas condições sanitárias com o acúmulo de lixo, presença de abrigos de animais silvestres dentro do perímetro urbano possibilitaram a domiciliação do vetor *Lu. longipalpis* (Ministério da Saúde, 2006; Mestre & Fontes, 2007).

3. Reservatórios

No Brasil, os reservatórios mais importantes são o cão doméstico (*Canis familiaris*), a raposa (*Dusycion vetulus*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Ministério da Saúde, 2006).

A primeira descrição da leishmaniose em cães foi realizada por Nicolle no Instituto Pasteur de Tunis em 1908. Desde então, parasitas da leishmaniose têm sido isolados dessa espécie em diversos países (WHO, 2010). O estreito relacionamento entre humanos e cães domésticos, o acentuado parasitismo cutâneo

e alta prevalência da infecção em cães, os têm incriminado como principal reservatório da *L. (L.) chagasi* e de extrema importância na cadeia epidemiológica da enfermidade, além da frequente ocorrência da enzootia canina precedendo aos casos humanos (Ashford, 1996; Moreno & Alvar, 2002; Desjeux, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Outros fatores importantes que devem ser levados em consideração na cadeia de transmissão das diferentes regiões endêmicas são os fatores ambientais, o estado nutricional dos animais expostos, a expectativa de vida e as características genéticas tanto da população canina quanto da humana. (Dantas-Torres, 2007).

A incidência de casos humanos é aumentada em anos subsequentes à identificação da alta prevalência em cães (Badaró, 1987). Nesse sentido a OMS recomenda que antes de iniciar as atividades de controle deve-se observar o estudo de distribuição e frequência da enfermidade nos cães, através inquéritos sorológicos (WHO, 2010).

O número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) tem aumentado de forma significativa nas áreas suburbanas do Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Fortaleza, Natal, São Luís, Salvador, Terezinha, Santarém e João Pessoa onde os cães são vistos como o principal reservatório do parasito (Marzochi & Marzochi, 1994).

No Estado do Rio de Janeiro onde anteriormente a LV estava restrita as regiões oeste e centro-oeste da capital, nas quais atingia somente cães com uma prevalência baixa, nos últimos anos essa característica foi alterada drasticamente com a expansão da doença para outras cidades endenes da região metropolitana e do Vale do Paraíba, dentro da mesorregião Sul Fluminense. Essa alteração torna-se de grande importância, não somente pela expansão, mas também pelo registro de

casos e óbitos humanos de leishmaniose visceral americana (LVA) (Marzochi *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

No ambiente silvestre, confinados em bosques ou zoológicos diversos mamíferos podem albergar o parasita como reservatórios. São eles: *Cerdocyon thous* (lobinho), *Speothos venaticus* (cachorro vinagre) *Dusicyon vetulus* (raposa grisalha), *Vulpes vulpes* (raposa vermelha), *Didelphis albiventris* (gambá), *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará), animais da ordem edentata como tatu e preguiças e ainda os primatas. (Deane & Deane, 1962; Lainson *et al.*, 1969; Marzochi & Marzochi, 1994; Ashford, 1996; Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Gramiccia & Gradoni, 2005; Dipineto *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Manna *et al.*, 2009).

4. Manifestações Clínicas da LVC

Nos cães, as manifestações clínicas apresentam um amplo espectro de características que variam do aparente estado sadio a um severo quadro final e são dependentes do tipo de resposta imunológica de cada animal. Inicialmente os parasitas encontram-se no lugar da picada. O parasitismo cutâneo, já descrito desde 1955 por Deane & Deane foi confirmado em cães sororretores do município do Rio de Janeiro, constituindo um sítio de fácil acesso para a confirmação parasitológica em cães suspeitos de LVC (Madeira *et al.*, 2009b). Posteriormente a distribuição da *L. (L.) chagasi* no cão infectado pode ser extensiva, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele, medula óssea, etc (Alvar *et al.*, 2004).

Dentre os principais sinais clínicos nos cães estão as lesões cutâneas, como as dermatites e úlceras, linfadenopatias localizadas ou generalizadas, perda de peso, anorexia, anemia, afecções oculares, onicogribose, atrofia muscular,

esplenomegalia e falência renal (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Diouani *et al.*, 2008).

De acordo com a classificação preconizada pelo Ministério da Saúde, os sinais clínicos dos cães podem ser alocados em três categorias distintas: assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos, com presença de adenite, perda leve de peso e pelo opaco; e sintomáticos, com todos ou alguns sinais mais comuns da doença, como alterações cutâneas, onicogribose, perda de peso moderada ou grave, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (Ministério da Saúde, 2006). Todas as formas clínicas participam ativamente do ciclo de infecção do flebotomíneo (Pozio *et al.*, 1981; Mancianti *et al.*, 1986).

5. Diagnóstico Laboratorial e Controle da LVC

As ações de vigilância e controle normatizadas estão centradas no diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, vigilância e monitoramento canino com eutanásia de cães com diagnóstico sorológico ou parasitológico positivos, vigilância entomológica, saneamento ambiental e controle químico com inseticida de efeito residual e medidas preventivas direcionadas ao homem, ao vetor e ao cão (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil, os municípios com transmissão de LV são estratificados a partir da média de casos humanos dos últimos três anos, segundo risco epidemiológico em: municípios sem transmissão (média de casos = 0), transmissão esporádica (média de casos $\geq 0,1$ e $< 2,4$), transmissão moderada (média de casos $\geq 2,4$ e $< 4,4$) e transmissão intensa (média de casos $\geq 4,4$). Sendo que as medidas de controle são

distintas para cada situação epidemiológica e adequadas de acordo com o município a ser trabalhado (Ministério da Saúde, 2009).

Devido à frequência elevada de cães infectados assintomáticos e com sinais clínicos mínimos, assim como a dificuldade da detecção direta do parasita, a biotecnologia tem-se concentrado no desenvolvimento de testes de diagnóstico indiretos que sejam rápidos e práticos para permitirem monitorar grandes populações de cães, e que também apresentem uma elevada sensibilidade e especificidade para poderem ser utilizados eficientemente nos programas de vigilância epidemiológica (Tesh, 1995; Rosati *et al.*, 2003).

O diagnóstico da LVC compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais podem ser dirigidos para evidenciar o parasita ou para detectar componentes da resposta imune tais como a produção de anticorpos específicos ou reações do tipo celular. Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico de cães podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado ou de linfonodos e, em alguns casos, de biópsias de pele íntegra, de lesões cutâneas ou de outras vísceras. No exame parasitológico direto é realizada a pesquisa de formas amastigotas, em lâminas de vidro, por aposição ou dispersão do material coletado na punção, corado pela técnica de Giemsa ou de Leishman. O exame parasitológico indireto tem por objetivo o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, por exemplo, NNN (iniciais dos nomes de seus idealizadores Novy, McNeal e Nicolle) acrescido de meio Schneider e enriquecido com soro fetal bovino (Deane *et al.*, 1955; Ministério da Saúde, 2006).

A análise histopatológica dos fragmentos teciduais também é importante para o diagnóstico da LVC, pois permite identificar as formas parasitárias e ao mesmo

tempo contribuir para o diagnóstico diferencial com outras doenças (Slappendel, 1988; Lima *et al.*, 2004). Outros métodos utilizados são a imunohistoquímica para detectar antígenos parasitários nos tecidos examinados e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto (kDNA) do parasito (Degrave *et al.*, 1994; Kenner *et al.*, 1999; Schubach *et al.*, 2001; Marcondes *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005). Tafuri e *et al.* (2004) descreveram um método alternativo, preciso e de menor custo, utilizando soro canino hiperimune como anticorpo primário, para ser aplicado na técnica de imunohistoquímica. Com este método, os autores observaram facilmente formas amastigotas de *Leishmania* em diferentes órgãos.

A superposição de áreas endêmicas de LT e LV, como é o caso do município do Rio de Janeiro, pode dificultar o diagnóstico desses animais quando baseado somente em resultados de testes sorológicos, uma vez que coinfeções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* são descritas (Madeira *et al.*, 2006). A eletroforese de enzimas (isoenzimas) constitui um método muito eficaz na identificação de espécies de *Leishmania* (Cupolillo *et al.*, 1994). Cerca de seis sistemas enzimáticos (nucleosidase - NH₁ e NH₂, glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PDH, glucose phosphate isomerase - GPI, phosphoglucomutase - PGM e 6-phosphogluconate dehydrogenase - 6PGDH) conseguem, com segurança, separar amostras de *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* que podem ocorrer simultaneamente na área do estudo.

Dentre os testes sorológicos, a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) são as técnicas mais utilizadas em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LV, devido à possibilidade de utilizar amostras de sangue em papel filtro (eluato), algo que facilita a coleta e baixa o custo (Nunes *et al.*, 2001; Almeida *et al.*,

2005, Silva *et al.*, 2011). Desvantagens operacionais podem limitar o uso da IFI na rotina diagnóstica devido à necessidade do uso de microscópio óptico por pessoal treinado e pelo fato da leitura da lâmina por um técnico, de reações fracas ou pouco características, ser considerada como de avaliação subjetiva (Almeida *et al.*, 2005; WHO, 2010).

O desempenho do teste ELISA está diretamente influenciado pela qualidade dos antígenos utilizados. Estudos mostram que os testes de ELISA que utilizam preparações de antígenos brutos apresentam importantes limitações por causa da baixa especificidade, podendo produzir falsos positivos e reações cruzadas (Mancianti *et al.*, 1996), mesmo com sensibilidades elevadas (Ashford *et al.*, 1992; Mancianti *et al.*, 1995; Mancianti *et al.*, 1996; Sideris *et al.*, 1996).

O teste de aglutinação direta (TAD) como descrito por El Harith *et al.* (1996) pode ser empregada com bons resultados para diagnóstico da LVC (Islam *et al.*, 2004), porém, não é usada na rotina diagnóstica pela rede de saúde no Brasil. Nos últimos anos importantes avanços têm acontecido na elaboração de exames sorológicos para diagnóstico da leishmaniose visceral, construído a partir de antígenos puros ou recombinantes.

Diversos antígenos recombinantes de *L. (L.) chagasi* (rK9, rK26 e rk39) foram testados e avaliados quanto ao desempenho no diagnóstico da leishmaniose visceral humana (Houghton *et al.*, 1998; Zijlstra *et al.*, 1998; Bhatia *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2003) e canina (Ozensoy *et al.*, 1998; Zerpa *et al.*, 2000; Scalone *et al.*, 2002; Rosário *et al.*, 2005; Rosati *et al.*, 2003). O desempenho da sensibilidade e especificidade de testes com estes antígenos tem se mostrado elevado comparado aos testes sorológicos com antígenos convencionais (Chappuis *et al.*, 2006). O desempenho dessas moléculas em ensaios sorológicos clássicos tem influenciado a

sua utilização na construção de testes diagnósticos de última geração que empregam diferentes antígenos recombinantes associados num único ensaio, o que poderá aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da LV humana e canina.

Baseado nesse conceito, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) desenvolveu um teste imunocromatográfico voltado para o diagnóstico da LVC. Trata-se de um teste rápido qualitativo que emprega a técnica de imunocromatografia de duplo percurso (DPP) e o antígeno recombinante rK28 cujo resultado apresentou excelente desempenho (Pattabhi *et al.*, 2010). Possui vantagens em relação aos métodos até então utilizados, como a maior precisão, interpretação simplificada dos dados, uso de volumes mínimos de amostra, além da compatibilidade com diferentes tipos de fluidos corporais como sangue, soro, saliva, plasma, urina. Entretanto, em estudo recente conduzido por Grimaldi *et al.* (2012) foi demonstrado que apesar do *Dual Path platform*-Teste Rápido-Leishmaniose Visceral Canina (DPP-TR-LVC) ter apresentado alta especificidade (96%), sua sensibilidade entre os cães assintomáticos foi baixa (47%).

Entretanto, a complexidade do cenário clínico e a dificuldade da eleição do teste de referência (“padrão ouro”) têm dificultado os estudos de validação e padronização. Apesar de se saber que não existem testes ideais, nos quais sensibilidade e especificidade cheguem a 100%, é importante conhecer e determinar a abrangência e limites dos testes empregados. Um teste de referência não adequado pode enviesar as estimativas do teste a ser avaliado (sensibilidade e especificidade), especialmente quando se trata de valores de detecção do fenômeno biológico com uma importante amplitude de variação bioquímica (Hui & Zhou, 1998;

Hawkins *et al.*, 1999). Além disso, é possível que valores encontrados nos testes sorológicos sejam influenciados pelos períodos de manifestação da doença, principalmente nos precoces após a infecção quando o cão ainda não apresentou sinais clínicos.

O exame parasitológico direto apesar da alta especificidade não apresenta uma sensibilidade satisfatória para ser utilizado como o padrão ouro mais adequado, chegando a uma proporção de 90% de casos positivos identificados (Madeira *et al.* 2004). A imunofluorescência indireta tem sido utilizada até o momento como uma alternativa por apresentar uma ótima especificidade mesmo tendo uma sensibilidade menor (Mancianti *et al.*, 1995). Outros testes de referência propostos seriam a reação em cadeia da polimerase (PCR) devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, entretanto seu potencial de contaminação (falsos positivos) e o elevado custo da técnica têm limitado substancialmente seu uso na rotina diagnóstica ou como um teste de referência confiável nos estudos de validação.

Em estudo recente foi realizada uma comparação entre a PCR quantitativa e qualitativa onde não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as sensibilidades dos dois testes, com valores que variaram de 83% a 89% respectivamente (Solcà *et al.*, 2012). No entanto, a PCR quantitativa permite a quantificação do parasita, sendo uma ferramenta eficaz para confirmar o diagnóstico de LVC quando os resultados sorológicos do EIE são inconclusivos ou quando o cão ainda não soroconverteu (Martinez *et al.*, 2011).

O exame parasitológico indireto (cultura) representa uma metodologia útil pela sua elevada especificidade, no entanto necessita de procedimentos invasivos para a coleta do material (biópsia de pele, mucosa ou aspirado de medula óssea) além de maior complexidade operacional e limitada pela quantidade de material

coletado, complicando mais, quando se trata de cães sem manifestações clínicas (Madeira *et al.*, 2004).

Devido à complexidade do cenário epidemiológico dessa doença, as ações de controle devem ser adequadas ao contexto da área em questão para que possam ser efetivas. Na LVA, em área urbana, o cão doméstico continua sendo a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado esforços na aplicação de métodos cada vez mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LVC nesses animais. A tecnologia recombinante em conjunto com a caracterização de antígenos específicos imunodominantes têm permitido o desenvolvimento de uma segunda geração de diagnóstico imunoenzimático, a qual poderá auxiliar de forma mais eficaz no controle da LVA.

O diagnóstico canino adequado somado a medidas integradas de controle são ferramentas importantes para prevenir e controlar a doença nos humanos. O diagnóstico precoce associado a uma retirada rápida desses animais do campo reduz significativamente a soroprevalência dos demais cães na região, além de reduzir a incidência de casos humanos (Ashford *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 1998; Marzochi *et al.*, 2009). Entretanto, os exames diagnósticos disponíveis atualmente possuem limitações que dificultam as ações de controle. Os exames sorológicos de IFI e ELISA apresentam alta sensibilidade e especificidade quando se compara animais infectados sintomáticos com animais negativos de áreas não endêmicas (Andrade *et al.*, 1989; Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2008). Porém, essa realidade se altera quando há animais infectados oligossintomáticos, assintomáticos ou negativos de áreas endêmicas, portadores de doenças passíveis de reação cruzada, alterando a sensibilidade e a especificidade, e comprometendo o diagnóstico (Silva *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Porrozzi *et al.*, 2007). Um teste

com uma baixa acurácia não cumpre o papel proposto para orientar ações de saúde pública, pois não distingue com precisão os cães infectados dos sadios, havendo a eutanásia de animais negativos e permanência de positivos.

Até o ano de 2011, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) orientava os laboratórios da rede pública participantes do Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses, recomendando o uso dos métodos diagnósticos sorológicos, Ensaio imunoenzimático (EIE) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) (titulação > 1:40) como confirmatório. Este procedimento era utilizado na rotina e nos inquéritos caninos em municípios onde já houve registro da doença (Ministério da Saúde, 2011a). A partir de dezembro de 2011, após estudos de avaliação do teste imunocromatográfico (*Dual Path platform*-Teste Rápido-Leishmaniose Visceral Canina, DPP-TR-LVC), encomendados pelo MS, o qual emprega as proteínas recombinantes k39 e k26 como antígenos, novas recomendações foram divulgadas. Em decorrência destes estudos, o MS através de nota técnica (Ministério da Saúde, 2011b) orienta a implementação gradativa nos laboratórios da rede pública do uso do DPP-TR-LVC que passa a ser usado como teste de triagem e o EIE-LVC como teste confirmatório para diagnóstico da LVC. Nesta situação, o DPP pode ser usado com amostras de sangue total, soro ou plasma, e o EIE apenas em soro obtido de sangue por punção venosa.

