



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB**

**Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos-PB: aspectos
epidemiológicos e padronização de um ensaio sorológico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

RAIZZA BARROS SOUSA SILVA

PATOS-PB
2015



CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB

Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos-PB: aspectos epidemiológicos e padronização de um ensaio sorológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

RAIZZA BARROS SOUSA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo

PATOS-PB
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

S5861

Silva, Raizza Barros Sousa

Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos-PB: aspectos epidemiológicos e padronização de um ensaio sorológico / Raizza Barros Sousa Silva. – Patos, 2015.

51f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

“Orientação: Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo”

Referências.

1. Calazar.
2. Doença negligenciada.
3. HSP70.
4. *Leishmania* spp.
5. Proteína recombinante. I. Título.

CDU 614.4

RAIZZA BARROS SOUSA SILVA

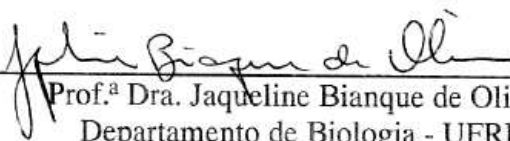
Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos/PB: aspectos epidemiológicos e padronização de um ensaio sorológico

APROVADA EM 19/02/2015

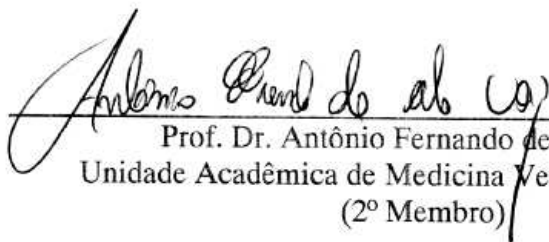
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof.^a Dra. Marcia Almeida de Melo
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - UFCG
(Orientadora)



Prof.^a Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira
Departamento de Biologia - UFRPE
(1º Membro)



Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - UFCG
(2º Membro)

A Deus e aos meus pais, Neide e Itamêr, que são meu alicerce...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me abandonar e sempre aumentar a minha fé Nele, por iluminar e guiar os meus pensamentos e acalmar o meu coração nos momentos de angústia. “Senhor, faça-se em mim segundo a Tua vontade”.

À minha orientadora profa. Dra. Marcia Almeida de Melo pela paciência, orientação e ensinamentos. E de igual forma a seu marido, Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade, pela coorientação.

Aos meus pais, Neide e Itamêr, por serem minha fortaleza e me incentivarem na constante busca pelo conhecimento. São exemplo de dedicação, seriedade e honestidade. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Júnior, Danthe, Julianne, Ana Stella, Jéssica e Débora, por sempre estarem presente em minha vida na partilha de minhas conquistas e frustrações. Amo vocês!

Às minhas sobrinhas lindas e amadas, Cecille, Maria Valentina e Maria Eduarda, fontes dos sorrisos mais sinceros, fazem com que eu esqueça todos os problemas.

A George, pelo seu amor, carinho e companheirismo; e à sua família, pelo acolhimento.

Aos meus cunhados e cunhadas, vocês são, na verdade, irmãos!!!

À minhas avós, tios, tias, primos e primas, em especial à tia Leir e tia Zélia.

Às minhas amigas, Ana Lucélia e Vanessa Lira, vocês são verdadeiros exemplos a serem seguidos, me espelho em vocês. Obrigada pelo dia-a-dia, pela amizade e companheirismo. Não tem como deixar de fora... Raiara, Lilianne, Suzanna e Maira, vocês são amigas-irmãs. Espero sempre tê-las na minha vida!

Ao pessoal do BIOLMOL, pela colaboração na realização desse trabalho. Em especial a Gilzane, Marília e Heitor, vocês foram essenciais para essa conquista.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Antônio Fernando Melo Vaz e Prof.^a Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira, por aceitarem participar e contribuir com esse trabalho. Prof. Fernando, sua contribuição veio muito antes da participação na banca, seus

conhecimentos e disponibilidade foram fundamentais para a realização desse estudo. Obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, em especial a Jonas, que está sempre disposto a nos ajudar.

RESUMO

No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. É uma zoonose crônica, considerada um grave problema de saúde pública no mundo. O Capítulo I do presente trabalho objetivou estimar a soroprevalência e os fatores de risco da leishmaniose visceral canina (LVC) na zona rural do município de Patos, Paraíba, além de avaliar a eficiência dos testes sorológicos: ELISA, RIFI e Teste Imunocromatográfico *Dual Path Plataform* (DPP). Considerou-se o ELISA como padrão ouro, já que é o teste confirmatório pelo Ministério da Saúde para a LVC. Foram coletadas 362 amostras de sangue e a prevalência sorológica foi determinada a partir das amostras que foram positivas em, pelo menos, dois testes sorológicos. Aplicou-se um questionário epidemiológico aos proprietários para identificação dos fatores de risco. A soroprevalência encontrada foi de 11,33% (41/362). O DPP apresentou sensibilidade de 58,33% e especificidade de 95,54%. A RIFI apresentou sensibilidade de 83,33% e especificidade de 99,36%. Os resultados da comparação dos ensaios sorológicos demonstram que o DPP não é a melhor técnica para triagem dos animais positivos em função da baixa sensibilidade do método. O fator de risco identificado na análise multivariada foi o sexo, em que os cães machos apresentaram duas vezes mais chances de desenvolver a doença, o que pode ser justificado por serem mais utilizados para a caça e como cão de guarda, o que favorece a exposição do animal aos flebótomos. A soroprevalência da leishmaniose visceral canina aumentou consideravelmente no município de Patos, o que indica a necessidade de aplicação de medidas de controle. O objetivo do Capítulo II foi desenvolver e padronizar um teste de Soroaglutinação em Látex (SAL) utilizando a proteína recombinante HSP70 de *Leishmania (L.) infantum chagasi* para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Quarenta amostras de soro, 20 positivas e 20 negativas, foram testadas em três diluições diferentes. Os melhores resultados foram na diluição 1:4, com sensibilidade de 75% e especificidade de 90%. O teste de Soroaglutinação em Látex é um bom método de diagnóstico de triagem por ser um teste rápido e de fácil manipulação; a utilização do antígeno purificado poderá aumentar a sensibilidade do ensaio.

Palavras-chave: Calazar; doença negligenciada; HSP70; *Leishmania* spp.; proteína recombinante.

ABSTRACT

In Brazil, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. It is a chronic zoonosis and considered a worldwide public health problem. Chapter I describes the prevalence and risk factors of canine visceral leishmaniasis (CVL) in Patos, Paraíba, and evaluate the performance of serological tests commonly used in CVL (ELISA, IFA and Test DPP immunoassay). 362 blood samples were collected and serologic prevalence was determined from samples that were positive in at least two serological tests. The owners answered an epidemiological questionnaire to identify potential risk factors. Estimated seroprevalence was 11.33% (41/362). ELISA was taken as the gold standard because it is established as the confirmatory test to CVL by the Ministry of Health. Dual Path Platform (DPP) had a sensitivity of 58.33% and specificity of 95.54%. IFA had a sensitivity of 83.33% and specificity of 99.36%. The comparison of serological tests showed that DPP is not the best technique to screen for positive animals due to its low sensitivity. By multivariate analysis, animal gender was identified as risk factor and male dogs were two times more likely to develop the disease, what can be justified because of their use in hunting and as guard dogs, increasing the contact with other animals and with phlebotomine sand flies. The prevalence of canine visceral leishmaniasis has increased considerably in the county of Patos, Paraíba, which indicates the urgent need to take control measures. Chapter II describes the development and standardization of a latex agglutination test based on a recombinant protein (HSP70) of *Leishmania (L.) infantum chagasi* for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Forty serum samples, 20 from positives and 20 from negative animals, were tested at three different dilutions. The best result was on 1:4, with a sensitivity of 75% and specificity of 90%. The Rapid Latex Agglutination Test is a good screening method, being fast and of easy handling; the use of purified antigen may enhance the assay sensitivity.

