

Teresinha Cristina Cândido

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ELISA - ANTÍGENO
TOTAL E ELISA - LIGANTE DE FUCOSE E MANOSE EM CÃES
SINTOMÁTICOS E OLIGOSSINTOMÁTICOS PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

**ARAÇATUBA – SP
2007**

Teresinha Cristina Cândido

**Comparação entre os métodos de ELISA - Antígeno total e ELISA -
Ligante de Fucose e Manose em cães sintomáticos e
oligossintomáticos para leishmaniose visceral**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), da cidade de Araçatuba – SP, para obtenção de título de mestre em medicina veterinária.

Área de concentração: Fisiopatologia médica e cirúrgica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizotto;

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Marçal Felix de Lima.

Araçatuba – SP

2007

Catalogação-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C217c Cândia, Teresinha Cristina
Comparação entre os métodos de ELISA-antígeno total e ELISA-Ligante de fucose e manose em cães sintomáticos e oligossintomáticos para leishmaniose visceral / Teresinha Cristina Cândia. - Araçatuba : [s.n.], 2007
63 f. : il. ; tab. + 1 Cd-Rom

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2007
Orientador: Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto
Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cão 2. Leishmaniose visceral 3. ELISA 4. Ligante de fucose
5. Ligante de manose

CDD 636.0896

Dedicatória

Aos meus pais pela dedicação, carinho, esforço, e por sempre estarem presentes na minha jornada profissional.

Ao meu namorado pelo companheirismo, carinho e paciência.

Ao meu irmão pelos sonhos compartilhados e por acreditar em minha capacidade profissional.

A Deus por sempre estar presente em minha vida.

Agradecimentos Especiais

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizotto, pelos ensinamentos, paciência e carinho; que diante da sua vasta sabedoria, transparência e simplicidade, me faz ser mais uma de seus discípulos.

À amiga e co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria Marçal Felix de Lima, pelo carinho, amizade, ensinamentos, dedicação, disposição e por ter me acolhido em seu laboratório, permitindo a realização de grande parte desta pesquisa;

Agradecimentos

Ao Laboratório de imunologia Veterinária da UNESP – Araçatuba-SP, por disponibilizar o laboratório para realização de ELISA;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba-SP, e seus funcionários pela ajuda na coleta de materiais;

À amiga e colega de profissão Tatiana de Oliveira Gerzoschkwitz, pelo auxílio em minha clínica e na coleta de materiais;

Aos colegas médicos veterinários Cláudio Rossi e Maurício por terem fornecido gentilmente alíquotas de soro de animais de áreas não endêmicas;

À minha funcionária Silvana, pela paciência e ajuda no período da concretização deste trabalho;

Ao amigo Almir, técnico do laboratório de imunologia pela ajuda técnica na realização do teste de ELISA;

À amiga e colega de profissão Fabiana Ikeda, pela colaboração e discussões que contribuíram para este trabalho;

À amiga Maria Emília (Mila) por compartilhar anseios e pela força e incentivo no decorrer desta jornada;

Aos professores da UNESP – Araçatuba, que contribuíram em disciplinas, aumentando o meu conhecimento em várias áreas;

À amiga e professora doutora Gisele Fabrino pelo incentivo deste trabalho;

À professora e doutora Silvia Helena Venturoli Perri, por realizar testes estatísticos deste trabalho;

A todos os funcionários da UNESP – Araçatuba, que fizeram parte de toda esta jornada;

À Fort Dodge Saúde Animal, na pessoa da Dr^a Ingrid Menz, por fornecer gentilmente o FML, para realização de ELISA-FML;

E a todos que de forma direta ou indireta, fizeram parte da concretização deste trabalho, muito obrigado.

“As grandes coisas são feitas por pessoas que tem grandes idéias e saem pelo mundo para fazer com que seus sonhos se tornem realidades”.

Ernest Holmes

Sumário

Lista de Figuras	09
Lista de tabelas	10
Lista de abreviações	11
Resumo	12
Abstract	14
Introdução	15
Revisão de Literatura	19
Material e Métodos	25
Animais	26
Material Biológico	27
• Punção Aspirativa de Linfonodo	27
• Sangue	27
• Exame Parasitológico	27
• Método de ELISA	28
• ELISA para detecção de IgG para <i>Leishmania L.chagasi</i>	28
• ELISA para detecção de proteína antigênica do FML	30
• Interpretação dos Resultados de ELISA	31
• Análise Estatística	31
Resultados	32
Discussão	45
Conclusões	50
Referências Bibliográficas	52

Lista de Figuras

Figura 1. Mostra a freqüência de sinais clínicos observados em animais sintomáticos para Leishmaniose visceral canina (LVC)	33
Figura 2. Fotografia de animais com sintomas da LVC	34
Figura 3. Fotografia de cães com LVC, pertencentes ao grupo de animais oligossintomáticos	35
Figura 4. Exame citológico de aspirado de linfonodo poplíteo de cão, demonstrando o grau de parasitismo	37
Figura 5. Mostra em percentual, o grau parasitário observado nos grupos sintomático e oligossintomático	38
Figura 6. Reação sorológica pelo método de ELISA-AgT, em cães sintomáticos, oligossintomáticos e controle	40
Figura 7. Reação sorológica pelo método de ELISA-FML, em cães sintomáticos, oligossintomáticos e controle	41

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo nos ensaios de ELISA-AgT e ELISA-FML em cães do grupo sintomático e oligossintomático 42
- Tabela 2. Análise comparativa dos testes pareados de ELISA-AgT e ELISA-FML 43
- Tabela 3. Análise comparativa entre o grau de parasitismo e os métodos de ELISA-AgT e ELISA-FML no grupo sintomático e oligossintomático 44

Lista de abreviações

LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
ELISA	Ensaio imunoenzimático em fase sólida
ELISA-AgT	ELISA antígeno total de <i>Leishmania L. chagasi</i>
ELISA-FML	ELISA antígeno Ligante de Fucose e Manose
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
Dot-ELISA	Dot-enzyme-linked immunosorbent assay (teste rápido)
BSM-ELISA	bovine submaxillary mucin-ELISA
IFD	Imunofluorescência direta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
D. O.	Densidade óptica
rK-39	Antígeno recombinante - K39
rK-26	Antígeno recombinante - K26
RFC	Fixação de complemento
AgT	Antígeno total
FML	Ligante de Fucose e Manose
I.V.	Intravenosa
Kg	quilograma
ml	miligrama
°C	graus Celsius
μl	microlitros

Resumo

A Leishmaniose visceral canina (LVC), conhecida como calazar, é uma antroponose endêmica no Brasil, causada pela *Leishmania L. chagasi*. O teste sorológico de ELISA tem sido empregado na rotina de inquéritos epidemiológicos e no auxílio diagnóstico clínico de cães suspeitos. O método de ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA) usando o antígeno total de *Leishmania L. chagasi* (ELISA-AgT), assim como, o ELISA - Ligante de Fucose e Manose (ELISA-FML), tem demonstrado boa sensibilidade e especificidade para detectar a doença em cães assintomáticos e oligossintomáticos. O presente trabalho teve como objetivo comparar dois antígenos pelo método de ELISA no sorodiagnóstico de cães naturalmente infectados pela LVC, positivos no exame parasitológico, e agrupados em: grupo sintomático e, grupo oligossintomáticos, tendo como grupo controle cães de área não endêmica. Nos animais oligossintomáticos, a sensibilidade observada para ELISA-AgT foi de 86,7%, já para o método ELISA-FML apresentou valor de 90%. A especificidade foi de 100% no método de ELISA-AgT e 96,7 % para o ELISA-FML. Nos animais sintomáticos, a sensibilidade e especificidade para o ELISA-AgT foram de 90% e 93,3%, respectivamente; já o método de ELISA-FML apresentou sensibilidade e especificidade de 86,7% e 96,7%. No teste ELISA-AgT o valor preditivo positivo foi de 93,1% nos sintomáticos e 100% nos oligossintomáticos, enquanto que nos animais submetidos ao teste ELISA-FML, foi observado 96,3% para os sintomáticos e 96,4% para os oligossintomáticos. O índice Kappa foi utilizado para medir o grau de concordância real entre os dois métodos imunoenzimáticos empregados e o exame parasitológico direto, mostrando boa concordância entre os métodos realizados. Nossos resultados, mostraram que em animais oligossintomáticos o ELISA-FML

apresentou maior sensibilidade, enquanto que, nos animais sintomáticos, o ELISA-AgT revelou-se mais sensível na detecção de positividade.