6. Validação de Métodos Diagnósticos

O entendimento que mensuração é essencial à ciência parece uma observação banal e comum. A maioria dos livros texto de epidemiologia apresenta um capítulo sobre este tema, bem como os de filosofia da ciência. Mas, apenas na

última década esta noção disseminada deu lugar ao desenvolvimento de abordagens sistemáticas tanto para a mensuração laboratorial quanto para as ciências sociais.

A definição de mensuração mais amplamente utilizada é a formulada por Stevens (1951) que “é a atribuição de números a objetos ou eventos de acordo com regras”. Nas ciências sociais, para Carmines & Zeller (1979), “é o processo de ligar conceitos abstratos a indicadores empíricos”. Nesse sentido medir envolve considerações teóricas e empíricas, pois foca na relação crucial entre indicadores empiricamente construídos que é a resposta observável e o conceito não observável subjacente. Se esta relação é fraca, modelos inadequadamente construídos não resultam em maior compreensão dos fenômenos.

Existem duas propriedades básicas das medidas empíricas: a confiabilidade e a validade. Confiabilidade ou reprodutibilidade de um teste refere-se a extensão em que um experimento ou qualquer procedimento de medida gera os mesmos resultados em medidas repetidas. A medida de qualquer fenômeno sempre contém certa quantidade, maior ou menor, de erro aleatório. O objetivo de uma medida isenta de erro nunca é atingida em qualquer área da investigação científica, assim a não confiabilidade está sempre presente em extensão não conhecida. Porém, embora não ocorra concordância exata entre duas medidas repetidas, elas poderão tender a ser consistentes na mesma direção – o que se denomina confiabilidade. Quanto mais consistente mais reprodutível.

Estudos de confiabilidade aferem a extensão em que os resultados concordam com os obtidos por diferentes observadores, instrumentos ou procedimentos, ou pelo mesmo observador, instrumento ou procedimento em diferentes momentos no tempo. Considera-se idealmente que toda fonte de

variabilidade deveria ser creditada à variação entre participantes do estudo, porém outras variações interferem na vida real, duas delas passíveis de prevenção pelo controle de qualidade: a variabilidade intraobservador e a entreobservadores ou entre métodos.

A variabilidade intraobservador (inerente ao método) é a variabilidade de uma determinação laboratorial conduzida duas vezes na mesma amostra pelo mesmo técnico usando a mesma técnica ou a variabilidade de uma resposta a uma questão pelo mesmo participante do estudo quando a mesma entrevista é conduzida duas vezes.

A variabilidade entreobservadores (interobservadores) ou entre métodos é a variabilidade na mesma amostra conduzida por dois técnicos diferentes usando o mesmo teste ou a variabilidade de uma determinação laboratorial realizada no mesmo indivíduo pelo mesmo técnico usando diferentes ensaios.

Variabilidade dentro dos participantes do estudo refere-se a hábitos, comportamentos ou fisiológica ao longo do tempo em um mesmo indivíduo (depende de duas aferições em momentos diferentes).

A percentagem de concordância entre dois grupos de observação é obtida por dividir o número de observações pareadas nas células de concordância pelo número total de observações. É a maneira mais simples de resumir concordância para variáveis categóricas e pode ser calculada para variáveis com qualquer número de categorias. Porém é afetada pela prevalência do fenômeno em estudo, tanto muito elevada quanto muito pequena. Assim, para superar esta deficiência foram propostos duas medidas de concordância percentual positiva – o número de ocorrências para as quais ambos os observadores relatam um resultado positivo excluído o número médio de positivos para cada um dos observadores.

Essas medidas não levam em conta a concordância que pode ocorrer exclusivamente por acaso. A medida que corrige para o acaso é a estatística kappa definida como a fração de concordância observada não devida ao acaso em relação a concordância máxima não casual quando usando uma classificação categórica de uma variável. Como se depreende da fórmula:

$$K = (Po - Pe) / (1 - Pe)$$

onde Po é a proporção de concordância observada e Pe é a concordância esperada pelo acaso.

Existem várias classificações para a interpretação do valor de kappa; segundo Landis & Koch (1977): pobre (< 0); discreto (0 a 0,20); razoável (> 0,20 a 0,40); moderado (>0,40 a 0,60); substancial (> 0,60 a 0,80); quase perfeito (>0,80 a 1,0). Fleiss (1981) classificou em apenas três faixas: pobre (< 0,40); regular a bom (> 0,40 a 0,80) e excelente (> 0,80). A proposta por Altman (1991) divide-se em cinco categorias: pobre (< 0,20); discreto (> 0,20 – 0,40); moderado (> 0,40 a 0,60); bom (> 0,60 a 0,80) e muito bom (> 0,80).

Quando os resultados podem ser expressos em mais do que duas categorias, certos tipos de discordâncias podem ser mais graves do que outras e assim o kappa ponderado pode ser utilizado.

Para dados contínuos os índices mais frequentemente utilizados são: diagramas de correlação (*scatter*) que plotam os valores de cada método; Bland-Altman Plot que plota a diferença entre medidas pareadas na ordinal contra o valor médio na abscissa; Coeficiente de Correlação Linear (Pearson) – menos adequado para este uso e o Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) (ou Coeficiente de

Confiabilidade) que é uma estimativa da fração da variabilidade da média total causada pela variação entre indivíduo. Pode ser estendido para calcular a confiabilidade entre mais de dois observadores.

$$\text{Fórmula Geral CCI} = V_b/V_t = V_b/V_b+V_e$$

onde V_b é variância entre indivíduos; V_t é a variância total e V_e é a variância não esperada (erro).

O Coeficiente de Correlação Intraclasse (modelo *two-way* com dois avaliadores fixos) produz medidas de consistência dos valores dentro dos casos. O valor máximo de um CCI é 1; o limite inferior é um valor negativo indeterminado. Tem-se sugerido que valores de CCI acima de 0,75 devam ser considerados excelentes e valores acima de 0,4 como boa confiabilidade.

O gráfico de Bland-Altman (Bland & Altman, 1986) é um método estatístico para comparar duas técnicas ou aferir a confiabilidade de uma técnica utilizando medidas repetidas em uma série de indivíduos. O gráfico verifica se a variabilidade ou a precisão de um método está relacionada à característica a ser mensurada. Neste gráfico as diferenças (ou alternativamente as razões) são plotadas contra as médias das duas aferições. Linhas horizontais são traçadas com as diferenças médias, e com a diferença média mais ou menos 1,96 vezes o desvio padrão das diferenças. Se as diferenças dentro da média $\pm 1,96$ DP não são clinicamente importantes, os dois métodos ou duas aferições podem ser utilizados intercambiavelmente. O plot é útil para revelar as relações entre as diferenças e as médias, olhar para qualquer viés e identificar possíveis dados discrepantes (*outliers*).

O coeficiente de concordância ρ_c (Lin, 1989 & 2000) avalia o grau em que dois pares de observações caem em uma linha de 45° desde a origem. Ele contém medidas de precisão ρ que mede o quão distante cada observação se encontra da linha de melhor ajuste.

$$\rho_c = \frac{2\rho\sigma_x\sigma_y}{\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + (\mu_x - \mu_y)^2}$$

onde ρ é o coeficiente de correlação de Pearson; σ corresponde à variância e μ é a média.

McBride (2005) propôs a seguinte escala descritiva para valores de coeficiente de correlação de concordância (para variáveis contínuas): pobre (<0,90); moderada (0,90 a 0,95); substancial (0,95 a 0,99) e quase perfeita (>0,99).

O gráfico de Youden (Youden, 1959) é um método que compara tanto a variabilidade dentro do laboratório ou observador quando a entre observadores. Cada ponto no plot corresponde aos resultados de um laboratório e é definido pela primeira variável no eixo X e a segunda aos resultados do outro laboratório no eixo y. Uma linha horizontal mediana é traçada em paralelo ao eixo X de modo que existam tanto pontos acima quanto abaixo da linha. Uma segunda mediana é traçada em paralelo ao eixo Y de modo que tantos pontos à esquerda quanto à direita da linha estejam presentes. *Outliers* não são usados para determinar a posição da linha mediana. A interseção das duas linhas medianas é denominada mediana *Manhattan*. Um círculo é traçado, que deveria incluir 95% dos laboratórios, se erros constantes individuais pudessem ser eliminados. Uma linha de referência

de 45 graus é traçada através da mediana *Manhattan*. Assim a interpretação consiste em que os pontos que caem próximos à linha de referência, mas distantes da mediana de *Manhattan* (a interseção das duas linhas medianas) indicam um grande erro sistemático. Pontos que caem longe da linha diagonal indicam grande erro aleatório. Pontos fora das áreas indicadas pelo círculo podem indicar grande erro total.

Além disso, um indicador deve mediar aquilo a que se propõe medir, isto é, ele deve fornecer uma representação acurada de algum conceito abstrato, medir aquilo a que se propõe medir mais do que refletir algum outro fenômeno. Validade refere a relação crucial entre conceito e indicador. Validade é um problema de grau, nunca uma propriedade tudo-ou-nada (Carmines & Zeller, 1979); e um teste pode ser bastante confiável sem ser válido.

Existem dois tipos de erros que afetam as medidas empíricas: erro aleatório e erro não aleatório. Erro aleatório é um termo usado para designar todos aqueles fatores causais que confundem a mensuração de qualquer fenômeno. A quantidade de erro aleatório é inversamente relacionada ao grau de confiabilidade de um instrumento de medida, a questão também não é se algum instrumento apresenta erro aleatório, mas em que extensão isto ocorre. Este efeito de erro aleatório é totalmente assistemático – pode sub ou superestimar o verdadeiro valor, e afeta todas as áreas da investigação científica incluindo as ciências biológicas e físicas. O segundo tipo de erro é o não aleatório ou sistemático, cuja direção é sempre a mesma e afeta a validade de uma medida em sua essência, pois impede os indicadores ou testes de representar o construto teórico.

O que se valida não é um teste apenas, mas uma interpretação dos dados gerados por um procedimento específico (Cronbach, 1971). Existem vários tipos

diferentes de validade: critério, conteúdo, construto (extensão em que uma medida está de acordo com a teoria).

Validade de critério ou validade preditiva é o termo mais estreitamente reconhecido como validade. Define-se como quão bem uma medida correlaciona-se com um instrumento ou critério externo a ela. Se o critério é atual denomina-se validade de critério concorrente enquanto validade preditiva reserva-se a um critério futuro.

Dois termos são considerados os principais componentes da validade: Sensibilidade (a habilidade de um teste em identificar corretamente aqueles que têm a doença ou característica de interesse) e Especificidade (habilidade de um teste em identificar corretamente aqueles que não têm a doença ou característica de interesse).

Em termos clínicos, os valores preditivos positivo e negativo correspondem respectivamente à proporção de verdadeiros positivos entre indivíduos com teste positivo e verdadeiros negativos entre o total de negativos. São medidas utilizadas no contexto da avaliação de procedimentos diagnósticos e influenciadas pela prevalência da doença. (Sackett *et al.*, 1991).

Medidas compostas de acurácia como o índice de Youden, *Receiver Operating Characteristic* (Curva ROC) e *Likelihood ratios* contêm em sua fórmula tanto a especificidade quando a sensibilidade e são mais informativas.

A Curva ROC plota em um gráfico o desempenho do teste diagnóstico e permite a comparação entre diferentes estratégias por ser adimensional e a estatística é a área sob a curva (AUC) que varia de 0 a 1, quanto mais próxima de 1 melhor o teste em discriminar entre doentes e sadios. A curva ROC, através da sua área sob a curva, oferece uma estimativa da acurácia do teste em investigação. Na

curva ROC, a taxa positiva (sensibilidade) é plotada contra a taxa de falsos positivos (100 – especificidade) para diferentes pontos de corte. Cada ponto de corte na curva ROC representa um par correspondente a um limiar de decisão. Um teste com discriminação perfeita entre doentes e não doentes possui uma área sobre a curva igual a 1 (Zweig & Campbell, 1993).

Todos os estudos de validação trazem no contexto um senão muito importante: se o critério de referência é verdadeiramente representativo do desfecho que se deseja estudar. Em estudos epidemiológicos sobre validação, análises de custo e risco aos participantes devem também ser levadas em consideração, geralmente busca-se por exames mais rápidos, baratos e igualmente confiáveis e válidos em subgrupos de pacientes.

JUSTIFICATIVA

Em decorrência da importância que o cão doméstico exerce frente à manutenção do ciclo de transmissão da LV, uma das estratégias de controle da doença é a eliminação de cães soropositivos. Diante da dificuldade de detecção direta do parasito e à variabilidade de sintomas que impossibilitam o diagnóstico clínico, torna-se fundamental a existência de métodos sorológicos de fácil execução, rápidos e acurados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

No Brasil, os inquéritos soropidemiológicos caninos utilizavam o ensaio imunoenzimático como método de triagem e a positividade na imunofluorescência indireta (IFI) como critério confirmatório para eliminação dos cães (Ministério da Saúde, 2011). Com as novas recomendações, a partir do final do ano de 2011, de substituição gradativa do protocolo usado para a rotina diagnóstica da LVC, o EIE continua indicado, agora como técnica confirmatória.

No entanto, até o início deste trabalho, ainda não havia sido realizado um estudo de acurácia diagnóstica com tamanho amostral expressivo do ensaio imunoenzimático disponível no Brasil para diagnóstico de LVC. Dessa forma, este estudo investigou a acurácia e a confiabilidade do teste sorológico de ensaio imunoenzimático (EIE-LVC) produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o diagnóstico da LVC utilizando um delineamento de estudo compatível com os protocolos de validação preconizados na literatura (Sackett *et al.*, 1991) que melhorem a amostragem e as análises das variáveis categóricas e contínuas no momento da validação (Bossuyt *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar e validar o ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (Ensaio Imunoenzimático - Leishmaniose Visceral Canina; EIE-LVC) produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) - FIOCRUZ.

2. Objetivos Específicos

- i. Estimar a reprodutibilidade (variabilidade intra e entreobservador) do EIE-LVC;

- ii. Estimar medidas de validade de diagnóstico acurácia: sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança, área sob a curva ROC e os valores preditivos do EIE-LVC.

METODOLOGIA

1. Delineamento do estudo

Estudo seccional diagnóstico do ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina (EIE-LVC), no município do Rio de Janeiro e Belo Horizonte, com amostras coletadas no período de 1 de março de 2006 a 1 de julho de 2007, tempo necessário para a realização do trabalho de campo e completar o tamanho amostral calculado para este estudo. O delineamento seguiu o preconizado no *guideline Standards for Accuracy Reporting of Diagnostic Studies (STARD)* (Bossuyt *et al.*, 2003).

2. População Alvo: Amostragem de cães

A população de estudo foi composta por cães de áreas onde há ocorrência de casos humanos e caninos, confirmados de leishmaniose visceral (áreas com surto e áreas endêmicas) abrangendo todo o espectro da leishmaniose visceral canina (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos). Para tanto, foram realizados dois tipos de seleções nas áreas endêmicas: *i)* seleção por busca ativa realizada pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro e *ii)* seleção por amostragem sistemática de cães de três áreas do município do Rio de Janeiro: Bangu, Guaratiba e Realengo.

Também foram de interesse os cães recolhidos pelos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) do município do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte com suspeita de LVC. Neste caso, o CCZ informou ao médico veterinário do trabalho que um cão suspeito foi recolhido e esse foi até o CCZ para averiguar a elegibilidade do cão e procedeu a coleta de dados quando cabível.

3. Critérios de elegibilidade

3.1. Inclusão

- Todos os cães suspeitos de leishmaniose visceral (com manifestações sugestivas) com ou sem proprietário, detectados por busca ativa e que foram examinados pelo médico veterinário da equipe; além de todos os cães que residem na mesma casa dos cães incluídos;
- Cães assintomáticos foram selecionados, até atingir o tamanho amostral necessário, com intervalos de retiradas proporcionais ao tamanho populacional de cães saudáveis existentes em cada área endêmica;
- Cães sem proprietário recolhidos pelo CCZ devido a suspeita de LVC que não foram incluídos anteriormente pelas outras estratégias.

3.2. Exclusão

- Todos os cães suspeitos de leishmaniose visceral, em que os proprietários não concordaram com a participação (sem termo de consentimento livre e esclarecido).
- Cães cujo material de coleta foi insuficiente e/ou contaminado ou com dados clínicos e/ou epidemiológicos insuficientes para análise.
- Cão sem dono ou dono sem casa (tornando inexecutável o retorno e contato), exceto os cães recolhidos pelo CCZ.

4. Tamanho amostral

4.1. Validação

O tamanho amostral calculado necessário e exequível para a realização deste projeto foi de 402 animais em cada grupo (doentes versus não doentes – cães

com LVC versus controles) considerando uma sensibilidade de 95% (para o teste referência – IFI-LVC), uma sensibilidade esperada de 94% (para o método em avaliação – EIE-LVC); uma diferença limite de equivalência entre os dois métodos de 3%, um nível de significância de 5% e um poder de 80% utilizando-se a fórmula de cálculo amostral para equivalência de duas proporções. Para a construção de vários cenários amostrais utilizamos estimativas de sensibilidade e especificidade para o teste de referência IFI disponíveis na literatura científica indexada em trabalhos anteriores (Mancianti & Meciani, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Scalone *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2005) e foram consideradas com cautela as limitações particulares de cada uma delas. As variações de tamanho amostral ocorreram segundo a expectativa do desempenho para o teste EIE-LVC, em avaliação, e segundo a magnitude da margem de erro admitida.