Key words: Kala-azar; neglected disease; HSP70; *Leishmania spp.*; recombinant protein.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

- Quadro 1.** Dados censitários das casas e total de cães por estrato amostral da zonal rural do município de Patos, Paraíba..... **23**
- Quadro 2.** Valores absolutos e porcentagens (%) de amostras positivas e negativas no ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), padrão ouro, e no teste imunocromatográfico DPP (Dual Path Plataform) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, Paraíba..... **23**
- Quadro 3.** Valores absolutos e porcentagens (%) de amostras positivas e negativas no ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), padrão ouro, e na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, Paraíba..... **23**
- Quadro 4.** Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN), com intervalo de confiança de 95%, Índice *Kappa* e suas respectivas concordâncias, do teste imunocromatográfico DPP (Dual Path Plataform) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), tendo como padrão ouro o Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)..... **23**
- Quadro 5.** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à Leishmaniose Visceral Canina na zona rural de Patos, Paraíba..... **24**
- Quadro 6.** Fator de risco associados á Leishmaniose Visceral Canina na zona rural de Patos, Paraíba, estimado por regressão logística múltipla..... **25**

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN), com intervalo de confiança de 95%, Valor Kappa e suas respectivas concordâncias, nas diferentes diluições das amostras testadas na Soroaglutinação em Látex.....	33
------------------	--	-----------

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida a 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Coluna 1 - *Escherichia coli* selvagem (DH5 α), coluna 2 - *Leishmania infantum chagasi* e coluna 3 - *E. coli* clonada (HSP70/seta) (10 μ l de proteína por poço). O peso molecular (PM) está indicado em KDa..... **31**
- Figura 2.** Resultado do Western Blot utilizando pool de soros positivos diluídos 1/200. Seta: banda antigênica da fração carboxi-terminal da HSP70; L.c.: *Leishmania infantum chagasi*; DH5 α : *Escherichia coli* selvagem..... **31**
- Figura 3.** A. Reação de aglutinação em látex positiva (formação de grumos); B. Reação de aglutinação em látex negativa (suspensão permanece homogênea)..... **32**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BIOLMOL - Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido	mM - Milimolar
DAT - Teste de Aglutinação Direta	MS - Ministério da Saúde
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	OR – Odds Ratio
DPP - Dual Path Plataform	PB – Paraíba
EIE – Ensaio Imunoenzimático	pb- Pares de Base
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay	PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
<i>E. coli</i> - <i>Escherichia coli</i>	PE - Pernambuco
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz	pH - Potencial de Hidrogênio
g – x gravidade (9,8 m/s ²)	PM - Peso Molecular
HCl – Ácido Clorídrico	qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
HSP - Proteína de Choque Térmico	RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactosídeo	RJ – Rio de Janeiro
kDa – Quilodáltons	RPM - Rotação por minuto
KCl- Cloreto de Potássio	SAL - Soroaglutinação em Látex
kDNA - Ácido Desoxirribonucleico circular do cinetoplasto	SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil-sulfato de Sódio
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública	spp. – Várias espécies
LB – Meio de cultura Luria Bertani	V - Volt
<i>L. infantum chagasi</i> - <i>Leishmania infantum chagasi</i>	VPN - Valor Preditivo Negativo
LIT – Meio de cultura Liver Infusion Tryptose	VPP - Valor Preditivo Positivo
LV - Leishmaniose Visceral	VN - Verdadeiro-Negativo
LVC - Leishmaniose Visceral Canina	VP - Verdadeiro-Positivo
LVH - Leishmaniose Visceral Humana	UI – Unidade internacional
M - Molar	WB – Western Blot
mA – miliAmpère	WHO - World Health Organizatio
MgCl ₂ – Cloreto de Magnésio	µg – Micrograma
mL – Mililitro	µL - Microlitro
mm – Milímetro	µM - Micromolar
	°C - Grau Celsius
	% - Porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XII
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REFERÊNCIAS.....	14
3 CAPÍTULO I.....	15
Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, e análise das técnicas de diagnóstico sorológico	16
3.1 ABSTRACT	16
3.2 RESUMO.....	16
3.3 INTRODUÇÃO.....	17
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.5 RESULTADOS	18
3.6 DISCUSSÃO	19
3.7 CONCLUSÃO.....	20
3.8 REFERÊNCIAS	20
4 CAPÍTULO II.....	26
Desenvolvimento e padronização de um teste de Soroaglutinação em Látex para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: dados preliminares.....	27
4.1 RESUMO	27
4.2 ABSTRACT	27
4.3 REFERÊNCIAS	33
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	35
6 ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são um conjunto de enfermidades causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*. Uma dessas enfermidades é a leishmaniose visceral (LV), zoonose de caráter crônico e considerada uma das dezessete “Doenças Tropicais Negligenciadas” no mundo (WHO, 2014) e a segunda no Brasil.

No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), transmitida principalmente pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis* e o cão é o principal reservatório doméstico (WHO, 2014). É uma doença endêmica e em constante expansão, cujas medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) são: controle do reservatório canino (diagnóstico sorológico e eutanásia de cães positivos) e do vetor (aplicação de inseticidas), diagnóstico precoce e tratamento adequado em humanos (BRASIL, 2014).

Há uma grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis. No Brasil, os testes sorológicos autorizados e recomendados pelo MS para o inquérito sorológico dos cães possuem sensibilidade e especificidade bastante variáveis. Atualmente, o Teste Imunocromatográfico DPP (*Dual Path Platform*, Bio-Manguinhos) é preconizado como teste de triagem e o Ensaio imunoenzimático – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) como teste confirmatório (BRASIL, 2011). Falhas nesses resultados podem causar a eliminação de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos, favorecendo a disseminação da doença.

É necessário conhecer melhor sua epidemiologia local, com enfoque nos fatores de risco, para que as medidas de controles sejam adequadas para cada região (BRASIL, 2014). Desta forma, o Capítulo I dessa dissertação, teve o objetivo de estimar a soroprevalência e os fatores de risco da leishmaniose visceral canina (LVC) na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, e avaliar os testes sorológicos preconizados pelo MS.

Devido à necessidade de um diagnóstico de triagem de alta sensibilidade e especificidade, prático, rápido e de fácil manipulação, o Capítulo II descreve a padronização de um Teste de Soroaglutinação em Látex utilizando a proteína recombinante HSP70.

2 REFERÊNCIAS

Brasil. 2011. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011.**

Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/ Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública.

Brasil. 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** 1 ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

LAINSON, R.; RANGEL, E. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 100: 811-827.

WHO-World Health Organization. 2014. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em: 10/2014.

3 CAPÍTULO I

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE PATOS, SEMIÁRIDO PARAIBANO, E ANÁLISE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Manuscrito submetido à Revista Pesquisa
Veterinária Brasileira (ISSN: 0100-736X)
– Soropédica/RJ, qualis A2.

Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, e análise das técnicas de diagnóstico sorológico¹

Raizza B.S. Silva², Rodrigo S. Mendes², Vanessa L. Santana², Heitor C. Souza³, Tereza E.F. Rotondano⁴, Catarina P.S. Ramos⁵, Almir P. Souza², Paulo P. Andrade⁶ e Marcia A. Melo^{2*}

3. 1 ABSTRACT.- Silva R.B.S., Mendes R.S., Santana V.L., Souza H.C., Rotondano T.E.F., Ramos C.P.S., Souza A.P., Andrade P.P. & Melo M.A. 2014. [Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the county of Patos, in Paraíba State semiarid region, and analysis of serological diagnostic techniques.] Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no semiárido paraibano e análise das técnicas de diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília, Patos - PB, CEP: 58.708-110, Brasil. E-mail: marcia.melo@pq.cnpq.br

Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. It is a chronic disease and often a fatal zoonosis. It is considered as a serious worldwide public health problem and recognized by the World Health Organization as one of seventeen "Neglected Tropical Diseases". This study was conducted between 2012 and 2013, in the county of Patos, in Paraíba State semiarid region. The main purposes were to estimate the prevalence and the risk factors of canine visceral leishmaniasis (CVL) and to evaluate the performance of serological tests. Serological prevalence was determined using three techniques (ELISA, IFA and DPP chromatographic immunoassay - Dual Path Platform). ELISA was the golden standard, since it is the confirmatory test for CVL as established by the Brazilian Ministry of Health. 362 blood samples were collected; samples were considered positive if they were reactive in at least two serologic tests. An epidemiological questionnaire was applied to the dog owner to identify risk factors associated to CVL. The seroprevalence was 11.33% (41/362). Chromatographic immunoassay DPP showed a sensitivity of 58% (95%, CI: 0.43 to 0.72) and specificity of 96% (95%, CI: 0.93-0.98), with a Kappa index of 0.5. The IFA had a sensitivity of 85% (95%, CI: 0.72 to 0.94), specificity of 99% (95%, CI: 0.98 to 1) and Kappa value of 0.8. The risk factor identified in the multivariate analysis was gender (OR = 2.06 [1.05 to 4.03]), male dogs having 2.06 times more chance to get infected. The increased likelihood can possibly be explained by the use of male dogs for hunting and as guard dog, two factors that may increase dog exposure to infected sandflies. The prevalence of canine visceral leishmaniasis has increased considerably in the city of Patos compared to a survey conducted previously: in 2000, the prevalence was 1.97% among a sample of 2379 dogs, indicating the need of control measures. The results demonstrate that the Chromatographic immunoassay (DPP-Dual Path Platform) is not the best technique for screening positive animals due to its low sensitivity.

