

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

SABRINA GABRIELA LOPES

CARACTERIZAÇÃO DE SOROS UTILIZANDO O KIT EIE LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA | BIO-MANGUINHOS® PARA CONSTRUÇÃO DE SOROTECA

ORIENTADOR: PROF. EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

SABRINA GABRIELA LOPES

CARACTERIZAÇÃO DE SOROS UTILIZANDO O KIT EIE LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA | BIO-MANGUINHOS® PARA CONSTRUÇÃO DE SOROTECA
CANINA

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva

APROVADO EM: 09 de julho de 2025

Dr. Eduardo Almeida Marques da Silva
(Orientador)
(UFV)

M. Sc Neverton José Silva Ferreira
(UFV)

M. Sc Amanda Laviola de Andrade
(UFV)

SABRINA GABRIELA LOPES


CARACTERIZAÇÃO DE SOROS UTILIZANDO O KIT EIE LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA | BIO-MANGUINHOS® PARA CONSTRUÇÃO DE SOROTECA
CANINA

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva


APROVADO EM: 09 de julho de 2025

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 SABRINA GABRIELA LOPES
Data: 11/07/2025 17:09:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sabrina Gabriela Lopes

Autora

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA
Data: 13/07/2025 11:13:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Eduardo de Almeida Marques da Silva

Orientador

**Aos meus pais, que nunca viram
limites nos meus sonhos**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, no qual tenho muita fé e é o meu ponto de apoio nos dias difíceis. Sem Ele eu não teria chegado até aqui e não teria conhecido as pessoas incríveis que agora fazem ou já fizeram parte da minha vida.

Aos meus pais Rosane Maria Lopes e Geraldo Ivair Lopes, por nunca terem medido esforços para me permitir estudar e seguir os meus sonhos. Graças a eles me tornei quem sou. À minha irmã Caroliny Isabelle Lopes, por ter me mostrado que sonhos são possíveis de realizar, afinal o meu primeiro sonho realizado foi ela – e por ser a minha companheira de vida em todos os momentos. Ao amor da minha vida Cláudio Antunes Machado Filho, por ser um namorado incrível, me apoiar em todas as minhas ideias, por ter me presenteado com a amizade de pessoas tão especiais e por me fazer parte da sua família. Aos meus cães Luly, Pérola, Nick, Pituxo, Amora e Quindim, por mostrarem todos os dias o que é amor e me inspirarem a dar o meu melhor neste trabalho.

Aos meus avós, tios, primos e todas as pessoas incríveis que se fizeram família em meu coração, por sempre me apoiarem durante a realização do curso, rezarem por mim e me proporcionarem alguns dos melhores momentos e histórias da minha vida. Em especial ao meu avô Paulo, que sempre fez questão de demonstrar o quanto estava feliz em me ver na universidade, pelos 20 anos de risadas e por agora olhar por nós dos Céus.

Aos queridos Maria Aparecida de Castro Oliveira e Paulo de Oliveira, por serem os meus segundos pais e cuidarem de mim e minha irmã como suas filhas. Ao Jerushon Ayres de Moraes e Joana D'arc Rigueira, por terem me apresentado a Universidade Federal de Viçosa com outro olhar e pelas oportunidades que me permitiram ter ao longo do curso. A toda comunidade do Botafogo e Santo André de Cima, que fizeram parte do meu crescimento.

Aos amigos que fiz ao longo do curso e terei pelo resto da vida, por estarem ao meu lado em todos os momentos, especialmente me ajudando quando precisei e por terem feito dos meus dias mais leves e alegres. Também agradeço aos amigos que tinha desde antes de entrar na faculdade, com menção honrosa a Geovana Teixeira Campos, que está ao meu lado desde 2005 e me fez aprender o valor de uma amizade sincera.

A todos os professores que passaram pela minha vida, desde o ensino fundamental até agora, por terem deixado um pouco do seu conhecimento para me formar. Em especial à professora Tatiana Pereira, por me dizer que eu poderia me tornar bióloga quando crescesse e à professora Lucilene Santos, por me encantar com suas aulas de biologia.

Aos admirados membros do Laboratório de Imunoparasitologia: professor Eduardo de Almeida Marques da Silva, pelas risadas, orientação, ensinamentos e apoio; Vagner Dias, por ter me instruído para me tornar uma pesquisadora da imunoparasitologia e por compartilhar suas experiências comigo; Neverton José, por ter me introduzido à biologia molecular e ao ELISA, por me passar seus conhecimentos, me orientar e pelas conversas sobre a vida; Helena Tostes por ter se tornado minha grande amiga e por ter me ajudado em tudo que pôde; Ester Roberti, pelas conversas e aconselhamentos. Agradeço também aos membros do Laboratório de Infectologia Molecular Animal, por terem me acolhido durante esta pesquisa, em especial à professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela solicitude e à estudante de doutorado Amanda Laviola, por me ensinar as técnicas necessárias para que parte deste trabalho pudesse ser realizado e por me acompanhar durante o desenvolvimento dele.

Ao American Kennel Club, pelo patrocínio e fomento, ao curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, por me tornar uma profissional e a Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de ser uma estudante e pelo ensino de excelência.

A todos que possam se beneficiar deste trabalho de alguma forma, muito obrigada!

RESUMO

LOPES, Sabrina Gabriela, B.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025.
CARACTERIZAÇÃO DE SOROS UTILIZANDO O KIT EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA | BIO-MANGUINHOS® PARA CONSTRUÇÃO DE SOROTECA CANINA. Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por parasitos do gênero *Leishmania* sp., transmitida por picada de fêmeas infectadas de dípteros dos gêneros *Lutzomyia* sp. e *Phlebotomus* sp. Esta enfermidade acomete principalmente os cães, que são reservatórios naturais do agente etiológico e podem desenvolver duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar canina (LTC), com manifestações cutâneas e a leishmaniose visceral canina (LVC), de caráter sistêmico. Este trabalho visa auxiliar na construção de um banco de soros caninos (soroteca) por meio de amostras coletadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa para serem utilizados em diferentes pesquisas, buscando facilitar o acesso a material de testagem para futuras técnicas de diagnóstico sorológico de LVC. Foram coletadas 480 amostras devidamente catalogadas de acordo com as informações do prontuário de cada animal que continha suas suspeitas clínicas estabelecidas pelos médicos veterinários responsáveis. Para que parte da validação destas suspeitas clínicas fosse realizada, estas amostras foram submetidas a ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o *kit* “EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos®”, que é um teste preconizado pelo Ministério da Saúde, cujos resultados evidenciaram uma divergência com a suspeita clínica, sugerindo a necessidade de realização de testes moleculares ou parasitológicos nas amostras, para que seus diagnósticos sejam completamente validados.

Palavras-chave: Soroteca canina. Leishmaniose visceral. Ensaio imunoenzimático. ELISA. *Leishmania* sp.

