

FERNANDO LUIZ LIMA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS DE ROTINA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

TERESINA/PI

2009

FERNANDO LUIZ LIMA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS DE ROTINA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

TERESINA/PI

2009

048a Oliveira, Fernando Luiz Lima de
Avaliação dos métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina/Fernando Luiz Lima de Oliveira.
Teresina, 2009.
27f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

1. Leishmaniose visceral canina. 2. ELISA. 3. IFI. I. Título.

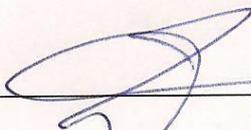
CDD 637.708 969.364

**MÉTODOS SOROLÓGICOS DE ROTINA NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Fernando Luiz Lima de Oliveira

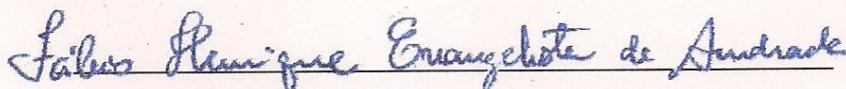
Dissertação aprovada em: 30/09/2009

Banca examinadora:



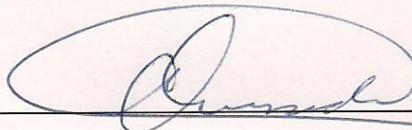
Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa – CCA/UFPI

Orientador



Prof. Dr. Fábio Henrique Evangelista de Andrade - UEMA

Examinador externo



Profª. Drª Ana Maria Quessada – CCA/UFPI

Examinadora interna

DEDICO

Aos meus pais, Luiz e Zulminda Oliveira, que, com extrema fé em Deus, dedicação e retidão de caráter, me dão exemplo de vida até hoje.

À minha esposa Neumann Coelho, e meus filhos Rodrigo e Letícia, pedaços da minha alma e motivação da minha vida.

À minha madrinha, Francisca Lima Martins, que com sua coragem me mostra como enfrentar a vida na adversidade.

A todos que padecem de leishmaniose visceral nesse imenso e desassistido Brasil, principalmente as indefesas crianças, vítimas do egoísmo, ganância e incompetência de muitos que dedicam suas vidas a si próprios.

AGRADECIMENTOS

Ao criador da existência, a quem a ciência se dobra a cada descoberta.

Ao meu competente orientador, Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, cuja confiança me propiciou viver esse momento.

Ao meu co-orientador e amigo de longa data, Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos meus queridos e amados irmãos Haroldo, Sandra, Luzia e Ana, com quem compartilho minha herança genética e meu dia-a-dia com muito amor e respeito.

Aos demais membros da minha FAMÍLIA e aos amigos de infância que até hoje me acompanham, pelo apoio e carinho necessários.

Às Professoras Ivete Lopes de Mendonça e Maria do Socorro Pires e Cruz, cuja ajuda possibilitou a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos: Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, pelo incentivo a fazer o mestrado; Flaviane Alves de Pinho, que conheci durante o mestrado e admiro pela sua maneira de ser e inteligência que a levará onde quiser; Nilton Andrade Magalhães, Kleverton Ribeiro da Silva, Lucilene dos Santos Silva, Edson Egledson, Luanna Vasconcelos, Larissa Maria, enfim, a todos que conheci nesta empreitada, e que me fizeram passar por muitos momentos felizes.

À Gerência de Zoonoses de Teresina, ao Laboratório de atividades anti-*Leishmania*, ao Laboratório de Sanidade Animal e ao Hospital Veterinário Universitário da UFPI pelo apoio, disponibilização de dados, materiais, equipamentos e imunobiológicos para a realização desta pesquisa.

Aos companheiros do Laboratório de Leishmaniose da Gerência de Zoonoses, Maria Dilsilene, Edilcastro Amorim, Kaline Holanda, Washington Mendes e Maria José Pereira, que trabalharam muito mais que eu na confecção das sorologias para este estudo, sendo de fato co-autores deste trabalho.