INDEX TERMS: neglected disease, endemic, Kinetoplastidae, *Leishmania* spp., Northeast.

3.2 RESUMO.- A leishmaniose visceral é causada, no Brasil, pela *Leishmania infantum chagasi*. É uma zoonose crônica e, frequentemente, fatal, sendo considerada um grave problema de saúde pública no mundo e reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das dezessete "Doenças Tropicais Negligenciadas". O presente estudo foi realizado entre os anos de 2012 e 2013, na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, com o objetivo de estimar a prevalência, os fatores de risco da leishmaniose visceral canina (LVC) na região e avaliar o desempenho dos testes sorológicos. Foram coletadas 362 amostras de sangue e a prevalência sorológica foi determinada através de três técnicas (ELISA, RIFI e Teste Imunocromatográfico DPP - *Dual Path Platform*), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram pelo menos dois testes reagentes.

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em...

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília, Patos - PB, CEP: 58.708-110, Brasil.

*Autor para correspondência: marcia.melo@pq.cnpq.br

³ Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Campus de Patos, PB.

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50.670-901, Brasil.

⁵ Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos (LPPB), Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco (UPE), Rua Ambrósio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, PE, CEP 50.100-130, Brasil.

⁶ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50.732-970, Brasil.

Aplicou-se um questionário epidemiológico aos proprietários para identificação dos possíveis fatores de risco. A soroprevalência encontrada foi de 11,33% (41/362). Considerou-se o ELISA como padrão ouro, já que é o teste confirmatório de para a LVC pelo Ministério da Saúde. O DPP apresentou sensibilidade de 58% (95% IC: 0,43-0,72) e especificidade de 96% (95% IC: 0,93-0,98), com índice *Kappa* de 0,57. A RIFI apresentou sensibilidade de 85% (95% IC: 0,72-0,94), especificidade de 99% (95% IC: 0,98-1) e valor *Kappa* de 0,88. O fator de risco identificado na análise multivariada por regressão logística múltipla foi o sexo (*OR* = 2,06 [1.05-4.03]) e os cães machos apresentam 2,06 vezes mais chances de apresentar a doença, que pode ser justificado por serem mais utilizados para a caça e como cão de guarda, dois fatores que aumentam a exposição do animal ao flebótomo. A prevalência da leishmaniose visceral canina aumentou consideravelmente no município de Patos comparado ao levantamento realizado em 2000, com 2379 animais, em que a prevalência foi de 1,97%, o que indica a necessidade de medidas de controle. Os resultados da comparação dos ensaios sorológicos demonstram que o DPP (*Dual Path Platform*) não é a melhor técnica para triagem dos animais positivos em função da baixa sensibilidade do método.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doença negligenciada, endemia, Kinetoplastidae, *Leishmania* spp., Nordeste.

3.3 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose crônica e frequentemente fatal, considerada um grave problema de saúde pública no mundo e reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas. No Brasil é causada pela *Leishmania infantum chagasi*, o principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e o cão é o reservatório doméstico (WHO 2014).

O nordeste brasileiro é a região com a prevalência mais alta de leishmaniose visceral humana (LVH) e canina (LVC) no país (Bavia et al. 2005). Vários fatores estão associados à prevalência, porém, são bastante controversos (Belo et al. 2013). Na Paraíba, pouco se sabe sobre a prevalência real da LVC nos municípios e quais os fatores de risco associados à infecção.

Apesar da grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis, no Brasil, os testes sorológicos autorizados e recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) possuem sensibilidade e especificidade bastante variáveis. Em 2011, o MS substituiu a Reação de imunofluorescência indireta – Bio-Manguinhos (RIFI®) pelo Teste Imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP, Bio-Manguinhos) como teste de triagem e o ELISA® – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) como teste confirmatório (Brasil 2011). Falhas nos resultados destes testes podem causar a eliminação de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos, favorecendo a disseminação da doença.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os fatores de risco da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, Paraíba, e verificar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de diagnóstico sorológico disponíveis.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na zona rural do município de Patos, terceira maior cidade do estado da Paraíba, localizada no semiárido paraibano. Para estimativa da prevalência da leishmaniose visceral canina, a área estudada foi estratificada e a amostra total foi constituída de três estratos amostrais (norte, sul e oeste), com intuito de obter uma amostragem uniforme da área rural. Sorteou-se de forma aleatória simples sem reposição, um número pré-estabelecido de casas por estrato amostral (23% do total de casas) da zona rural (Quadro 1).

Nas casas sorteadas foram realizadas coletas de sangue de todos os cães domiciliados e aplicado um questionário epidemiológico, para obter-se informações sobre parâmetros e fatores que favorecessem a disseminação da doença, tais como indicadores socioeconômicos do proprietário (renda familiar e grau de escolaridade) e indicadores dos fatores de risco da LVC (presença de outros animais domésticos ou silvestres; ambiente onde o animal é criado; características inerentes aos animais). A coleta das amostras ocorreu entre os anos de 2012 e 2013. O sangue foi obtido por venopunção cefálica, com o auxílio de seringa de 5 mL BD e agulha 25 X 8 mm BD estéreis e de uso individual. Um total de 5 mL de sangue foi depositado imediatamente em tubo contendo o anticoagulante citrato de sódio 4%.

Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Patos-PB. Foi retirado um mililitro de sangue total por amostra, feito alíquotas, identificados e congelados a -20°C para posterior utilização no diagnóstico molecular. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos para separação do plasma, que foi transferido para microtubos de 1,5 mL, identificados e estocados a -20°C até a realização dos ensaios sorológicos.

Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Municipal de Patos-PB, Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba (LACEN/PB), no Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses (Instituto Oswaldo Cruz/RJ) e no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido (BIOLMOL/UFCCG). As técnicas utilizadas para o diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum chagasi* nos cães foram: (a) Teste Imunocromatográfico DPP (*Dual Path Platform*) Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ); (b) Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os soros foram diluídos serialmente e uma proporção decrescente de 2x (1:10 – 1:320) e testados com antígeno de formas promastigotas de *Leishmania major-like* MHOM/BR/76/JOF, o ponto de corte para os títulos sorológicos foi de 1:40 (kit Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ); (c) ELISA – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Os controles foram estabelecidos a partir de cães sabidamente infectados e não infectados. Para todos os testes foi seguido o protocolo do fabricante. Foram consideradas positivas para LVC as amostras que foram reagentes em pelo menos dois testes sorológicos (Brasil 2006).

Os testes moleculares realizados foram a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional) e PCR em tempo real (qPCR), para confirmação das amostras sorologicamente positivas. A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando-se o reagente Brazol®, seguindo as recomendações do fabricante⁷. Como controle positivo da PCR utilizaram-se amostras de DNA extraídas de cultivo de *L. infantum chagasi*, mantidas em LIT (Liver Infusion Triptose), e caracterizada pelo perfil de isoenzima realizado no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/FIOCRUZ. Após a extração, o DNA foi eluído em 50µL de tampão TRIS-EDTA (10mM Tris-Cl, pH 7,5 e 1mM de EDTA, pH 8,0) e a concentração foi medida em espectrofotômetro (Eppendorf/BioPhotometer plus). A amostra foi armazenada em freezer a -20°C até o momento do uso.

Para a amplificação da sequência do minicírculo do kDNA de *L. infantum chagasi* foram utilizados os iniciadores LINR4 (5'-GGGGTTGGTGTAATAAGGG-3') e LIN19 (5'-CAGAACGCCCTACCCG-3'), que amplificam um produto de 720 pares de base (pb) (Aransay et al. 2000). A reação de amplificação continha 2 UI de Taq DNA polimerase, 10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM KCl; 50mM MgCl₂ e 10µM dNTP. Cada reação foi realizada com a adição de 5µL do DNA extraído de cada amostra teste e 0,5µM de cada iniciador para um volume final de 20µL. A termociclagem foi realizada em termociclador (Biocycler), seguindo as seguintes etapas: desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C seguida de 33 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C, e 1 minuto a 72°C, seguido por um passo de extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, por 50 minutos a uma voltagem de 80V e corrente de 400mA. Os produtos amplificados foram corados com brometo de etídio a 0,5µg/mL, visualizados em transiluminador.

A qPCR foi feita usando o termociclador da Bioer Technology. Os primers específicos Linf.1-23F (5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCT-3') e Linf.1-154R (5'-TTACACCAACCCCGTTTC-3') foram sintetizados de acordo com Cavalcanti et al. (2009) que amplificam um fragmento de 132 pb. Reações de 13µL incluíam 2µL de DNA das amostras, 1mM de cada primer e 6µL de SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). A reação foi realizada usando uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Controles positivos e negativos contendo ou não o DNA de isolados de *Leishmania* spp. foram incluídos. O software usado para a análise dos resultados foi o LineGeneK (versão 4.2.00).

Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa SPSS 20.0 for Windows, com nível de significância de 5%. As frequências relativa e absoluta dos animais reagentes na sorologia foram definidas por análise estatística descritiva. A concordância dos resultados obtidos nas técnicas sorológicas foi avaliada através da sensibilidade, especificidade e do indicador *Kappa* (k), conforme Andrade & Zicker (1997). Considerou-se o ELISA como padrão ouro, já que é o teste confirmatório para o Ministério da Saúde (Brasil 2011). Para identificar os fatores de risco associados à soropositividade foi realizada a análise univariada através do teste qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher quando necessário. Cada variável independente foi cruzada com a variável dependente e as que apresentaram valor de $p \leq 0,20$ (Zar 1999) foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (Hosmer & Lemesho 2000).

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, sob o protocolo nº 53/2012.

3.5 RESULTADOS

Foi coletado um total de 362 amostras de sangue de cães da zona rural do município de Patos, estado da Paraíba, e a prevalência sorológica da LVC nessa região foi de 11,33%, ou seja, 41 dos 362 cães foram positivos em pelo menos dois testes sorológicos. A população estudada era composta por 246 machos (67,96%) e 116 fêmeas (32,04%). Quanto à raça, 94,48% (342 cães) eram “sem raça definida” (SRD) e desses 39 (11,4%) foram soropositivo para LVC. Em relação ao contato com outros animais, 74,31% tinham contato com outros cães, a

⁷ LGC Biotecnologia

maioria vivia em ambiente de terra e cimento (66,02%) e 77,90% eram cães de caça. A técnica sorológica mais sensível foi o ELISA, que detectou 48 (13,26%) animais positivos e quatro ficaram na zona cinza (resultado indeterminado), sendo considerados negativos para esse estudo. A RIFI e o DPP identificaram 42 (11,60%) animais positivos em cada teste.

O DPP apresentou sensibilidade de 58,33% (95%, IC: 0,43-0,72) e especificidade de 95,54% (95%, IC: 0,93-0,98), com valor *Kappa* de 0,57, apresentando uma concordância moderada com o ELISA (padrão ouro). A RIFI apresentou sensibilidade de 83,33% (95%, IC: 0,70-0,93), especificidade de 99,36% (95%, IC: 0,98-1) e valor *Kappa* de 0,87, gerando uma concordância quase perfeita quando comparado com o ELISA. O valor preditivo positivo (VPP), que é a probabilidade de ter a doença se o resultado for positivo, foi de 66,67% para o DPP e 95,24% para a RIFI. O valor preditivo negativo (VPN), que é a probabilidade de não ter a doença quando o resultado for negativo, foi de 93,75% e 97,50% para DPP e RIFI, respectivamente (Quadro 2, 3 e 4).

A PCR convencional realizada a partir das amostras de sangue dos cães positivos na sorologia amplificou um único fragmento de aproximadamente 720pb, confirmando a presença do parasita no sangue de 18 das 41 amostras testadas (43,9%). Não foram observadas ampliações inespecíficas em nenhuma das amostras de campo. O único fragmento amplificado consiste no DNA de cinetoplasto de *L. infantum chagasi*. Na qPCR o índice de positivos subiu para 73,17%, 30 das 41 amostras testadas amplificaram um fragmento de 132pb.

Na análise univariada dos fatores de risco, observou-se associação significativa ($p \leq 0,2$) para as variáveis sexo, contato cães, pequenos ruminantes, bovinos, ratos, ambiente onde vive e acesso a açudes (Quadro 5). Essas variáveis foram submetidas à análise multivariada (regressão logística múltipla) e o fator de risco identificado foi o sexo (Odds Ratio = 2,06), em que os cães machos apresentam duas vezes mais chances de apresentar a doença (Quadro 6).

3.6 DISCUSSÃO

O nordeste brasileiro é a região com as mais altas taxas de prevalência de leishmaniose visceral humana e canina, que está em constante crescimento (Bavia et al. 2005). No município de Patos (PB) não é diferente, a prevalência da LVC aumentou consideravelmente quando se compara o atual estudo (11,33%) ao levantamento realizado em 2000, com 2379 animais da área urbana e rural, cuja soroprevalência foi de apenas 1,97%, detectada por ELISA e RIFI (Melo, comunicação pessoal).

A prevalência da LVC pode variar bastante entre as diversas localidades no mesmo município, o que sugere que os diversos ecossistemas favorecem a manutenção dos vetores de forma diferente e, em geral, a ocorrência na zona rural é maior do que na zona urbana (França-Silva et al. 2003); fato comprovado quando se compara o atual estudo com o realizado por Porto (2010), que demonstrou que a soroprevalência na zona urbana de Patos foi de 7,2% naquele período, tendo como método de diagnóstico o ELISA. Entre cidades e estados do Brasil a variação é ainda maior, com valores entre 0,7% em Salvador, na Bahia (Barboza et al. 2009), a 51,6% em São Luís, no Maranhão (Silva-Abreu 2008).

A sensibilidade do DPP, que detecta anticorpos contra rK26 e rK39, foi de apenas 58,33%. O resultado é preocupante, pois com a tendência de aumento de prevalência observada nos últimos anos, e sendo a técnica de triagem utilizada pelo Ministério da Saúde para identificação dos animais positivos desde 2011, 42% (IC 95%: 0,28-0,57) dos cães estão ficando no campo com resultado falso negativo, ou seja, permanecerão como uma fonte de infecção para o mosquito, favorecendo a disseminação da doença entre os animais e humanos. Vinte animais positivos no ELISA, que é o ensaio confirmatório do Ministério da Saúde, e também na RIFI, foram negativos no DPP. Queiroz Jr. (2011), avaliando o DPP, encontrou um resultado semelhante ao do presente estudo, sensibilidade de 56,1% e especificidade de 100% quando comparado à RIFI. A sensibilidade variou com o quadro clínico do animal; elevada apenas para cães sintomáticos (88,9%), 52,4% em animais oligossintomáticos e de 12% em assintomáticos. Grimaldi Jr. et al. (2012) também obtiveram resultados parecidos: cães sintomáticos com 98% de sensibilidade e assintomáticos com 47%.

Em estudo realizado por Santis et al. (2013) o DPP teve um melhor desempenho (sensibilidade de 68,42%, especificidade de 87,5%), mostrou-se mais sensível, mais específico e com maior confiabilidade do que o ELISA e a RIFI, tendo como padrão ouro o parasitológico direto. Este fato pode ser em função da comparação com o parasitológico, que possui a sensibilidade mais baixa do que qualquer outro método sorológico devido às características intrínsecas da técnica.

A RIFI apesar de utilizar antígeno bruto (promastigotas de *L. major-like*) apresentou um baixo índice de falsos positivos, apenas dois animais reagiram na imunofluorescência sendo negativos no ELISA, determinando uma especificidade de 99,37% e sensibilidade de 85,11%. Segundo Schwanke et al. (2014) além da especificidade, a sensibilidade da RIFI pode ser influenciada pela natureza do antígeno.

Alguns animais positivos na sorologia foram negativos na PCR convencional e na PCR em tempo real. Isso pode acontecer devido a alguns fatores, como: (a) baixa quantidade de parasita circulante no sangue no momento da coleta, já que a densidade de *Leishmania* spp. no sangue periférico é baixa e a parasitemia é

provavelmente episódica (Fichoux et al. 1999); (b) inibidores da PCR presentes no sangue, que podem afetar a sensibilidade do ensaio (Reithinger et al. 2003); (c) fatores relacionados aos primers, o protocolo de extração do DNA e o tipo de amostra utilizada (Lachaud et al. 2001, Reithinger et al. 2000); (d) permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasita; (e) reações cruzadas da sorologia com outros patógenos (Cabral 2007). A sensibilidade da PCR é maior em amostras de DNA extraídas de medula óssea, baço e linfonodos, contudo a coleta dessas amostras in vivo é muito invasiva (Cabral 2007). Segundo Gomes et al. (2007) e Maia et al. (2009), a PCR a partir do DNA de sangue total de cães é apropriada para a confirmação dos exames sorológicos, em estudos epidemiológicos a campo, programas de vigilância e controle da leishmaniose. Porém, tal afirmação não é confirmada pelos dados do presente estudo, em que as duas técnicas de PCR utilizadas não foram capazes de detectar todas as amostras positivas; associado a isso, é uma técnica laboriosa e dispendiosa para ser usada em larga escala, como é o caso de inquéritos epidemiológicos.