ABSTRACT

LOPES, Sabrina Gabriela, B.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025.
CARACTERIZAÇÃO DE SOROS UTILIZANDO O KIT EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA | BIO-MANGUINHOS® PARA CONSTRUÇÃO DE SOROTECA CANINA. Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by parasites of the genus *Leishmania* sp., transmitted through the bite of infected female dipterans of the genera *Lutzomyia* sp. and *Phlebotomus* sp. The disease primarily affects dogs, which are natural reservoirs of the etiological agent and may develop two main clinical forms: canine cutaneous leishmaniasis (CCL), characterized by cutaneous lesions, and canine visceral leishmaniasis (CVL), a systemic condition. This study aims to contribute to the development of a canine serum bank (serotheque) by collecting samples from the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa, to be used in various research projects. The objective is to facilitate access to testing material for future serological diagnostic techniques for CVL. A total of 480 samples were collected and properly cataloged based on information from each animal's medical record, which contained the clinical suspicions established by the attending veterinarians. To partially validate these clinical suspicions, the samples were subjected to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the "EIE Canine Visceral Leishmaniasis | Bio-Manguinhos®" kit, a test recommended by the Brazilian Ministry of Health. The results revealed discrepancies in relation to clinical suspicions, suggesting the need for confirmatory molecular or parasitological testing to ensure the full and accurate validation of the diagnoses.

Keywords: Canine serum collection. Visceral leishmaniasis. Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA. *Leishmania* sp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1 SOROTECA.....	12
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.....	12
1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	15
1.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A LVC.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 COLETA, TRIAGEM E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	20
3.2 REALIZAÇÃO DO ELISA.....	20
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paciente em fase final da leishmaniose visceral.....	13
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	14
Figura 3 – Cão com diagnóstico de leishmaniose visceral canina.....	16
Figura 4 – Resultados do grupo de amostras de interesse.....	24
Figura 5 – Resultados do grupo de amostras com demais diagnósticos.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxas de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para LVC disponíveis atualmente.....	17
Tabela 2 – Separação das amostras por grupo.....	23
Tabela 3 – Comparação dos resultados de especificidade e sensibilidade do kit EIE Bio-Manguinhos encontrados na literatura.....	27

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 SOROTECA

Soroteca é uma coleção de soros armazenados sob condições adequadas (geralmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), com o intuito de preservar seus componentes. O objetivo de criar uma soroteca é manter viáveis amostras para serem utilizadas em pesquisas científicas, diagnósticos, desenvolvimento de testes sorológicos, ou validação de biomarcadores.

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

A leishmaniose é uma doença zoonótica que também infecta os seres humanos, causada por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* sp. (BRASIL, 2014). É considerada uma doença tropical negligenciada, que se enquadra nessa classificação devido ao baixo aporte financeiro disponibilizado para seu controle em comparação com outras doenças e ao fato de estar presente principalmente em países em desenvolvimento e de baixo poder socioeconômico, onde parte da população tem condições precárias de alimentação e moradia (WHO, 2010, PAHO, 2023). Suas manifestações clínicas dependem da espécie do parasito que causa a infecção, tendo duas formas principais: leishmaniose cutânea (LC), que tem como exemplos de causadores as espécies *Leishmania major*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania amazonensis*, sendo as duas últimas as principais no Brasil; leishmaniose visceral (LV), causada principalmente pela *Leishmania chagasi* nas Américas e *Leishmania infantum* na Europa e África; (WHO, 2025, NEVES, *et al.*, 2019). A forma visceral é a mais grave da doença, sendo fatal em 95% dos casos não tratados (WHO, 2025) e afeta principalmente fígado, baço, medula óssea e linfonodos, além de outros tecidos (WHO, 2010, PAHO, 2023). Ao longo do desenvolvimento da doença ocorre perda significativa de peso, além de hepato e esplenomegalia, acarretando aumento significativo da região abdominal do paciente, o que causa uma série de complicações, podendo levar à fatalidade (BRASIL, 2014). (FIGURA 1)

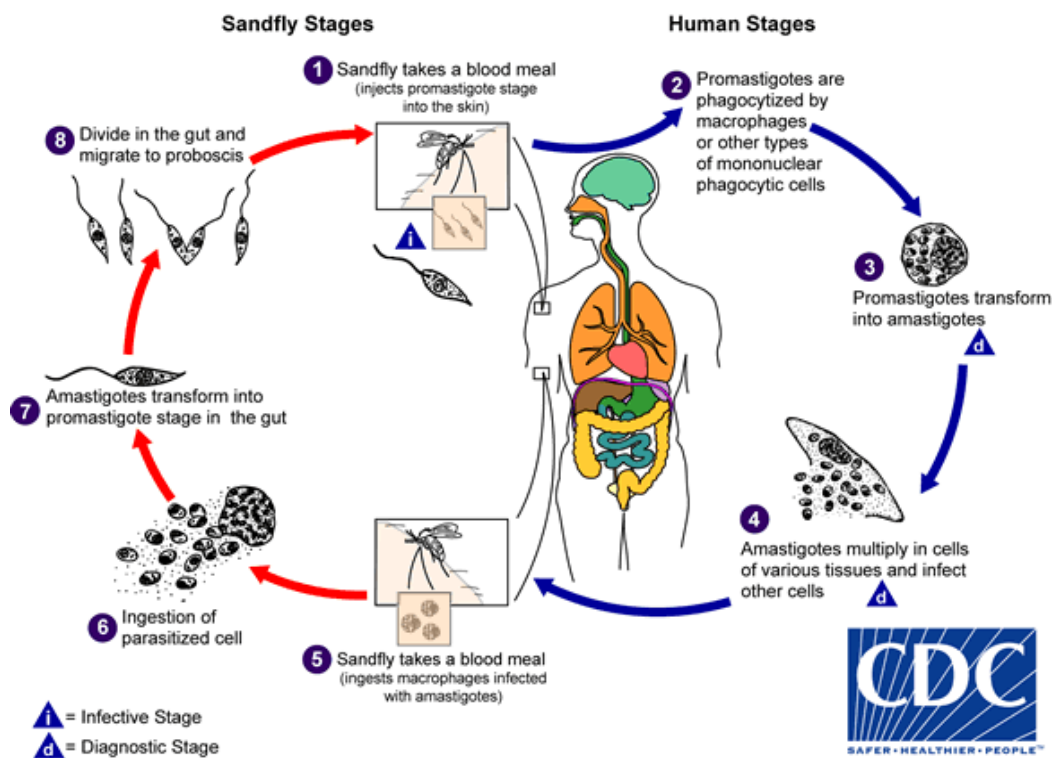
Figura 1: Paciente em fase final de LV, apresentando perda de peso e aumento da região abdominal ocasionada pela hepatoesplenomegalia.



Fonte: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014, BRASIL.

A transmissão da doença se dá pela picada de fêmeas de insetos hematófagos, chamados flebotomíneos ou flebótomos, dos gêneros *Phlebotomus* sp. na Europa e *Lutzomyia* sp. nas Américas, que transmitem o agente etiológico durante sua alimentação (ROCHA, *et al.*, 2013). Os parasitos presentes no vetor se encontram em sua forma promastigota, caracterizada por ser uma célula alongada que possui flagelo e é móvel, a qual adentra o hospedeiro durante a picada do inseto e interage principalmente com os macrófagos, que a fagocitam. Após adentrar nas células por fagocitose, a *Leishmania* passa para sua forma amastigota, que é uma célula ovalada, que apresenta um flagelo curto e é imóvel (ROCHA, *et al.*, 2013, NEVES, *et al.*, 2019). Uma vez dentro do macrófago, o parasito se multiplica de forma intensa por divisão binária, até causar lise da célula. As formas amastigotas liberadas adentram em outras células fagocitárias, inclusive as que se encontram circulantes no sangue, de forma que quando outro flebotomíneo realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro será infectado, completando o ciclo. (ROCHA, *et al.*, 2013, NEVES, *et al.*, 2019) (FIGURA 2).

Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania*. (1) o flebotomíneo se alimenta, injetando as formas promastigotas na pele; (2) macrófagos fagocitam as formas promastigotas; (3) as formas promastigotas se transformam em amastigotas no interior da célula; (4) as formas amastigotas se multiplicam intensamente, rompendo o macrófago e adentrando novas células (5) outro flebotomíneo se alimenta do sangue infectado (6) macrófagos infectados que foram ingeridos se rompem (7) e as formas amastigotas se transformam em promastigotas no interior do intestino do inseto (8). Formas promastigotas se dividem e migram para a probóscide do vetor.



Fonte: Centers For Disease Control and Prevention, EUA. (<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>).

Pelo fato de o parasito infectar macrófagos para realizar sua multiplicação, já se observa que ele é capaz de evadir o sistema imune do paciente, o que evidencia a alta complexidade da resposta imune do organismo infectado (NEVES, *et al.*, 2019, ELMAHALLAWY, *et al.*, 2021). Um dos fatores que permitem *Leishmania* escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro é a presença da glicoproteína gp53 em sua superfície, que impede a ação do sistema complemento por sua inativação e impede que enzimas presentes no fagolisossomo do macrófago sejam

capazes de causar danos a ela (NEVES, *et al.*, 2019, ELMAHALLAWY, *et al.*, 2021). Além disso, as taxas de linfócitos T *helper*, responsáveis pela secreção de citocinas específicas e de imunoglobulinas, principalmente da classe IgG, ficam aumentadas (NEVES, *et al.*, 2019).

1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

Com o processo de urbanização da leishmaniose, que ocorreu devido ao desenvolvimento das cidades, os reservatórios naturais de *Leishmania chagasi*, que são animais que favorecem a manutenção do ciclo de vida do parasito, tornando os flebotomíneos que se alimentam de seu sangue infectados com o agente etiológico de LV (DANTAS-TORRES, 2007), antes representados por algumas espécies de mamíferos silvestres, passaram a ser os cães (LAINSON E RANGEL, 2005). Por esse motivo a LV se tornou mais disseminada, uma vez que eles são animais presentes na maioria dos ambientes domésticos e são facilmente acessados pelo flebótomo por estarem expostos a ele durante o horário ativo e, portanto, se tornaram o principal elo entre o vetor, que é o responsável pela transmissão da LV, e os seres humanos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Quando o cão é infectado, *Leishmania* presentes em seu organismo se distribuem de maneira que os insetos vetores tenham pleno acesso a elas, ficando abundantes em suas vísceras e na derme, sendo o local propício para picadas do flebótomo (WHO, 2010, PAHO, 2023).

A doença se manifesta no organismo do cão, causando a leishmaniose visceral canina (LVC), a depender da imunocompetência e idade do animal (BRASIL, 2014). No geral, a infecção é crônica e generalizada e pode permanecer latente ou evoluir para a forma grave, sendo fatal para o animal (BRASIL, 2014). A LVC possui três classificações, a depender de como a doença se manifesta: assintomática, onde não há manifestação de nenhum sinal clínico indicativo da doença. É a mais prevalente nos cães; oligossintomática, onde ocorre aparecimento de alguns sintomas, como o aumento dos gânglios linfáticos, perda de peso e alterações na pelagem; sintomática, onde há a manifestação de vários sintomas, como perda significativa de massa corporal, alterações na pele e perda dos pelos, espessamento das unhas, perda parcial do movimento das patas e ceratoconjuntivite (FIGURA 3 – BRASIL, 2014).

Figura 3: cão diagnosticado com LVC, com perda de massa, queda da pelagem e ceratoconjuntivite.



Fonte: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014, BRASIL

1.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LVC

Atualmente, a LVC deve ser diagnosticada considerando uma junção de fatores, baseando-se em observações clínicas, epidemiologia e testes sorológicos e parasitológicos (FARIA, *et al.*, 2012). Em primeiro lugar, é necessária uma avaliação feita por um médico veterinário, possibilitando a realização do diagnóstico clínico, que se baseia na sintomatologia e histórico do cão. Porém, a LVC possui sintomas similares aos de outras doenças, como a babesiose e a erliquiose, além de existirem cães positivos que são assintomáticos, o que faz com que esse tipo de diagnóstico tenha confiabilidade reduzida (FARIA, *et al.*, 2012, BRASIL, 2014).

Os testes parasitológicos se baseiam em encontrar o parasito no organismo do animal. Para esse fim, pode-se utilizar a técnica de análise histológica do tecido potencialmente infectado, que consiste na busca microscópica de amastigotas em amostras de linfonodos, medula óssea ou do baço. Embora essa técnica apresente especificidade de até 100%, sua sensibilidade pode ser reduzida, uma vez que o material coletado pode ser proveniente de uma região ainda não infectada. Ademais, o procedimento de obtenção da amostra, geralmente realizado por meio de biópsia, pode representar riscos à vida do animal. (FARIA, *et al.*, 2012). Outra técnica é o cultivo *in vitro* e *in vivo* da amostra biológica, que tem o objetivo de multiplicar as *Leishmania* que podem estar presentes nela, mas geralmente não é um método

muito utilizado pelo excesso de tempo necessário para que se obter os resultados (FARIA, *et al.*, 2012, ROCHA, *et al.*, 2013). Além disso, há o método molecular, que busca pelo material genético de *Leishmania* utilizando técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), que fornece resultado qualitativo, informando a presença ou ausência do parasito apenas e a de PCR em tempo real (qPCR), que fornece resultado quantitativo que permite a determinação da carga parasitária na amostra analisada (FARIA, *et al.*, 2012).

Atualmente, alguns dos métodos empregados no diagnóstico incluem a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que utiliza o parasito como antígeno (FARIA *et al.*, 2012); os testes rápidos imunocromatográficos, como o *Dual Path Platform* (DPP), baseados na interação entre anticorpos e antígenos recombinantes; e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que também se fundamenta na ligação entre anticorpos e antígenos recombinantes. Apesar dos testes sorológicos possuírem grande capacidade de resultar em razoáveis níveis de sensibilidade e especificidade, nenhum deles se mostra tão eficaz quanto, por exemplo, a qPCR. (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxas de sensibilidade e especificidade de alguns testes sorológicos para diagnóstico de LVC disponíveis atualmente, em comparação com a técnica molecular de qPCR.

Teste	Sensibilidade	Especificidade
qPCR	95%	98%
RIFI	85%	71%
DPP - LVC®	83%	93%
ELISA – EIE LVC®	76%	83%

Fontes: Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, 2014, GONÇALVES, 2018.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é uma técnica baseada na interação entre anticorpos e antígenos, seguida da formação de uma reação cromogênica a partir de um substrato incolor. Essa reação permite a detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos presentes na amostra, por meio da medição da intensidade da coloração desenvolvida (MASOODI, *et al.*, 2021). O teste possui diferentes formas, como o ELISA indireto, ELISA competitivo, ELISA direto e o ELISA sanduíche (MASOODI, *et al.*, 2021, DRIJVERS, *et al.*, 2017). O tipo indireto, que é o empregado no kit “EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos®”, que foi escolhido para este estudo por ser um teste preconizado pelo Ministério da Saúde, utiliza placas com os antígenos de interesse adsorvidos, onde se liga a porção Fab dos anticorpos anti-*Leishmania* possivelmente presentes no soro. Após essa ligação ser estabelecida, utiliza-se um anticorpo

anti-imunoglobulina marcado com uma enzima, que liga sua porção Fab na porção Fc do anticorpo do soro e será responsável pela emissão de cor da reação. Nesse contexto, o presente estudo pretende contribuir para a construção de um banco de soros caninos, bem como para a confirmação dos diagnósticos das amostras catalogadas, por meio da aplicação do ELISA para leishmaniose visceral canina, fornecido por Bio-Manguinhos®.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Auxiliar na construção de um banco de soros caninos para utilização de seus antígenos na testagem de técnicas diagnósticas a serem desenvolvidas futuramente.