Palavras-chave: cão, leishmaniose visceral, ELISA, ligante de Fucose-manose.

Abstract

Visceral canine leishmaniasis or calazar is Brazilian an endemic antropozoonosis caused by *Leishmania L. chagasi*. ELISA sorological test has been used in routine of epidemiological studies and in diagnosis of clinical suspect dogs. The immunoenzymatic assay in solid phase (ELISA) using *Leishmania L. chagasi* total antigens AgT-ELISA and Fucose Manose ligant-ELISA (FML-ELISA) has been showed good sensibility and specificity for detection disease in asymptomatic and oligosymptomatic dogs. The present paper has the goal of compare the efficiency of two antigens by ELISA methods in dogs naturally affect by leishmaniasis with positive parasitological exam and grouped by symptoms. Group composed by symptomatic dogs, and Group by oligosymptomatic dogs. Control group was constituted of dogs from *Leishmania* free areas. Dogs of Group oligosymptomatics presented 86,7% of sensibility in AgT-ELISA and 90% at FML-ELISA. The specificity was 100% at AgT-ELISA and 96.7% for FML-ELISA. At Group symptomatics the sensibility and specificity for AgT-ELISA and FML-ELISA were respectively 90% and 93.3% and, the FML-ELISA showed 86.7% and 96.7% corresponding to sensibility and specificity. On ELISA-AgT the positive predictive valor was 93.1% at symptomatic and 100% at oligosymptomatic, moreover in the dogs tested by FML-ELISA the valor was 96.3% for the symptomatic and 96.4% for oligosymptomatics. The Kappa was used and showed a good concordance between both methods tested. Our results had shown that in oligosymptomatics animals the FML-ELISA presented greater sensitivity, while that, in the symptomatic animals, the AgT-ELISA showed more sensible in the detention of positive.

Key Words: dog, leishmaniasis visceral, ELISA, Fucose Manose ligant.

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar, é uma doença causada por protozoário do gênero *Leishmania*; no Brasil o agente etiológico é a *Leishmania L. chagasi*, na Europa e África a *Leishmania L. donovani* ou a *Leishmania L. infantum*. Sua transmissão, ocorre através da picada de flebótomo fêmea do gênero *Lutzomyia longipalpis* infectada. O vetor está adaptado ao ambiente urbano, sendo encontrado no interior das residências, nos abrigos de animais domésticos e no peridomicílio, sua atividade é crepuscular e noturna (BEVILACQUA et al., 2001, IVERSON et al., 1979, LUZ et al, 2001).

Nos últimos dez anos, áreas endêmicas vêm se alastrando devido ao impacto ambiental do desflorestamento e urbanização acelerada. A leishmaniose acomete cerca de dois milhões de novos casos humanos por ano, dos quais 500 mil são de LV. Na América do Sul, o Brasil é o país mais afetado concentrando 90% dos casos da doença (Brasil, 2003). Ocorre de forma endêmica na região noroeste do Estado de São Paulo desde 1998, e a primeira descrição foi na cidade de Araçatuba-SP (LUVIZOTTO et al., 1999).

O cão é considerado o principal reservatório e apresenta grande importância epidemiológica por ter alta prevalência em regiões endêmicas (MARZOCHI et al., 1985), apresentando-se como sintomáticos ou oligossintomáticos.

A LV é caracterizada pelo comprometimento do sistema monocítico macrofágico, onde os parasitos se multiplicam e disseminam. Os principais sintomas observados em cães são: linfadenomegalia, esplenomegalia, úlceras cutâneas, alopecia, descamação cutânea, onicogribose e hipertermia (IKEDA-GARCIA et al., 2007, MATTOS JÚNIOR et al., 2004).

Os exames sorológicos, visando a pesquisa de anticorpos circulantes, são empregados como ferramenta no diagnóstico de casos clínicos e em inquéritos epidemiológicos, existindo uma grande variedade de técnicas e antígenos empregados (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; BORJA-CABRERA et al., 1999; BRAGA et al., 1998; DA-SILVA et al., 2005; LIMA et al., 2005; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2004; ROSARIO et al., 2005).

A Imunofluorescência indireta (RIFI) em eluato de papel filtro, do sangue coletado de pina de orelha dos cães, é utilizado como o método oficial adotado pelo Centro de Controle e Zoonose de Araçatuba-SP para a detecção da LV nos cães.

Cinquenta cães sintomáticos para LV provenientes da cidade de Araçatuba-SP com diagnóstico positivo no exame citológico de aspirado de linfonodo, foram submetidos ao teste de ELISA utilizando antígeno de lisado total de promastigotas de *Leishmania L. chagasi*. Os grupos foram comparados utilizando-se conjugados de peroxidase com proteína A e Anti-IgG de cão, demonstrando que com o uso da proteína A os valores de absorbância foram maiores em relação ao anti- IgG de cão, concluindo que o teste de ELISA com antígeno total de parasitos de *Leishmania L. chagasi* associado ao conjugado de peroxidase com proteína A apresenta grande potencial no diagnóstico e controle da leishmaniose visceral canina (LVC). Foi também testado possibilidades de reação cruzada com *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis*, mostrando negatividade a estes patógenos (LIMA et al., 2005).

Tendo em vista a importância epidemiológica no diagnóstico sorológico precoce na leishmaniose visceral canina, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Comparar a sensibilidade e especificidade entre os métodos sorológicos de ELISA-AgT e ELISA-FML;
2. Comparar a sensibilidade de ambos os métodos sorológicos em animais sintomáticos e oligossintomáticos, correlacionando-os com o grau de parasitismo.
3. Comparar a sintomatologia com o grau de parasitismo.

Revisão de Literatura

A LV é uma antroponose causada pela *Leishmania L. chagasi*; no Brasil, os cães e roedores são considerados reservatórios principais da doença. Sua transmissão ocorre através da forma promastigota que se desenvolve no interior do tubo digestivo do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, também conhecido como mosquito-pólvora, e são inoculadas no hospedeiro quando o vetor fêmea se alimenta (ETTINGER; FELDMAN, 2004). O ciclo enzoótico envolve raposas, chacais, lobos e também flebótomos; as raposas que circulam no peridomicílio, podem servir de reservatório aos flebótomos que infestarão os cães tornando-os reservatórios domésticos (TESH, 1995).

A presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em cães domésticos foi relatado pela primeira vez na Tunísia em 1908 (NICOLLE, 1908).

No Brasil, inicialmente a LV foi descrita como esporádica, acometendo animais e humanos nas áreas rurais e silvestres; posteriormente a doença foi observada em áreas periurbanas nas cidades São Luis-MA, Teresina-PI e Natal-RN (LUZ et al., 2001; DEANE, 1956). A primeira suspeita de caso humano de LV no estado de São Paulo foi na grande São Paulo em 1978 (IVERSSON et al., 1979). Nos últimos anos tem sido observado casos autóctones de LV na cidade de Araçatuba-SP e outros municípios da região Noroeste Paulista, onde existia uma população canina estimada em 33.015 (GALIMBERTTI et al., 1999, NEVES et al., 2001). Devido a grande expansão geográfica e processo de urbanização, tem havido um aumento da incidência em regiões que já vivenciaram epidemias (OLIVEIRA et al., 1998). Em Belo Horizonte-MG, os casos da doença em cães precederam a epidemia humana (BEVILACQUA et al., 2001), observação esta detectada também em estudos no Nordeste brasileiro. Nos focos rurais, mantendo a relação

população humana-canina-vetor de forma adequada, a endemia local permanecerá tendo o cão como o principal reservatório (DEANE, 1956).