4.2. Confiabilidade

O tamanho amostral para verificação de reprodutibilidade foi estimado em no mínimo 208 soros testados por dois observadores independentes, para um Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) de 0,95, um nível de 95% de confiança e um erro absoluto de 0,02. Assim todas as amostras incluídas (N=802) foram analisadas em duplicata no mesmo laboratório do IPEC (Laboratório de Vigilância em Leishmanioses) pela mesma profissional (LDN) em dois momentos distintos para avaliação da variabilidade intraobservador. Para a avaliação da variabilidade entreobservadores foram repetidas 167 amostras no laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte-MG por outra profissional utilizando os seguintes lotes: IFI-LVC 060LC008Z e EIE-LVC 06PEL010Z.

5. Manejo dos animais e exame clínico

Os cães foram amordaçados e contidos mecanicamente. Foram sedados com cloridrato de ketamina (10 mg/Kg) associado a acepromazina (0,2 mg/Kg) por via intramuscular. Após a sedação ou contenção, foram colocados sobre uma mesa de aço inoxidável.

Durante a consulta, os animais foram submetidos ao exame clínico e dermatológico, no qual foi observada a presença de lesões cutâneas e mucosas, especificando o número e localização, além da presença de sinais clínicos característicos da LVC, avaliação do estado geral, condição corporal e hidratação.

Para este estudo, a forma clínica de cada animal foi determinada a partir dos sinais clínicos característicos, sendo assintomáticos aqueles que não apresentaram esses sinais, oligossintomáticos aqueles que apresentaram de um a dois sinais e polissintomáticos aqueles que apresentaram três ou mais sinais.

Na avaliação da condição corporal do animal, foram estabelecidas as seguintes características:

- **muito magro:** para aqueles que apresentaram as costelas, as vértebras lombares, ossos pélvicos e saliências ósseas facilmente visíveis, sem gordura corporal palpável e perda evidente de massa muscular;
- **magro:** para aqueles que apresentaram costelas facilmente palpáveis, o topo das vértebras lombares visíveis, ossos pélvicos começando a ficar evidentes, sem gordura corporal palpável, cintura e reentrância abdominal evidente;
- **normal:** para aqueles que apresentaram costelas palpáveis, com mínima cobertura de gordura, cintura facilmente observada, reentrância abdominal evidente e abdômen retraído quando visto de lado;
- **obeso:** costelas difíceis de serem palpadas devido a cobertura de gordura, ausência de cintura ou levemente visível, leve reentrância abdominal ou abdômen distendido, depósitos de gordura evidentes sobre a área lombar e base da cauda, podendo existir também sobre o tórax e pescoço.

Como critério para o estado geral do animal, caracterizou-se como:

- **Bom:** para aqueles animais que apresentaram condição corporal ideal ou obesa, alimentação normal, defecação e micção normais, temperatura corporal normal e que interagem com o ambiente e os proprietários;
- **Regular:** para aqueles que estavam magros, não se alimentavam adequadamente, apresentaram alguma alteração em suas funções digestivas e/ou urinárias, podendo ou não apresentar alterações cutâneas e/ou músculo-esqueléticas, podendo ou não estar levemente desidratados, temperatura corporal normal ou alterada, mais quietos, evitavam interagir com os proprietários;
- **Ruim:** para aqueles animais magros ou muito magros, com anorexia, diarreias sanguinolentas ou não, severamente desidratados, com lesões cutâneas e/ou músculo-esqueléticas, que permaneciam deitados ou em um canto da casa, temperatura corporal alterada, alterações respiratórias e/ou oftamológicas;

Em todos os animais foram coletadas amostras de pele do pavilhão auricular direito e da região da escápula. Se houvesse lesão, nessa foi realizada biópsia juntamente com o pavilhão auricular direito excluindo a biópsia do membro.

6. Coleta de fragmentos cutâneos

No local da biópsia foi realizada tricotomia, limpeza com água e sabão, antissepsia com álcool a 70%, anestesia local com lidocaína 2%. Foram retirados dois fragmentos de pele com *punch* 3mm. A primeira amostra foi acondicionada em solução salina estéril, contendo 50 µg de 5'fluorocitosina; 1000 UI de penicilina e 200 µg de estreptomicina por mL para a tentativa de isolamento de *Leishmania* em cultura; a segunda em microtubo estéril para técnica de PCR.

7. Coleta de sangue

Para a coleta de sangue tanto a localização da punção como a quantidade de material coletado dependeu do tamanho do animal: *i)* para cães de grande porte (acima de 10 kg) foram coletados em tubo estéril 10 mL de sangue da veia cefálica, após a realização da tricotomia com lâmina descartável e antissepsia do local da punção com álcool a 70%. *ii)* para cães de pequeno porte (abaixo de 10 kg) a coleta foi de 5 mL e na veia jugular, seguindo os mesmos critérios de punção e antissepsia que os animais de grande porte.

8. Variáveis de interesse

Houve três grupos de variáveis de interesse: (a) variáveis que compuseram o teste de referência (Cultura, PCR e IFI-LVC) e (b) variáveis do teste estudado (EIE-LVC) e (c) variáveis de espectro clínico.

Teste de referência: resultado do teste imunofluorescência, resultado da cultura de *Leishmania* e quando cabível a identificação da espécie isolada, resultado da PCR (biópsia de pele).

Teste estudado: resultados do teste EIE-LVC.

9. Confiabilidade e Reprodutibilidade

O estudo de confiabilidade e reprodutibilidade foi realizado de forma a estimar a variabilidade inerente ao teste testando-se a mesma amostra. Para que houvesse uma estimativa confiável, uma mesma amostra foi testada pelo menos duas vezes de forma mascarada. O mascaramento foi realizado com o mesmo profissional aplicando o teste na mesma amostra em momentos distintos. Para a reprodutibilidade, as amostras também foram analisadas por um profissional do

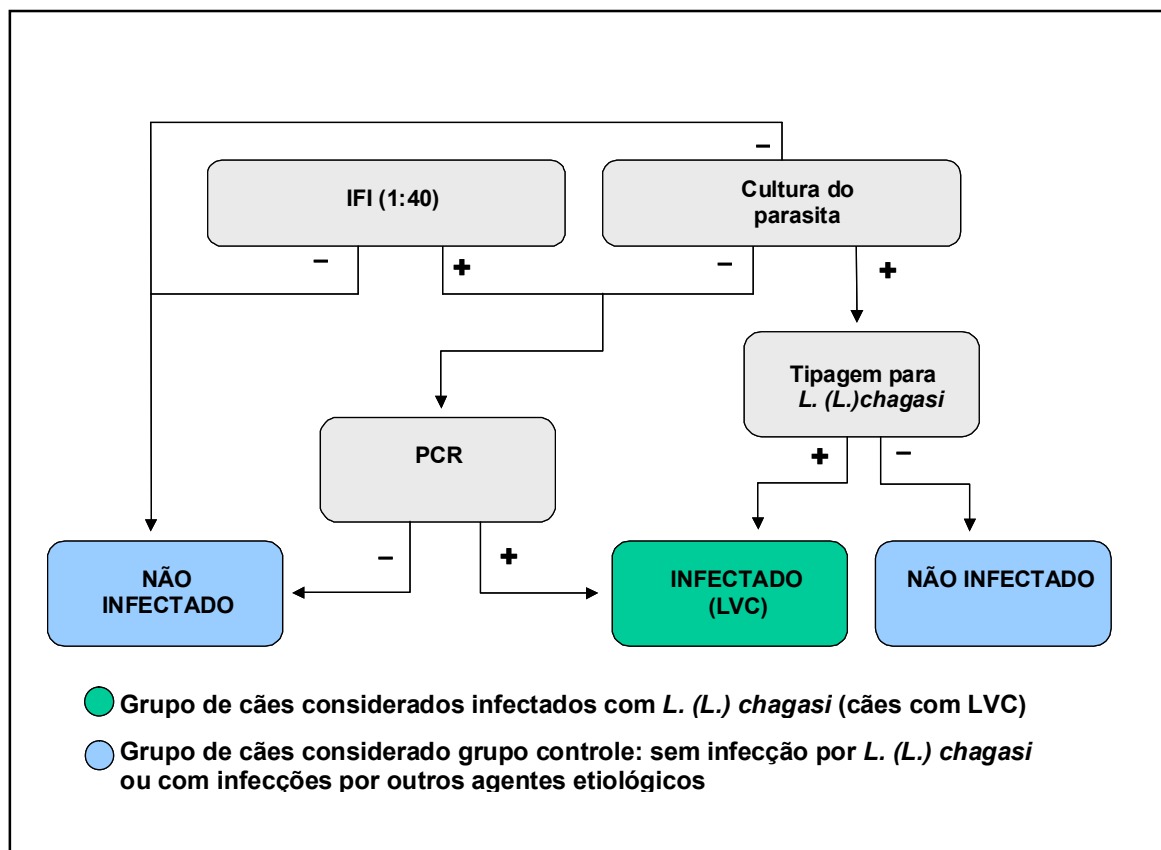
laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte-MG.

10. Teste de referência

Devido à ausência de um teste de referência sorológico (“padrão ouro”) consensual para validação de novas tecnologias utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral, nossa definição dos grupos considerou os resultados de diversos métodos diagnósticos. Desta forma a definição do grupo de “cães com LVC” e do grupo “controle” iniciou-se com uma combinação em paralelo da imunofluorescência indireta (IFI) e o exame parasitológico (cultura) com tipagem para *L. (L.) chagasi* por eletroforese de enzimas (isoenzimas). Nos casos em que a IFI foi positiva e não foi possível o crescimento do parasita na cultura, a técnica de apoio utilizada foi a PCR para detecção de DNA de *L. (L.) chagasi*. Não optamos por utilizar a PCR em paralelo com a IFI e a cultura para todas as amostras por ser desnecessário e elevar substancialmente o custo. Como detalhado na Figura 1, foram considerados cães com LVC os que apresentaram crescimento de *L. (L.) chagasi* na cultura de fragmento de pele ou IFI e PCR positivos.

As amostras para os testes de referência e em investigação foram coletadas simultaneamente de modo que não ocorreu mudança do estado de doença do cão.

O mesmo teste de referência foi aplicado de forma mascarada em toda a amostra considerada. Isto é, o teste de referência não foi aplicado condicionado ao resultado do teste em investigação ou vice-versa.



IFI – Imunofluorescência Indireta; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; LVC – Leishmaniose Visceral Canina

Figura 1: Operacionalização do “padrão de referência”

11. Cultura para *Leishmania*

Para o diagnóstico parasitológico indireto (cultura) foram processados fragmentos teciduais. De cada animal foram coletados fragmentos de lesões cutâneas (quando presentes) e pele íntegra (região da orelha). Na ausência de lesões cutâneas foram coletados fragmentos de pele íntegra de dois locais (região escapular e da orelha). Os fragmentos teciduais foram embebidos em solução salina contendo 50 µg de 5'fluorocytocine; 1000 UI de penicilina e 200 µg de estreptomicina por mL e conservados a 4° C durante 24 horas. Após esse período, cada fragmento

foi transferido assepticamente para um tubo separado contendo meio de cultura bifásico (NNN acrescido de meio Schneider com 10% de soro fetal bovino) e mantido a temperatura de 26-28°C. Os cultivos foram observados a fresco em intervalos semanais durante trinta dias.

12. Caracterização dos parasitas isolados

Foi empregada para tipagem das amostras isoladas a técnica *multi-locus enzyme electrophoresis* (MLEE) (Cupolillo *et al.*, 1994). Formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider enriquecido com soro fetal bovino 10%. Quando a cultura alcançou a concentração com aproximadamente 10^8 parasitas, foi centrifugada e lavada três vezes em salina (NaCl 0,85%, EDTA 0,01M, pH 8,0) e o *pellet* estocado em nitrogênio líquido. A eletroforese em gel de agarose (1%) empregou cinco sistemas enzimáticos: nucleosidase (NH1 e NH2, E.C.3.2.2.1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), glucose phosphate isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9) e 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.43).

13. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para o isolamento do DNA, utilizamos o kit *Genomic Prep Cells and tissue DNA isolation* (Amershan Pharmacia®). Fragmentos de tecido (10-25 mg) macerados com o auxílio de pistilo foram colocados em tubo contendo solução de lise celular e proteinase K (20 mg/mL) e submetidos à temperatura de 65°C durante 3 horas. Após a incubação, foi acrescentada RNase A (2 mg/mL) invertendo o tubo diversas vezes e incubando-o à 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionada solução de precipitação de proteínas, homogeneizando vigorosamente, e após

centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo isopropanol 100%, invertendo o tubo até a formação de um precipitado branco. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e adicionado etanol 70%, centrifugando e desprezando novamente o sobrenadante. Ao final do processo foi adicionada solução de hidratação do DNA. Os tubos foram estocados a -20°C para posterior análise molecular.

A detecção de DNA do parasita foi realizada através da amplificação pela PCR utilizando-se um par de iniciadores D1/D2 que amplificam a região variável dos minicírculos do kDNA de *Leishmania (L.) chagasi/Leishmania (L.) infantum*. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 3 µL de amostra de DNA, solução tampão Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) 0,2 mM, 10 pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA Polimerase e água ultra pura para PCR.

A amplificação do kDNA foi realizada em equipamento termociclador automático (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems®). Os ciclos de amplificação iniciaram-se a 95°C por 3 minutos, seguido por 33 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60,5°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle positivo da reação foi utilizado o kDNA (5 ng/µL) da cepa referência de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e o controle negativo continha todos os componentes, exceto o DNA.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 1,5%. Foram adicionados ao gel, 10 µL do produto amplificado com 1 µL de corante sendo submetido a uma corrida de 80V por aproximadamente 2 horas. Foi utilizado *100 Base-Pair DNA Ladder* (Amersham Pharmacia®) como marcador de tamanho de DNA. O gel foi corado em solução de brometo de etídio

(0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System®).

14. Imunofluorescência Indireta

O teste sorológico IFI consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com parasitos (*Leishmania*) fixados em lâminas de microscopia a qual é revelada com o uso de uma anti-imuglobulina de cão marcada com fluorocromo. A leitura é realizada em microscópio que utiliza incidência de luz ultravioleta na lâmina, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

O kit de Imunofluorescência indireta utilizado foi o produzido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ/RJ) e sua utilização obedeceu às orientações fornecidas no manual de instruções do fabricante (Anexo A).

Um aspecto também importante foi o ponto de corte utilizado para definição de positivos e negativos por este teste, que foi diluições maiores que 1:40, conforme especificado nas recomendações técnicas de uso do kit.

15. Teste em investigação – EIE-LVC

Consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de culturas *in vitro* que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas. A execução e interpretação do teste seguiram as orientações informadas no manual de instruções do fabricante (Anexo B).

O procedimento do teste foi realizado com descrito a seguir: adicionou-se 100µL dos soros controle do teste e das amostras analisadas na diluição 1:100, que

possuindo anticorpos específicos se fixaram aos antígenos presente na placa de reação. Realizou-se uma incubação em estufa a 37°C por 30 minutos e após lavou-se a placa (200 µL/poço) por seis vezes, aguardando 30 a 60 segundos entre cada lavagem (o tampão de lavagem é fornecido no kit). Na etapa seguinte, adicionou-se 100 µL/poço do conjugado (anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase) previamente diluído a 1:100, este se ligou aos anticorpos caso estejam presentes. Realizou-se uma nova incubação em estufa a 37°C por 30 minutos e após lavou-se a placa conforme descrito anteriormente. Para evidenciação da reação, adicionou-se 100 µL/poço do substrato que é composto por um cromógeno (Tetrametilbenzidina-TMB) que, pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio, formou um composto de coloração azul turquesa. Realizou-se uma incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 minutos. Para interromper a reação, adicionou-se 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M, a coloração passou a ser amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades onde não havia anticorpos específicos, não houve desenvolvimento de cor, o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). A leitura dessa placa foi realizada em espectrofotômetro equipado com filtro de 450nm.

16. Mascaramento

Para evitar viés de informação, o mascaramento é altamente recomendado (Bossuyt *et al.*, 2003), principalmente em métodos que de alguma forma são dependentes do operador. Por isso, os testes de referência, as avaliações clínicas e epidemiológicas e o teste em investigação foram aplicados de forma mascarada e independente. Ou seja, a aplicação do teste, dos exames de referência e de outras

avaliações foram realizadas por diferentes técnicos (com códigos no material examinado) e sem o conhecimento do resultado das demais avaliações executadas.

17. Resultados indeterminados e por espectro de gravidade

Como em todo teste de resultado contínuo há expectativa de resultados indeterminados ou na chamada “zona cinza”. Deve-se definir *a priori* qual a menor medida de validade aceitável para caracterização da zona cinza (ex: sensibilidade e especificidade igual a 95%). Através da técnica da curva ROC podem ser estimados os valores dos resultados incluídos na zona cinza de acordo com a aceitação dos investigadores.

