



Análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Comparative analysis among the different protocols used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis

RIALA6/1752

Denise Maria Bussoni BERTOLLO², Jose Eduardo TOLEZANO^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2889. E-mail: tolezano@hotmail.com

²Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido: 05.07.2017 - Aceito para publicação: 31.03.2018

RESUMO

Foi realizada análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em inquéritos soropidemiológicos, na região de São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012. Para cada protocolo avaliou-se o total de exames processados, o tempo médio para examinar as amostras coletadas nos diferentes períodos e a análise de concordância bruta. Foram utilizados quatro protocolos: diagnóstico apenas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em 12.871 (28,4%) cães, por ensaio imunoenzimático (EIE) e RIFI em 632 (1,4%); 22.387 (49,4%) por EIE/RIFI, e 9.453 (20,8%) pelo teste rápido (TR) *Dual Path Platform* (DPP[®])/EIE. Nos dois primeiros grupos, as análises foram no eluato de sangue coletado em papel de filtro, e nos dois últimos no soro sanguíneo. O protocolo TR-DPP[®]/EIE demandou menor tempo (dias) desde a execução até a liberação dos resultados, em comparação aos demais. Na avaliação das taxas de concordância bruta, o TR-DPP[®]/EIE apresentou melhor desempenho (58,5%). Apesar de, o atual protocolo TR-DPP[®]/EIE tenha contribuído para diminuir a discordância entre os resultados obtidos nos EIE/RIFI, o EIE confirma menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes, o que indica a necessidade de buscar novas alternativas para efetuar o diagnóstico em cães.

Palavras chaves. leishmaniose visceral, inquéritos epidemiológicos, técnicas e procedimentos diagnósticos.

ABSTRACT

The comparative analysis was performed among the different protocols proposed for diagnosing the canine visceral leishmaniasis in the seroepidemiological surveys performed in the region of São José do Rio Preto, from 2008 to 2012. Each protocol evaluated the total number of processed tests, the mean time for examining the collected samples, in different periods, and the gross agreement analysis. Four protocols were used: diagnosis only by indirect immunofluorescence test (IFT), in 12,871 (28.4%) dogs samples; by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and IFT in 632 (1.4%); (ELISA/IFT) in 22,387 (49.4%) and the rapid test (RT) *Dual Path Platform* (DPP[®])/ ELISA in 9,453 (20.8%). In the first two groups, the tests were performed using eluates from blood collected in the filter paper, and in the two last employed serum samples. RT-DPP[®]/ELISA demanded less time (days), from the test starting until the results release. In the of gross agreement rates, RT-DPP[®]/ELISA showed the best performance (58.5%). Although the new protocol RT-DPP[®]/ELISA has contributed to decrease in the mismatch between ELISA and IFT results, ELISA confirms less than 60% of RT-DPP[®] reagent samples, indicating the need for searching the new alternatives for the canine diagnosis.

Keywords. visceral leishmaniasis, health surveys, diagnostic techniques and procedures.

INTRODUÇÃO

No Brasil, responsável por 90% dos casos da América Latina, a leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum chagasi*¹⁻³. Os cães infectados são considerados os principais reservatórios desse protozoário no ciclo urbano de transmissão da LV, para o homem e outros animais, via de regra através da picada de dípteros da subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor^{1,4}.

Para o diagnóstico da LV, tanto nos seres humanos quanto para os animais, são considerados os sinais clínicos, os dados epidemiológicos e o diagnóstico laboratorial^{2,3}.

O diagnóstico clínico da LV canina baseia-se na observação de sinais e sintomas, principalmente: linfadenopatia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, alterações dermatológicas, hiporexia, onicogrifose e diarreia². Na fase terminal observa-se paresia das patas posteriores, caquexia, inanição culminando com o óbito do animal^{2,5}. As manifestações clínicas estão associadas ao tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado, entre os quais, a interação dos fatores do sistema imunológico, antigenicidade e carga parasitária⁶.