Dantas-Torres (2006), propõe a necessidade de investigação da real prevalência da infecção por *Leishmania* em cães domésticos, além das espécies de *Leishmania* em outros possíveis reservatórios, sugerindo estudos mais profundos da participação do gato doméstico. A possibilidade dos animais domésticos participarem como fonte de infecção sanguíneo de flebótomos pode favorecer a manutenção dos mesmos no peridomicílio, pois foi observada a dificuldade de captura de flebótomos, onde não existem animais domésticos (DIAS et al., 2003).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados nos cães são a linfadenomegalia, emagrecimento progressivo, úlceras cutâneas, descamação cutânea, onicogribose, alopecia (FEITOSA et al., 2000, MATTOS JÚNIOR et al., 2004). Uma ampla variação de sintomas pode ser observada no cão, desde a ausência de alterações clínicas ou até mesmo sintomas comuns a outras enfermidades, possibilitando classificar clinicamente animal em sintomático, oligossintomático e assintomático (BRASIL, 2003; GENARO, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000). Em humanos, os fatores que predispõe o desenvolvimento clínico da LV incluem a má nutrição e imunossupressão (GUERIN, et al., 2002).

Os inquéritos diagnósticos caninos e humanos na década de 60, eram realizados por punção de fígado, baço e raspado de pele, métodos estes eficazes, mas de difícil utilização em massa (ADLER; THEODOR, 1932). A fixação de complemento (RFC) e a imunofluorescência indireta (RIFI), mostraram boa sensibilidade porém baixa especificidade devido às reações cruzadas com tripanossomatídeos e riquetsias (PAPPAS, 1984, PAPPAS, 1985).

Na década de 70 surgiram exames sorológicos com técnicas que apresentaram alta sensibilidade e especificidade, como o ELISA, Dot-ELISA, ELISA-FML, BSM-Elisa; entretanto permaneceram reações

cruzadas com outros tripanossomatídeos. A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) tem demonstrado maior sensibilidade e especificidade em animais assintomáticos e com títulos baixos de anticorpos (ALVES; BEVILACQUA, 2004, ASHORD et al., 1995, MANCIANTI, 2004).

Dentre os métodos de diagnóstico, o exame parasitológico para pesquisa direta do parasito, tem sido amplamente difundido, possuindo alta especificidade; porém, a sensibilidade é baixa falhando na detecção de casos onde o parasitismo é baixo. No diagnóstico de rotina, a punção aspirativa de linfonodo e medula óssea são empregadas na identificação de formas parasitárias amastigotas (BARROUIN-MELLO et al., 2006; BRASIL, 2003; MOREIRA et al., 2002).

Em 2002, Moreira et al., correlacionaram a técnica de IFD (imunofluorescência direta) aplicado em esfregaços de linfonodo poplíteo, como exame direto do parasito, concluindo que o exame direto possui alta especificidade e metodologia rápida, porém, o método de IFD, demonstrou maior sensibilidade, com maiores índices de positividade.

Na LV é difícil a correlação de sinais clínicos, quantidade parasitária e sorologia, pois, os títulos elevados de anticorpos na RIFI nem sempre estão correlacionados com os sinais clínicos e análise parasitológica, assim como o grau de parasitismo nem sempre está associado aos sintomas (MADEIRA et al., 2004, SOUZA et al., 2005). Braga et al. (1998), observaram em seus experimentos que o ELISA utilizando soro de cão, mostrou-se 4,6 vezes mais sensível que RIFI do eluato de papel filtro, pois detectaram maior número de cães precocemente infectados.

Entre os antígenos purificados utilizados para diagnóstico da LV está o ligante de fucose-manose (FML), que é composto por uma fração glicoproteica, que inibe a penetração de promastigota e amastigota em macrófagos murinos *in vitro* (PALATINIK et al., 1989; PALATINIK-DE-SOUZA et al., 1993). O FML está presente na superfície do parasita

durante todo o seu ciclo (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 1993) sendo um potente imunógeno para camundongos e coelhos, e um antígeno específico no sorodiagnóstico humano (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 1995) e canino (BORJA-CABRERA et al., 1999). Esta fração glicoproteica é composta de 29% de açúcares neutros, 44% de proteínas e traços de carboidratos e hexoaminas. Entre os açúcares neutros foram identificados: 10% fucose, 47% manose, 30% glicose, 12% galactose (PALATINIK et al., 1989).

Testes com ELISA-FML foram realizados em soros humanos como método diagnóstico da LV; mostrando 100% de sensibilidade e 96% de especificidade em pacientes sintomáticos; dos pacientes aparentemente saudáveis e positivos no ELISA-FML, 20% desenvolveram a sintomatologia no período de 10 meses (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 1996). Em 417 amostras de sangue humano da cidade de Natal-RN, foram realizadas comparações entre o método de RIFI (eluato) com ELISA-FML (soro) obtendo-se como resultados de positividade para leishmaniose, médias de 12,9% para o ELISA-FML, e 8,7% para RIFI, mostrando que o ELISA-FML era mais sensível (PALATINIK-DE-SOUZA et al., 2004).

Borja-Cabrera et al. (1999), compararam o método de ELISA utilizando antígenos FML e lisado total de promastigota de *Leishmania L. mexicana*, com o método de RIFI utilizando antígenos total de *Leishmania L. mexicana* e *Leishmania L. chagasi* e observaram que em cães sintomáticos o ELISA-FML mostrou 100% de sensibilidade, o ELISA com *Leishmania L. mexicana* 55,6%, e 33,3% para ambos antígenos no RIFI. Em cães assintomáticos foram observadas sensibilidade de 100% para o FML, 43% para ELISA com *Leishmania L. mexicana* e 24% para ambos antígenos no RIFI. A campo o ELISA-FML mostrou-se mais sensível, seguido pelo ELISA (soro) com *Leishmania L. mexicana*; concluindo que o ELISA-FML foi mais sensível e específico, sugerindo ser útil no controle da LV em áreas endêmicas.

Foi observado por Borja-Cabrera (2000), uma correlação significativa entre os sintomas de animais positivos para LV com a densidade óptica (D.O.) de ensaio sorológico de ELISA-FML.

Foram realizadas comparações do método de ELISA entre soro e eluatos utilizando antígenos de *Leishmania L. amazonensis*, *Leishmania L. chagasi*, rK-39 e rK-26; em grupos de animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os antígenos de *Leishmania L. amazonensis*, *Leishmania L. chagasi*, mostraram maior sensibilidade independente da fase clínica da doença, tanto no eluato como no soro, já os antígenos recombinantes mostram-se mais sensíveis para detectar cães sintomáticos independente de ser usado soro ou eluato, porém sem mostrar diferença estatística entre os tipos de antígenos. A análise de reações cruzadas com outros patógenos como *Tripanosoma cruzi*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis*, foram nulos no ensaio de ELISA utilizando antígenos recombinantes (ROSÁRIO et al., 2005).

O antígeno total utilizado nos testes sorológicos, é constituído de frações antigênicas da forma promastigota do parasito, sendo portanto de baixo custo, e de fácil realização (LIMA et al., 2003, MARTIN et al., 1998; MOHAMMED et al., 1985).

A busca de diagnóstico precoce em humanos e cães se faz necessária por se tratar de uma zoonose que pode ser fatal para humanos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados noventa cães, sendo, sessenta animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Araçatuba-SP, portadores de infecção natural por *Leishmania L. chagasi*, confirmado pelo exame citológico de punção de linfonodo poplíteo, e trinta animais saudáveis provenientes de região não endêmica cidade de Santos-SP. Os animais foram agrupados em:

- Grupo sintomático: composto por trinta animais positivos, que apresentavam mais de dois sinais clínicos. Rarefação pilosa e alopecia, úlceras cutâneas, caquexia, onicogribose, linfadenomegalia, dentre outros.
- Grupo oligossintomáticos: composto por trinta animais positivos, que apresentavam boa condição corpórea, ausência de lesões cutâneas, porém apresentavam linfadenomegalia.
- Grupo controle: composto por trinta animais saudáveis, provenientes da cidade de Santos-SP, região não endêmica para LV.