Objetivos específicos:

1. Coletar, catalogar e armazenar soros disponibilizados pelo Hospital Veterinário da UFV;
2. Realizar teste de confirmação dos diagnósticos do material catalogado utilizando a técnica de ensaio imunoenzimático EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos[®].

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA, TRIAGEM E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue foram colhidas dos cães pelos médicos veterinários durante atendimento no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa. O material utilizado para esta pesquisa foi o excedente do que foi coletado normalmente durante a rotina de atendimento do Hospital, de forma que nenhum cão tenha sido submetido a desconforto adicional para que ela fosse realizada. A permissão para utilização das amostras foi solicitada aos tutores dos animais por intermédio de formulário de consentimento fornecido pela American Kennel Club (AKC) (Anexo A) e o uso das amostras foi certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), processo nº 30/2025 (Anexo B).

Após a coleta, o sangue foi centrifugado a $1.500 \times g/10$ min, de acordo com protocolo do Laboratório de Imunoparasitologia – LIP/DBG/UFV. Os soros e as células foram armazenados em microtubos comuns de 1,5 mL e em microtubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), respectivamente, que foram identificados com número devidamente catalogado e correlacionado com as informações dos prontuários dos animais, em que constam a localização e o diagnóstico clínico de cada um deles. Todos esses procedimentos foram realizados pela equipe do Hospital.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Infectologia Molecular Animal, onde foram mantidos em seus microtubos originais. Tanto as amostras de soro quanto de células foram armazenadas em *freezer* a -20 °C para uso em experimentos posteriores.

3.2. REALIZAÇÃO DO ELISA

Como parte da validação do diagnóstico informado das amostras, foi realizado o ELISA utilizando o *kit* “EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos”, lote 16UEL01Z, cujo manual de instruções presente no kit (Anexo C) foi devidamente seguido.

Um total de 480 amostras foram submetidas ao ELISA e elas foram separadas em cinco grupos (Tabela 2): suspeita de LVC (8 amostras), vacinados para LVC (7 amostras), hemoparasitoses ativas (23 amostras), histórico de hemoparasitoses (16 amostras) e demais diagnósticos (426 amostras),

Para iniciar o teste, o diluente das amostras foi preparado seguindo o volume indicado para 96 reações: 1,4 g de lecitina de leite, 14 mL de diluente de amostras 5X e 56 mL de água

destilada, que foram misturados utilizando um agitador magnético, resultando em aproximadamente 70 mL de diluente preparado, do qual 500 µL foram distribuídos em microtubos de 1,5 mL, 3 deles identificados como “controle positivo”, “controle negativo”, “sem soro” e o restante com o número das amostras conforme com a organização da soroteca. Após esse processo, o microtubo identificado como “sem soro” foi separado, já que ele deveria possuir apenas o diluente, e nos demais foram pipetados 5 µL dos controles disponibilizados no *kit* e das amostras de soro canino conforme a identificação previamente realizada.

Em seguida, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços com antígenos de *Leishmania major like* já adsorvidos (100 µL por poço), de modo que na primeira fileira houvesse dois poços com o controle positivo, três com o controle negativo, dois com o diluente sem soro e nas demais fileiras foram distribuídas as 89 amostras da soroteca. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para que os anticorpos presentes nas amostras positivas se ligassem ao antígeno presente nas suas cavidades. Após a incubação, o conteúdo líquido da placa foi descartado e foi feita lavagem em lavadora automática (6 vezes com 200 µL de tampão de lavagem por poço com intervalo de 45 segundos entre lavagens), para remover todo o conteúdo não ligado. O tampão de lavagem foi preparado de acordo com o manual de instruções do *kit* (25 mL de tampão de lavagem 20X (incluso no *kit*) em 475 mL de água destilada para lavagem de uma placa). Após finalizada a lavagem, foram adicionados 100 µL do anticorpo conjugado anti-imunoglobulina G marcado com a enzima peroxidase, que foi previamente diluído 1:100 no diluente utilizado na preparação das amostras. A placa foi novamente incubada a 37 °C por 30 minutos para ligação do anticorpo conjugado às imunoglobulinas G ligadas aos antígenos. Após esse processo, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa foi submetida ao mesmo processo de lavagem citado anteriormente.

Após a última etapa de lavagem, foram adicionados 100 µL de substrato a cada poço, previamente preparado com 12 mL de diluente, 120 µL da substância cromogênica tetrametilbenzidina (TMB) e 24 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos, protegida da luz. Nas reações positivas, observa-se o desenvolvimento de coloração azulada, resultante da interação da solução reveladora com o conjugado enzimático. Ao final do tempo de incubação, foram adicionados 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) por poço para interromper a reação, promovendo a mudança da coloração azul para amarela nas amostras reagentes, enquanto os poços sem reação mantiveram-se incolores.

A leitura de absorvância foi feita em espectrofotômetro da marca Heales, modelo MB-850, com incidência de luz a 450 nanômetros (nm). Os controles positivos deveriam estar dentro da faixa de leitura $\geq 0,500$ de densidade óptica (DO) e os negativos na faixa de $\geq 0,050 \leq 0,120$ DO para que os resultados do teste pudessem ser considerados como válidos. Depois da leitura, foram realizados os cálculos do *cut-off* (CO), que foi realizado multiplicando a média da DO dos controles negativos (XCN) por dois ($CO = XCN \times 2$) e da faixa cinza (FC), que é o resultado do valor encontrado de CO multiplicado por 1,2 ($FC = CO \times 1,2$), conforme descrito no manual de instruções do *kit*. Os cálculos permitiram detecção dos valores dos resultados positivos ($DO \geq CO$), dos resultados negativos ($DO < CO$) e dos resultados indeterminados, que apresentaram densidade óptica entre o valor do CO e da FC.