Na LV canina, os sinais clínicos observados podem ser confundidos com outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes, tais como: dermatites, erliquiose e babesiose^{2,7}. Portanto, é essencial a existência de métodos laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LV^{2,3,8}.

Os dados epidemiológicos são baseados na investigação detalhada da história clínica do animal, na investigação de deslocamento do cão nos últimos 12 meses, no tempo de permanência do cão infectado na residência ou local provável de infecção, na busca de presença de vetores e na identificação de fatores que possam contribuir para a ocorrência do caso^{3,9}.

O diagnóstico laboratorial da LV canina pode ser realizado, por meio de técnicas parasitológicas e imunológicas¹⁰. Para o diagnóstico parasitológico utiliza-se o exame microscópico direto (após coloração), isolamento *in vivo* (inoculação em animais de laboratório) e *in vitro* (cultura em meios de cultura acelular), análise histopatológica e técnicas moleculares^{2,11,12}.

No diagnóstico imunológico da LV canina,

as técnicas sorológicas mais utilizadas, realizadas a partir de amostras de sangue, são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (EIE)¹⁴ e teste rápido (TR)-DPP[®] (*Dual Path Platform*)¹³.

A RIFI consiste na reação de anticorpos presentes no soro com os parasitos, forma promastigota (*Leishmania sp.*), fixados em lâmina¹⁴. Posteriormente, emprega-se conjugado anti-IgG de cão marcada com isotiocianato de fluoresceína para evidenciar a ligação antígeno anticorpo. Para alguns pesquisadores a RIFI pode atingir sensibilidade superior a 90% e especificidade superior a 70%^{15,16}. A utilização da reação com antígeno de *Leishmania donovani*, aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, e resulta em maior detecção do diagnóstico em animais assintomáticos ou oligossintomáticos¹⁷.

Para o diagnóstico canino, até meados de 2012, a RIFI foi utilizada nas investigações em foco de transmissão, em inquéritos sorológicos censitários ou amostrais, para avaliar a prevalência da doença. E como teste confirmatório para as amostras reagentes pelo EIE^{2,3,18}.

O EIE baseia-se na utilização de antígenos solúveis de *Leishmania major like* adsorvido em microplacas, e anticorpos marcados com a enzima peroxidase, no qual permite a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. A sensibilidade do EIE pode alcançar 90% a 100% e a especificidade entre 85% a 94%¹⁵. O teste é sensível, permite detectar baixos títulos de anticorpos, porém não tão preciso na detecção em cães assintomáticos¹⁰.

Durante muitos anos, desde a década de 1970 e até o ano de 2002, o Ministério da Saúde recomendava a utilização da RIFI para a realização de inquéritos epidemiológicos caninos para a identificação dos animais infectados por *Leishmania infantum chagasi*. Nesse período, a RIFI era a única técnica laboratorial utilizada para esse diagnóstico quando da realização dos inquéritos soroparasitológicos no contexto das ações de vigilância e controle da LV. A partir de 2002 e até 2012, para o diagnóstico laboratorial da LV canina foi empregado o protocolo que incluía o EIE como teste de triagem e a RIFI como teste confirmatório¹⁹.

Nos últimos anos, diferentes versões de testes imunocromatográficos, dotados com proteínas

recombinantes, foram desenvolvidas a partir de antígenos do complexo *Leishmania donovani*^{12,20}. A imunocromatografia representa a alternativa às técnicas sorológicas convencionais. É tecnologia que proporciona a realização da ligação antígeno-anticorpo num suporte sólido, executada em temperatura ambiente²¹. Por conter antígeno recombinante apresenta elevada sensibilidade e especificidade²². De fácil operacionalização, mesmo em campo, baixo custo e fácil interpretação, o teste imunocromatográfico DPP® – Biomanguinhos – Fiocruz, patentado pela Chembio Diagnostics – EUA e desenvolvido por Instituto Biomanguinhos, rapidamente foi incorporada como teste para a triagem de amostras no protocolo desde 2012, e ainda em vigor para o diagnóstico da LV canina^{20,23}.