Após avaliação clínica e coleta de material, os animais do grupo A e B foram eutanasiados, seguindo as normas da Secretaria de Saúde e Higiene Pública do município de Araçatuba-SP. Estes animais foram previamente submetidos à anestesia com Thiopental sódico ® (25mg/Kg/IV) e posteriormente eutanasiados com cloreto de potássio a 19,1% (1mg/Kg/IV).

Material Biológico

Punção aspirativa de linfonodos

Os cães dos grupos sintomático e oligossintomático, foram submetidos à punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo, segundo a técnica preconizada por Cowell et al., 1999. Os esfregaços corados pelo Panótico rápido (Labor Clin ®) foram examinados em microscópio de luz com objetiva de 100X à imersão.

Sangue

Os cães dos grupos sintomáticos, oligossintomáticos e controle, foram submetidos à coleta de sangue por venopunção jugular e, após formação de coágulo, foi centrifugado a 3000rpm, para obtenção de soro. As amostras de soro foram aliquotadas em frascos de polipropileno de 1,5 ml e armazenadas em freezer a -20°C para posterior realização do teste enzimático de ELISA.

Análise Parasitológica

Os esfregaços de linfonodo foram examinados por um observador experiente, com o objetivo de identificar formas amastigotas típicas de *Leishmania sp.* Para tanto, utilizou-se um escore a fim de quantificar o grau de parasitismo em cada esfregaço, analisando-se 50 campos em cada esfregaço. Dessa forma, o grau de parasitemia foi classificados em: raro (1 a 10 parasitos/ esfregaço), discreto (11 a 20 parasitos/esfregaço), moderado (21 a 30 parasitos/esfregaço) e acentuado (> 30 parasitos/esfregaço).

Método de Elisa

Método de ELISA para detecção de IgG para *Leishmania L. chagasi* segundo (LIMA et al., 2003).

O teste foi realizado no Laboratório de Imunologia Veterinária da UNESP de Araçatuba. Para a realização do ensaio, microplacas de poliestireno de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 µl da solução, por poço, contendo 20 µg/ml de proteína de lisado total de promastigotas de *Leishmania L. chagasi* em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), sendo incubadas a 4 °C por uma noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas por três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20, pH 7,2 (PBS T 20) e bloqueadas com 150 µl, por poço, de PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida as foram lavadas novamente com PBS T 20.

As amostras foram diluídas em PBS T 20 acrescido de 10% de SFB, na diluição de 1:400, a mesma diluição foi realizada para os controles positivos e negativos. A seguir foram adicionados 100 µl de amostras e padrões, por poço, em triplicata. Esta etapa do ensaio foi incubada por três horas, à temperatura ambiente e em seguida as placas foram lavadas novamente com PBS T 20.

Posteriormente foram adicionados 100 µl de anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase (Sigma, EUA), por poço, diluído 1:1000 em PBS T 20. A incubação foi realizada por uma hora, à temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada novamente com PBS T 20. A seguir, as placas foram cobertas com 100 µl da solução reveladora, composta pelo substrato o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma,EUA) (0,4mg/ml), água oxigenada (H₂O₂), ácido cítrico (0,1 M) e

fosfato de sódio dibásico (0,2 M), por poço, e permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e o momento de leitura.

A reação ocorreu em cinco minutos, no escuro e foi interrompida pela adição de 50 μ l, por poço, de ácido clorídrico 1 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, Spectra Count TM (Packard Bio Science Company, U.S.A.), utilizando filtro para comprimento de onda de 490 nm.

ELISA para detecção de proteína antigênica do FML segundo (BORJA-CABRERA, 1999) com modificação.

As microplacas de poliestireno de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 µl da solução, por poço, contendo 40 µg/ml de antígeno FML em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), sendo incubadas por uma hora a 37 °C e após a 4 °C por uma noite.

Após a sensibilização as placas foram lavadas por três vezes com PBS acrescido de 1 % de leite desnatado e Tween 20, pH 7,2 (PBS T 20). As amostras foram diluídas na concentração de 1:100 no tampão (PBS T 20), a mesma diluição foi realizada para os controles positivos e negativos. A seguir foram adicionados 100 µl de amostras e padrões, por poço, em triplicata. Esta etapa do ensaio foi incubada por uma hora , à temperatura de 37°C e em seguida as placas foram lavadas novamente com PBS T 20.

Posteriormente foram adicionados 100 µl de anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase (Sigma, EUA), por poço, diluído 1:1000 em PBS T 20. A incubação foi realizada por uma hora, à temperatura ambiente e em seguida a placa foi lavada novamente com PBS T 20. A seguir, as placas foram cobertas com 100 µl da solução reveladora, composta pelo substrato o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma,EUA) (0,4mg/ml), água oxigenada (H₂O₂), ácido cítrico (0,1 M) e fosfato de sódio dibásico (0,2 M), por poço, e permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e o momento de leitura.

A reação ocorreu em cinco minutos, no escuro e foi interrompida pela adição de 50 µl, por poço, de ácido clorídrico 1 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, Spectra Count TM (Packard Bio Science Company, U.S.A.), utilizando filtro para comprimento de onda de 490 nm.

Interpretação dos resultados do ELISA.

O ponto de corte “cut off” foi determinado através do programa estatístico “MedCalc” pelo método curva Roc (Gardner; Greiner, 2006) através da densidade óptica (D.O.) dos soros negativos e a D.O. dos soros positivos.

Análise Estatística

A análise estatística foi constituída dos seguintes testes não paramétricos: o teste de McNemar, utilizado para comparar proporções de resultados positivos de dois grupos dependentes; teste de qui-quadrado que verificou associação entre métodos e grupos; para associação entre parasitismo e as variáveis estudadas, foi usado teste exato de Fisher (Zar, 1998). As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System). Os resultados estatísticos foram considerados significativos, quando $P < 0,05$. Os valores da sensibilidade e especificidade entre as variáveis, foram determinados pela curva Roc (Gardner; Greiner, 2006), empregando-se o programa MedCalc. O índice Kappa (Smith, 1995) foi utilizada para medir o grau de concordância real entre o teste parasitológico e as técnicas de ELISA.

Resultado

Avaliação Clínica dos Animais

Grupo sintomático

Foram observados neste grupo quinze cães machos e quinze fêmeas, que apresentaram sintomas (Figura 2) abaixo relatados:

- Linfadenomegalia (30 cães)
- Onicogrifose (18 cães)
- Rarefação pilosa (15 cães)
- Caquexia (15 cães)
- Pododermatite (12 cães)
- Alopecia em pina (12 cães)
- Alopecia periocular (9 cães)
- Úlceras cutâneas (9 cães)
- Descamação cutânea (8 cães)

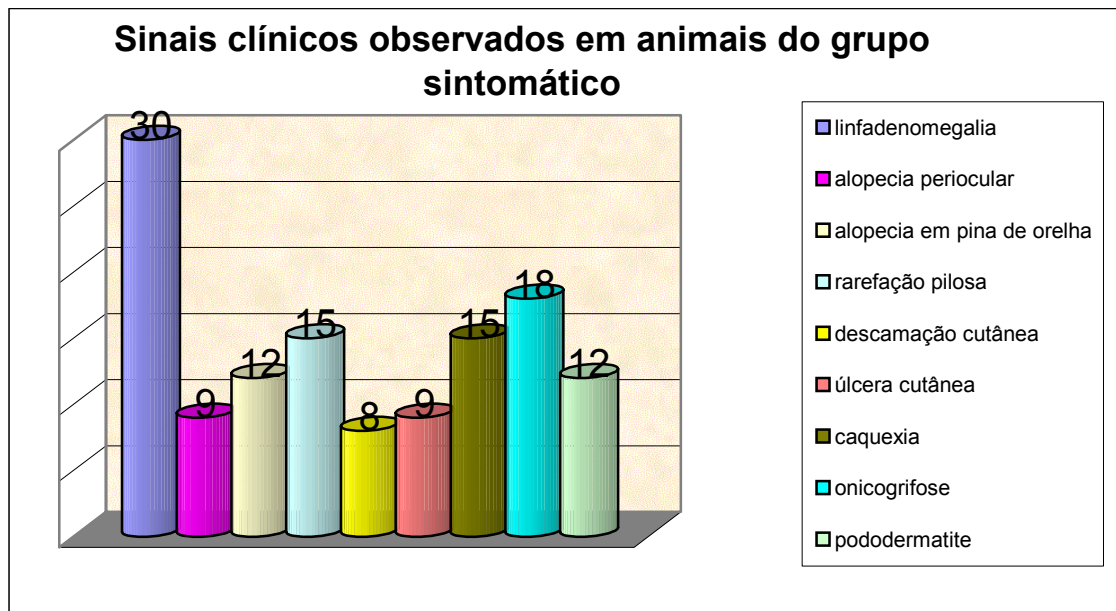


Figura 1. Mostra a frequência de sinais clínicos observados em animais sintomáticos para LVC (n = 30).