Aos Professores, Colegiado e Funcionários e da Pós-Graduação, que, com dedicação e competência, me ajudaram em todas as etapas desse período.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 CAPÍTULO 1: Métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose visceral canina	8
RESUMO	8
ABSTRACT	8
2.1. INTRODUÇÃO	9
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.3. RESULTADOS	11
2.4. DISCUSSÃO	12
2.5. CONCLUSÕES	14
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	18

OLIVEIRA, Fernando L. L.; CARVALHO, Fernando A. A.; MENDONÇA, Ivete L.; COSTA, Francisco A. L. Métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose visceral canina [Serological methods of routine in the diagnostic of canine visceral leishmaniasis] **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam uma alta taxa de incidência no mundo, inclusive no Brasil. Os cães são considerados reservatórios domésticos importantes no ciclo infeccioso da leishmaniose visceral. O Ministério da Saúde recomenda a utilização do teste ELISA indireto para a triagem inicial dos cães suspeitos e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a confirmação dos casos positivos. Mas, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil é um problema de saúde pública devido a fatores como: sinais clínicos semelhantes a outras doenças, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível. Visando analisar o desempenho dos kits IFI e ELISA (Biomanguinhos/FIOCRUZ) usados na rotina de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, foram analisados 75 soros de cães parasitologicamente positivos para LV (esfregaços ou cultura de pele, medula ou linfonodos) atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI e 14 soros de cães de região indene para a doença em ambas as provas. A análise dos testes separadamente revelou uma sensibilidade (S) de 79% e uma especificidade (E) de 100% para o IFI e respectivamente de 98% e 100% para o ELISA, com concordância Kappa de 0,83. Associados em paralelo, os testes obtiveram S=74% e E=100%, ao passo que em série os valores foram S=76% e E=98%, não mostrando diferença significativa das análises individuais dos mesmos. Como a associação dos testes concorre para a obtenção de resultados mais seguros, com menos falso-negativos e falso-positivos, recomenda-se o uso dos testes combinados em paralelo, fazendo a triagem inicial com ELISA e submetendo os negativos no primeiro teste ao IFI, diminuindo assim o tempo entre a coleta de sangue e a remoção e eutanásia do cão infectado.

Palavras-chave: *Leishmania*, IFI, ELISA, cão, soro

OLIVEIRA, Fernando L. L.; CARVALHO, Fernando A. A.; MENDONÇA, Ivete L.; COSTA, Francisco A. L. Methods of routine in the diagnostic of canine visceral leishmaniasis [Métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose visceral canina] **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

Leishmaniasis are parasitic disease caused by protozoon of the genus *Leishmania* wich present one high incidence rate in the world including Brazil. The dogs are considered important domestic reservoirs in the infectious cycle of visceral leishmaniasis. The Health Department recommends the use of test indirect ELISA for the initial selection of the dogs suspicious and the reaction of indirect immunofluorescent (IFI) for the confirmation of the positive cases. However the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil is a public health problem due to factors such as clinical signs similar to other diseases, non-specific histopathological changes and lack of a diagnostic test 100% specific and sensitive. To study the performance of IFA and ELISA kits (Biomanguinhos / FIOCRUZ) used in routine diagnosis of canine visceral leishmaniasis, we analyzed sera from 75 positive parasitologically dogs to LV (smear or culture of skin, bone marrow or lymph nodes) enrolled in the University Veterinary Hospital of the UFPI and 14 sera from dogs of region unaffected for the disease in both events. A separate analysis of the tests showed a sensitivity (S) 79% and a specificity (Sp) 100% for the IFI and 98% and 100% for ELISA respectively, with Kappa of 0.83. Associates in parallel, the tests obtained $S = 74\%$ and $E = 100\%$, while in series the values were $S = 76\%$ and $E = 98\%$, showing no significant difference in the individual analysis. As the pool of competing tests to obtain more reliable results with fewer false negatives and false positives, we recommend the use of combined tests in parallel, doing the initial screening with ELISA and subjecting the negatives in the first test to the IFIs thereby reducing the time between blood collection and removal and euthanasia of the infected dog.

Keywords: *Leishmania*, IFI, ELISA, dogs, sera

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam uma alta taxa de incidência no mundo, inclusive no Brasil. Nos hospedeiros vertebrados, incluídos o cão e o homem, a doença pode se apresentar na forma cutânea, de cura espontânea, muco-cutânea e na forma visceral, fatal para o homem, se não tratada (GRIMALDI; TESH, 1993). São endêmicas em aproximadamente 88 países. Desses, 72 são considerados países em desenvolvimento e, neste grupo, 13 países estão incluídos como apresentando a menor taxa de desenvolvimento mundial (DESJEUX, 2004).