Trata-se de um teste qualitativo que visa à detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza como antígeno a proteínas recombinantes (r)K28 de *Leishmania infantum chagasi*^{24,25}.

O antígeno rK28 é uma fusão poliproteica que inclui regiões de haspb1 e haspb 2 de *Leishmania donovani*, homólogos de k26 e k9 de *Leishmania infantum*, respectivamente e, *Leishmania donovani kinesin*, homólogo k39 de *Leishmania infantum*^{24,26,27}.

Em 2012, ocorreu uma alteração significativa no protocolo visando o diagnóstico sorológico canino. Desta forma, a metodologia de EIE, anteriormente utilizada para a triagem sorológica, foi substituída pelo TR-DPP® LV e a RIFI utilizada como ensaio confirmatório foi substituída pelo EIE, passando a triagem a ser uma atividade realizada pelos municípios quando possível (Nota Técnica nº 01/2011 – CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS).

Neste trabalho objetivou-se realizar uma análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados para diagnóstico da leishmaniose visceral canina na região de São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo com base em dados secundário, obtidos por meio de inquéritos soropidemiológicos canino, utilizado no diagnóstico da LV canina realizado no período de 2008 a 2012.

Local e período estudado

O estudo foi desenvolvido na região administrativa de São José do Rio Preto localizada no noroeste paulista, composta por 102 municípios. (Figura 1).

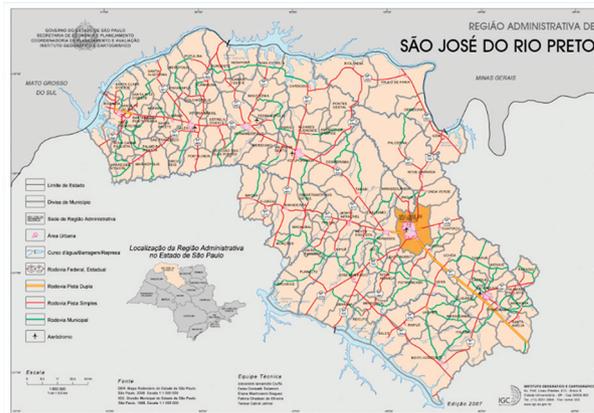


Figura 1. Mapa da região administrativa de São José do Rio Preto. Fonte: Disponível em: http://www.igc.sp.gov.br/produtos/mapas_ra.aspx?ra=7

Inquéritos epidemiológicos e protocolos para o diagnóstico da LV canina

Foram analisados os resultados dos testes sorológicos para o diagnóstico da LV canina, dos municípios participantes dos inquéritos caninos, no período 2008 a 2012.

Durante o período de estudo dos cães incluídos nos inquéritos sorológicos foi utilizada amostra de sangue coletado em papel de filtro tipo Whatman nº1 ou soro sanguíneo obtido de sangue venoso coletado em tubo seco. Por recomendação do Ministério da Saúde (MS), ao longo do tempo, foram utilizados quatro diferentes protocolos para a realização do diagnóstico sorológico para a LV canina:

(a) A partir de eluato de amostra de sangue coletado em papel de filtro Whatman nº1 examinado somente pela RIFI (protocolo 1) e, pelo EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório (protocolo 2);

(b) A partir de soro sanguíneo examinado pelo EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório (protocolo 3) e, pelo TR-DPP® como teste de triagem e o EIE como confirmatório (protocolo 4) (Figura 2).