A variável sexo foi apontada como fator de risco para a LVC: cães machos apresentaram duas vezes mais chances de ter a doença. Em uma revisão sistemática sobre os fatores de risco associados à LVC desenvolvido por Belo et al. (2013), foi visto que as variáveis associadas à doença são bastante controversas e que vinte e três publicações associam a LVC com sexo. Estudos epidemiológicos realizados em Tocantins (Santos et al. 2008), em Pernambuco (Dantas-Torres et al. 2006), na Croácia (Zivicnjak et al. 2005) e na Espanha (Fisa et al. 1999) apresentam uma maior prevalência da doença em cães machos. Zivicnjak et al. (2005) apontaram que diferenças na prevalência poderiam ser devido a riscos distintos na exposição e/ou aumento na mortalidade feminina devido a gravidez e amamentação, resultando em uma maior renovação da população de fêmeas. No presente estudo, vários cães machos eram utilizados para a caça e normalmente é o sexo preferido como cão de guarda, dois fatores que aumentam a exposição do animal ao flebótomo.

3.7 CONCLUSÃO

A soroprevalência para leishmaniose visceral canina aumentou na zona rural do município de Patos-PB e associada a maior exposição do cão aos flebótomos. Os resultados da comparação dos ensaios sorológicos demonstram que o DPP não é a melhor técnica para triagem em função da baixa sensibilidade do método.

3.8 REFERÊNCIAS

- Andrade A.L.S.S. & Zicker F. 1997. Avaliação de testes diagnósticos, p.9-30. In: Ibid. (Eds), Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis. Vol.1. FNS, OPAS, Brasília, DF.
- Aransay A.M., Scoulica E. & Tselentis Y. 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested pcr on minicircle kinetoplastic DNA. Appl. Environ Microbiol. 66(5): 1933-1938.
- Bavia M.E., Carneiro D.D., Gurgel H.C., Madureira Filho C. & Barbosa M.G. 2005. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. Parasitol., Cambridge, 47: 165-169.
- Barboza D.C.P.M., Leal D.C., Souza B.M.P.S., Carneiro A.J.B., Gomes Neto C.M.B.; Alcântara A.C.D., Julião F.S., Moura S.A.B., Peralva L.M.P., Ferreira F. & Franke C.R. 2009. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 10(2): 434-447.
- Belo V.S., Struchinera C.J., Wernecka G.L., Barbosa D.S., Oliveira R.B., Neto R.G.T. & Silva E.S. 2013. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. Vet. Parasitol. 195: 1- 13.
- Brasil. 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p.
- Brasil. 2011. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/ Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública.

- Cabral A.W.D. 2007. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 56p.
- Cavalcanti M.P., Brito M.E.F., Souza W.V., Gomes Y.M. & Abath F.G. 2009. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *The Veterinary Journal*, 182: 356–358.
- Dantas-Torres F., Brito M.E. & Brandão-Filho S.P. 2006. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140: 54–60.
- França-Silva J. C., Costa R. T., Siqueira A. M., Machado-Coelho G. L. L., Costa C. A., Mayrink W., Vieira E. P., Costa J. S., Genaro O. & Nascimento E. 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111:161-173.
- Fichoux Y.L., Quaranta J.F., Aueuvre J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D. & Kubar J. 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1953-1957.
- Fisa R., Gállego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrió J., Gállego J. & Portús M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.** 83: 87–97.
- Gomes A.H.S., Ferreira I.M.R., Lima M.L.S.R., Cunha E.A., Garcia A.S., Araújo M.F.L. & Pereira-Chioccola V.L. 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 144: 234-241.
- Grimaldi Jr G., Teva A., Ferreira A.L., Santos C.B., Pinto I.D., Azevedo C.T. & Falqueto A. 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®; CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106(1): 54-9.
- Hosmer D.W. & Lemesho W.S. 2000. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 375p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=Po0RLQ7USIMC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acessado em: 10/2013.
- Lachaud L., Chabbert E., Dubessay P., Reynes J., Lamothe J. & Bastien P. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J. Clin. Microbiol.* 39: 613-617.
- Maia C., Ramada J., Cristóvão J.M., Gonçalves L. & Campino L. 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179:142-144.
- Porto M.L. 2010. Soroprevalência e fatores de risco para Leishmaniose Visceral Canina em Patos, Paraíba, Brasil. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB. 46 p.
- Queiroz Jr E.M. 2011. Validação do teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE. 77 p.
- Reithinger R., Lambson B.E., Barker D.C. & Davies C.R. 2000. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J. Clin. Microbiol.* 38: 748-751.
- Reithinger R., Espinoza J.C., Courtenay O. & Davies C.R. 2003. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Clin. Microbiol.* 41: 1486-1493.
- Santis B., Santos E.G.B., Souza C.S.F., Chaves S.A.M. 2013. Performance of DPP™ immunochromatographic

rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50(3): 198-205.

Santos H.D. 2008. Fatores Associados à Soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina no Município de Piraquê, Estado do Tocantins, Brasil. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 89 p.

Schwanke K., Silva A.M.M., Pacheco A., Bahia M., Silveira F.T., Scofield A. & Góes-Cavalcante G. 2014. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 34(3): 255-260.

Silva-Abreu A.L., Lima T.B., Macedo A.A., Moraes-Júnior F. J., Dias E.L., Batista Z. S., Calabrese K.S., Moraes J.L.P., Rebêlo J.M.M. & Guerra R.M.S.N. C. 2008. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por leishmania em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.* 17: 197-203.

Thursfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*. 3rd ed. Wiley Blackwell, Oxford, 610p.

Zivicnjak T., Martinković F., Marinculić A., Mrljak V., Kucer N., Matijatko V., Mihaljević Z., Barić-Rafaj R. 2005. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet. Parasitol.* 131: 35-43.

WHO-World Health Organization. 2014. Leishmaniasis. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em: 10/2014.

Zar J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4rd ed. Prentice-Hall, New Jersey. 663p.

Quadro 1. Dados censitários das casas e total de cães por estrato amostral da zonal rural do município de Patos, Paraíba

Estratos Amostrais	Total de casas ^a	Casas amostradas	Total de cães
Norte	358	83	99
Sul	575	133	162
Oeste	334	78	101
Total	1267	294	362

^a Dados obtidos do SIAB, SMS, DAB.

Quadro 2. Valores absolutos e porcentagens (%) de amostras positivas e negativas no ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), padrão ouro, e no teste imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, Paraíba

		DPP		Total
		Reagente (%)	Não Reagente (%)	
ELISA	Positivo	28 (7,73%)	20 (5,53%) - FN	48
	Negativo	14 (3,87%) - FP	300 (82,87%)	314
Total		42	320	362

FN- Falso- negativo; FP- Falso- positivo.

Quadro 3. Valores absolutos e porcentagens (%) de amostras positivas e negativas no Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), padrão ouro, e na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos, Paraíba

		RIFI		Total
		Reagente (%)	Não Reagente (%)	
ELISA	Positivo	40 (11,05%)	8 (2,21%) - FN	48
	Negativo	2 (0,55%) - FP	312 (86,19%)	314
Total		42	320	362

FN- Falso- negativo; FP- Falso- positivo.

Quadro 4. Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN), com intervalo de confiança de 95%, Índice Kappa e suas respectivas concordâncias, do Teste Imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform) e da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), tendo como padrão ouro o Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

Teste	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	VPP	VPN	Índice Kappa	Conclusão da Replicabilidade
DPP	58,33% (0,43-0,72)	95,54% (0,93-0,98)	66,67%	93,75%	0,57	Moderada
RIFI	83,33% (0,70-0,93)	99,36% (0,98-1)	95,24%	97,50%	0,87	Quase Perfeita

Quadro 5. Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à Leishmaniose Visceral Canina na zona rural de Patos, Paraíba.