Como citado anteriormente, existe um tempo de latência de resposta sorológica dos cães infectados (tempo entre a infecção e surgimento de anticorpos detectáveis). Não há evidências de uma correspondência precisa entre a ausência/presença de anticorpos e as fases das manifestações clínicas. No entanto, parece haver um consenso de que os cães assintomáticos estejam em fases precoces da doença e por isso provavelmente ainda possuem menores títulos de anticorpos.

Devido a estas considerações também foram realizados cenários comparando cães na ausência de manifestações de leishmaniose, isto é, em bom estado geral e que poderiam ser considerados em estágio precoce da doença, admitindo-se nesta fase ser pior a performance do teste em investigação (EIE-LVC), com aqueles em estágio mais avançado de doença, ou seja, em cães com manifestações clínicas (estado regular ou ruim).

18. Análise estatística

Foi construído um banco utilizando o software de gerenciamento (Teleform®) aplicado aos questionários padronizados preenchidos para cada cão incluído no estudo. Os formulários preenchidos com os dados clínicos de anamnese e laboratoriais foram escaneados e validados pelo módulo de controle de qualidade e ao final o banco foi exportado para o software estatístico de análise de dados *Statistical Package for the Social Sciences - SPSS Windows v. 20.0*.

A análise consistiu de quatro etapas conforme preconizado em Rothman & Greenland (1998) e Bossuyt *et al.* (2003): (a) exploração sumária de dados e descrição da amostra; (b) estimativas gráficas e numéricas de confiabilidade; (c) estimativas dos critérios de validade e valores preditivos; (d) estimativa de pontos de corte ótimos e definição de valores indeterminados. Estas análises foram realizadas utilizando-se os softwares MedCalc 12.1, Mariakerke, Bélgica; Win-Pepi 11.1 - programa de computador para Análises Epidemiológicas (Gahlinger & Abramson, 1995); SPSS Windows v. 20.0.

A exploração dos dados constou de busca de inconsistências das observações e observação da qualidade dos dados quanto a valores ausentes e atípicos (possíveis erros de coleta e de digitação), para isto foram utilizados gráficos de dispersão, histogramas, *Box-and-whisker*. Posteriormente, houve construção de tabelas de frequências e estimativas de tendência central e dispersão sobre os dados de interesse clínicos como raça dos cães, local de habitação, idade, sexo, condição clínica, resultados do exame físico.

Foram construídas medidas de confiabilidade e gráficos para visualização de concordância entre as medidas do teste em investigação (EIE-LVC). Para esta avaliação, os estimadores utilizados foram: o Coeficiente de correlação intraclasse

(CCI), modelo *two-way* do tipo consistência para medida única e média com respectivos intervalos de 95% de confiança (Rothman & Greenland, 1998) e de coeficiente de concordância de Lin (Lin, 1989; Lin, 2000). Também foram apresentados gráficos de Bland-Altman (Bland & Altman, 1986) e de Youden (1959). Para a avaliação da confiabilidade intraobservador foram comparadas duas leituras em 802 amostras pela mesma profissional treinada (LDN) em dois momentos diferentes e para a confiabilidade entreobservadores, duas leituras em 167 amostras em dois laboratórios diferentes (CCZ-Belo Horizonte e IPEC-FIOCRUZ), por profissionais distintos.

Para o estudo da acurácia foram construídas curvas ROC de toda a amostragem e estratificando-se pelo estado geral do cão (bom, regular ou ruim) e calculadas estimativas de sensibilidade e especificidade, razão de verossimilhança positiva e negativa e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), considerando o ponto de corte gerado por cada curva ROC com respectivos intervalos de 95% de confiança. Também foram construídos gráficos *dot plot* - gráfico duplo com uma linha horizontal indicando o ponto de corte que melhor separa os dois grupos isto é que minimiza resultados falsos negativos e positivos. Neste estudo foram classificados como assintomáticos aqueles cães sem sinais clínicos sugestivos de LV; oligossintomáticos os com até dois sinais clínicos e polissintomáticos os cães com mais de dois sinais clínicos.

Finalmente, foram estudados possíveis pontos de cortes otimizados através de diferentes técnicas consagradas na literatura. Tais técnicas consistem em equilibrar a sensibilidade e a especificidade do teste através de cálculos de medidas de validade com variações de pontos de corte. Tais estratégias incluem análise além

das estatísticas das áreas sob as curvas ROC (Hanley & McNeil, 1982) como as *odds ratio* diagnósticas.

19. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ) sob o número P-0286/06 (Anexo C), com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo D) sendo assinado pelos donos dos animais incluídos no projeto.

Os procedimentos constaram de preenchimento de formulário (Anexo E) com dados de identificação e de exame clínico sumário do cão e ainda houve coleta de material que constou de retirada de sangue para realização de exames sorológicos e de biópsia de pele (dois fragmentos) de diferentes localizações de acordo com a presença ou ausência de lesões tegumentares evidentes. Esses procedimentos foram realizados por um médico veterinário seguindo recomendações universalmente definidas quando cabíveis tais como: imobilização dos animais, sedação, anestesia local, antissepsia e assepsia em ambiente previamente preparado para este fim.

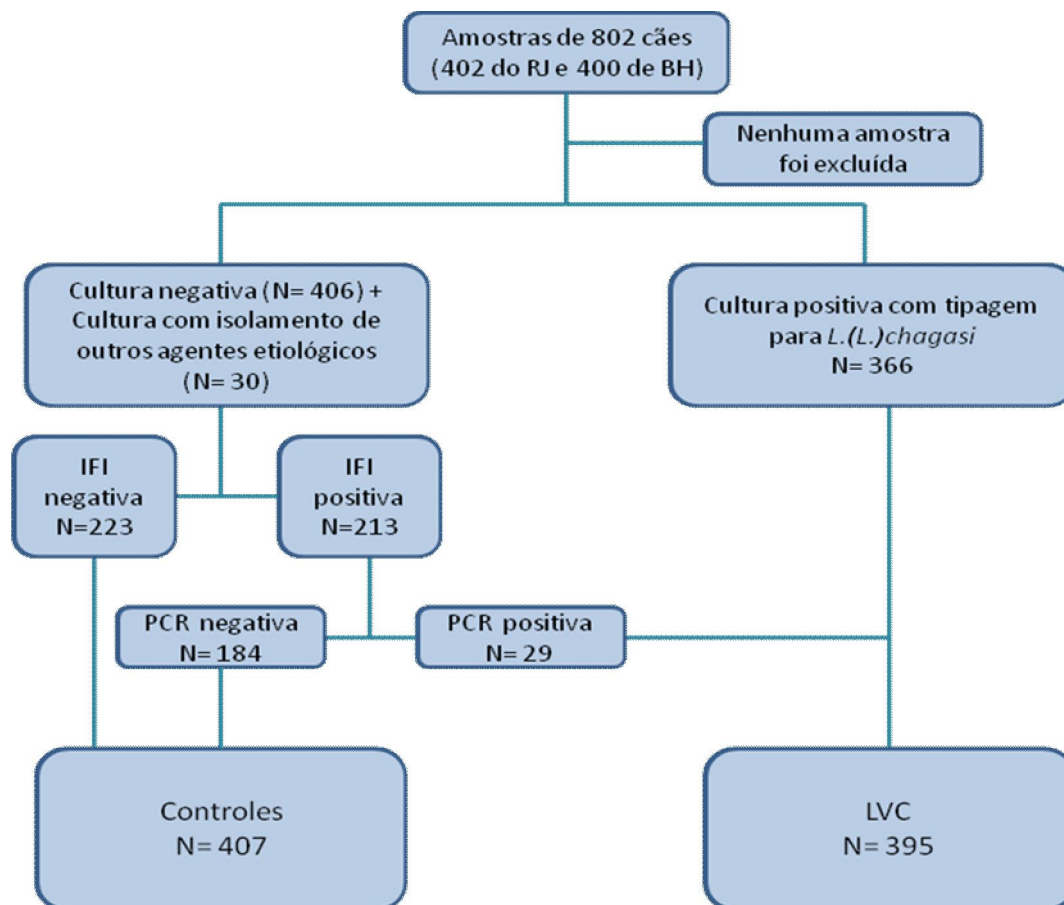
RESULTADOS

1. Dados gerais e clínicos

A população de estudo foi composta por 802 cães, sendo 402 animais do município do Rio de Janeiro e 400 de Belo Horizonte. Dentre os cães examinados, 526 (65,6%) não possuíam raça definida e 433 (54%) eram do sexo masculino, 424 (52,9%) de área urbana e 217 (27,1%) de área rural. A informação sobre ambiente do animal ficou restrita a 206 (25,7%) no quintal da casa e 112 (14,0%) com acesso à rua.

No isolamento parasitário em cultura foram encontradas 406 (50,6%) amostras de cães com cultura negativa, 366 (45,6%) apresentaram positividade e posterior caracterização para *L. (L.) chagasi* e em 30 (3,8%) amostras foram isolados outros agentes etiológicos, *L. (Viannia) braziliensis* (N=7) e *Trypanosoma caninum* (N=23) (Madeira *et al.*, 2009a, Pinto *et al.*, 2010).

A definição do grupo de “cães com LVC” e do grupo “controle” foi realizada a partir de uma combinação em paralelo da imunofluorescência indireta (IFI) e a cultura. Das 802 amostras de cães examinadas, houve discordância entre o resultado da cultura negativa e a IFI positiva em 213 amostras, sendo necessária a realização da PCR para confirmação do diagnóstico (29 amostras positivas). Assim, foram incluídos nas análises do estudo 395 (49,3%) animais com diagnóstico de LVC e 407 (50,7%) sem infecção (controles) (Figura 2).



RJ – Rio de Janeiro; BH – Belo Horizonte; IFI – imunofluorescência Indireta; PCR – reação em cadeia da polimerase; LVC – leishmaniose visceral canina.

Figura 2. Fluxograma das amostras dos animais utilizados para avaliação do EIE-LVC desde a seleção até a definição de cães com LVC e cães controles.

O peso foi aferido em 386 cães e variou de 1 a 55 kg, com mediana de 12 (e intervalo interquartil – IIQ de 8 a 20 kg); a temperatura retal foi aferida em 365 cães e variava de 33,2°C a 41,5°C com média de 38,9°C e mediana 39,0°C (IIQ 38,5- 39,6). O número de lesões variou de uma a dez com mediana de duas (IIQ 1 a 4). Comparando os dois grupos no que tange a estas características temos que o peso mediano era menor (13 kg) e o número de lesões maior (duas IIQ 1 – 5) nos cães com LVC comparados aos controles (18,1 kg e uma lesão IIQ 1-2) (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas dos cães com LVC e controles.

Característica (N)	LVC Mediana (IIQ)	Controles Mediana (IIQ)
Idade (anos) N=474	2,24 (2 – 2,25)	2,0 (2,0 – 3,0)
Peso (Kg) N=789	13,0 (9,7-20,0)	18,1 (10,0 – 25,0)
Número de Lesões N=798	2,0 (1,0 – 5,0)	1,0 (1,0 – 2,0)
Temperatura retal (°C) N=767	38,6 (38,3- 39,5)	38,9 (38,5 – 39,5)

LVC – leishmaniose visceral canina; IIQ - Intervalo interquartil; kg – quilograma.

Na avaliação dos dados clínicos 749 cães (93,4%) apresentavam alguma característica não necessariamente sugestiva de LVC, somente 252 tinham lesões de pele, sendo 101 uma única lesão; 54 duas e 97 três. Observou-se que os cães com diagnóstico de LVC apresentaram uma prevalência mais elevada de algumas características em relação aos animais controles, embora predominassem nos dois grupos cães com bom estado geral e peso normal (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência de características dos cães com diagnóstico positivo para LVC e cães controles.

Características (N)	Diagnóstico		Total
	Controles N(%)	LVC N(%)	
Estado Geral (N=802)			
Bom	375 (92,1)	256 (64,8)	631
Regular	27 (6,6)	75 (19)	102
Ruim	5 (1,2)	64 (16,2)	69
Lesões cutâneas (N=798)	78 (19,2)	174 (44,4)	252
Condição corporal (N=759)			
Muito magro	36 (10,1)	3(0,7)	39
Magro	77(21,7)	41(10,1)	118
Normal	230 (64,8)	347(85,9)	577
Obesos	12(13,4)	13(3,2)	25
Emagrecimento (N=554)	28 (8,3)	74 (24,3)	102
Alopecia (N=773)	12 (3,0)	64 (17,3)	76
Descamação cutânea (N=769)	42 (10,5)	141 (38,2)	183
Onicogribose (N=765)	11 (2,8)	71 (19,5)	82
Alterações oftálmicas (N=759)	39 (9,7)	104 (29,1)	143
Adenite (N=772)	27 (6,7)	88 (23,7)	115
Esplenomegalia (N=777)	23 (5,7)	49 (13,2)	72

Missings: lesões cutâneas (4); condição corporal (43); emagrecimento (248); alopecia (29); descamação cutânea (33); onicogribose (37); alterações oftálmicas (43); adenite (30); esplenomegalia (25).

Pouco mais de um terço dos cães, 301 (37,5%) foi considerado assintomático, enquanto 226 (28,2%) oligossintomáticos, sendo classificados como polissintomáticos 275 cães (34,3%).

Entre os cães considerados em bom estado geral, 286 eram assintomáticos, 202 apresentavam até dois sinais (geralmente alteração leves do tipo descamação cutânea, pelo opaco e adenite) e 143 estavam polissintomáticos, já entre aqueles em regular estado geral 68 apresentavam três sinais físicos ou mais; 20 até dois e 14 nenhum; como esperado, todos os cães avaliados como em estado clínico ruim apresentavam sinais físicos: sendo a grande maioria (N=65) polissintomáticos (lesões de pele, onicogrifose e emagrecimento) e 4 cães oligossintomáticos.

2. Reprodutibilidade do EIE-LVC (Bio-Manguinhos)

Na avaliação sorológica, a confiabilidade dos resultados intraobservador (mesmo laboratório) foi excelente, com o valor do Coeficiente de Correlação Intraclasse de 0,98 (IC 95% 0,98;0,99) para toda amostra e excelentes coeficientes de correlação de concordância de Lin (Tabela 3). Considerando as aferições nos dois laboratórios distintos, a confiabilidade entreobservadores, o resultado ainda foi excelente tanto quando aferido pelo CCI medida única (0,73; IC 95% 0,66;0,78) quanto CCI medida média (0,88; IC 95% 0,86;0,91).

Tabela 3. Coeficiente de correlação de concordância de Lin para toda a amostra de cães (N=802) em análises intraobservador comparado a resultados entre laboratórios de 167 amostras – EIE-LVC Bio-Manguinhos.

Tamanho Amostral	802	167
Coeficiente de correlação de concordância	0,98	0,40
IC de 95%	0,98 a 0,98	0,31 a 0,48
Pearson ρ (precisão)	0,98	0,62
Fator de correção para viés (acurácia)	0,99	0,64

IC – Intervalo de Confiança

Esta boa correlação entre as duas aferições se depreende também pela superposição linear dos pontos à inspeção do gráfico de dispersão das 802 amostras avaliadas pela mesma profissional em duas aferições distintas e cegadas para a caracterização do diagnóstico de referência (Figura 3).

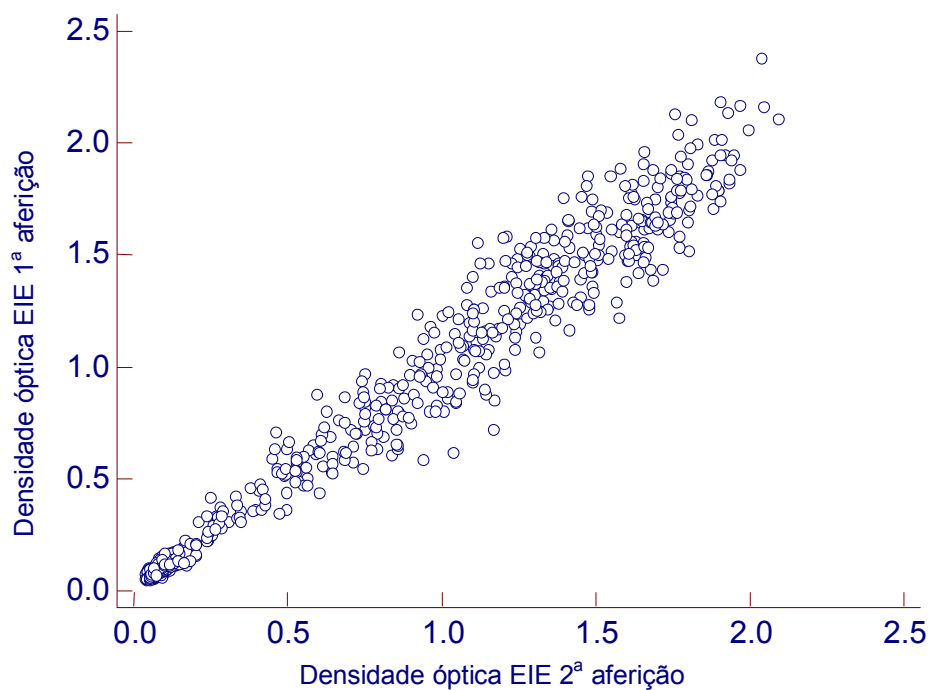


Figura 3. Diagrama de dispersão para duas aferições do EIE-LVC (N= 802) no mesmo laboratório em momentos distintos.