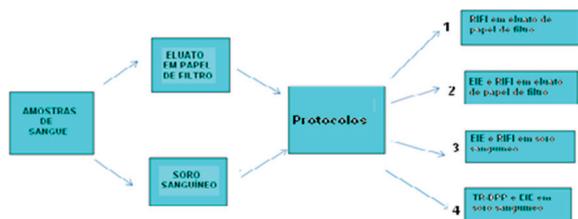


Figura 2. Esquema representativo dos protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, nos inquéritos sorológicos caninos no período de 2008 a 2012

No estado de São Paulo, até junho de 2010, as amostras de sangue dos cães eram coletadas em papel de filtro marca Whatman nº1, através de punção da ponta da orelha com uma lanceta, impregnando-se uma área mínima de 3x3 cm do papel de filtro padronizada, distribuída uniformemente na frente e no verso. As amostras eram acondicionadas à temperatura de 4°C ou 20°C por até 30 dias ou à -20°C até 60 dias da coleta, protegidas em saco plástico livre de umidade, conforme orienta a Nota Técnica da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) nº 03/2007 publicada no Diário Oficial do Estado (DOE) de São Paulo de 15/11/07.

A partir junho de 2010, as amostras de sangue dos cães passaram a ser coletadas por punção venosa, transferidas para tubo seco para obtenção de soro sanguíneo e submetidas ao diagnóstico da LV canina, conforme Nota Técnica da CCD nº2 02/2009 publicada no DOE de São Paulo de 24/12/09, que determina a substituição da utilização do eluato de sangue em papel de filtro por amostra de soro sanguíneo. O volume coletado varia de 1,0 a 3,0 ml, de acordo com o tamanho do cão.

Em 2012, o MS recomendou a uma nova substituição do protocolo, para o diagnóstico da LV canina quando da realização dos inquéritos sorológicos caninos em municípios com transmissão e/ou sob investigação de LV. No novo protocolo emprega-se o ensaio imunocromatográfico TR-DPP® como triagem

sorológica e o EIE como confirmatório.

Análise dos dados coletados

Para a análise dos dados, digitalizaram-se os resultados dos exames utilizados nos inquéritos soroepidemiológicos caninos em planilha *Excel*. Analisou-se o tempo médio para examinar todas as amostras coletadas nos diferentes períodos e protocolos, amostras consideradas inadequadas, ou de maior rejeição, ou seja, coletadas de forma incorreta ou apresentaram lipemia e hemólise e solicitação de nova amostra.

Na análise de concordância bruta entre os métodos empregados na triagem sorológica e teste confirmatório de diagnósticos da LV canina, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de concordância} = \frac{\text{Concordâncias}}{\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}} \times 100$$

Ética Animal

O estudo foi elaborado e executado seguindo-se as diretrizes e normas que regem as pesquisas envolvendo seres animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Instituto Adolfo Lutz sob o Parecer nº 06/2013.

RESULTADOS

Ao longo do período do estudo foram utilizados diferentes protocolos para o diagnóstico da LV canina. Das 45.343 amostras, 12.871 (28,4%) foram examinadas somente pela RIFI e 632 (1,4%) por EIE e RIFI, tendo sido ambos os grupos de amostras examinadas a partir de eluato de sangue coletado em papel de filtro; 22.387 (49,4%) por EIE e RIFI e 9.453 (20,8%) por TR-DPP® e EIE, sendo que nesses dois grupos foram examinadas amostras com soro sanguíneo (**Figura 3**).

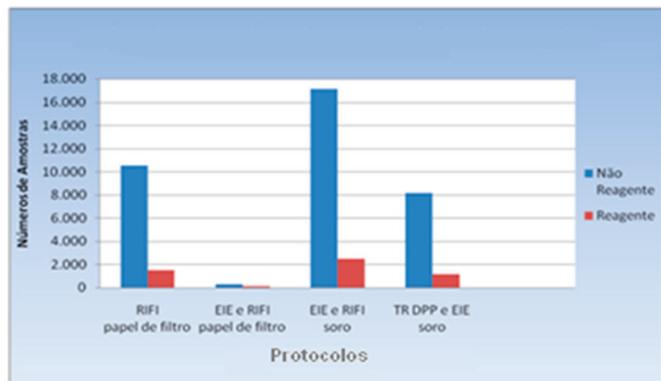


Figura 3. Resultados observados na utilização de diferentes protocolos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período 2008 a 2012