Figura 2. Animais com sintomas da LVC. (A) Animal apresentando caquexia, alopecia em região periorcular bilateral e dermatite. (B) Onicogribose. (C) Dermatite ulcerativa em região articular. (D) lesão ulcerativa com rarefação pilosa em pina.

Grupo oligossintomático

Dos animais deste grupo, 15 cães eram machos e 15 fêmeas, que se apresentavam em boa condição corpórea, e todos com linfadenomegalia (100%) (Figura 3).



Figura 3. Animal com LVC pertencente ao grupo de animais oligossintomáticos. (A e C) Demonstra animal em boa condição corpórea, livre de lesões dermatológicas. (B) Linfonodo poplíteo com aumento de volume (linfadenomegalia).

Diagnóstico Parasitológico

A avaliação do grau de parasitismo nos esfregaços de linfonodo dos animais sintomáticos, mostrou que 36,7% apresentaram raros parasitos, seguido pelos 33,3% de animais que apresentam moderado parasitismo, 16,7% mostrou discreto parasitismo, enquanto que 13,3% do grupo apresentou acentuado grau parasitário. Nos animais oligossintomáticos, raro grau parasitário foi observado em 50% do grupo, seguido pelos 20% que apresentaram moderado parasitismo, inúmeros parasitos foram observados em 16,7% dos animais, e 13,3% dos animais apresentaram discreto grau parasitário (Figura 4A, B,C, D e Figura 5).

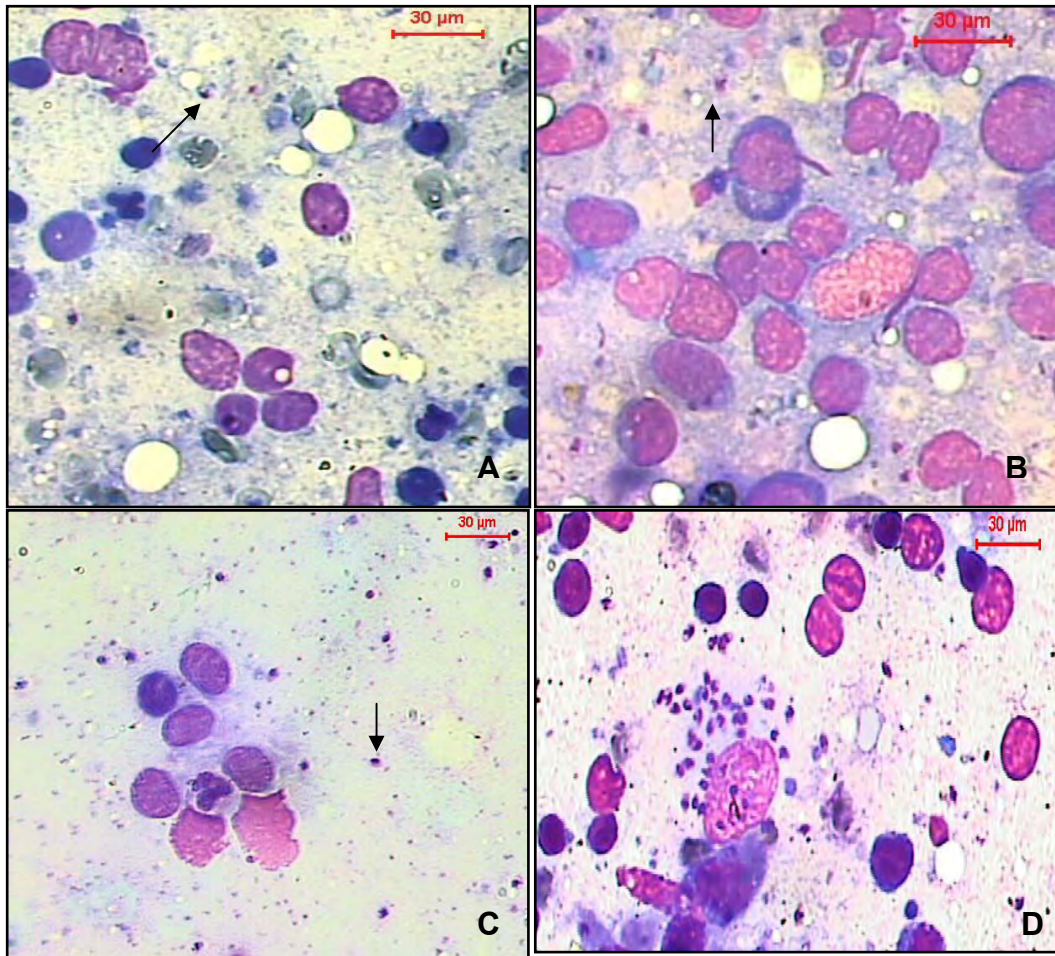


Figura 4. Fotomicrografia do esfregaço de aspirado de linfonodo poplíteo de cão, demonstrando o grau de parasitismo. (A) Representa raros parasitos, indicado na seta. (B) Demonstra discreto parasitismo. (C) Demonstra moderado parasitismo. (D) Demonstra inúmeros parasitos no interior do citoplasma de macrófago. Panótico Rápido.

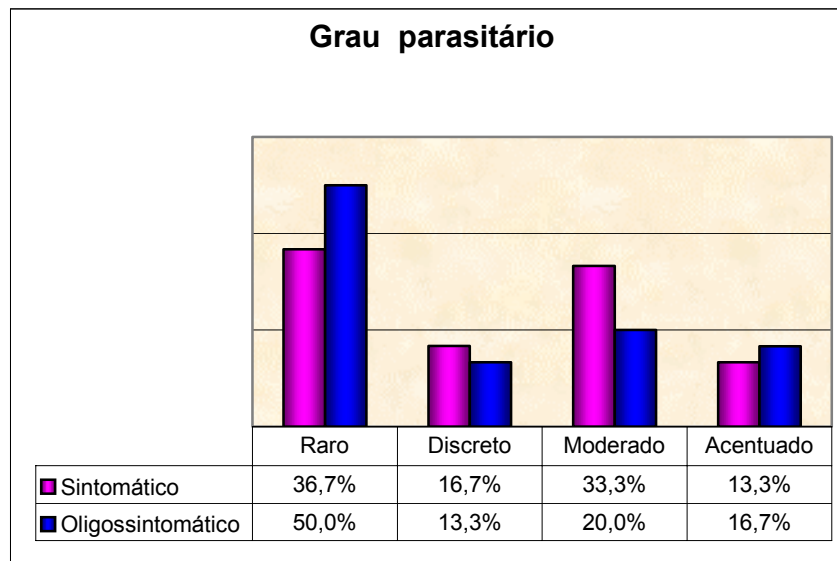


Figura 5. Mostra em percentual, o grau de parasitismo observado nos grupos sintomáticos e oligossintomáticos.