Variável	Nº total de animais	Animais positivos (%)	Valor de p
Grau de Escolaridade			
Analfabeto	1	0 (0%)	0,932
1º Grau	179	20 (11,2%)	
2º Grau	182	21 (11,5%)	
3º Grau	0	0 (0%)	
Renda familiar			
Até 1 Salário Mínimo	67	5 (7,5%)	0,541
1 a 2 Salários Mínimos	247	30 (12,1%)	
Mais de 2 Salários Mínimos	48	6 (12,5%)	
Sexo			
Macho	246	22 (8,9%)	0,037*
Fêmea	116	19 (16,4%)	
Idade (Meses)			
3 – 6	10	2 (20%)	0,503
7 – 12	55	8 (14,5%)	
13 – 24	117	16 (13,7%)	
25 – 48	65	7 (10,8%)	
49 – 72	77	6 (7,8%)	
Acima de 72	38	2 (5,3%)	
Raça			
CRD	20	2 (10%)	0,847
SRD	342	39 (11,4%)	
Tipo de criação			
Domiciliar	1	0 (0%)	0,813
Semi-domiciliar	119	12 (10,1%)	
Solto	242	29 (12%)	
Contato com animais			
Não	20	3 (15%)	0,594
Sim	342	38 (11,1%)	
Contato com equídeos			
Não	354	41 (11,6%)	0,307
Sim	8	0 (0%)	
Contato com silvestres			
Não	268	29 (10,8%)	0,609
Sim	94	12 (12,8%)	
Contato com felinos			
Não	157	20 (12,7%)	0,458
Sim	205	21 (10,2%)	
Contato com cães			
Não	93	7 (7,5%)	0,180*
Sim	269	34 (12,6%)	
Contato com suínos			
Não	326	38 (11,7%)	0,621
Sim	34	3 (8,8%)	
Contato com pequenos ruminantes			
Não	142	11 (7,7%)	0,084*
Sim	220	30 (13,6%)	
Contato com bovinos			
Não	93	7 (7,5%)	0,180*
Sim	269	34 (12,6%)	
Contato com aves			
Não	336	26 (11%)	0,800
Sim	126	15 (11,9%)	
Contato com ratos			
Não	348	41 (11,8%)	0,173*

Sim	14	0 (0%)	
Ambiente onde é criado			
Terra	82	5 (6,1%)	0,113*
Cimento	41	3 (7,3%)	
Terra e Cimento	239	33 (11,3%)	
Limpeza do loca			
Não	175	17 (9,7%)	0,349
Sim	187	24 (12,8%)	
Frequência de limpeza			
Diária	0	0 (0%)	0,612
Semanal	20	3 (15%)	
Quinzenal	167	21 (12,6%)	
Mensal	0	0 (0%)	
Nunca	175	17 (9,7%)	
Vacinação			
Não	0	0 (0%)	-
Sim	362	41 (11,3%)	
Qual vacina			
Apenas Antirrábica	353	40 (11,3%)	0,984
Apenas Contra Virose	0	0 (0%)	
Ambas	9	1 (11,1%)	
Vermifugação			
Não	62	6 (9,7%)	0,653
Sim	300	35 (11,7%)	
Presença de carrapatos			
Não	325	38 (11,7%)	0,515
Sim	37	3 (8,1%)	
Animal de caça			
Não	80	6 (7,5%)	0,221
Sim	282	35 (12,4%)	
Acesso a açudes			
Não	71	5 (7%)	0,204
Sim	291	36 (12,4%)	
Já ficou doente			
Não	346	39 (11,3%)	0,880
Sim	16	2 (12,5%)	
Qual doença?			
Nenhuma	346	39 (11,3%)	0,880
Erliquiose	16	2 (12,5%)	
Acesso a Zona Urbana			
Não	90	8 (8,9%)	0,417
Sim	272	33 (12,1%)	

* Variáveis usadas na regressão logística múltipla.

Quadro 6. Fator de risco associados á Leishmaniose Visceral Canina na zona rural de Patos, Paraíba, estimado por regressão logística múltipla.

Fatores de risco	Odds ratio	IC 95%	Valor de p
Sexo	2,0620	1.05-4.03	0,0343

4 CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: DADOS PRELIMINARES

(Short Communication)

Manuscrito submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (INSS 0102-0935) – Belo Horizonte/MG, qualis A2.

Desenvolvimento e padronização de um teste de Soroaglutinação em Látex para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: dados preliminares

R.B.S. Silva¹, H.C. Souza², P.P. Andrade³, M.A. Melo^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos – PB, Brasil. * Autor para correspondência:

marcia.melo@pq.cnpq.br

² Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos – PB.

³ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – PE, Brasil.

4.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e padronização de um teste de Soroaglutinação em Látex utilizando uma proteína recombinante HSP70 de *Leishmania infantum chagasi* para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Quarenta amostras de soro, 20 positivas e 20 negativas, foram testadas na soroaglutinação em látex em três diluições diferentes. Os melhores resultados foram obtidos na diluição do soro em 1:4, com sensibilidade de 75,0% e especificidade de 90,0%. O teste de Soroaglutinação em Látex é um bom método de diagnóstico de triagem por ser rápido e de fácil manipulação; a utilização do antígeno purificado poderá aumentar a sensibilidade do ensaio.

Palavras-chave: calazar; doença negligenciada; HSP70; proteína recombinante

Development and standardization of test serum agglutination in latex for diagnosis of canine visceral leishmaniose: preliminary data

4.2 ABSTRACT

The objective of this study was to develop a Latex Agglutination Test using a recombinant protein of *Leishmania infantum chagasi* for diagnosis of canine visceral

leishmaniasis. Forty sera samples, 20 positive and 20 negative, were tested in the latex agglutination test in three different dilutions. The best results were in 1:4 dilution of sera, with sensitivity of 75,0% and specificity of 90,0%. The Latex Agglutination Test is a simple and quick method for screening of canine visceral leishmaniasis and the use of purified antigen could enhance the sensitivity of the assay.

Key words: Kala-azar; neglected diseases; HSP70; recombinant protein

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários intracelulares e no Brasil é causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*. É uma doença parasitária, de caráter zoonótico e, por isso, de grande importância para a Saúde Pública (WHO, 2014).

As medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) são baseadas no controle do reservatório canino (diagnóstico sorológico e eutanásia de cães positivos), no controle do vetor (aplicação de inseticidas) e no diagnóstico precoce e tratamento adequado em humanos (BRASIL, 2014). Porém, os números de casos de leishmaniose visceral no Brasil estão em constante crescimento, o que demonstra que as medidas de controle não estão sendo eficazes (BRASIL, 2011b).

A doença é caracterizada pela grande produção de anticorpos e o estímulo de linfócitos B policlonais favorece a utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico, evitando os métodos parasitológicos, que são invasivos e levam riscos aos pacientes (GONTIJO e MELO, 2004). A ocorrência de reação cruzada na sorologia com outras doenças diminui com a utilização de antígenos recombinantes específicos. Atualmente, duas proteínas recombinantes de *Leishmania*, a K39 e a HSP70, são utilizadas como antígenos em testes sorológicos para o diagnóstico da LV. Os diagnósticos preconizados pelo MS são o teste Imunocromatográfico DPP (*Dual Path Plataform*) e o ensaio imunoenzimático (ELISA-EIE), desenvolvidos pela Bio-Manguinhos (BRASIL, 2011a).

O emprego de aglutinação de partículas de poliestireno (látex) sensibilizadas com antígeno específico tem facilitado o diagnóstico de várias doenças infecciosas. Para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina há alguns relatos: Dereure et al. (1998) utilizaram antígeno total solúvel e Akhoundi et al. (2013), utilizando antígeno A2 purificado, relataram elevadas sensibilidade e especificidade.

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e a padronização de um teste de soroaglutinação em látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, baseado na detecção de anticorpos contra a proteína recombinante HSP70.

O gene que codifica a fração carboxi-terminal da proteína HSP70 foi clonado no plasmídeo p-bluescript e inserido na bactéria *Escherichia coli* DH5 α . A bactéria transformada foi cultivada por 18 horas a 37°C em meio Luria Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). Para indução da expressão da proteína, foi adicionado ao meio IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) 0,5M, um análogo da lactose que inativa o repressor lacZ, induzindo a transcrição do operon lac e a produção da proteína.

Para avaliação da expressão da proteína e sua antigenicidade foi realizada a técnica de Western Blot (WB) de acordo com Ausubel (2002), com gel de corrida de poliacrilamida na concentração de 12% (p/v). A transferência para membranas de nitrocelulose foi realizada pelo sistema semi-úmido. O marcador de peso molecular possuía proteínas na faixa de 14,4 a 212 KDa (K494, Protein MW Marker, Amresco LLC, EUA).

A sensibilização do látex se deu através da adsorção física, seguindo o protocolo de Garcia et al. (2013). As pérolas de látex (Polybead® Carboxylate Red Dyed Microspheres 1.00 μ m. Polysciences, Inc.) fornecidas em suspensão a 2,6%, foram diluídas para 1% em tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0). A adsorção do látex foi realizada com a adição de 2,5 mL do antígeno (proteína recombinante HSP70) para cada 500 μ L do látex a 1%, e mantido sob agitação constante (50 rpm) por cinco horas, em temperatura ambiente. Em seguida, o látex sensibilizado foi centrifugado a 1000 x g por dez minutos e lavado com tampão borato de sódio 0,002M (pH 8,0). O látex foi ressuspenso em tampão borato para um volume final de 1 mL. Foram adicionados 1% de soro albumina bovina e 0,01% de azida sódica, com a finalidade de saturar os locais não revestidos pelo antígeno para evitar reação inespecífica e para conservação do látex sensibilizado, respectivamente. O látex sensibilizado foi mantido refrigerado a 4°C até o momento do uso.