4. RESULTADOS

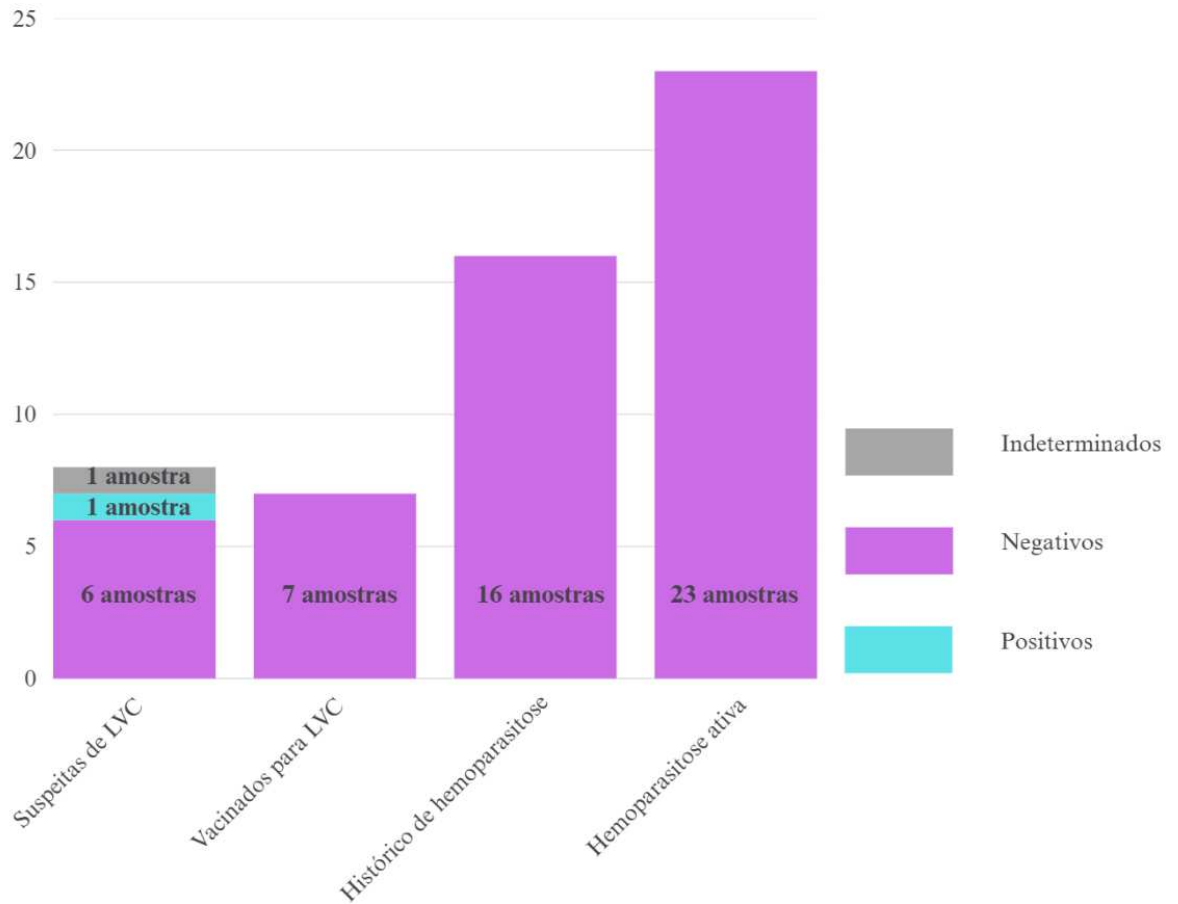
Quatro grupos avaliados no ELISA compostos por um total de 54 amostras de interesse: suspeita de LVC, vacinados para LVC (que foram selecionadas devido ao fato do cão possuir anticorpos anti-*Leishmania*, mas que não deveriam dar positivo no teste), hemoparasitoses ativas e histórico de hemoparasitoses (que foram selecionadas para testar possíveis reações cruzadas), as quais 52 apresentaram resultados negativos, 1 resultado positivo e 1 indeterminado (ambos do grupo de amostras com suspeita ou diagnóstico de LVC), como é mostrado na figura 4.

Tabela 2 - Separação das amostras por grupos.

Grupos de amostras	Amostras por grupo	Nº das amostras	Resultado obtido no ELISA
Suspeita de LVC	8 amostras	85, 112, 121, 175, 248, 277, 298, 400	1 amostra positiva (nº400) 1 amostra indeterminada (nº 298) 6 amostras negativas
Vacinados para LVC	7 amostras	125, 169, 174, 202, 216, 294, 443	7 amostras negativas
Hemoparasitoses ativas	23 amostras	51, 55, 87, 105, 118 (duplicada), 134, 180, 205, 215, 234, 256, 272, 279, 291, 299, 303, 312, 362, 405, 418, 430, 437,	23 amostras negativas
Histórico de hemoparasitoses	16 amostras	1, 47, 100, 140, 164, 168, 181, 192, 230, 233, 238, 288, 310, 316, 320, 353	16 amostras negativas
Demais diagnósticos	426 amostras	Demais amostras	2 amostras positivas (nº 138 e 210) 424 amostras negativas

Fonte: Elaboração própria, 2025

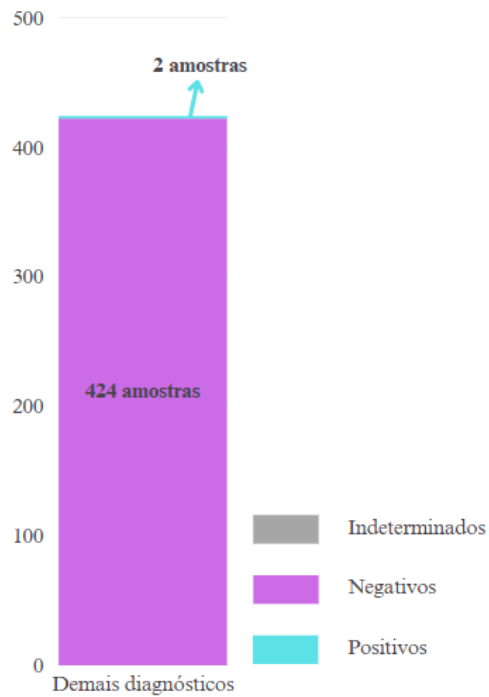
Figura 4 - Resultados do grupo de amostras de interesse



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Já no grupo de amostras com demais diagnósticos, houve dois resultados positivos, como é mostrado na figura 5, cujos diagnósticos clínicos foram informados como sendo de anaplasma e displasia coxofemoral.

Figura 5 - Resultados do grupo de amostras com demais diagnósticos.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Após a obtenção dos resultados, foi calculada a compatibilidade dos dados clínicos com os resultados do teste, utilizando as equações de sensibilidade e especificidade:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{(\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{8 \text{ amostras}}{(8 \text{ amostras} + 6 \text{ amostras})} \times 100$$

Essa equação informa a capacidade do teste de identificar nas amostras quais são positivas para a doença e resultou num valor de 57%, que difere do real valor de sensibilidade do teste, que é de 94,54%.

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{(\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{428 \text{ amostras}}{(428 \text{ amostras} + 2 \text{ amostras})} \times 100$$

Essa equação informa a capacidade do teste de identificar que as amostras negativas são verdadeiramente negativas e o resultado obtido foi de 99,53%, que se mostrou similar à do teste, cujo valor é 91,76%.

5. DISCUSSÃO

Como a cidade de Viçosa e região não são áreas endêmicas para a leishmaniose (BRASIL, 2024), a quantidade de soros de cães positivos para LVC foi muito pequena, tanto na suspeita estabelecida pelos médicos veterinários, quanto no resultado do ELISA. Porém os soros obtidos ainda serão amplamente utilizados nos testes a serem desenvolvidos, mesmo que a maioria das amostras tenha obtido resultado negativo.