Diagnóstico Sorológico

Ensaio Imunoenzimático de ELISA

No ELISA-AgT, o ponto de corte determinado pela curva Roc foi , D.O. de 0,170 no grupo sintomático, e D.O. de 0,232 para o grupo oligossintomático (Figura 6A e 6B). No ELISA-FML o mesmo procedimento foi adotado, e o ponto de corte foi estabelecido em D.O. de 0,170 para ambos os grupos (Figura 7A e 7B).

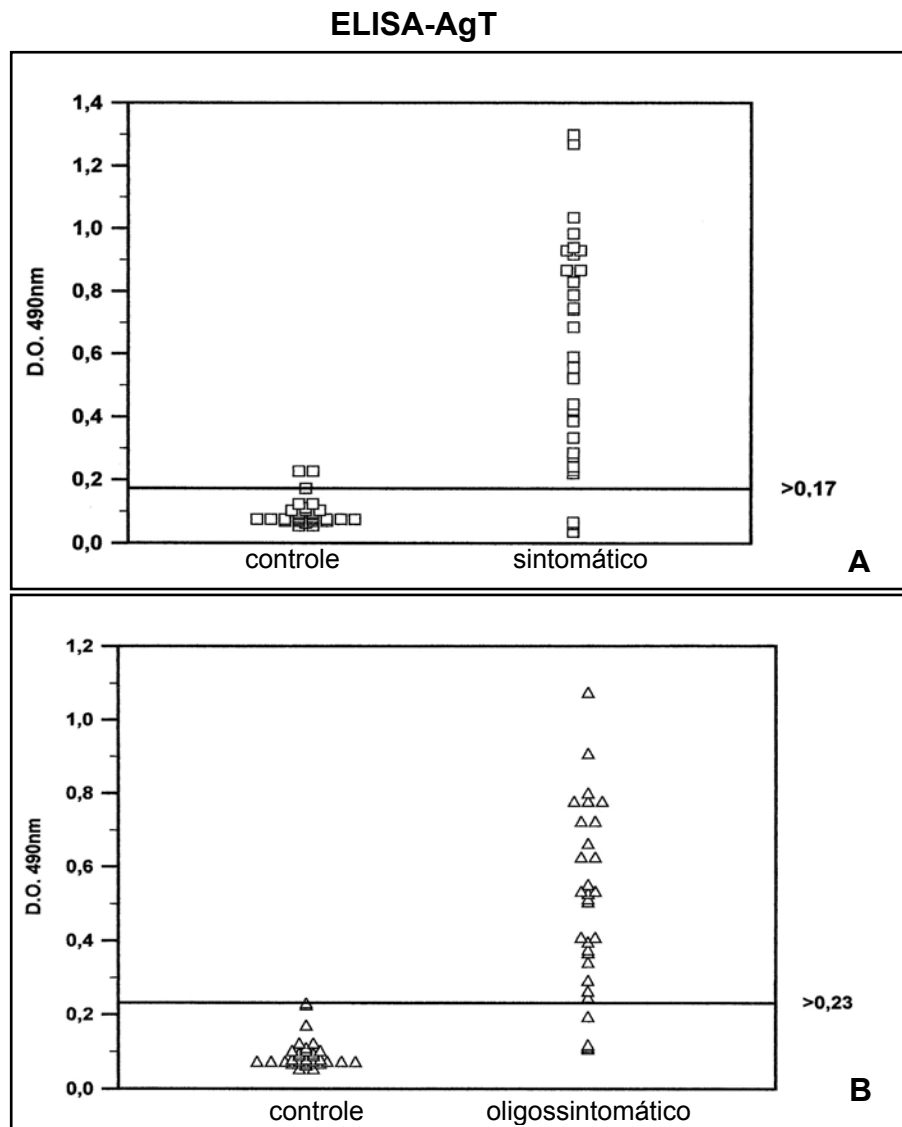


Figura 6. Reação sorológica pelo método de ELISA-AgT, em cães sintomáticos (A), oligossintomáticos (B) e controle (A e B) (n = 30 para cada grupo representado). O ponto de corte está indicado.

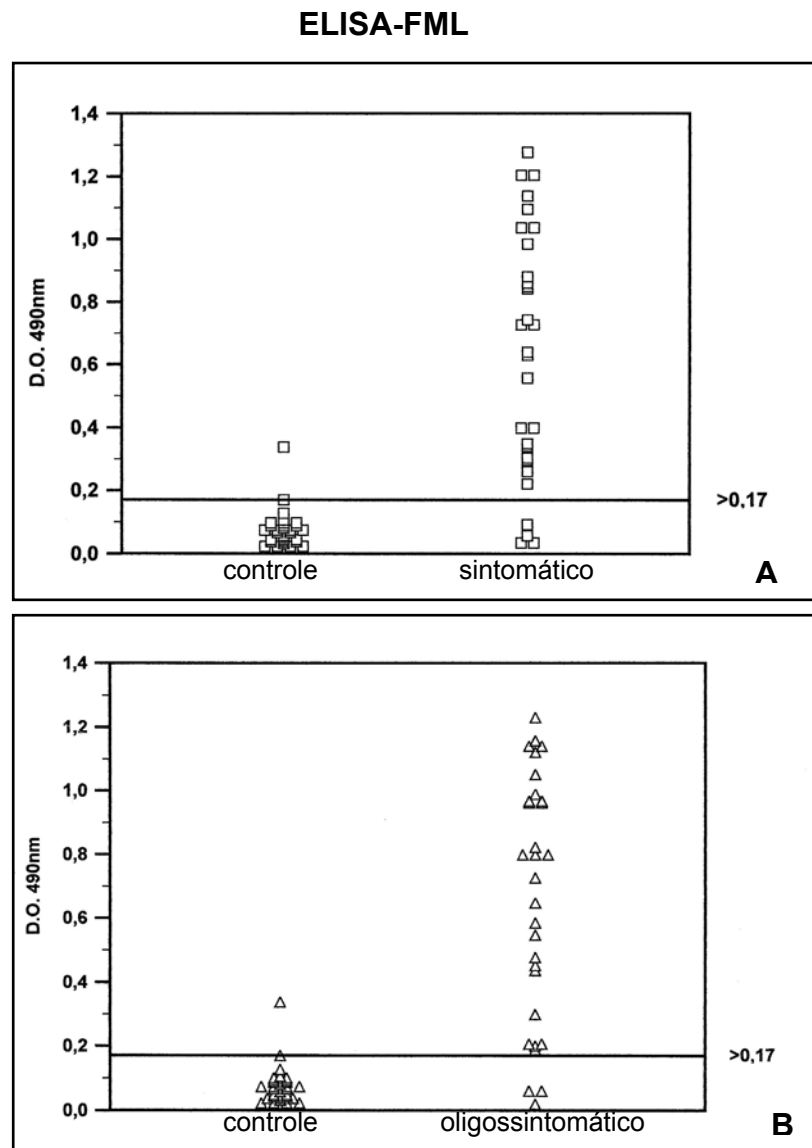


Figura 7. Reação sorológica pelo método de ELISA-FML, em cães sintomáticos (A), oligossintomáticos (B) e controle (A e B) (n = 30 para cada grupo representado). O ponto de corte está indicado.

O teste de ELISA-AgT, mostrou sensibilidade de 90% nos animais sintomáticos, e 86,7% para o grupo oligossintomático, a especificidade obtida foi de 93,3% para o grupo sintomático e 100% nos animais oligossintomáticos; o valor preditivo positivo foi maior no grupo oligossintomático (100%), enquanto que no grupo sintomático foi de 93,1% (Tabela 1).

No ensaio de ELISA-FML, a sensibilidade foi de 86,7% nos animais oligossintomáticos, e 90% nos sintomáticos; a especificidade foi de 96,7% em ambos os grupos, o valor preditivo positivo foi de 96,3% para o grupo sintomático e 96,4% para os oligossintomáticos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo nos ensaios de ELISA-AgT e ELISA-FML em cães do grupos sintomático e oligossintomático

Método	Grupo	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo
ELISA-AgT	Sintomático	90,0%	93,3%	93,1%
	Oligossintomático	86,7%	100%	100%
ELISA-FML	Sintomático	86,7 %	96,7%	96,3%
	Oligossintomático	90,0%	96,7%	96,4%

A comparação da positividade dada pelo teste ELISA-AgT e ELISA-FML, mostrou discreta diferença na positividade entre ambos diagnósticos (3,3%), porém, não mostrou diferença estatística significativa pelo teste de McNemar $p > 0,05$ (Tabela 2).