A seguir observa-se o gráfico Bland-Altman para duas aferições no mesmo laboratório em dois momentos diferentes dos 802 cães. Revela, também, reprodutibilidade excelente em medida repetida de cada amostra e mesmo profissional treinado com a maioria das observações recaindo entre dois desvios padrões da diferença (Figura 4). O comportamento foi semelhante, para a reprodutibilidade entre observadores de diferentes laboratórios empregando mesmo lote do kit EIE-LVC Bio-Manguinhos (Figura 5).

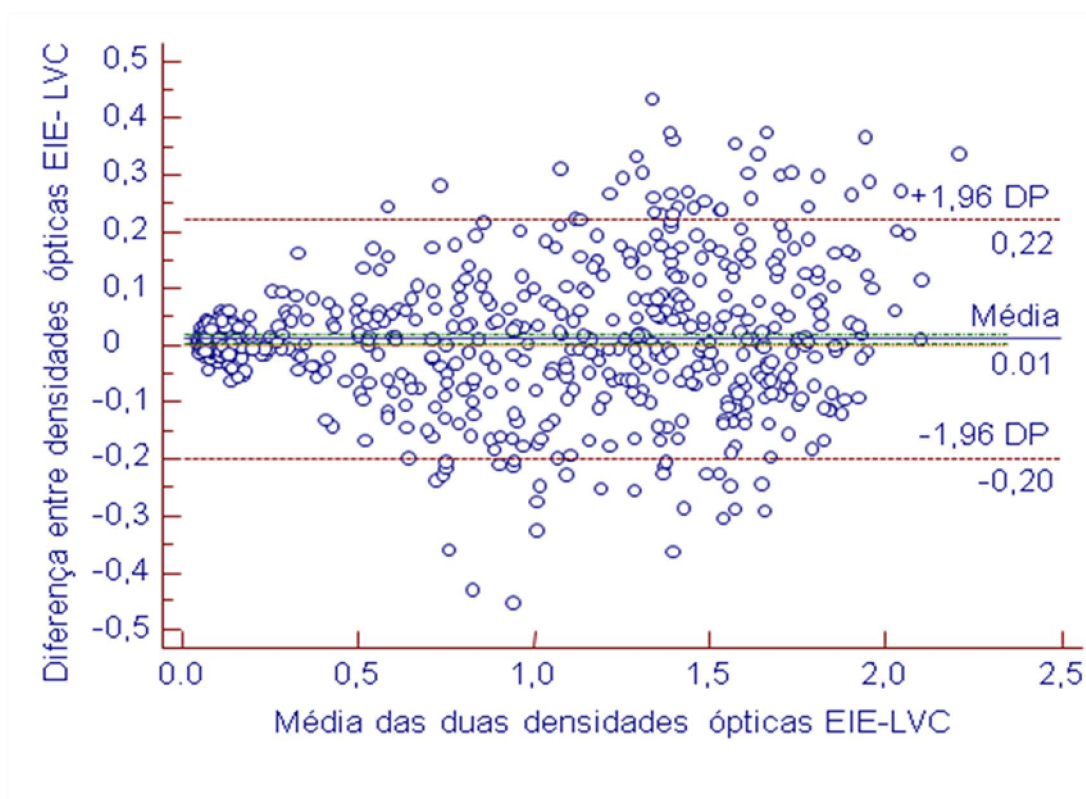


Figura 4. Gráfico Bland-Altman do EIE-LVC (N=802).

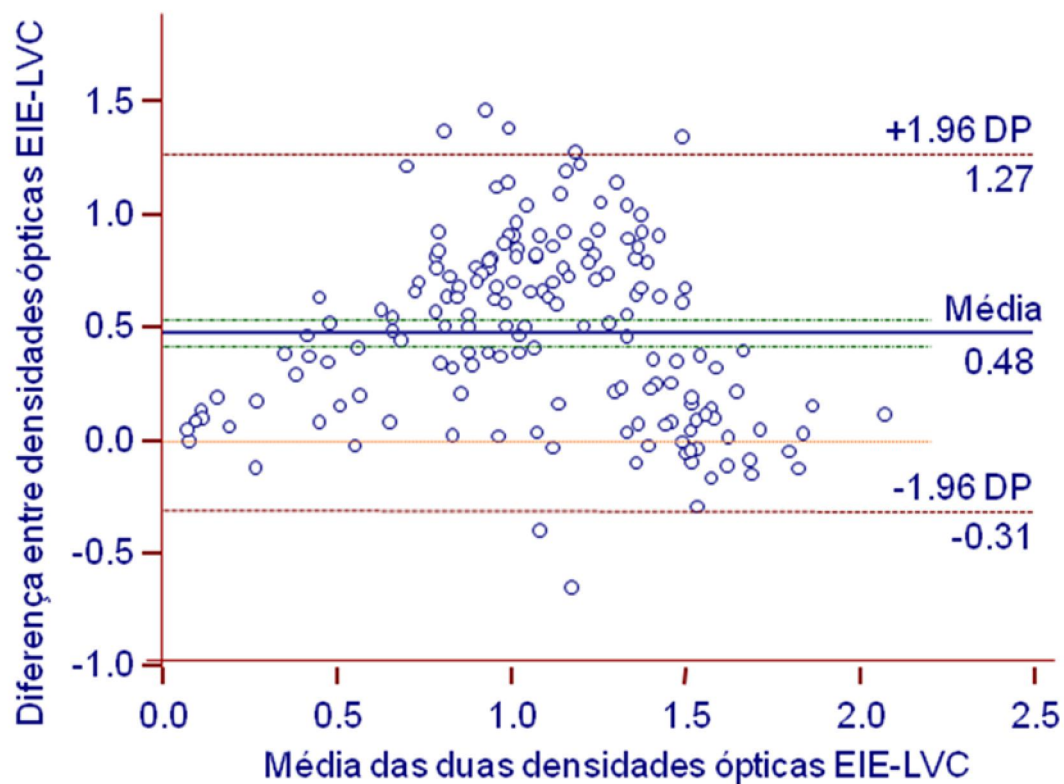


Figura 5: Gráfico Bland-Altman EIE-LVC (N=167).

Analisando-se o espectro clínico como preconizado pelo STARD (Bossuyt *et al.*, 2003) há algumas discordâncias distribuídas entre a classificação pelo estado geral do cão (Figura 6).

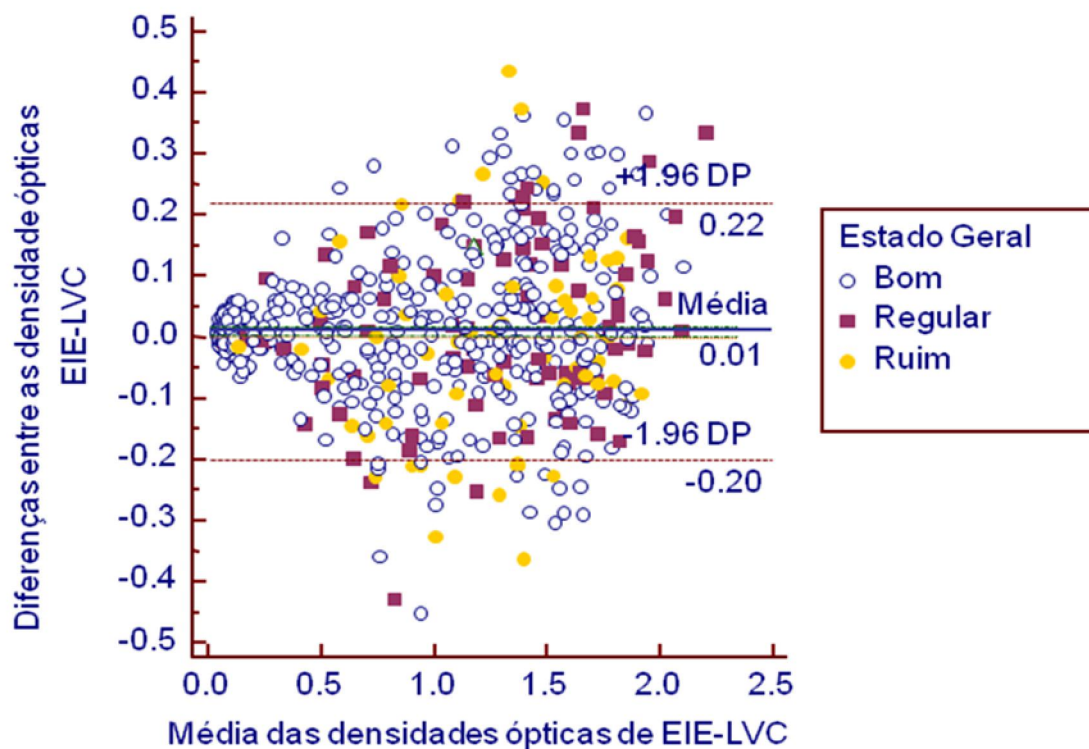


Figura 6. Distribuição das diferenças entre as densidades ópticas (DO) com relação ao estado geral do cão.

A confiabilidade do teste EIE-LVC Bio-Manguinhos é excelente mesmo quando dicotomizando o resultado pelo ponto de corte com kappa ponderado de 0,94. Para a reprodutibilidade entre dois laboratórios variou de 0,92 a 0,79, mais preciso na ausência do diagnóstico de LVC (controles) (Tabela 4).

Tabela 4. Confiabilidade do ensaio imunoenzimático considerado como variável categórica para leishmaniose visceral canina em duas aferições independentes pelo mesmo profissional treinado (N=802) e em dois laboratórios distintos (N=167).

Confiabilidade Teste EIE-LVC	Kappa (IC 95%)	Ppos (%)	Pneg (%)	Concordância total
Intraobservador				
(N=802)				
Kappa ponderado	0,94 (0,91 - 0,97)			97,9
Reator	0,98 (0,97 - 1,00)	99,2	99,0	99,1
Não reator	0,96 (0,95 - 0,68)	97,9	98,5	98,3
Indeterminado	0,43 (0,17 - 0,68)	43,5	99,2	98,4
Entreobservadores*				
(N= 167)				
Positivo	0,79 (0,56 - 1,00)	99,1	80,0	98,2
Negativo	0,92 (0,76 - 1,00)	92,3	99,7	99,4

* kappa para o valor indeterminado incalculável

Ppos - Proporção Concordância em Positivos, Pneg- Proporção de Concordância em Negativos e IC - Intervalo de Confiança

A inspeção da figura 7 não evidencia tendência a erros sistemáticos graves ou aleatório, com os pontos (N=802) bem ajustados à linha de 45° traçada sobre a mediana Manhattan. Porém, entre as 167 análises duplicadas em laboratórios diferentes observam-se pontos distantes da linha mediana indicando erros sistemáticos (Figura 8).

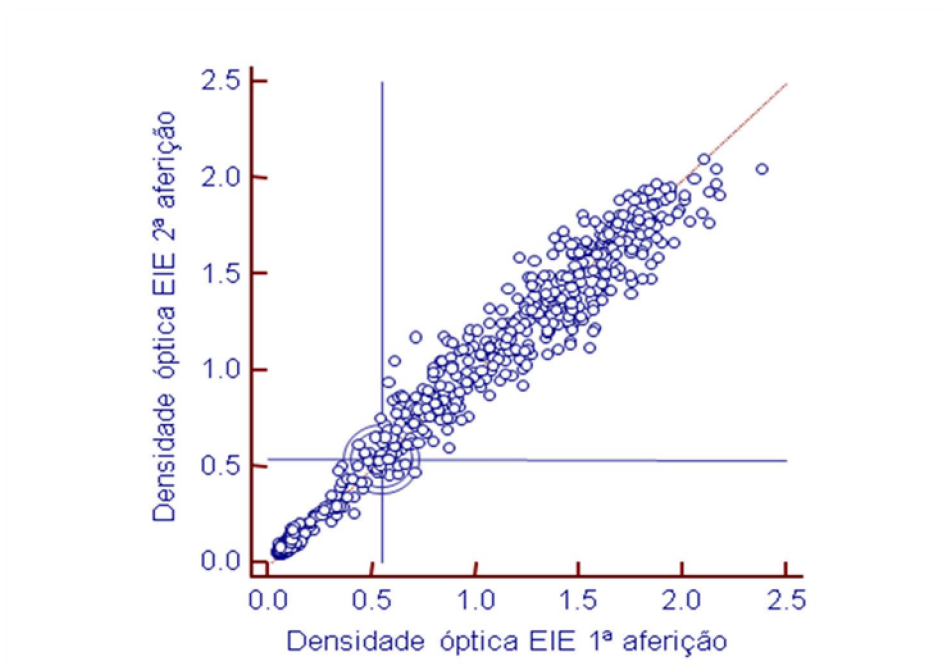


Figura 7. Gráfico de Youden com resultados da análise (intraobservador) do EIE-LVC (N=802).

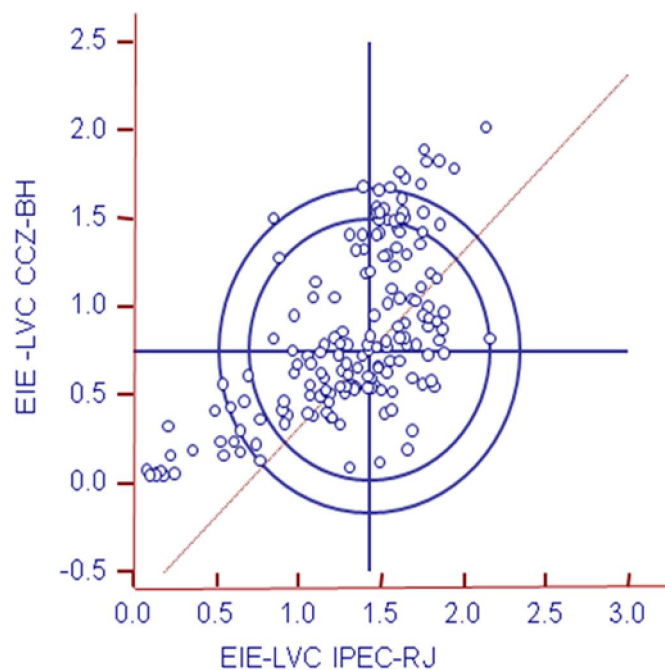


Figura 8. Gráfico de Youden com resultados de EIE-LVC da análise entreobservadores de 167 amostras realizadas em laboratórios do Rio de Janeiro (IPEC) e de Belo Horizonte (CCZ).

Ao compararem-se as três aferições, duas do IPEC-RJ (DO1 e DO2) e uma do CCZ-BH (EIE BH) observa-se distribuição diferente entre os laboratórios (Figura 9).

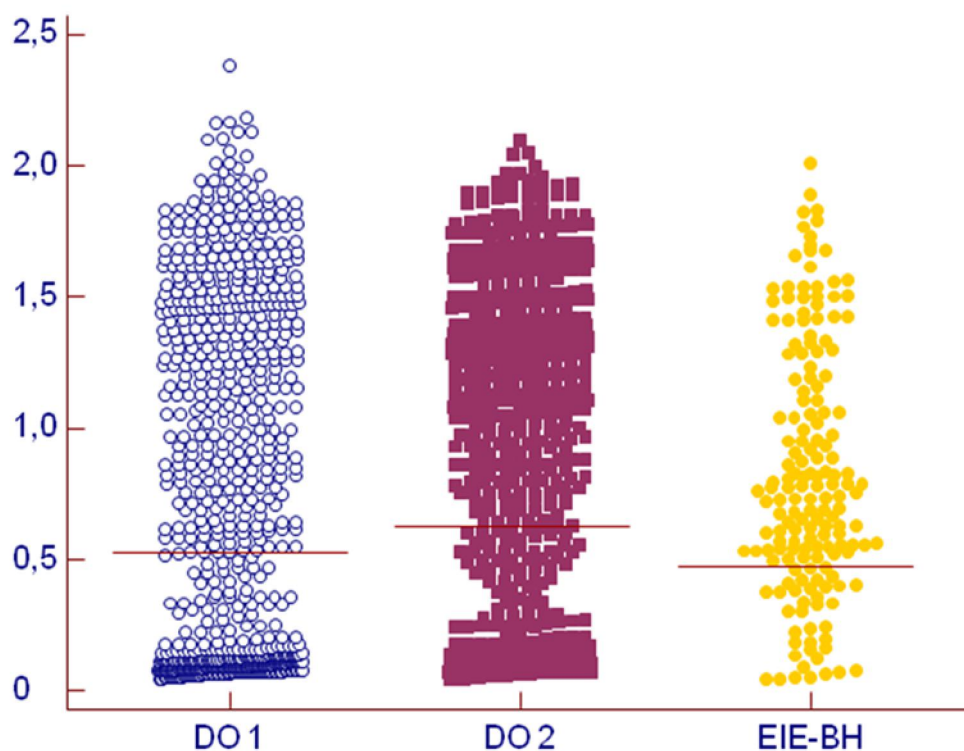


Figura 9. Gráfico Dot plot das três aferições para a primeira leitura da densidade óptica (DO1) e segunda leitura (DO2) realizadas no IPEC-RJ e a densidade óptica EIE-BH realizada no CCZ-BH (N=167).