A *Leishmania* compreende duas formas distintas morfológicamente: amastigota e promastigota. As amastigotas são formas arredondadas, aflageladas, altamente infectantes e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. São parasitas intracelulares obrigatórios, sendo encontradas no interior de células fagocíticas, como os macrófagos, no hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são formas alongadas, possuem um flagelo longo, são menos infectantes em relação às amastigotas e são encontradas no hospedeiro invertebrado, um díptero da espécie *Lutzomyia longipalpis*. (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000).

Atualmente, estima-se que cerca de 380 milhões de pessoas encontram-se expostas aos riscos de infecção e que 12 milhões estejam desenvolvendo uma das formas da doença. A cada ano ocorrem 1,5 a 2 milhões de novos casos, dos quais cerca de 500.000 correspondem a casos de leishmaniose visceral (LV) (DESJEUX, 1996; WHO, 2000). Por tais motivos, as leishmanioses são classificadas como uma das seis principais endemias que afetam os países em desenvolvimento (WHO, 1993).

A LV tem ampla distribuição, ocorrendo em países da Ásia, da Europa, do Oriente Médio, da África e das Américas, onde é denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou “calazar neotropical”. Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na região Nordeste (BRASIL, 2004).

Duas décadas após o registro da primeira epidemia urbana registrada na cidade de Teresina, no estado do Piauí (COSTA et al., 1990), já foram diagnosticados casos autóctones em São Luís (MA), Fortaleza (CE), Natal (RN), Aracaju (SE), Belo Horizonte (MG), Santarém (PA), Corumbá (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO),

Araçatuba (SP) (BRASIL, 2006). No município de Teresina, no período de 2000 a meados de 2009, foram registrados 1.342 casos e 87 óbitos humanos (FMS, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Casos e óbitos por leishmaniose visceral humana no município de Teresina, no período de 2000 a meados de 2009.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
Casos	179	101	149	239	193	140	115	78	98	50	1342
Óbitos	25	13	20	31	7	8	9	6	10	10	139
Total	204	114	169	270	200	148	124	84	108	60	1481

Fonte: SINAN-FMS

Os cães são considerados reservatórios domésticos importantes no ciclo infeccioso da leishmaniose visceral (KEENAN et al., 1984) e compreendem a principal fonte de infecção para os vetores flebotômíneos, devido à elevada prevalência da infecção canina, quando comparada à infecção humana. Cães infectados, mesmo se assintomáticos, podem apresentar grande quantidade de parasitas na pele, fato que favorece a infecção do vetor e, conseqüentemente, a transmissão para o homem (MONTEIRO et al., 1994). No Continente Americano, a principal espécie causadora da leishmaniose visceral é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (LAINSON; SHAW, 1987).

As manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC) podem variar consideravelmente, dependendo de vários fatores, como a interação com a espécie infectante, a fase atual da doença e a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. O período de incubação da doença pode variar de 1 mês a 4 anos (LANOTTE et al., 1979; KEENAN et al., 1984). Comumente ocorrem a linfadenomegalia, o enfraquecimento crônico do animal (caquexia), as lesões cutâneas como alopecia, úlceras, dermatite esfoliativa e onicogribose, anemia, hepatoesplenomegalia, disfunção renal severa e colites (ABRANCHES et al., 1991; FERRER et al., 1991; CIARAMELLA et al., 1997; FONT; CLOSA, 1997; TAFURI et al., 2001), porém, cães infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, mantendo a infecção no ambiente.

As medidas de controle da leishmaniose visceral (LV), atualmente adotada pelos órgãos governamentais, preconizam o tratamento das pessoas doentes, o emprego de inseticidas nas residências para eliminação do vetor e a eutanásia de cães infectados (BRASIL, 2004). Contudo, sabe-se que em áreas endêmicas, cerca de 60 a 80% dos

cães que tem contato com o parasita, como demonstrado pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* ou resposta imune mediada por célula específica, na maioria não tem sinais da doença. Além disso, sintomas sugestivos de outras doenças também são observados em alguns cães (GRADONI, 2002; BRYDEN et al., 2002), dificultando o diagnóstico de LVC nessas áreas (FERRER, 1991). Entretanto, todos esses animais são eutanasiados quando o diagnóstico da infecção é estabelecido, uma medida que gera sérios transtornos para os órgãos responsáveis pelo controle da enfermidade. Por outro lado, sabe-se, também, que somente parte dos animais infectados, efetivamente, transmite a doença; que o parasitismo da pele de cães não ocorre na mesma intensidade em todas as fases da infecção, pois a infecção do vetor é mais provável de ocorrer quando ele se alimenta em cães em um estágio mais avançado da doença (KEENAN et al., 1984).