Neste estudo o primeiro protocolo utilizado, no período de setembro 2008 a junho de 2010, considerava a RIFI realizada com eluato de sangue coletado em papel de filtro como a única técnica laboratorial para o diagnóstico da LV canina. Nesse período a RIFI foi utilizada com objetivo duplo, teste de triagem para identificar as amostras não reagentes e, teste confirmatório para diagnosticar os animais infectados.

Das 12.871 amostras de sangue examinadas somente pela RIFI, 10.532 (81,8%) foram consideradas não reagentes, isto é, sem anticorpos anti-*Leishmania*, detectáveis pela técnica sorológica empregada; 1.519 (11,8%) apresentaram reatividade frente às promastigotas e 820 (6,4%) amostras foram consideradas inadequadas para realização do exame.

Concomitante ao período de utilização do protocolo 1, e por um período curto de avaliação, entre janeiro e fevereiro de 2010 foi utilizado o EIE como método de triagem sorológica e a RIFI como teste confirmatório, em amostras de eluato de sangue coletados em papel de filtro (protocolo 2). Foram examinadas 632 amostras, sendo que destas 458 (72,5%) foram consideradas não reagentes, 153 (24,2%) reagentes e 21 (3,3%) amostras inadequadas. Devido ao curto período em que este protocolo foi utilizado, procedeu-se apenas análise de concordância bruta entre os métodos que foi de 28,4%.

A partir de julho de 2010 até junho de 2012 utilizou-se o protocolo 3 para o diagnóstico da LV canina, substituindo-se o eluato de sangue coletado em papel de filtro por soro sanguíneo. Foram coletadas 22.387 amostras, sendo 17.123 (76,5%

não reagentes, 2.484 (11,1%) reagentes e 2.507 (11,2%) amostras consideradas inadequadas para a realização do exame. Não se observou diferença no percentual de reatividade entre os protocolos 2 e 3, ou seja, eluato de sangue colhido em papel de filtro e sangue total colhido em tubo seco.

A partir de julho de 2012 um novo protocolo 4, preconizado pelo MS inclui o ensaio imunocromatográfico TR-DPP® para a realização da triagem sorológica e o EIE como teste confirmatório. Das 9.453 amostras analisadas, 8.173 (86,5%) foram não reagentes, 1.185 (12,5%) reagentes, e 95 (1,0%) das amostras estavam inadequadas para análise.

Na análise das amostras consideradas inadequadas para a realização do diagnóstico da LV canina, foi observado que as amostras de sangue coletadas em tubos secos, para o protocolo 3, EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório foram as de maior rejeição, com solicitação de nova amostra (11,2%) 2.507/22.387. Dentre as causas estão: hemólise, lipemia; erros no tempo/rotação de centrifugação; armazenamento e transporte inadequados.

No período em que se utilizaram os protocolos 1,2 e 3, a quase totalidade das amostras foi processada, tanto por EIE quanto por RIFI, no Laboratório de Leishmaniose do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto. A partir da implantação do protocolo 4, com introdução do teste TR-DPP®, ocorreu um processo de descentralização, passando a responsabilidade da realização dos testes para os serviços municipais de saúde. Com a capacitação continuada dos agentes de zoonoses, houve uma diminuição expressiva do percentual de rejeição das amostras, de 11,2% (2.507/22.387) para 0,4% (95/9.453) (**Figura 4**).