3. Acurácia do EIE-LVC (Bio-Manguinhos)

O ponto de corte (*cut-off*) do ensaio imunoenzimático, EIE-LVC, foi definido através da curva ROC. A leitura de densidade óptica (DO) considerada como *cut-off* para a 1ª aferição foi 0,563 e 0,647 para a 2ª aferição. A figura 10 reproduz as distribuições das leituras nos dois grupos (LVC e controles) para todos os cães

incluídos neste estudo (N= 802). A figura 11 representa a distribuição dos resultados de cada grupo (LVC versus controles) quanto ao estado geral do cão.

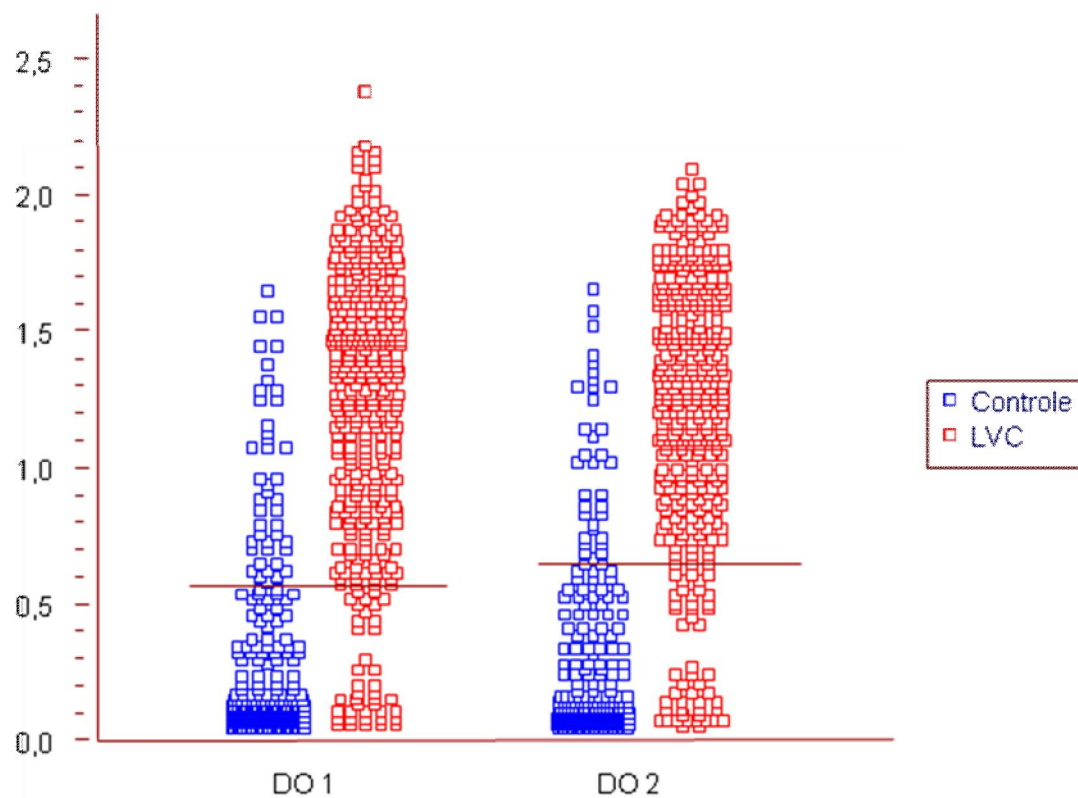


Figura 10. Distribuição das densidades ópticas (DO) nas duas aferições no EIE-LVC nos dois grupos - LVC (N= 395) e controles (N=407).

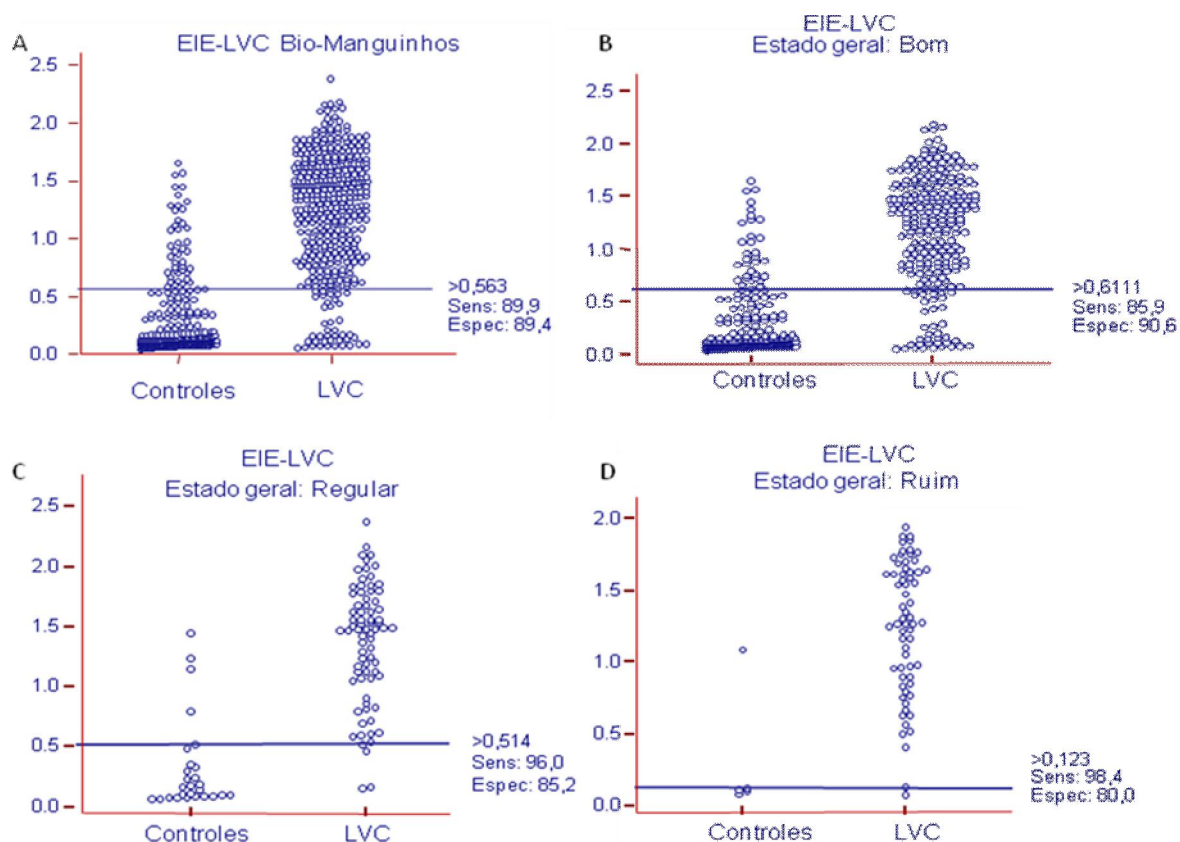


Figura 11. Gráfico Dot Plot para (A) pontos de corte de toda amostra (N=802) e segundo estado geral do cão: (B) bom (N=631), (C) regular (N=102) e (D) ruim (N=69).

Os parâmetros de acurácia calculados para as duas aferições realizadas com todas (N=802) amostras séricas indicaram sensibilidade de 89,9% (IC 95% 86,5-92,7) e 87,6% (IC 95% 83,9-90,7) para a 1ª e 2ª aferições, respectivamente, e especificidade de 89,4% (IC 95% 86,0-92,2) e 91,6% (IC 95% 88,5-94,1).

As Curvas ROC (Figura 12), os parâmetros de acurácia (Tabela 5) para toda a amostra e segundo estado geral do cão evidenciaram que o EIE-LVC Bio-Manguinhos discrimina bem os cães com LVC dos controles inclusive em cães em

bom estado geral. Sendo quase nove vezes mais frequentemente positivo nos cães com LVC comparado aos controles quando foi analisado apenas os cães considerados pelo veterinário em bom estado geral. Este desempenho foi pior quando analisados os cães em estado regular (seis vezes mais positivo em cães com LVC do que em controles) e naqueles em estado geral ruim foi cerca de cinco vezes mais positivo (Tabela 6).

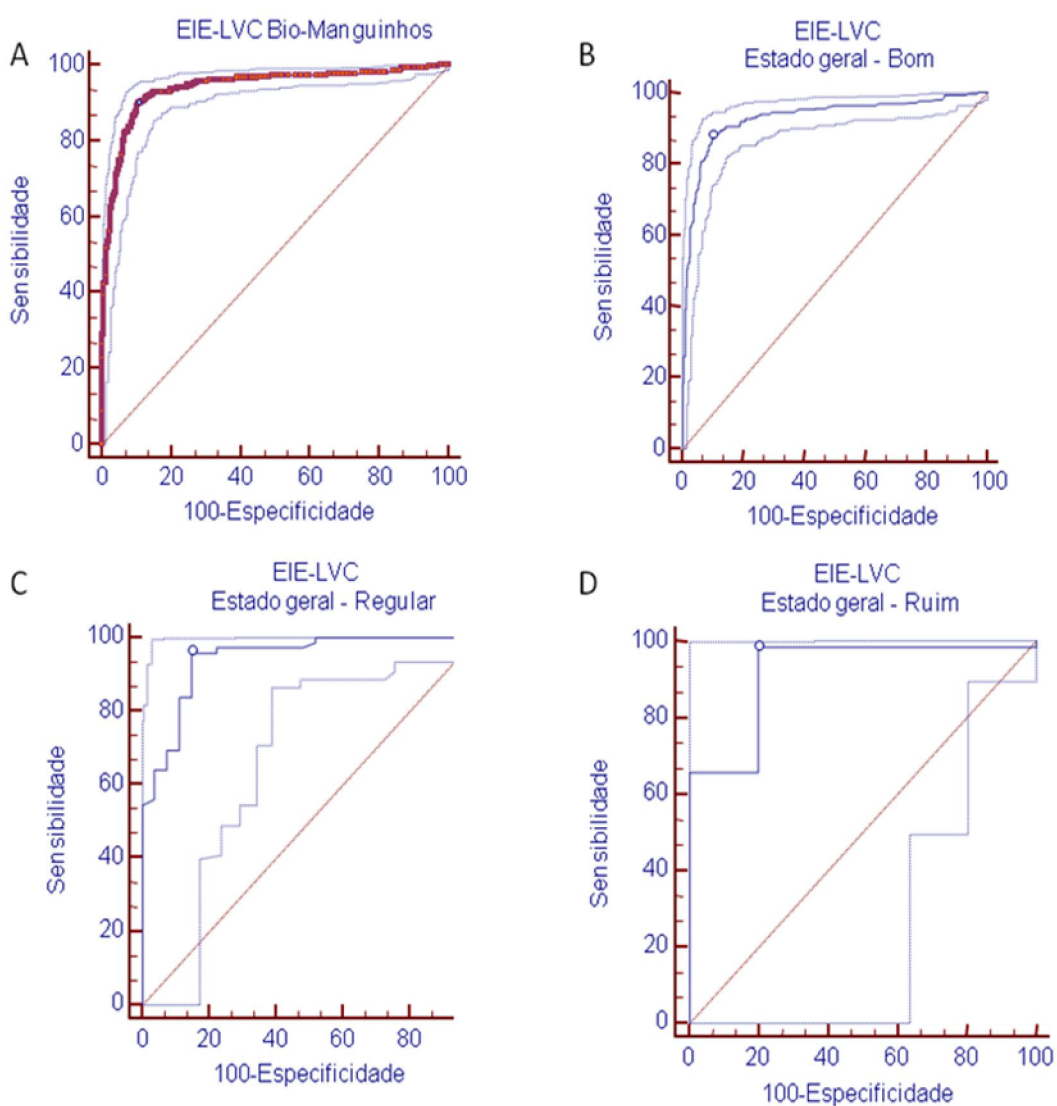


Figura 12. Curvas ROC e parâmetros de acurácia (A) para toda amostra (N=802) e segundo estado geral do cão: (B) bom (N=631), (C) regular (N=102) e (D) ruim (N=69).

Tabela 5. AUCs do teste EIE-LVC para toda a amostra (N=802) e segundo estado geral do cão.

Estado Geral	N Positivos (%)	AUC (IC 95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC 95%)
Todos	395 (49,3)	0,94 (0,92-0,96)	84,1 (78,8-88,7)	98,1 (94,7-99,7)
Bom	256 (64,8)	0,93 (0,91- 0,95)	85,2 (77,1-91,3)	92,9 (87,4-96,5)
Regular	75 (19)	0,94 (0,89-0,99)	97,4 (89,1-99,8)	63,3 (38,5-83,8)
Ruim	64 (16,2)	0,92 (0-1,00)	98,8 (91,5-99,1)	62,7 (19,5-94,2)

N Positivos - Número de cães positivos para LVC; AUC - *área under curve* (área sob a curva); VPP - Valor preditivo positivo; VPN - Valor preditivo negativo e IC - Intervalo de Confiança

Tabela 6. Melhor ponto de corte para EIE-LVC segundo estado geral do cão e parâmetros de acurácia: Sensibilidade, Especificidade e Razões de Verossimilhança Positivas e Negativas com respectivos IC de 95%.

Estado Geral	Ponto de corte (cut-off)	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC95%)	RV + (IC 95%)	RV - (IC 95%)
Todos	0,563	89,9 (86,5-92,7)	89,4 (86,0-92,2)	8,51 (8,1-8,9)	0,11 (0,08-0,2)
Bom	0,560	88,2 (83,6-91,9)	89,8 (86,3-92,7)	8,68 (8,2-8,2)	0,13 (0,08-0,2)
Regular	0,514	96,0 (88,8-99,2)	85,2 (66,3-95,8)	6,40 (5,5-7,6)	0,05 (0,01-0,2)
Ruim	0,123	98,4 (91,6-100,0)	80,0 (28,4-99,5)	4,92 (3,2-7,6)	0,02 (0,001-0,3)

RV – Razão de Verossimilhança e IC - Intervalo de Confiança

DISCUSSÃO

A LV tornou-se uma doença urbana, antes considerada predominantemente rural ou peri-urbana, e tem alcançado os grandes centros no Brasil (Brasília, São Paulo, Tocantins, Belo Horizonte, Rio de Janeiro). Dentre as medidas de controle para a doença humana estão os inquéritos sorológicos caninos e a eutanásia de cães soropositivos, no entanto esse controle tem sido insuficiente ou não veloz o suficiente para conter a disseminação da doença através dos vetores. Assim, permanece a busca por testes sorológicos que apresentem resultados acurados e válidos para o diagnóstico da LVC, de maneira que os cães positivos não deixem de ser removidos e os cães não infectados não sejam submetidos, desnecessariamente, à eutanásia.

No Brasil, as técnicas sorológicas utilizadas na rede de vigilância epidemiológica são a imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático. Apesar da IFI apresentar moderada sensibilidade e especificidade, algumas desvantagens tais como a não automação do procedimento e a avaliação subjetiva do resultado, que afeta a sua reprodutibilidade, têm sido apontadas como fatores limitadores para sua utilização. Alguns autores também questionam a existência de reações cruzadas com outras enfermidades e variações de sensibilidade e especificidade dependendo do tipo de antígeno utilizado (Almeida *et al.*, 2005; Boarino *et al.*, 2008; Troncarelli *et al.*, 2009). Além de apresentarem um desempenho superior, os ensaios imunoenzimáticos eliminam a subjetividade do resultado por serem automatizados (Rosati *et al.*, 2003).

O presente estudo avaliou a acurácia e confiabilidade do ensaio imunoenzimático (EIE-LVC) para o diagnóstico da LVC. Este é um dos primeiros estudos realizados no Brasil com vistas a avaliar a acurácia desse teste produzido

por laboratório público com amostra ampla, coletada em mais de uma área endêmica de dois estados brasileiros, com padrão de referência composto por uma combinação de resultados de duas a três técnicas (IFI, cultura e PCR), por não existir um único teste que isoladamente possua características próximas a um padrão-ouro, e que avaliou também as precisões intra e interlaboratorial.

A importância do diagnóstico laboratorial adequado da LVC é ainda maior considerando que o diagnóstico clínico muitas vezes não é realizado pela ausência de especificidade de sinais clínicos e principalmente porque cerca de dois terços dos cães verdadeiramente positivos são assintomáticos. Algumas questões operacionais limitaram a comparação clínica deste estudo, pois dados de anamnese não puderam ser coletados para os 400 cães recolhidos ao CCZ de Belo Horizonte, bem como as questões epidemiológicas relativas ao ambiente do cão. Mas o exame físico foi então considerado para elaborar uma comparação do desempenho do teste EIE-LVC segundo a condição clínica do paciente, isto é, espectro clínico e gravidade da doença como preconizado no *guideline* STARD (Bossuyt *et al.*, 2003). No entanto, não foi possível a avaliação desses resultados frente a literatura devido a escassez de artigos científicos que classifiquem a condição clínica do cão como realizamos neste estudo.