O *kit* Bio-Manguinhos representa uma ferramenta promissora para a detecção confiável de resultados positivos e negativos, refletindo sua elevada sensibilidade (94,54%) e especificidade (91,76%). No entanto, o diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina (LVC) é desafiador, considerando a diversidade e a baixa especificidade dos sinais clínicos associados à doença (ROCHA, *et al.*, 2020). Além disso, muitos animais podem permanecer assintomáticos ao longo de toda a vida. Nesse contexto, a dificuldade em identificar clinicamente cães positivos para LVC pode ter contribuído para a discordância observada entre os resultados do EIE-Bio-Manguinhos-LVC e os dados clínicos neste estudo. Cabe destacar ainda que a sensibilidade e a especificidade do teste podem variar de acordo com a região em que é aplicado (Tabela 3), o que pode estar relacionado ao fato de a área ser ou não endêmica, bem como à pressão seletiva exercida pelo ambiente sobre o parasito. Essa pressão pode resultar em variabilidade genética que, por sua vez, pode influenciar o desempenho do teste diagnóstico.

Tabela 3 – Comparação dos resultados de especificidade e sensibilidade do *kit* EIE Bio-Manguinhos encontrados na literatura.

Autor	Local	Especificidade	Sensibilidade
LIRA <i>et al.</i> , 2006	Recife - PE	87,5%	72%
CAMARGO, 2008	Bauru e Botucatu - SP	99%	93,33%
TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2019	Brasília - DF	11,59%	90,54%
BORJA, 2017	Salvador - BA	87%	67%

Fonte: Elaboração própria, 2025.

A baixa sensibilidade observada no teste durante este estudo pode estar relacionada à utilização de antígenos provenientes da espécie *Leishmania major*, agente etiológico da leishmaniose cutânea. No entanto, o alvo diagnóstico do teste é a leishmaniose visceral, causada por *Leishmania chagasi*. Embora ambas pertençam ao mesmo gênero, apresentam diferenças genéticas significativas, especialmente em genes relacionados ao metabolismo, à organização celular e ao transporte intracelular, o que pode comprometer a reatividade cruzada e, conseqüentemente, a eficácia diagnóstica do ensaio (ROCHETTE *et al.*, 2008), o que pode interferir no reconhecimento por parte do anticorpo.

Porém, os resultados obtidos utilizando o *kit* “EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos” no que se refere à detecção de 6 amostras negativas dentre as 8 com suspeita de LVC sugerem algum desvio de interpretação feita na suspeita clínica de positividade. Conforme citado acima, o teste sorológico utilizado apresenta relevante confiabilidade no que diz respeito à sensibilidade, apesar do antígeno utilizado no teste ser proveniente de espécie não causadora de LV. Além disso, foram testadas 5 amostras do grupo de interesse utilizando o *kit* DPP - LVC® Bio-Manguinhos, nele se observou positividade em 2 amostras, onde uma foi positiva e outra indeterminada no ELISA, e negatividade no restante delas (dados não amostrais), evidenciando uma grande semelhança entre os resultados dos dois testes, fato que corrobora para a possível imprecisão ocorrida na suspeita clínica.

Uma vez que o diagnóstico da LVC é algo complexo de ser realizado devido às limitações dos testes sorológicos, diagnóstico clínico e parasitológico, além do alto custo da realização dos testes moleculares, o controle profilático da leishmaniose deve ser realizado com o uso de repelentes e coleiras impregnadas com inseticidas, já que o controle do vetor é complexo, por ser difícil contê-lo, devido ao fato dele ser uma espécie silvestre (NEVES, *et al.*, 2019). Ademais, a vacina que era disponibilizada no Brasil contra a LVC, sorológicos

Leishmune[®], teve sua licença de fabricação e comercialização suspensa pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na nota técnica de nº 038//2014/DFIP/SDA do ano de 2014, devido ao não cumprimento do regulamento nº 31/2007, ou seja, por não atender completamente os requisitos para estudos de fase 3, que se refere à avaliação da eficácia vacinal prevista no citado regulamento (BRASIL, 2014), o que reduziu uma das possibilidades de profilaxia.

O diagnóstico correto, precoce, sensível e específico da LVC é de extrema importância para a identificação rápida e precisa da doença, especialmente em regiões não endêmicas, contribuindo significativamente para o controle epidemiológico (SOUZA *et al.*, 2019). No entanto, a identificação de cães infectados ainda se baseia em métodos diagnósticos que apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Resultados falso-negativos dificultam o controle da enfermidade, impedem o tratamento adequado dos animais infectados e comprometem as estratégias de vigilância sanitária (MARCONDES *et al.*, 2019). Além disso, a imprecisão diagnóstica pode levar ao abatimento indevido de cães saudáveis, quando identificados como falso-positivos (DA ROCHA *et al.*, 2018). Nesse contexto, a busca por novos testes diagnósticos para a LVC, que apresentem maior sensibilidade e especificidade em comparação aos atualmente disponíveis no mercado, mostra-se essencial. A construção de sorotecas devidamente validadas permite a realização de estudos mais robustos, tanto pela quantidade de amostras disponibilizadas, quanto pela qualidade assegurada por sua validação. O presente trabalho contribui para esse processo ao participar da validação da soroteca por meio da aplicação de um teste sorológico comercialmente disponível. Os resultados obtidos serão comparados com métodos de maior especificidade, como a qPCR, conferindo maior confiabilidade às amostras e viabilizando seu uso em pesquisas futuras voltadas ao desenvolvimento de novos testes diagnósticos para a LVC, como na utilização da proteína recombinante LPG3 de *Leishmania chagasi* (artigo em submissão) para desenvolvimento de teste ELISA, e também na utilização de seus peptídeos lineares ou em quimera (projeto 03313-A, AKCCHF, 2024 - 2027), além do aprimoramento de antígenos do teste ELISA utilizando a rLiNTPDase2 de *Leishmania infantum* (SOUZA, A. C. A. de *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

Este estudo é uma análise inicial utilizando o *kit* “EIE leishmaniose visceral canina | Bio-Manguinhos”, que nos forneceu resultados de análises de uma soroteca que está sendo

construída para utilização em pesquisa de novos testes de diagnóstico de LVC. Esses resultados, juntamente com os de testes complementares de maior especificidade como qPCR e DPP, permitirá que a soroteca seja consolidada e o procedimento poderá ser expandido futuramente para a análise de novos testes imunológicos para LVC.

Em segunda análise, se destaca a necessidade da criação de uma técnica diagnóstica acessível e eficaz para que a LVC possa ter seu diagnóstico realizado em cães o mais rápido possível e de forma correta. Dessa maneira seu tratamento poderá ser feito precocemente, evitando a evolução da doença, a atuação deles como reservatório de *Leishmania* e a eutanásia de animais saudáveis. A busca por novas técnicas de diagnóstico sorológico depende de validação das metodologias a serem testadas, que, por sua vez, depende de uma soroteca robusta e confiável e esse trabalho contribui para esse processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KOTSAKIS, S. D.; KARAGOUNI, E. A canine-directed chimeric multi-epitope vaccine induced protective immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 350, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030350>. Acesso em: 02 jul. 2025.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, n. 7, 2012.
- AMERICAN KENNEL CLUB CANINE HEALTH FOUNDATION (AKCCHF). **03313-A: Standardization and evaluation of the use of LPG3 linear peptides alone or in chimera form for the serodiagnosis of CVL by ELISA**. Disponível em: <https://www.akcchf.org/grant-directory/03313-a/>. Acesso em: 2 jul. 2025.
- BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_control_leishmaniose_visceral.pdf. Acesso em: 20 jun. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). **Doença de notificação – Leishmaniose visceral: casos confirmados – Brasil**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 2 jul. 2025.
- BORJA, Lairton Souza. **Desenvolvimento de teste imunodiagnóstico baseado em antígenos recombinantes para leishmaniose visceral canina**. 2017. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.
- CAMARGO, Janaína Biotto. **Elucidação diagnóstica na leishmaniose visceral canina para a vigilância epidemiológica e controle desta zoonose**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, nov. 2007.
- DA ROCHA, I. C. M. *et al.* Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 586, 2018.
- DRIJVERS, J. *et al.* The enzyme-linked immunosorbent assay: the application of ELISA in clinical research. In: **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. Elsevier Inc., 2017. p. 119-133.
- ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: a review and assessment of recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111671, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>. Acesso em: 8 jul. 2025.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. de. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, jun. 2012.
- FERREIRA, Neverton José Silva. **Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante**

associada ao derivado de eugenol MR1. 2024. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2024.