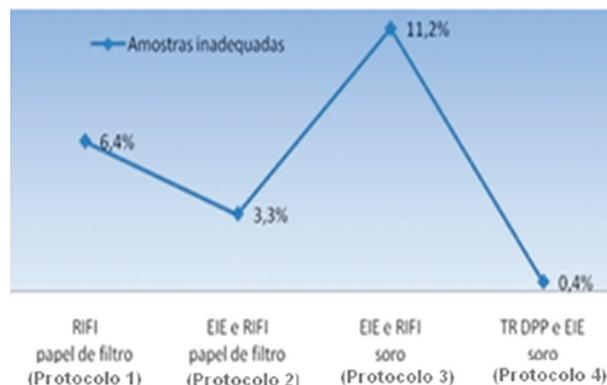


Figura 4. Taxas de rejeição de amostras coletadas no período de 2008 a 2012, para a realização do diagnóstico da leishmaniose visceral canina, segundo o protocolo utilizado

Comparando-se o tempo médio para examinar todas as amostras coletadas nos diferentes períodos e os protocolos diagnósticos utilizados, observou-se que o protocolo 1, de teste único, exame pela RIFI em amostras de eluato de sangue coletado em papel de filtro, consumiu 630 dias para o processamento de 12.785 amostras, o que representou a necessidade, em média, entre 60 e 90 dias para a liberação dos resultados de cada amostra examinada. No protocolo 4 com TR-DPP[®] como triagem sorológica e o EIE como teste confirmatório, foram 180 dias para examinar 9.801 amostras, em média, entre 15 a 20 dias para a liberação dos resultados. A linearidade aponta que o protocolo 4 demanda menor tempo (dias) em relação aos demais (Figura 5).

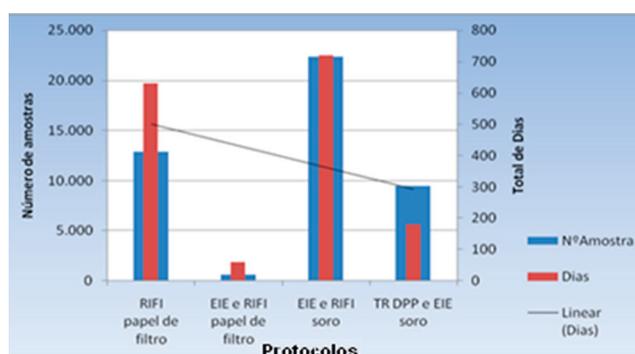


Figura 5. Relação entre os protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de estudo, e o tempo (dias) gasto para examinar todas as amostras recebidas

Em relação à avaliação das taxas de concordância bruta entre os métodos de diagnósticos da LV canina utilizados na triagem sorológica e teste confirmatório, o TR-DPP[®]/EIE apresentou melhor desempenho 58,5%.

DISCUSSÃO

O período entre 2008 e 2012 em análise no presente estudo incluiu a utilização de quatro diferentes protocolos para a realização dos diagnósticos para a LV canina. Além disso, até a metade do ano de 2010 trabalhou-se com eluato de amostras de sangue coletadas em papel de filtro. A partir de então somente foram examinadas amostras de soro sanguíneo.

No primeiro deles, apenas a RIFI foi utilizada para o diagnóstico laboratorial. Isso ocorreu num

período inicial de registros e investigações de focos de transmissão da LV canina em diversos municípios da região de São José do Rio Preto.

Nesse período a RIFI cumpria simultaneamente dois papéis: teste de triagem para diagnosticar os animais soronegativos e teste confirmatório da infecção, tal como preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. A disponibilidade de uma única técnica para a identificação de animais que, em tese, uma vez diagnosticados sororreagentes deveriam ser recolhidos e submetidos à eutanásia representou uma das condições relacionadas por Costa e Vieira²⁸ sobre a insuficiência técnica para suportar o componente controle do reservatório canino.

As taxas de prevalência da infecção canina estiveram sempre em valores $\geq 9,5\%$, com média de 14,1% para todo o período. O quantitativo de novas coletas, em decorrência de amostras consideradas inadequadas variou entre 5,9 e 10,8% podendo ser explicado, em parte, por resultados “indeterminados”, em situações de zona cinza no ensaio imunoenzimático e, pela qualidade da amostra enviada ao laboratório.