Quarenta amostras de soro canino, 20 positivas e 20 negativas, foram testadas na Soroaglutinação em Látex (SAL). Sendo as amostras consideradas positivas quando

eram reagentes nos três testes e negativas, quando não reagentes nos três testes: (a) Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA S7 – Biogene Ind. Com. Ltda, Recife, PE), (b) Teste Imunocromatográfico DPP (*Dual Path Platform*) Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos), e (c) Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR). O padrão ouro utilizado foi o conjunto de testes, já padronizados. Os soros testados foram diluídos em 1:2, 1:4 e 1:8 em solução de diluição.

No momento da realização do teste, o soro e o látex eram previamente deixados em temperatura ambiente. A reação de SAL se dava a partir da mistura de quantidades iguais de soro diluído e látex sensibilizado (15µL), homogeneizada por movimentos circulares em placas de vidro com auxílio de bastão durante dois minutos. A leitura final era realizada após 4 minutos. O soro foi considerado reagente quando houve a formação de grumos de qualquer intensidade e o que permaneceu homogêneo foi considerado negativo para calazar canino. No caso de resultados duvidosos, as reações eram repetidas e consideradas como diagnóstico negativo caso permanecesse a dúvida.

Para calcular a especificidade, sensibilidade e o valor kappa do Teste de Soroaglutinação em Látex foram utilizados os programas gratuitos DAG_Stat e BioEstat 5.0.

A expressão de uma proteína heteróloga a partir de um segmento de gene clonado num plasmídeo pode frequentemente ser identificada pela análise das bandas proteicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Uma expressão perceptível do gene clonado pode ser vista como uma banda intensa, inexistente na bactéria sem o plasmídeo, e com o peso molecular (PM) esperado pela construção recombinante. Com isso, através da coloração do gel por Coomassie Brilliant Blue foi possível verificar que houve expressão do gene correspondente a região carboxi-terminal da HSP70 com um peso molecular entre 31 e 45 kDa (Fig. 1).

Através do WB (Fig. 2), foi possível verificar: a) não houve reação inespecífica entre o soro canino e a *E. coli*, pois não houve aparecimento de bandas na coluna de DH5α; b) o protocolo foi eficiente, uma vez que as bandas antigênicas de *L.infantum chagasi* estão presentes e c) a *E. coli* clonada com HSP70 está expressando a proteína, que é bastante antigênica e foi reconhecida pelo pool dos soros de cães positivos para calazar.

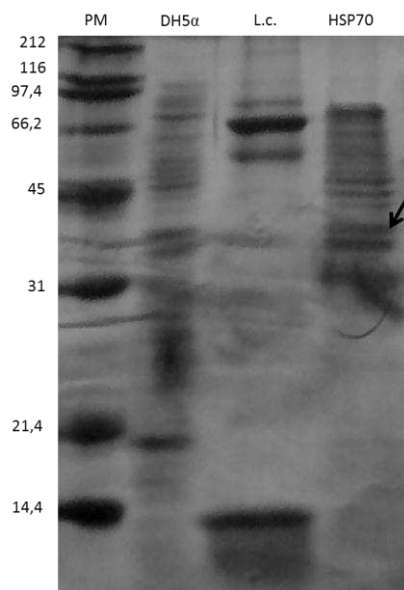


Figura 1. Gel de poliacrilamida a 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Coluna 1 - *Escherichia coli* selvagem (DH5 α), coluna 2 - *Leishmania infantum chagasi* e coluna 3 - *E. coli* clonada (fração carboxi-terminal da HSP70/seta) (10 μ l de proteína por poço). O peso molecular (PM) está indicado em KDa.

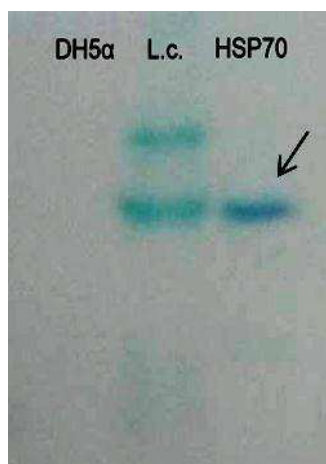


Figura 2. Resultado do Western Blot utilizando pool de soros positivos diluídos 1/200. Seta: banda antigênica da fração carboxi-terminal HSP70; L.c.: *Leishmania infantum chagasi*; DH5 α : *Escherichia coli* selvagem

O soro que apresentou grumos em qualquer intensidade na SAL foi considerado positivo e o que permaneceu homogêneo foi considerado negativo para calazar canino (Fig. 3). Dos 40 soros testados, 27 (17 positivos e 10 negativos) tiveram resultados

concordantes na diluição 1:2, 33 (15 positivos e 18 negativos) na diluição 1:4 e 28 (8 positivos e 20 negativos) em 1:8. Cinco soros sabidamente positivos foram negativos na diluição 1:4, desses, dois foram negativos em todas as diluições e três positivos na diluição 1:2.

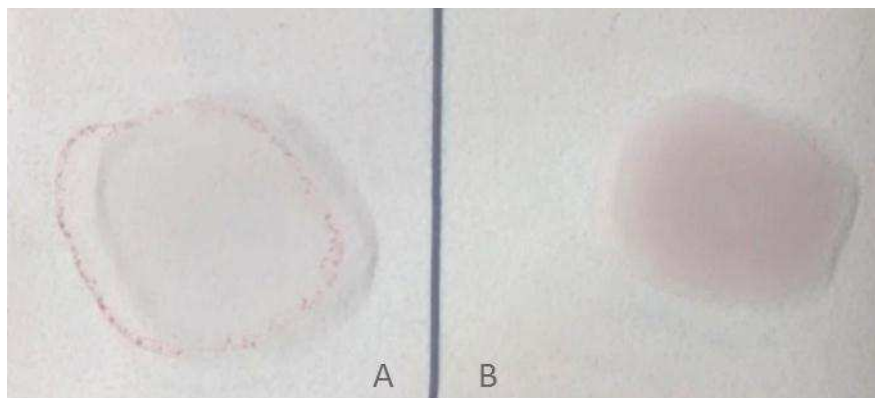


Figura 3. A. Reação de aglutinação em látex positiva (formação de grumos); B. Reação de aglutinação em látex negativa (suspensão permanece homogênea)

As sensibilidades e especificidades do SAL nas diferentes diluições dos soros foram: diluição 1:2, sensibilidade de 85,0% (95% IC: 0,62 – 0,97) e especificidade de 50,0% (95% IC: 0,27 – 0,73); diluição 1:4, sensibilidade foi de 75,0% (95% IC: 0,51 – 0,91) e especificidade de 90,0% (95% IC: 0,68 – 0,99); e diluição 1:8, sensibilidade de 40,0% (95% IC: 0,19 – 0,64) e a especificidade de 100,0% (95% IC: 0,83 – 1,00). Os valores de Kappa foram, respectivamente, 0,35, 0,65, 0,40, quando comparado com o padrão ouro, obtendo concordância razoável (0,21 a 0,4) nas diluições 1:2 e 1:8 e substancial (0,61 a 0,80) na diluição 1:4, segundo a classificação de Thursfield (2007) (Tab. 1).

Tabela 1. Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Negativo (VPN), com intervalo de confiança de 95%, Valor Kappa e suas respectivas concordâncias, nas diferentes diluições das amostras testadas na Soroaglutinação em Látex

Diluição das Amostras	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP	VPN	Valor de Kappa	Conclusão da Replicabilidade
1:2	85,0	50,0	62,96	76,92	0,35	Razoável
1:4	75,0	90,0	88,24	78,26	0,65	Substancial
1:8	40,0	100,0	100,0	62,5	0.40	Razoável

Observa-se que à medida que aumenta a diluição do soro aumenta a especificidade, mas, em contrapartida, diminui a sensibilidade, pois ocorre diminuição da quantidade de anticorpos específicos. Tal fato poderá ser corrigido com a utilização do antígeno purificado.

A sensibilidade e especificidade do teste de SAL foram baixas, quando comparadas a outros ensaios utilizando o látex para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Dereure et al. (1998) relatam uma sensibilidade de 93%, especificidade de 98,9% e kappa igual a 0,883, utilizando antígeno total solúvel, tomando-se como padrão o teste de imunofluorescência indireta.