GONÇALVES, Luiz Fernando Camargo Teixeira. **Validação do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar na rotina diagnóstica de um laboratório de saúde pública, São Paulo, Brasil**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/99/99131/tde-26042018-111529/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

GRAMICCIA, M., GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005.

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

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>. Acesso em: 2 jul. 2025.

MASOODI, K. Z.; LONE, S. M.; RASOOL, R. S. ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay. In: MASOODI, K. Z. *et al.* (Org.). **Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology**. Cap. 22, p. 127–131, 2021.

NEVES, David Pereira *et al.* Parasitologia básica. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>. Acesso em: 21 jun. 2025.

PACHECO, L. V. *et al.* Comparação dos testes preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 58, 2015.

PAGNIEZ, J. *et al.* A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. **Parasite**, v. 30, p. 10, 2023.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis: epidemiological report in the Americas**, no. 10. Washington, D.C.: PAHO, 2023. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>. Acesso em: 02 jul. 2025.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F. de; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 7 dez. 2014.

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

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 16 out. 2009.

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

- ROCHA, Arnaldo (org.). **Parasitologia: para enfermeiros, veterinários, biomédicos, nutricionistas, fisioterapeutas, dentistas, fonoaudiólogos, médicos e demais interessados**. 1. ed. São Paulo: Rideel, 2013. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- ROCHA, S. T. F.; SHIOSI, R. K.; FREITAS, A. B. M. Canine visceral leishmaniasis – review of literature. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 34, 2020.
- ROCHETTE, A. *et al.* Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, 29 maio 2008.
- SOUZA, A. C. A. de *et al.* High performance of ELISA test using recombinant rLiNTPDase2 from *Leishmania infantum*: a Phase II diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105535, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105535>. Acesso em: 2 jul. 2025.
- SOUZA, C. S. F.; SILVA, V. L. A.; LABARTHE, N. Evaluation of DPP® and SNAP® rapid tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, 2019.
- TEIXEIRA, A. I. P. *et al.* Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 06 jul. 2025.

ANEXOS

ANEXO A – Formulário de consentimento do proprietário/ Agência responsável

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO/AGÊNCIA RESPONSÁVEL

Título: Padronização e avaliação do uso de peptídeos lineares LPG3 isolados ou em forma químera para o sorodiagnóstico de LVC por ELISA

1. Por que esse estudo será realizado? Este estudo é parte de um projeto que visa desenvolver um sorodiagnóstico para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. O objetivo é que este estudo conduza a um simples teste que permita a detecção de animais infectados.

2. Que animais/pacientes podem participar no estudo? Qualquer cão com mais de 2,5kg.

3. Por que o meu animal NÃO pode participar no estudo? Pacientes que já tiveram Leishmaniose Visceral Canina, foram tratados e estão saudáveis, não são elegíveis para participar deste projeto. Cães com menos de 2,5 kg ou com menos de 6 meses de idade não serão elegíveis.

4. O que acontecerá com meu animal, se participarmos do estudo? Os cães serão gentilmente imobilizados e 10 ml de sangue (cerca de 2 colheres de chá) serão coletados de uma veia do pescoço ou perna. Pressão direta será aplicada por um curto período após a coleta de sangue. Uma pequena área de pelo pode ser cortada para a recolha de sangue.

5. Há algum benefício do estudo para o meu animal? O seu cão não receberá nenhum benefício direto da participação neste estudo.

6. Há algum risco ou desconforto para o meu animal? A coleta deste volume de sangue geralmente é muito bem tolerada na maioria dos cães, exceto em cães muito pequenos (razão pela qual os cães com menos de 2,5 kg são excluídos). A principal complicação é um leve hematoma no local da coleta de sangue que se resolve rapidamente por si só (geralmente alguns dias). Ocasionalmente, uma pequena quantidade de pelo deve ser raspada.

7. Eventos adversos imprevistos: eventos adversos significativos que afetam a saúde do seu cão são muito improváveis e, se ocorrerem, serão tratados pelo veterinário da sua família ou veterinários do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa.

8. Responsabilidades do dono: você deve levar o seu cão à consulta conforme determinado pelo veterinário responsável e informar qualquer infecção/doença do seu cão descoberta antes deste estudo.

9. Liberação do participante: Como o conforto do seu cão é a nossa principal prioridade, o seu cão pode ser retirado do estudo caso a coleta de sangue cause perturbação significativa ou caso não consigamos obter sangue após três tentativas durante uma visita.

10. Obrigações financeiras: A coleta de sangue será feita sem custos.

11. Confidencialidade: Toda a informação sobre o dono e seu cão será mantida confidencial, e quaisquer dados de pesquisa gerados pelo seu cão serão mantidos em anonimato para futuras apresentações ou publicações.

12. Pessoas para contato a respeito deste estudo: Os participantes podem contactar qualquer uma destas pessoas com perguntas sobre este estudo:

Nome: Eduardo de Almeida Marques da Silva (Principal Pesquisador-Coordenador)
Telefone: 55(31)36125044

Email institucional: eduardo.marques@ufv.br
 Endereço: Laboratório de imunoparasitologia, Universidade Federal de Viçosa–MG, Brasil
 CEP: 36570-900

Nome: Evandro Silva Favarato (Veterinário responsável pelo projeto)
 Telefone: 55(31)36124619
 Email institucional: esfavarato@ufv.br
 Endereço: Departamento de veterinária, Universidade Federal de Viçosa–MG, Brasil
 CEP: 36570-900

13. Agradecimentos do proprietário: Como proprietário legal (ou agente deste animal), eu entendo e reconheço o seguinte: a. Estou concordando em participar de um estudo de pesquisa na Universidade Federal de Viçosa.

b. Sou livre para retirar o meu consentimento e descontinuar a participação no estudo a qualquer momento.

c. A decisão de meu animal participar deste estudo é exclusivamente minha e a participação é voluntária.

d. A decisão de se retirar do estudo ou de desconsiderar as recomendações dos veterinários envolvidos no estudo, isenta os investigadores das obrigações atuais e futuras (tanto médicas como financeiras) para com o animal de estimação e/ou proprietário abrangido por este estudo.

e. Eu discuti os procedimentos/benefícios e riscos da participação no estudo e tive a oportunidade de ter minhas perguntas sobre o estudo respondidas.