Tabela 2. Análise comparativa dos testes pareados de ELISA-AgT e ELISA-FML.

Grupo	ELISA-AgT	ELISA-FML			P ⁽¹⁾
		Positivo	Negativo	Total	
		%	%	%	
Sintomático (n = 30)	Positivo	80,0	6,7	86,7	1,000
	Negativo	10,0	3,3	13,3	
	Total	90,0	10,0	100,0	
Oligossintomático (n = 30)	Positivo	80,0	6,7	86,7	0,6547
	Negativo	10,0	3,3	13,3	
	Total	90,0	10,0	100,0	
Controle (n = 30)	Positivo	0,0	3,3	3,3	0,5637
	Negativo	6,7	90,0	96,7	
	Total	6,7	93,3	100,0	

⁽¹⁾ teste de McNemar

A análise comparativa entre o grau de parasitismo e a presença de sintomatologia nos animais, não mostrou valor significativo pelo teste exato de Fisher em ambos os grupos estudados ($P=0,6327$). Porém, foi observada uma correlação significativa ($P<0,0145$) entre o grau de parasitismo com a positividade obtida no ensaio de ELISA-AgT; o mesmo não foi observado no ensaio de ELISA-FML (Tabela 3).

Tabela 3. Análise comparativa entre o grau de parasitismo com a positividade sorológica de ELISA-AgT e ELISA-FML de ambos os grupos estudados.

Variável	Categoria	Parasitismo										P ⁽¹⁾
		raro		discreto		moderado		acentuado		Total		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Grupo	Sintomático (n = 30)	11	36,7	5	16,7	10	33,3	4	13,3	30	100	0,6327
	Oligossintomático (n = 30)	15	50	4	13,3	6	20	5	16,7	30	100	
	Total (n = 60)	26	43,3	9	15,0	16	26,7	9	15	60	100	
ELISA-AgT	Positivo	22	84,6	9	100	16	100	5	55,6	52	86,7	0,0145
	Negativo	4	15,4	0	0,0	0	0,0	4	44,4	8	13,3	
	Total	26	100	9	100	16	100	9	100	60	100	
ELISA-FML	Positivo	22	84,6	8	88,9	15	93,7	8	88,9	53	88,3	0,9346
	Negativo	4	15,4	1	11,1	1	6,3	1	11,1	7	11,7	
	Total	26	100	9	100	16	100	9	100	60	100	

(1) teste exato de Fisher.

Discussão

Os principais sintomas observados na avaliação clínica dos animais, foram linfadenomegalia, lesões dermatológicas e onicogrifose, corroborando com os achados de Feitosa, et al., 2000, Mattos Junior, et al., 2004 e Ikeda-Garcia et al., 2007.

No Brasil, as medidas adotadas para a contenção da LVC, encontram-se no controle do vetor, identificação da doença, e posterior eutanásia do cão infectado. Neste contexto, o diagnóstico de animais positivos pelas técnicas sorológicas e parasitológicas, tem importante papel, visto que os achados clínicos e hematológicos são compatíveis com outras doenças infecciosas.

Em relação ao exame parasitológico, apesar de apresentar baixa sensibilidade, a especificidade é alta, quando observado a presença do parasito ao exame direto. Em nossos resultados, observamos oito cães positivos para LVC no exame parasitológico, dentre estes, quatro apresentavam acentuado grau de parasitismo, que obtiveram sorologia negativa no ensaio de ELISA-AgT; o mesmo foi observado no teste de ELISA-FML, onde, sete animais positivos ao exame parasitológico, mostraram negatividade sorológica, dados estes que corroboram com os observados por Barrouin-Mello et al., 2006; Barrouin-Mello et al., 2006; Brasil, 2003; Moreira et al., 2002. Nosso estudo revelou correlação significativa ($P=0,0145$) entre o grau de parasitismo com a positividade sorológica no ensaio de ELISA-AgT, porém não revelou correlação entre o grau de parasitismo com a sintomatologia, concordando com dados observados por Madeira et al., 2004; Souza et al., 2005.

Diferentes métodos sorológicos são utilizados para o diagnóstico da doença. Desses, a reação de imunofluorescência indireta (IFI) tem sido amplamente empregada, embora, tal método apresente limitações, tais como: reatividade cruzada com outras doenças e sensibilidade

reduzida para detecção de cães assintomáticos (ALMEIDA et al., 2004, BRAGA et al., 1998, SUNDAR; RAÍ, 2002).

A técnica de ELISA apresenta vantagens, pois a leitura é automatizada, não depende do observador, vários testes são processados ao mesmo tempo e tem sido utilizada em levantamentos epidemiológicos (SUNDAR; RAÍ, 2002). Métodos de ELISA utilizando o antígeno total do parasito são descritos para o diagnóstico da doença canina e humana (LIMA et al., 2003, MARTIN et al., 1998; MOHAMMED et al., 1985). Tais métodos têm algumas vantagens sobre outros métodos comumente utilizados. A preparação de antígeno total é simples, grandes quantidades são produzidas sob condições padronizadas (EVANS et al., 1990). Visto que o antígeno total apresenta determinados epítomos antigênicos que não estão presentes no antígeno solúvel.

Nossos resultados mostraram que o ELISA-AgT apresentou sensibilidade e especificidade altas, sendo mais sensível nos animais sintomáticos (90,0%) do que nos oligossintomáticos (86,7%) e especificidade de 93,3% para os sintomáticos e 100% nos oligossintomáticos. Rosário et al., 2005, realizou ELISA com antígeno total de *Leishmania L. chagasi*, em animais positivos para LVC pelo método de IFI e obteve sensibilidade de 98% e especificidade e 100%; nossos resultados mostraram a mesma especificidade no grupo de oligossintomáticos, porém com menor sensibilidade (86,7%). A diferença observada na sensibilidade pode estar associada ao exame ouro do diagnóstico, onde no nosso estudo foi realizado exame direto parasitológico, e o acima descrito foi previamente diagnosticado por teste sorológico.

Métodos de ELISA baseados em frações purificadas ou recombinantes têm sido descritos (METTLER et al., 2005, NIETO et al., 1999, RHALEM et al., 1999) e apresentam alta sensibilidade e especificidade, tendo como vantagem, menor possibilidade de reações

cruzadas com outros patógenos (METTLER et al., 2005, ROSÁRIO et al., 2005).

Entre os antígenos purificados utilizados para diagnóstico da LV está o ligante de fucose-manose (FML), que é um antígeno específico no sorodiagnóstico humano (PALATINIK et al., 1995) e canino (BORJA-CABRERA et al., 1999).

Em cães sintomáticos, o método ELISA-FML empregando proteína A conjugada à peroxidase para detecção dos anticorpos, resultou em sensibilidade e especificidade de 100% (BORJA-CABRERA et al., 1999). No grupo de animais sintomáticos estudado, o mesmo método utilizando anti-IgG de cão, conjugado à peroxidase para detecção de anticorpos, resultou em sensibilidade de 86,7% e especificidade de 96,7%. A diferença observada em nossos estudos, com os obtidos por Borja-Cabrera et al., 1999, pode ser atribuída ao uso da proteína A. De fato, a proteína A conjugada à peroxidase apresenta vantagem em relação ao uso de IgG conjugada à peroxidase pois, a proteína A reage com todas as classes de IgG e também reage parcialmente com IgA e IgM (GOUDSWAARD et al., 1978). O uso de proteína A conjugado à peroxidase aumenta a diferença nos valores de absorbância no soro de cães infectados e saudáveis, o que auxilia na discriminação dos animais positivos (LIMA et al., 2003); tal fato se reflete diretamente na sensibilidade do ensaio. Nos animais assintomáticos, Borja-Cabrera et al., 1999, obteve sensibilidade de 100%. Em nosso estudo, o grupo oligossintomático, o qual mais se assemelha ao grupo acima descrito, apresentou sensibilidade de 86,7% e especificidade de 96,7%, a menor sensibilidade observada pode estar associada à não utilização de proteína A.