Mesmo considerando as dificuldades para uma análise de desempenho entre os vários protocolos em razão de se tratar de conjuntos de amostras coletadas de animais e municípios distintos, em diferentes períodos, pode-se destacar que a cada novo protocolo utilizado adicionou características favoráveis à sua implementação.

Além da diminuição das taxas de rejeição de amostras foi possível: a inclusão de um segundo teste laboratorial e a necessidade de resultados reagentes em ambos os testes para a liberação de resultados positivos; a substituição do eluato de amostra coletada em papel de filtro pelo soro sanguíneo diminuindo assim as incertezas em relação à qualidade e tipo de papel de filtro utilizado eliminou as distorções relativas ao volume de amostra aplicado por unidade de área e sobre as condições de armazenamento até a entrega no laboratório; a inclusão de um novo teste no formato imunocromatográfico, como teste de triagem, com antígeno recombinante específico possibilitou a diminuição das taxas de rejeição de amostras e aumento do número de amostras examinadas, bem como descentralizando a execução do teste até o nível municipal pelas equipes de controle de zoonoses.

Observações semelhantes foram registradas por Costa e Vieira²⁸ e por Grimaldi et al²⁹.

O protocolo 4 atualmente em uso favorece uma diminuição considerável no tempo necessário para a realização do diagnóstico laboratorial, ou seja, desde a coleta da amostra até a liberação dos resultados. No período de utilização da RIFI em amostras coletadas em papel de filtro, em média eram necessários de 60 a 90 dias para a liberação dos resultados. Atualmente, com a utilização do teste imunocromatográfico são necessários entre 15 e 20 dias apenas.

Em relação às taxas de concordância bruta entre os métodos diagnósticos utilizados, ainda que protocolo 4 TR-DPP[®] (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância, atualmente, o teste EIE confirma pouco menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes.

De acordo com Laurenti et al³⁰, o TR-DPP[®] apresenta um bom desempenho como teste sorológico para LV canina, visto que detecta tanto cães assintomáticos e sintomáticos em proporções iguais. Apesar da sua sensibilidade ainda não ser a ideal, melhorou a precisão do novo protocolo de diagnóstico LV canina no Brasil, especialmente para os cães infectados. Considerando a maior especificidade de TR-DPP[®] (95,1% vs 77,8%), valor preditivo positivo (95,1% vs 81,1%) e valor de probabilidade positiva (18,3% versus 4,1%) em comparação com o EIE Biomanguinhos. Faz-se necessário a realização de estudos que considerem a utilização do TR-DPP[®] como um teste de confirmação, em vez de um teste de triagem como sugerido.

Coura-Vital et al²⁵, a partir de estudos realizados por inquéritos soropidemiológicos e de seguimento de uma coorte de cães, verificaram que com a utilização do protocolo TR-DPP[®] como teste de triagem e EIE como confirmatório, equivalente ao protocolo 4 do presente estudo, as taxas de prevalência e incidência para LV canina foram maiores do que aquelas observadas quando da utilização do EIE triagem e RIFI confirmatório, equivalente ao protocolo 3 do presente estudo, indicando que a magnitude da infecção em áreas endêmicas possa ter sido subestimada no passado. Esses mesmos autores²⁵ sugerem que em municípios endêmicos e com grande demanda de exames, dever-se-ia utilizar o

EIE para triagem e DPP para confirmação, pois isso facilitaria execução e reduziria o custo dessas ações.

Laurenti et al³⁰ afirma que os kits do EIE e RIFI distribuídos pelo MS, fornecidos por Biomanguinhos utilizam como antígeno de *Leishmania major like* (espécie causadora da leishmaniose cutânea), determinar resultados falso-positivos e negativos.