Assinatura do dono/agente _____

Data

14. Garantias do veterinário responsável:

a. Expliquei os detalhes do estudo e respondi às perguntas o melhor que pude.

b. Se o animal é um paciente no Hospital Veterinário, discuti a inscrição do paciente neste estudo com o membro superior da faculdade responsável pelos cuidados deste paciente.

Veterinário responsável _____ Data

Testemunha _____ Data

ANEXO B – Certificado do Conselho de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900- Telefone: (31) 3612 2315

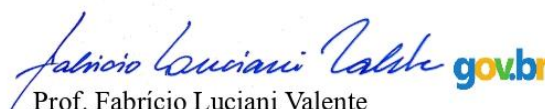
Viçosa, 12 de maio de 2025

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, certifica que o Processo nº **30/2025**, com o Projeto de Pesquisa intitulado, **“Utilização em pesquisas para desenvolvimento e padronização de testes rápidos para o diagnóstico moleculares e imunológicos de doenças de acometimento em cães”** coordenado pelo(a) professor(a) Juliana Lopes Rangel Fietto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular está de acordo com a legislação vigente, Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com as Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, CONCEA e, apresenta especificidade, caracterizando *“A não utilização de animais vivos”*, portanto sendo aprovado por esta comissão em 12 de maio de 2025.

CERTIFICATE

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that **30/2025** Process, with the Research Project titled, **“Use in research for the development and standardization of rapid tests for the molecular and immunological diagnosis of diseases affecting dogs”**, coordinated by Professor(a) Juliana Lopes Rangel Fietto from Department of Biochemistry and Molecular Biology, is of according to current legislation, Law No. 11,794, of October 08, 2008, with the Normative Resolutions issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA and, presents specificity, characterizing "Non-use of live animals", therefore being approved by this commission in May 12, 2025.


Prof. Fabrício Luciani Valente

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

Documento assinado digitalmente

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE

Data: 13/05/2025 16:36:45-0300

Verifique em <https://validar.itf.gov.br>

ANEXO C – Manual de instruções do *kit* EIE leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos®

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

Produto: Partida nº: Vencimento:
Seção: EIE nº: Data:

Início:hmin Termina:hmin


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

Densidade Ótica das Amostras

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



Cálculo de Cut-Off (CO)
CO = XCN x 3
XCN = média da densidade ótica das orificios do controle negativo.
X = média das DO.
DO = Densidade ótica.
CN = Controle Negativo.
CO = DO.CN1 + DO.CN2 + DO.CN3 - XCN = X
CO = X x 2 =

Técnico Responsável:
Observações:



EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

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

EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos

(Uso Veterinário)

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(material fornecido para 384 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* *lfxz*, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE

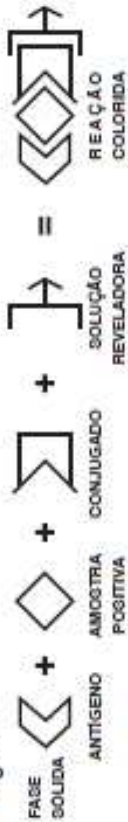
O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* *lfxz* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/ "strips" (fase: sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina G, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-antígeno, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

ESQUEMA DO TESTE

Reagente



Não Reagente



CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico "in vitro".

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

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

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

PROCEDIMENTO DO TESTE

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

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

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

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

1. Preparo do diluente de amostras/conjugado:

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

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

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

MATERIAL FORNECIDO

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

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

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

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

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

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

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

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

6- Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 5 vezes com tampão de lavagem (250 µL/orifício). **Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.**

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

Nº Strips duplas	Nº de reações	Diluyente Amostras/ Conjugado Diluido	Conjugado
01	Até 16	2 mL	20 µL
02	Até 32	4 mL	40 µL
03	Até 48	5 mL	50 µL
04	Até 64	7 mL	70 µL
05	Até 80	9 mL	90 µL
06	Até 96	11 mL	110 µL

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

9- Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

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

11. Preparo do substrato:

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

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LP	A04	A12	A20	A28	A36	A44	A52	A60	A68	A76	A84
B	LN	A05	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	A69	A77	A85
C	LN	A06	A14	A22	A30	A38	A46	A54	A62	A70	A78	A86
D	LN	A07	A15	A23	A31	A39	A47	A55	A63	A71	A79	A87
E	SS	A08	A16	A24	A32	A40	A48	A56	A64	A72	A80	A88
F	A01	A09	A17	A25	A33	A41	A49	A57	A65	A73	A81	A89
G	A02	A10	A18	A26	A34	A42	A50	A58	A66	A74	A82	A90
H	A03	A11	A19	A27	A35	A43	A51	A59	A67	A75	A83	A91

LP = Controle Positivo LN = Controle Negativo SS = Sem soro A = Amostra

4- Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30 min.

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

5- Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37 °C ± 1 °C até a total dissolução dos cristais.

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

Nº Strips duplas	Nº de reações	Tampão de lavagem [20X]	H2O destilada
01	Até 16	2,5 mL	47,5 mL
02	Até 32	4,5 mL	85,5 mL
03	Até 48	6,5 mL	123,5 mL
04	Até 64	8,5 mL	161,5 mL
05	Até 80	10,5 mL	199,5 mL
06	Até 96	12,5 mL	237,5 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

Nº Strips duplas	Nº de placas	Tampão de lavagem [20X]	H2O destilada
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

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

FC = CO x 1,2
 Exemplo: CO = 0,322
 FC = CO x 1,2
 FC = 0,322 x 1,2
 FC = 0,386



RESULTADOS

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao *Cut-Off*.
Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cut-Off*.
Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o *Cut-Off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.
Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como **INDETERMINADO**.

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

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

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

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

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

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

LEITURA

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

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

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

Cálculo do Cut-Off (CO)

CO = XCN x 2
 XCN = Média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
 DO = Densidade ótica
 CN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO CN 1 = 0,100
 DO CN 2 = 0,086
 DO CN 3 = 0,101
 CO = XCN x 2
 $0,099 \times 2 = 0,199$
 $\frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} = \frac{0,100 + 0,086 + 0,101}{3} = 0,099$

Exemplo 2:

DO CN 1 = 0,110
 DO CN 2 = 0,080
 Bio-CH3 → 644 → Fora da faixa de validação do teste = descartar
 CO = XCN x 2
 $0,100 \times 2 = 0,200$
 $\frac{DO_{CN1} + DO_{CN2}}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,100$

Exemplo 3:

DO CN 1 = 0,110
 DO CN 2 = 0,080
 Bio-CH3 → 644 → Fora da faixa de validação do teste = descartar
 CO = XCN x 2
 $0,095 \times 2 = 0,190$
 $\frac{DO_{CN1} + DO_{CN2}}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$

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 (FASTEIE) for fi eld diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Amer.J.Trop.Med.Hyg.*1993;Jan-48(1):1-8.
3. BADARÓ, R. DJARTE, M.J.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. 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: 95-208.
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. *Epidemiologia*. 2003. Cap 18; p 259-270.
9. MONTOYA, 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, P.K. KAWAMI, 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-LISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immuno.L.Method.* 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(7): 289-290.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 8966/2004.
Responsável Técnico: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.781.055.00015-30
SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
Indústria Brasileira

Aprovação da Arte: maio14

Arte: BM-BUL-030-07-R-23489

Texto: MI_EIE_LVC_10