Dentre os cães avaliados, as características clínicas que estiveram mais presentes foram as lesões cutâneas, descamação, alopecia, emagrecimento, alterações oftálmicas, onicogrifose e adenite assim como relatado na literatura (Alvar *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2006, Travi *et al.*, 2009).

Bigeli *et al.* (2008) identificaram em amostra de 113 cães em Palmas, Tocantins, que 24,8% foram classificados como assintomáticos (sem sinais clínicos sugestivos de LVC); 46% como oligossintomáticos (com até dois sinais clínicos

sugestivos da doença) e 29,2% como polissintomáticos (mais de dois sinais clínicos sugestivos de LVC). Os sintomas mais frequentes observados foram onicogribose, alopecia e emagrecimento. Esta distribuição e sintomatologia são semelhantes as do presente estudo reforçando a generabilidade externa dos achados para outras áreas endêmicas brasileiras. No entanto, Dantas-Torres *et al.* (2006) encontrou, em inquérito soropidemiológico realizado em 322 cães na cidade de Paulista – Pernambuco, uma prevalência de 85,3% de cães considerados assintomáticos.

Um achado relevante foi o isolamento em cultura de outros agentes etiológicos em 30 (3,8%) amostras, sendo sete amostras caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* e 23 como *Trypanosoma caninum*. Este último descrito por Madeira *et al.* (2009a) como uma nova espécie de protozoário do gênero *Trypanosoma*, isolado de pele íntegra de um cão doméstico na cidade do Rio de Janeiro. Em estudo onde se avaliou 155 cães, Silva *et al.* (2011) também relatou a presença de *T. caninum* em sete amostras e cinco de *L. (V.) braziliensis*. Cabe ressaltar que a distribuição de ambos protozoários numa mesma área geográfica indica a necessidade de testes diagnósticos que assegurem a identificação e diferenciação desses agentes na infecção canina.

Na avaliação da reprodutibilidade do teste EIE-LVC, a confiabilidade dos resultados intraobservador foi excelente ($k= 0,94$) e entreobservadores (laboratórios distintos) variou de substancial ($k= 0,79$) a quase perfeito ($k=0,92$). Lira *et al.* (2006) avaliaram o EIE-LVC realizado por dois técnicos experientes em um cenário duplo cego e encontrou confiabilidade excelente com um valor de kappa de 0,975. Também corroborando com nossos resultados, Machado *et al.* (2007) avaliaram como perfeita a concordância entre diferentes laboratórios.

Nosso estudo encontrou ótimos parâmetros de acurácia par o teste EIE-LVC, com sensibilidade de 89,9% e 87,6% e especificidade de 89,4% e 91,6%, respectivamente para primeira e segunda aferições.

Em estudo semelhante com 41 amostras (25 cães com diagnóstico parasitológico para LVC e 16 cães negativos de área não endêmica), Lira *et al.* (2006) encontrou sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5%. Além dos autores utilizarem como controles cães de área não indene, um grupo de cães com outras doenças não foi levado em consideração para a avaliação, o que diferencia do nosso estudo cujos cães com outro diagnóstico foram considerados controles.

Ferreira *et al.* (2007) avaliaram a IFI, o ensaio imunoenzimático e um teste de aglutinação direta (TAD) em 234 cães de Belo Horizonte – Minas Gerais. Para os controles foram utilizados 20 cães nascidos e criados em canil da Universidade Federal de Minas Gerais, mantido em condições especiais, negativos para todos os testes parasitológicos e sorológicos e 20 cães com diagnóstico para outras patologias (*Trypanosoma cruzi*, *L. (V.) braziliensis*, *Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis*). A IFI, ELISA e TAD apresentaram 72%, 95% e 93% de sensibilidade, respectivamente e as especificidades observadas foram 52%, 64% e 95%, respectivamente.

Estudo publicado com amostra de 305 animais dos quais nove com isolamento parasitário de *L. (L.) chagasi* em cultura de biópsia de pele, evidenciou sensibilidade perfeita de 100% e especificidade de 96,6% do EIE-LVC (Figueiredo *et al.*, 2010), valores mais altos do que os do presente estudo. No entanto, Silva *et al.* (2012) em 144 amostras de soro canino testadas encontraram valores de sensibilidade (93%) e especificidade (87%) semelhantes aos nossos.

Lima *et al.* (2010) compararam a performance de um teste ELISA, utilizando antígenos brutos e um teste imunocromatográfico com o antígeno recombinante rk39 em amostra de 102 cães, sendo 47 positivos para LVC (confirmados pela PCR) e 57 saudáveis. O desempenho do ELISA (sensibilidade-100%; especificidade-91,2%) foi ligeiramente superior ao teste imunocromatográfico (sensibilidade-91,5%; especificidade-94,7%), entretanto, vantagens como a facilidade na realização e rapidez no diagnóstico possibilitam que o teste imunocromatográfico seja utilizado nos trabalhos em campo (Lima *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Além disso, Figueiredo *et al.* (2010) recomendaram que o teste utilizado anteriormente (IFI) como método confirmatório deveria ser melhor avaliado, pois seus resultados demonstraram a superioridade do desempenho do EIE e que a IFI deveria ser substituída nos inquéritos soroepidemiológicos realizados pelos órgão de vigilância epidemiológica.

Inúmeras dificuldades para realização deste estudo relacionaram-se a execução de um trabalho de campo que envolveu vários serviços da FIOCRUZ pelo período de quase dois anos e em dois estados (RJ e MG). Incluiu transporte, armazenagem e processamento de amostras, inclusive em âmbito interestadual com os devidos cuidados de biossegurança. Estes aspectos aumentaram os custos do estudo bem como o tornaram demorado. Foi necessário também estrito controle de qualidade para o fluxo de informações, e a elaboração do banco de dados em software de gerenciamento dos vários formulários para cada resultado e que necessitou de posterior re-verificação para dados faltantes realizada pela própria doutoranda. A baixa frequência de cães positivos no Rio de Janeiro exigiu a coleta em áreas de alta endemicidade o que foi propiciado pelo CCZ de Belo Horizonte, dificultando a conclusão da amostra prevista (802 cães). Em linhas gerais além do

resultado de acurácia do teste houve o aprendizado do trabalho de campo e em equipe.

De acordo com nossos resultados e os encontrados na literatura, conclui-se que o teste EIE-LVC-Bio-Manguinhos é acurado e preciso para o diagnóstico desta patologia, que se confirma diante das novas recomendações do Ministério da Saúde para a utilização do teste imunocromatográfico (DPP-TR-LVC) como método de triagem e o EIE-LVC como técnica confirmatória.

No entanto, permanecem os esforços para definir o conjunto de testes diagnósticos perfeito para diagnóstico da LVC e espera-se que este estudo tenha contribuído para nortear desenhos adequados à validação diagnóstica nesta área e responder a acurácia do teste EIE-LVC Bio-Manguinhos.

CONCLUSÕES

1. A confiabilidade intraobservador foi quase perfeita para o EIE-LVC Bio-Manguinhos; e a reprodutibilidade entreobservadores, em laboratórios distintos, foi boa sendo quase perfeita para concordância em resultados positivos;
2. A sensibilidade foi alta nas duas aferições (89,9% e 87,6%) com toda a amostra e especificidade atingiu valores semelhantes (89,4% e 91,6%). A capacidade de identificar verdadeiros sadios (especificidade) caiu naqueles cães identificados como em estado regular e ruim;
3. A acurácia foi alta independente do estado geral do cão com áreas sobre a curva ROC variando de 0,94 a 0,92, e como esperado, os valores preditivos positivos aumentaram com a piora do estado geral do cão;
4. Os valores preditivos negativos do teste caíram muito em cães com estado geral comprometido, tanto regular quanto ruim;
5. O EIE-LVC Bio-Manguinhos discriminou cães verdadeiramente doentes mesmo clinicamente em bom estado, sendo 8,6 vezes mais frequentemente positivo em verdadeiros doentes comparados a cães sem LVC; já em cães com estado clínico regular esta distinção foi de 6,4 vezes e naqueles cães em estado geral considerado ruim, a razão de verossimilhança positiva foi próxima de 5;

6. A razão de verossimilhança negativa do teste EIE-LVC Bio-Manguinhos, isto é, a capacidade de discriminar os cães sadios, aumentou com a piora do estado geral do cão – variando de 0,13 (cães em bom estado) para 0,02 (cães em estado clínico ruim).

7. O desempenho do teste EIE-LVC o credencia para o diagnóstico em população de cães suspeitos de leishmaniose visceral canina.

REFERÊNCIAS

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 2005;127(3-4):227-232.

Altman DG. *Practical statistics for medical research*. 1st ed. London: Chapman and Hall/CRC Press; 1991.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1-88.

Andrade CR, Nascimento AE, Moura PM, Andrade PP. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar. *Braz J Med Biol Res* 1989;22(5):611-5.

Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today* 1992;8(3):104-5.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996;14(5):523-32.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, 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* 1998;59(1):53-7.

Badaró R. Current situation in regard to leishmaniasis in Brazil. In: Walton BC, Wijeyaratne PM, Modabber F, eds. *Research on Control Strategies for the Leishmaniases*. Ottawa: IDRC; 1987. p. 91-100.

Basano SA & Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras de Epidemiol* 2004;7(3):328-337.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;102(2):249-61.

Bigeli JG, Oliveira Junior WP, Aguiar GB, Caudas ODA, Oliveira, JDD. Prevalência de *Leishmania (L.) chagasi* em cães do município de Palmas - Tocantins, por PCR. In: Anais da 12ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses/24ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas; 23-25 out 2008; Uberaba, Minas Gerais; 2008. p.279.

Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurements. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.

Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008;31(6):527-36.

Bossuyt, PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM *et al.* Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ* 2003;(326):41-4.

Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ *et al.* Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31(5):419-24.

Carmines EG & Zeller RA. *Reliability and Validity Assessment*. Newbury Park:Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences; 1979.

Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006;333: 723.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997;141(21):539-43.

Cronbach L. Test validation. In: Thorndike R, Educational Measurement. 2nd ed. Washington:American Council on Education; 1971. p.443-507.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr., Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(3):296-311.

Dantas-Torres, F & Brandão-Filho, SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39(4):352-6.

Dantas-Torres F, Brito ME, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 2006;140(1-2):54-60.

Dantas-Torres, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007;149:139–146.

Deane LM & Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1955;47(1):75-87.

Deane LM & Deane MP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962;4:198-212.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceará. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 1955;7(1):131-41.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:463-469.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996;14(5):417-23.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004;27(5):305-18.

Diouani MF, Ben Alaya Bouafif N, Bettaib J, Louzir H, Jedidi S, Ftaiti A *et al.* Dogs *L. infantum* infection from an endemic region of the north of Tunisia: a prospective study. Arch Inst Pasteur Tunis 2008;85(1-4):55-61.

Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE, *et al.* Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. J Wildl Dis 2007;43(3):518-20.

El Harith A, Chowdhury S, Al-Masum A, Semião-Santos S, Das PK, Akhter S, *et al.* Reactivity of various leishmanial antigens in a direct agglutination test and their value in differentiating post-kala azar dermal leishmaniasis from leprosy and other skin conditions. J Med Microbiol 1996;44(2):141-6.

Ferreira C, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol 2007;146(3-4):235-41.

Figueiredo FB, Gremião ID, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, *et al.* First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102(2):200-1.

Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, Abrantes TR, Mouta-Confort E, Passos SR, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010;52(4):193-6.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed. New York:Wiley; 1981.

Gahlinger PM & Abramson JH. *Computer Programs for Epidemiologic Analysis - Pepi*, versão 2.05. Georgia: USD Inc; 1995.

Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005;35(11-12):1169-80.

Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, *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. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2012;106:54– 59.

Hanley JA & McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.

Hawkins DM, Garret JA, Stephenson B. Some issues resolution using an imperfect gold standard. *Stat Med* 2001;20(13):1997-2001.

Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YA, Scalone A, Badaro R, *et al.* A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 1998;177(5):1339-44.

Hui SL, Zhou XH. Evaluation of diagnostic tests without gold standards. *Stat Methods Med Res* 1998;7(4):354-70.

Islam MZ, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Ekram AR, Sarder AH, *et al.* Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(1):78-82.

Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB *et al.* Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J Cutan Pathol* 1999;26(3):130-6.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. Volume 1. *Biology and Epidemiology*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969;63(6):741-5.

Landis JR & Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159-74.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* 2008;107(2):205-7.

Lima WG, Michalick MS, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica* 2004;92(1):43-53.

Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Neto LS, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2010;173:330–333.

Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45:255-268.

Lin LI. A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 2000;56:324-325.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC 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. *Vet Parasitol* 2006;137:11–16.

Machado JG, Moraes JRC, Costa RT, Nascimento E, Moreira EC. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina realizado pelos laboratórios de Belo horizonte, MG, Brasil. *Vet e Zootec* 2007;14(1):47-51.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Leal CA, Marzochi MC. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004;8(6):440-4.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100(5):442-5.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2009a;136(4):411-23.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009b;87(2):260-2.

Mancianti F, Gradoni L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop Med Parasitol* 1986;37(2):110-2.

Mancianti F & Meciani N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *Am J Vet Res* 1988;49(8):1409-11.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 1995;59(1):13-21.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* 1996;65(1-2):1-9.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, *et al.* *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 2006;142(3-4):271-80.

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 2009;87(1):76-8.

Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ *et al.* A survey of visceral leishmaniasis in dogs from Santa Maria and neighbouring municipalities, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(4):499-501.

Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O and Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors* 2011;4:57.

Marzochi MC & Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Pública* 1994;10(2):359-375.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E *et al.* Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(5):570-580.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 1999;119(3):237-46.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 2001;122(4):393-403.

McBride GB. A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient. NIWA Client Report: HAM2005-062; 2005.

Mestre GL & Fontes CJ. The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40(1):42-8.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ªed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. 120 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ªed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2009. 816 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Ministério da Saúde (Brasil). 2010. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. Fonte: Sinan/SVS/MS, atualizado em 23/7/11. [Acesso em 12/07/2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf

Ministério da Saúde (Brasil). 2011a. Nota técnica 48/2011 – CGDT/DEVIT/SVS/MS, de 19 de setembro de 2011. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. [Acesso em 10/07/2012]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf

Ministério da Saúde (Brasil). 2011b. Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, de 29 de dezembro de 2011. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).

Moreno J & Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002;18(9):399-405.

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E, *et al.* Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(3):299-300.

Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):495-503.

Oliveira FS, Brazil RP, Pacheco RS. Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies. *Trends Parasitol* 2005;21(12):552-3.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, *et al.* Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(3):363-9.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(1):39-44.

Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA *et al.* Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;(9):e822.

Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(1):77-8.

Pinto AGDS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Barros JHS, *et al.* Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2010;26:1-8.

Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008;107(1):66-9

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD, *et al.* 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* 2007;14(5):544-8.

Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop* 1981;38(4):383-93.

Rosário EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(2):197-203.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, *et al.* Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(6):1153-6.

Rothman KJ & Greenland S. Precision and Validity in Epidemiologic Studies In: Modern Epidemiology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.

Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. The selection of diagnostic tests. In: Clinical Epidemiology: A Basic. Science for Clinical Medicine. 2nd ed. Boston: Little Brown & Co; 1991.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Paiva Hoffmann M, Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998;12(3):315-7.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol 2002;104(4):275-85.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(7):987-96.

Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A, Dotsika E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. Parasite 1996;3(2):125-30.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Vet Parasitol 2011;179:257–61.

Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Filho CJLB, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet J 2012. Article in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.010>.

Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 2006;30(6):637-43.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *The Veterinary quarterly* 1988;10(1):1-16.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):560-3.

Solcà MS, Guedes CES, Nascimento EG, Oliveira GGS, Santos WLC, Fraga DBM, *et al.* Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 2012;184:133–40.

Stevens SS. Mathematics, measurement and psychophysics. In: *Handbook of Experimental Psychology*. New York: John Wiley & Sons; 1951. p. 1-49.

Tafari WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004;292(1-2):17-23.

Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(3):287-92.

Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, *et al.* Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81(6):994–1003.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis Vet Parasitol 2009;164(2-4):118-23.

WHO (World Health Organization). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series; 2010:949.

Youden WJ. Graphical diagnosis of interlaboratory test results. Industrial Quality Control 1959;15:24-28.

Zerpa O, Ulrich M, Negron E, Rodriguez N, Centeno M, Rodriguez V, *et al.* Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94(5):484-7.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, *et al.* rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5(5):717-20.

Zweig MH & Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 1993;(39):561- 577.

ANEXO A – Manual de Instruções (IFI-LVC Bio-Manguinhos)



IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

Tel.: (21) 3862.9393

FAX: (21) 2561.0277

SAC: 0800.210.310

www.bio.fiocruz.br

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(material fornecido para 2000 determinações)

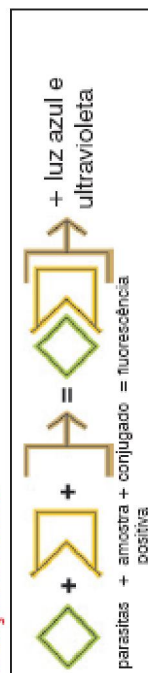
PRINCÍPIO DO TESTE:

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

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

ESQUEMA DO TESTE:

Reação Positiva



Reação Negativa



MATERIAL FORNECIDO:

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

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

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

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

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

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

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

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Somente para uso "IN VITRO".