Já Akhoundi et al. (2013) relataram uma sensibilidade de 95.2% (95% IC, 95.0 – 95.4%) e especificidade de 100% (95% IC, 100%) utilizando antígeno A2 purificado, comparando com o DAT na diluição 1/320.

O teste de Soroaglutinação em Látex é um bom método de diagnóstico de triagem por ser um teste rápido e de fácil manipulação e a utilização do antígeno purificado poderá aumentar a sensibilidade do ensaio.

4.3 REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, B.; MOHEBALI, M.; SHOJAEE, S. et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: Assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Experim. Parasitol.**, v. 133, n.3, p. 307–313. 2013.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 5th ed, 2 Vol. Wiley, New York, Cap. 10, p. 1 - 145, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação**: Paraíba – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 35 p., 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1 ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

DEREURE, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F. et al. Leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: intérêt et réalisation du test au latex. Applications en éco-épidémiologie. **Bullet. de la Soc. de Pathol. Exoti.**, v. 91, n. 4, p. 300-305, 1998.

GARCIA, V.S.; GONZALEZ, V. D. G.; CAUDANA, P. C. et al. Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 384-391, 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

THURSFIELD, M., 2007. **Veterinary Epidemiology**. 3rd ed. Wiley Blackwell, Oxford, 624 pp.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A soroprevalência para leishmaniose visceral canina aumentou na zona rural do município de Patos-PB o que indica a necessidade de medidas de controle mais eficazes. A participação efetiva de fatores de risco na leishmaniose visceral canina no Brasil ainda é difícil de ser estabelecida em função falta de padronização da metodologia utilizada nos inquéritos epidemiológicos nas diferentes regiões do país. Quanto às intervenções de controle com base no sexo do cão, tal medida deve ser recomendada, porém são necessárias mais investigações para confirmar tal associação. Os resultados da comparação dos ensaios sorológicos demonstram que o DPP não é a melhor técnica para triagem em função da baixa sensibilidade do método.

A proteína recombinante HSP70 de *Leishmania (L.) infantum chagasi* possui um grande potencial antigênico e é um antígeno promissor para ser utilizado no teste de soroaglutinação em látex, uma vez que animais infectados produzem uma forte resposta humoral contra a proteína de choque térmico. O teste de Soroaglutinação em Látex é um bom método de diagnóstico de triagem por ser um teste rápido e de fácil manipulação, porém o ensaio ainda necessita de ajustes para melhorar a acurácia e de testes na população real para validação da técnica.

6 ANEXOS

ANEXO I**NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE
PPGMV – UFCG****CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL CAMPUS DE PATOS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA VETERINÁRIA****NORMA N° 01/2011**

Altera a NORMA N° 01/09 de 04 de fevereiro de 2009 e acrescenta novos critérios para a elaboração e defesa da dissertação e tese do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no uso de suas atribuições, de conformidade com a legislação em vigor, e nos termos da Resolução N° 13/02 do CONSEPE e do seu Regulamento.

RESOLVE:

Art. 1° Decide modificar a redação do § 1° do art. 2° da norma 01/2009 e estabelece que o aluno deva apresentar, antes da defesa, o comprovante de submissão dos trabalhos da dissertação e tese às revistas Qualis A1, A2, B1 e B2 da CAPES.

§ 1° - O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois, e poderão ser da seguinte forma:

I - uma revisão da literatura e um trabalho já enviado a uma revista científica Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos enviados à revista Qualis citadas no Caput do artigo. 54

§ 2º - O corpo da tese poderá ser constituído por:

I - três trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo e uma revisão da literatura.

§ 3º Os demais itens relacionados com a elaboração da dissertação deverão seguir as normas no Anexo.

Art. 2º A qualificação do doutorado deverá ser feita em um prazo de 30 (trinta) meses após o ingresso do doutorando no Programa.

Art. 3º A presente Norma entra em vigor a partir da data de sua publicação.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE

O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois: 1- Revisão da literatura e 2- um trabalho nas normas da revista científica Qualis A ou B da CAPES o qual será enviado, obedecendo ao prazo máximo de 30 dias após a defesa.

Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, um título que abranja os dois artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos.

O trabalho será redigido seguindo as normas da revista para a qual será enviado. A revisão da literatura, se não tiver sido enviada para outra revista, deve seguir as mesmas normas que o trabalho a ser enviado, deverá ser incluída versão em inglês e português. Se a dissertação constar de mais de um trabalho original, estes deverão seguir as normas das respectivas revistas para as quais serão enviados.

Em todos os casos, no final da dissertação devem ser incluídas, como anexo, as normas da (s) revista (s) para as quais os trabalhos serão enviados. Para a formação da dissertação, será utilizada a folha A4. O estilo da fonte deve ser Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 entre as linhas.

Na capa será incluído o nome da instituição, abaixo o título, ao lado direito à descrição da dissertação sem constar à área, abaixo o nome do mestrando e por último o nome da cidade, Estado e data. A contracapa será constituída da mesma forma da capa, acrescentando-lhe apenas o nome do orientador e no verso, a ficha catalográfica.

No caso do aluno optar pela apresentação deverá ser incluída uma introdução com uma explicação dos dois trabalhos. No final, após o último capítulo deverão ir as conclusões do(s) trabalho(s). Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da dissertação deve ser incluído, à direita da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final.

O sumário será antes da introdução. As Figuras, Tabelas ou Quadros devem ser incluídos dentro dos resultados, em folhas separadas, com não mais de 4 Figuras, Quadros ou Tabelas por folha.

Um volume deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.

Cinco exemplares da dissertação devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa. Após a defesa o mestrando deverá entregar na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da dissertação, com pelo menos 2 (duas) em capa dura, no prazo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica.

Na versão final da dissertação não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista, mas somente a cópia do trabalho em português. No anexo deverá constar uma folha mencionando o site da revista em que o artigo será publicado. Deverá ser entregue na Coordenação em separado uma cópia do artigo escrito em inglês, com as devidas correções da banca, a ser enviado para publicação.

Agradecimentos e dedicatórias serão optativos.

Entregar uma cópia em CD da dissertação e/ou tese em pdf em um único arquivo. Deverá ser idêntico à versão impressa. Não será aceito a dissertação em mais de um arquivo.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

ANEXO II NORMAS DO CAPÍTULO I

INSTRUÇÕES AOS AUTORES PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA Brazilian Journal of Veterinary Research

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impresa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou

Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas,

com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o

nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO III
Comprovante de submissão
CAPITULO I
Revista Pesquisa Veterinária Brasileira
*Segundo instruções aos autores da PVB

Submissão de artigo para avaliação pela Pesquisa Veterinária Brasileira



marcia.melo@pq.cnpq.br (marcia.melo@pq.cnpq.br) Adicionar aos contatos 29/10/2014 Documentos

Ações

Para: jurgen.dobereiner@pvb.com.br

Cc: raizzabs@hotmail.com, andrade@ufpe.br, sergio.azevedo@pq.cnpq.br, almir@cstr.ufcg.edu.br, rodrigo.souza.mendes@gmail.com, nessavet...



1 anexo (93,9 KB)

Outlook.com Exibição Ativa



Baixar como zip Salvar no OneDrive

Dr. Jürgen Döbereiner,
bom dia.

Submetemos o artigo ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO E ANÁLISE DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO para avaliação de posterior publicação na Pesquisa Veterinária Brasileira.

Atenciosamente,

Marcia Melo

ANEXO IV NORMAS DO CAPÍTULO II

INSTRUÇÕES AOS AUTORES Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

□ O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

□ Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

□ Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

□ Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.

o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o

indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*): ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$95,00, por página impressa em preto e R\$280,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

ANEXO V
Comprovante de submissão
CAPITULO II
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

[ABMVZ] - Status do Trabalho alterado na Revista ABMVZ - ID 8099/2014

↑ ↓ ×



Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia ? ABMVZ - Publicacoes Online Adicionar aos contatos 26/11/2014 ▶
Para: raizzabss@hotmail.com, abmvz@abmvz.org.br ↵

Ações ▾

[PORTUGUÊS]

Esta é uma mensagem automática. Guarde este e-mail para referência. Não responda a este email. Para contato use abmvz.artigo@abmvz.org.br

Prezado(a) Senhor(a),

Informamos que o status do manuscrito "Padronização de um teste de Soroaglutinação Rápida em Látex para diagnóstico da leishmaniose visceral canina / Standardization of a test serum fast agglutination in latex for diagnosis of canine visceral leishmaniose" mudou para: Aguardando avaliação do Comitê Editorial

Acesse <http://www.abmvz.org.br> para acompanhar a tramitação do seu trabalho.

Atenciosamente

Editor do ABMVZ