Nossos resultados mostraram que em animais oligossintomáticos o ELISA-FML apresentou maior sensibilidade, por outro lado, nos animais sintomáticos, o ELISA-AgT mostrou-se mais sensível na detecção de positividade na LVC; porém as diferenças observadas na sensibilidade em ambos os métodos e grupos foram de 3,3% mostrando-se discretas.

Conclusão

1. O ELISA-FML apresentou maior sensibilidade do que o ELISA-AgT nos animais oligossintomáticos. O ELISA-AgT, apresentou maior sensibilidade do que o ELISA-FML nos animais sintomáticos;
2. Ambos os métodos sorológicos ELISA-AgT e ELISA-FML, são eficazes no diagnóstico da LVC, pois, apresentaram discreta diferença na sensibilidade de ambos os métodos sorológicos nos grupos estudados;
3. A avaliação do grau de parasitismo, não está correlacionada com a progressão da doença;
4. Pode haver uma correlação positiva entre o método sorológico ELISA-AgT com o exame parasitário.

Referências Bibliográficas

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on mediterranean kala-azar. VI. canine visceral leishmaniasis. **Proc. R. Soc. Lond.** v. 116, n. 801, p. 494-504, 1932.

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania L. chagasi*. **Vet. Parasitol.** v.127, n. 3-4 , p. 227-232, 2004.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública.** v. 20, n. 1, p.259-265, 2004.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK,I.; EULALIO,C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE,W.; BARKER JUNIOR, R.H.; BADARÓ, R.; DAVID J.R. Comparison of the Polimerase Chain Reaction and Serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES, A.Z.; COSTA, K.M.; JUNQUEIRA, R.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C.A.P. *Leishmania major*-Like Antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; ANDRADE FILHO, F.A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F.S.; FRANKE, C.R.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Vet. J.** v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; SANTOS, S.O.; CHAGAS-JÚNIOR, A.D.; PAIXÃO, M.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 111, n. 3-4, p. 251-261, 2006.

BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

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

BORJA-CABRERA, G.P. Análise do potencial diagnóstico, prognóstico e imunoprotetor do antígeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania L. donovani*, no calazar canino experimental e de área endêmica. 2000. 79 f. **Tese para título de Ph. D.** Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2000.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.DE OLIVEIRA. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; De LIMA, R.; GRADONI, C.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.** v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat.** 2ª ed. São Paulo: Mosby, 1999. 338p.

DA-SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública.** v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev. Saúde Pública.** v.10, n. 3, p. 537-541, 2006.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1956. 162p. **Tese de livre docência** – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 1956.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBELO, L.M.M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**. v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 2156p.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MACAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmaniasis in Northast Brazil: Assesment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 42, n. 2, p. 118-123, 1990.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-São Paulo (Brasil). **Clín. Vet.** v. 15, n. 28, p. 36-44, 2000.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATIZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODOS, L.A.C.; CASANOVA, C. Leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** v. 32, n. 1, p. 217, 1999

GARDNER, I.A.; GREINER, M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. **Vet. Clin. Pathol.** v. 35, n. 1, p. 8 – 17, 2006.

GENARO, O.; RASO, P.; DA COSTA, C.A.; CARVALHO, M.D.; DO AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87, n. 1, p. 163-164, 1992.

GOUDSWAARD, J.; NOORDZIJ, A.; VAN DAM, R.H.; VAN DER DONK, J.A. Quantification of turkey immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. **Z. Immunitätsforsch. Immunobiol.** v. 154, n. 3, p. 248-255, 1978.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet. Infect. Dis.** v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; LIMA, V.M.F.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; FEITOSA, M.M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.** v. 143, n. 3-4, p. 254-259, 2007.

IVERSSON. L.B.; CAMARGO, M.E.; ROCHA E SILVA, E.O.; CHIEFF, P.P.; BARROS, J.A.C. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública.**, v. 13, n. 2, p. 159-167, 1979.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V.M.F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A.C.; CORREA, A.P.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesq. Vet. Bras.** v. 25, n. 4, p. 215-218, 2005.

LUVIZOTTO, M.C.R.; BIAZZONO, L.; EUGENIO, F.R.; ANDRADE, A.L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: **Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 20., 1999,  guas de Lindóia. **Anais...**,  guas de Lindóia, 1999. p. 24-25.

LUZ, K.G.; SUCCI, R.C.M.; TORRES, E. Nível sérico da vitamina A em crianç s portadoras de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. M d. Trop.** v. 34, n. 4, p. 381-384, 2001.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; LEAL, C.A.; MARZOCHI, M.C.A. 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.** v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**. v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MARTIN, S.K.; THUITA-HARUN, L.; ADOYO-ADOYO, M.; WASUNNA, K.M. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 92, n. 5, p. 571-577, 1998.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MATTOS JUNIOR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C.; COSTA, D.A. Aspectos clínicos e de laboratórios de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 54, n. 1, p. 119-122, 2004.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; HEINRICH, C.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, an Immunofluorescent-Antibody Test, and two rapid test (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Test) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* Infections in dogs. **J. Clinic. Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MOHAMMED, E.A.; WRIGHT, E.P.; KAGER, P.A.; LAARMAN, J.J.; PONDMAN, K.W. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kalaazar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 79, n. 3, p. 344-350, 1985.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.

NEVES, V.L.F.C.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cad. Saúde Pública.** v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du laka azar. CRL. **Acad. Sci.** v. 146, p. 789, 1908.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

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

OLIVEIRA, C.D.L.; PESSANHA, J.E.; COSTA, I.O. Histórico das ações e metodologias propostas e adotadas no controle da leishmaniose visceral no Município de Belo Horizonte, 1993 a 1998. Belo Horizonte: **Secretaria Municipal de Saúde**, Departamento de Ações de Saúde, Serviço de Controle de Zoonoses, 1998. 46p. (Relatório).

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

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose-Ligand (FML). **Acta. Trop.** v.53, n. 1, p. 59-72, 1993.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; GOMES, E.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; PALATNIK, M.; LUZ, K.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.** v. 89, n. 4, p. 390-393, 1995.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; GOMES, E.M.; DE SOUZA, E.P.; DOS SANTOS, W.R.; DE MACEDO, S.R.; DE MEDEIROS, L.V.; LUZ, K. The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 29, n. 2, p. 153-163, 1996.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; GOMES, E.M.; BATISTA-DE-MELO, L.M.; BORJA-CABRERA, G.P.; PALATNIK, M.; LAVOR, C.C. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 76, n. 3, p. 583-593, 2004.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; CANNON, L.T. SR.; HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** v. 14, n. 3-4, p. 239-249, 1984.

PAPPAS, M.G.; CANNON, L.T.; HOCKMEYER, W.T.; SMITH, D.H. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 79, n. 2, p. 147-151, 1985.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.** v. 81, n. 3, p. 173-184, 1999.

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

SAS Intitute Inc., **SAS OnlineDoc** ®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc, 1999.

SMITH, R.D., 1995. **Veterinary clinical epidemiology**, a problem-oriented approach. Boca Ratón: CCR Press, 279.

SOUZA, B.M.P.S.; REBOUÇAS, M.F.; OLIVEIRA, L.S.; FREITAS, D.S.; JULIÃO, F.S.; ALCÂNTARA, A.C.; PAULE, B.J.A.; BARROUIN-MELO, S.M.; FRANKE, C.R. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 5, n. 1, p. 31-40, 2004.

SUNDAR, S.; RAÍ, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v. 15, n. 6, p. 593-598, 2002.

Tesh, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

Zar, J.H., 1998. **Bioestatistical analysis.** 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 930p.