4 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

Sais	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) PA - 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) PA - 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH_2PO_4) PA - 0,0028M	0,34 g
Água destilada q. s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 5

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

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

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

TITULAÇÃO DO CONJUGADO:

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

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

1- Ferver as lâminulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição, e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

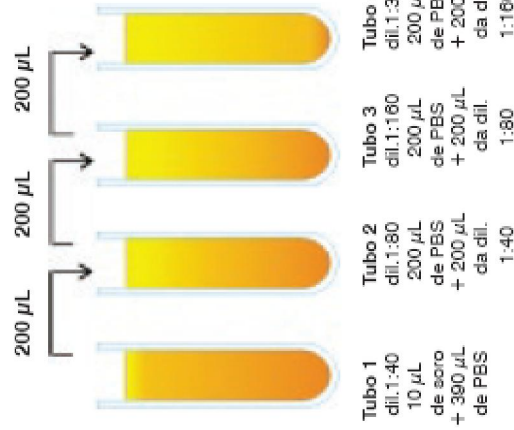
2- Separar 3 lâminas e pingar 10 μL do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo.

3- Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente ou duas horas a 37°C, para uma boa fixação dos parasitas.

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

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

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 7



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

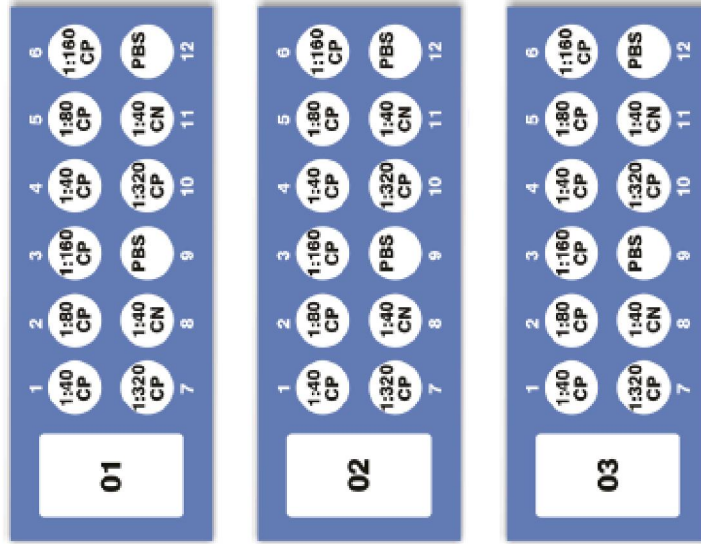
6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

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

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

6 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Ex:



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

8 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

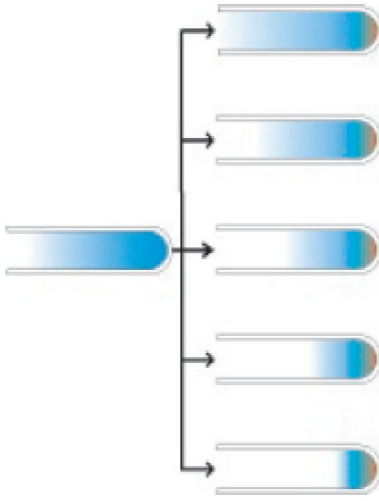
9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

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

11- Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

12- Diluir o conjugado anti-Ig cão marcado com fluoresceína, conforme descrito a seguir:

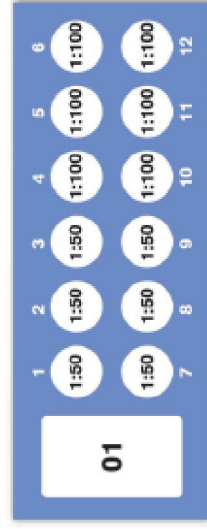
20 µL de Conjugado + 980 µL PBS-AE
díl. 1:50



Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
díl. 1:100	díl. 1:150	díl. 1:200	díl. 1:250	díl. 1:300
100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL
PBS-AE	PBS-AE	PBS-AE	PBS-AE	PBS-AE
+ 100 µL	+ 100 µL	+ 100 µL	+ 100 µL	+ 100 µL
díl. 1:50	díl. 1:50	díl. 1:50	díl. 1:50	díl. 1:50

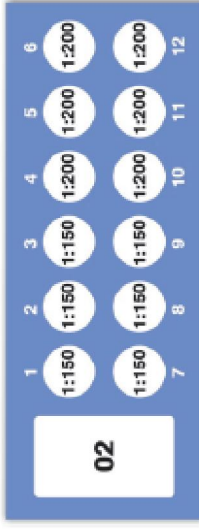
13- Adicionar 15 µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes conforme esquema a seguir:

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 9



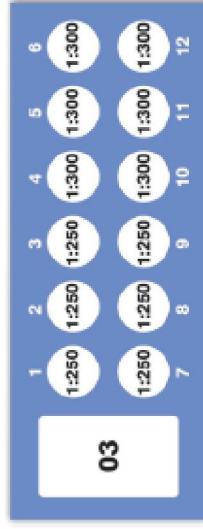
lâmina 1 -
diluição 1:50

lâmina 1 -
diluição 1:100



lâmina 2 -
diluição 1:150

lâmina 2 -
diluição 1:200



lâmina 3 -
diluição 1:250

lâmina 3 -
diluição 1:300

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

15- Lavar as lâminas 3 (três) vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.

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

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

12 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEITURA E INTERPRETAÇÃO:

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

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

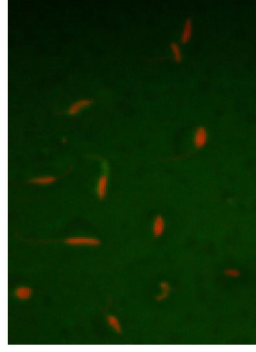
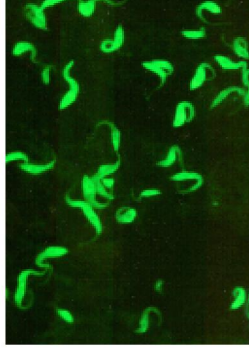
3- Proceder a leitura das amostras, considerando os padrões a seguir:

Amostras reagentes

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

Amostras não reagentes

Os soros teste que não apresentarem fluorescência.

**ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:**

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

14 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

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

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

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

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

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

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

ATENÇÃO:

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

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8972, em 04/10/2004.

Resp. Téc. Méd. Vet.: Dr. Joel Majerowicz. CRMV-RJ 2342

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

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

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

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

SAC: 0800.210.310 www.bio.fiocruz.br

edição: dezembro de 2004

BM_008_07Bk

ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA MODELO DE PROTOCOLO

IFI nº: _____ Data: ____/____/____

Kit: _____ Lote: _____

Validade: _____

Lâmina nº:

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

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

Lâmina nº:

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

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

Técnico responsável: _____

Observações: _____

ANEXO B – Manual de Instruções – (EIE-LVC Bio-Manguinhos)



LEISHMANIOSE

EIE - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA



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

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

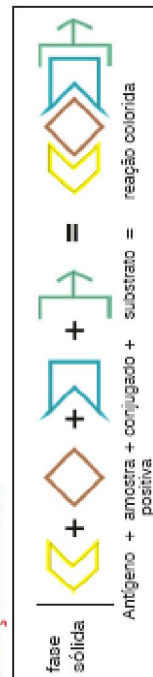
PRINCÍPIO DO TESTE:

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

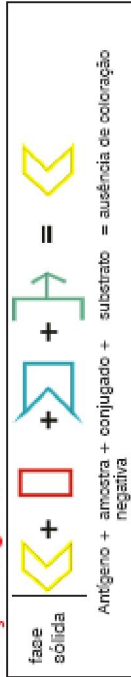
Para evidência da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso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

ESQUEMA DO TESTE:

Reação Positiva



Reação Negativa



MATERIAL FORNECIDO:

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

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

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

4 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

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

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

Manter a -20°C: R-08, R-09, R-10, R-11.

Manter entre 2° e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06 e R-07.

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

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

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

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

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

- as amostras, assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado;
- homogeneizar as amostras e controles antes de usar;

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 5

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

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS DE SORO:

- 1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

n° strips duplas	n° reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

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

- 3 - Distribuir 100 µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o controle positivo, na "C" e "D" o

6 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP Amostra 3	Amostra 11	Amostra 10	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83	Amostra 91
B	CP Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84	Amostra 92
C	CN Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85	Amostra 93
D	CN Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86	Amostra 94
E	SS Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87	Amostra 95
F	SS Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88	Amostra 96
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90	Amostra 98

CP= Controle Positivo

CN=Controle Negativo

SS=Sem Soro

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

5 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

n° strips duplas	n° reações	R-03	H ₂ O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 7

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

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

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

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

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

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

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

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

11 - Preparo do substrato:

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

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

LEITURA:

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

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

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

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

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

CO	
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA
	AMOSTRAS REATIVAS

VALIDAÇÃO DO TESTE:

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

- Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO
 - Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO
- Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO:

- 1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

10 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

n° strips duplas	n° reações	R-01(5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	14 mL	1,4g	56 mL

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

3 - Adicionar 400 µL de diluente de amostra/conjugado por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman n°1 ou 500 µL para amostras coletadas em papel Klabin 80.

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

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

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

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostras 3	Amostras 11	Amostras 19	Amostras 27	Amostras 35	Amostras 43	Amostras 51	Amostras 59	Amostras 67	Amostras 75	Amostras 83
B	CP	Amostras 4	Amostras 12	Amostras 20	Amostras 28	Amostras 36	Amostras 44	Amostras 52	Amostras 60	Amostras 68	Amostras 76	Amostras 84
C	CN	Amostras 5	Amostras 13	Amostras 21	Amostras 29	Amostras 37	Amostras 45	Amostras 53	Amostras 61	Amostras 69	Amostras 77	Amostras 85
D	CN	Amostras 6	Amostras 14	Amostras 22	Amostras 30	Amostras 38	Amostras 46	Amostras 54	Amostras 62	Amostras 70	Amostras 78	Amostras 86
E	SS	Amostras 7	Amostras 15	Amostras 23	Amostras 31	Amostras 39	Amostras 47	Amostras 55	Amostras 63	Amostras 71	Amostras 79	Amostras 87
F	SS	Amostras 8	Amostras 16	Amostras 24	Amostras 32	Amostras 40	Amostras 48	Amostras 56	Amostras 64	Amostras 72	Amostras 80	Amostras 88
G	1	Amostras 9	Amostras 17	Amostras 25	Amostras 33	Amostras 41	Amostras 49	Amostras 57	Amostras 65	Amostras 73	Amostras 81	Amostras 89
H	2	Amostras 10	Amostras 18	Amostras 26	Amostras 34	Amostras 42	Amostras 50	Amostras 58	Amostras 66	Amostras 74	Amostras 82	Amostras 90

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

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

8 - Preparo do tampão de lavagem:

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

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

n° strips duplas	n° reações	R-03	H ₂ O dest.
1	até 16	2 mL	38 mL
2	até 32	3 mL	57 mL
3	até 48	4 mL	76 mL
4	até 64	5 mL	95 mL
5	até 80	7 mL	133 mL
6	até 96	8 mL	152 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

12 EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos

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

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

10 - Preparo do conjugado:

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

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

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

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

14 - Preparo do substrato:

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

EIE - Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 13

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

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

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

LEITURA:

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

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

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

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

RESULTADOS

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

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

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

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

CO	
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	AMOSTRAS REATIVAS
FAIXA CINZA	

VALIDAÇÃO DO TESTE:

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

Controle Positivo $\geq 0,500$ densidade ótica

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

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

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO DO TESTE

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

DISPONIBILIDADE

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

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

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. EULALIO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Amer.J. Trop. Med. Hyg. 1993; Jan; 48(1): 1-8.
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 binding. 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. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. Biol. Of sanit. Param. 1980; 89: 195-208.
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. Epidemiologia. 2003. Cap 18; p 259-270.

9. MONTROYA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labeled 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, PK. KAWAI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 1974; 22(12):1084-1091.
12. PAPPAS, M.G. HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, 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 Min. da Agricultura sob o nº 8968, em 22/09/2004. Resp. Téc. Méd. Vet.: Dr. Joel Majerowicz. CRMV-RJ 2342

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

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

Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz
CNPJ 33.781.055/0015-30
Departamento de Reativos para Diagnóstico
Av. Brasil, 4365 - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ
Tel: (21) 3882.9393 Fax: (21) 2561.0277
SAC: 0800.210.310
www.bio.fiocruz.br

edição: novembro de 2004
BM_014_05Bk

**Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose
Visceral Canina
MODELO DE PROTOCOLO**

Lote: _____ Validade: _____
EIE Nº: _____ Data: _____

Disposição das amostras

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

Densidade ótica das amostras

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

Cálculo do Cut-Off: (amostras de soro)

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

CO =

Técnico Responsável: _____
Observações: _____

**Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose
Visceral Canina
MODELO DE PROTOCOLO**

Lote: _____ Validade: _____
EIE Nº: _____ Data: _____

Disposição das amostras

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

Densidade ótica das amostras

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

Cálculo do Cut-Off: (amostras de soro)

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

CO =

Técnico Responsável: _____
Observações: _____

Anexo C – Aprovação no CEUA-FIOCRUZ

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

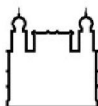
Certificamos que o Programa nº P-0286/06, intitulado “Avaliação e validação de novos Kits de diagnóstico para Leishmania produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos” sob a responsabilidade da Dra. Sônia Regina Lambert Passos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em reunião de 20/03/06. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 04 de julho de 2010.

Rio de Janeiro, 04 de julho de 2006.



Dr. Hugo Caire C. Faria Neto
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Serviço de Zoonoses

Termo de Consentimento

Eu, _____, portador da carteira de identidade nº _____, expedida pelo órgão _____, autorizo a utilização dos dados e materiais coletados no (s) meu (s) cão (es), sob registro _____ para a pesquisa relacionada à Leishmaniose Visceral Canina com o título “**Avaliação e validação de novos kits de diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos**”.

Autorizo, também, aos Médicos Veterinários desta equipe, a conter fisicamente, examinar e coletar os referidos materiais; e que nele (s) sejam aplicadas técnicas anestesiológicas como sedações, anestésias locais e ou gerais, estando ciente dos riscos anestésicos. Estou ciente que nenhuma outra intervenção clínico-cirúrgico ou exame serão realizados além das necessárias para a pesquisa e que, tanto a identificação desse (s) animal (is) quanto os resultados serão mantidos em sigilo, exceto quando representar risco para saúde pública.

_____, _____ de _____ 200_____

Anexo E – Formulários

4850541827		PROTOCOLO DE CAMPO VETERINÁRIO	
1-Nº	2-Data de Coleta		
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3-Nome do Animal:			
<input type="text"/>			
4-Proprietário:			
<input type="text"/>			
5-Endereço:			
<input type="text"/>			
6-Bairro:			7-Estado:
<input type="text"/>			<input type="text"/>
8-Cidade:		9-Telefone:	
<input type="text"/>		<input type="text"/> - <input type="text"/>	
10-Raça: ANIMAL			
<input type="checkbox"/> SRD	<input type="checkbox"/> Outros	<input type="text"/>	
11-Sexo		12-Idade:	
<input type="checkbox"/> Macho	<input type="checkbox"/> Fêmea	<input type="checkbox"/> Até 12 Meses	<input type="checkbox"/> Acima de 1 ano até 7 anos
13-Tipo de Pelagem		14-Peso:	
<input type="checkbox"/> Curto	<input type="checkbox"/> Longo	<input type="text"/> , <input type="text"/>	
15-Vacinação:		16-Outras:	
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> V8	<input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> V10	<input type="checkbox"/> Anti-rábica		
<input type="checkbox"/> Contra Leishmaniose			
17-Castrado:			
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
EXAME CLÍNICO			
18-Estado Geral		19-Condição Corporal:	
<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Ruim	<input type="checkbox"/> Muito Magro
<input type="checkbox"/> Muito Magro	<input type="checkbox"/> Magro	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Obeso
20-Mucosas:			21-Temperatura:
<input type="checkbox"/> Hipocoradas	<input type="checkbox"/> Normocoradas	<input type="checkbox"/> Hiperemicas	<input type="checkbox"/> Ictéricas
<input type="checkbox"/> Ausente			<input type="checkbox"/> Leve
<input type="checkbox"/> Severa			<input type="checkbox"/> Sim
<input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> Não
22-Desidratação:		23-Prenhez:	
<input type="checkbox"/> Ausente		<input type="checkbox"/> Sim	
<input type="checkbox"/> Leve		<input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Severa			
24-Presença de Ectoparasitos:		25-Lesões Cutâneas:	
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Piolhos	<input type="checkbox"/> Sim	
<input type="checkbox"/> Pulgas	<input type="checkbox"/> Carrapatos	<input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="text"/>	26-Início das Lesões:	
		<input type="text"/>	
28-Localizações das Lesões:			27-Nº de Lesões:
<input type="checkbox"/> Orelha	<input type="checkbox"/> Nariz	<input type="checkbox"/> Escroto	<input type="checkbox"/> Não se aplica
<input type="checkbox"/> Outras			<input type="text"/>
<input type="text"/>			