CONCLUSÃO

Ao longo do período considerado no presente estudo, cada protocolo utilizado adicionou características favoráveis à sua implementação, e diminuição das taxas de rejeição de amostras inadequadas. O protocolo 4 com o TR-DPP[®] como teste triagem, contribuiu para a diminuição das taxas de rejeição de amostras, e a descentralização da execução deste teste aumentou o número de amostras examinadas pelas equipes de controle de zoonoses dos municípios.

O protocolo atual, TR-DPP[®] e EIE, diminuiu o tempo (horas/dias) necessário para realização do diagnóstico laboratorial da LV canina. A concordância bruta entre os métodos utilizados no diagnóstico da LV canina revelou que embora o novo protocolo TR-DPP[®] (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância atualmente, o teste EIE confirma menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes. A discordância nos resultados entre o teste de triagem e o confirmatório indica a necessidade de busca por novas alternativas para o diagnóstico canino.

AGRADECIMENTOS

A Margarida G. Bassi, Diretora do Centro de Laboratórios Regional do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, pelo apoio e incentivo. Aos colegas Roberto M. Hiramoto e Helena H. Taniguchi, pela colaboração na revisão do texto.

Originado da Dissertação de Mestrado: Bertollo DMB – Aspectos soropidemiológicos da leishmaniose visceral no DRS XV Região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2016.

REFERÊNCIAS

1. Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):232-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
3. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo (SP): CCD/SUCEN; 2006. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/publicacoes/manuais-tecnicos>
4. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 1994;54:1-881.
5. Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr*. 2002;78(2):120-7. Disponível em: <http://www.jped.com.br/conteudo/02-78-02-120/port.asp>
6. Magalhães LF, Wilson TM, Magalhães AP. Quadro clínico de cães com leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. *Vet Not. (Online)*. 2013;18(Supl 2):77-82.
7. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>
8. Manson-Bahr PE. Diagnosis. In: Peters W, Killic-Kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p.703-29.
9. Medeiros MMC, Abreu MM. Epidemiologia clínica. In: Rouquayrol MZ, Gurgel M. *Epidemiologia e Saúde*. 7.ed. Rio de Janeiro(RJ): MedBook; 2013. p.149-76.
10. Gontijo CME, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):338-49. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v7n3/11.pdf>
11. Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. 3.ed. São Paulo (SP): Guanabara Koogan; 2011.
12. Drumond KO, Costa FAL. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(1):3-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652011000100002>
13. Marcondes M et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol*. 2011;175(1-2):15-9. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/42279>
14. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet*. 2007;12(71):34-42. Disponível em: <https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica-veterinaria-n7117>
15. Vexenat JA, Fonseca de Castro JA, Cavalcante R, Silva MRP, Batista WH, Campos JH et al. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Terezina, N. E. Brasil. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 1993; 70(3-4):467-72.
16. Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 1995;59(1):13-21. [https://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00738-X](https://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)00738-X)
17. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1)259-65. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>

18. Vigilato MAN. Distribuição especial da leishmaniose visceral canina e humana no município de Birigui [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98349>
19. Donato LR, Lima Junior FEF, Albuquerque R, Gomes MLS. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. *Rev Educ Contin Med Vet Zoot*. 2013;11(2):18-23. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/16219>
20. Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde*. 2008;17(2):107-16. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742008000200004>
21. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*. 2008;107(2):205-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.023>
22. Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Neto LS, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2010;173(3-4):330-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.07.012>
23. Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Cunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):185-93. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial66_2_completa/1127.pdf
24. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9):e822. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>
25. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Mopreira N et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(3):e91009. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>
26. Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Pires e Cruz MS, Alonso DP, Ribolla PEM et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2017;59: e39. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759039>
27. Burns-Junior JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(2):775-9. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.2.775>
28. Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(2):223-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000200013>
29. Grimaldi GJr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto I, Azevedo CT et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path-Platform technology (DPP[®] CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(1):54-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>
30. Laurenti MD, Santana Leandro MVJr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CSF et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodignosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014;205(3-4):444-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>