Nesse contexto, o controle da LVC é de suma importância para a redução de casos humanos, mas esse controle deve ser feito de forma mais criteriosa, de modo a levar em consideração o cão como um fator de risco real para a transmissão da LV para o homem e não adotar, simplesmente, a eliminação indiscriminada de animais, muitos provavelmente sem potencial de transmissão, como forma de controle, até mesmo porque em muitos estudos a exterminação pura e simples de cães não tem reduzido a incidência da enfermidade (COSTA; VIEIRA, 2001).

O diagnóstico da LVC no Brasil é um problema de saúde pública devido a fatores como: sinais clínicos semelhantes a outras doenças, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL, 2006)

Até a década de 1930, no Brasil, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como a punção de fígado, de baço e o raspado de pele. Esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, mas não eficazes para realizar um levantamento epidemiológico que requer um procedimento fácil, rápido e seguro (ADLER; THEODOR, 1932).

Assim, em 1938, o exame sorológico, realizado pela fixação do complemento (RFC), foi utilizado pela primeira vez, para diagnosticar a leishmaniose visceral humana. Em 1957, foi descrita a RFC para inquéritos caninos (FLEMMINGS et al., 1984). Desde então, buscou-se o aprimoramento ou novas técnicas para utilização em levantamentos epidemiológicos e que assegurasse um resultado confiável, para que medidas preventivas fossem tomadas contra a disseminação da doença. Desse modo foi

adotada, no Brasil, a imunofluorescência indireta (IFI) como padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina (BRASIL, 2006).

Utilizada desde a década de 1960, a IFI demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos e os da leishmaniose tegumentar americana (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Assim, a necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 1970, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-padrão. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoraram a sensibilidade e especificidade da técnica (COSTA et al., 1991; OZENZOY, 1998)

O Ministério da Saúde recomenda a utilização do teste ELISA indireto para a triagem inicial dos cães suspeitos e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a confirmação dos casos positivos. O material recomendado para o diagnóstico sorológico da LVC é o soro sanguíneo e, em algumas situações, o eluato de sangue embebido em papel de filtro, considerando-se positivos os soros reagentes nas diluições iguais ou superiores a 1:40 (BRASIL,2006).

Essas duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, o ELISA por estar em fase de implantação, inicialmente está sendo recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2006).

A RIFI é de fácil execução, utiliza como antígeno promastigotas de *L. donovani* fixadas em lâmina; outra vantagem é a possibilidade de pesquisa tanto de IgG quanto de IgM, que é importante pela precoce positividade (MARZOCHI et al., 2001; GENARO, 2003).

A reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose humana (complexo *Leishmania major like*), é o teste padrão ouro de referência para diagnóstico humano no Brasil (LAURENTINO-SILVA, 1999) e também muito utilizado em Medicina Veterinária para diagnóstico da leishmaniose canina. A titulação de 1:40 para o cão e 1:80 para humano foi estabelecida como padrão também para o diagnóstico pela RIFI (TÁVORA, 2004).

O ELISA para leishmaniose canina (complexo *Leishmania donovani*), consiste em um teste elaborado por Avrameas et al. (1992), e modificado por Laurentino-Silva (1999) (kit Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), onde o resultado é obtido por meio da visualização da alteração de cor sem o auxílio de equipamentos mensuradores de absorvância (TÁVORA, 2004).

Os métodos diagnósticos por sorologia, por suas características próprias, são os de eleição e são largamente empregados pela sua fácil e rápida execução, bem como sua confiabilidade em certas condições, como as de campanhas de saúde pública, onde são examinados grandes contingentes populacionais. O teste parasitológico é o método conclusivo de diagnóstico da doença; é considerado o padrão ouro. Por meio dele, faz-se a detecção e a identificação do parasita a partir de biópsias ou aspirados de tecidos. Outras técnicas, como a imunohistoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) também são utilizadas, porém, não têm a praticidade de serem empregadas em triagens de campo (KEENAN et al., 1984; TAFURI et al., 2001; TAFURI et al., 2004).

Na LVC é difícil a correlação de sinais clínicos, carga parasitária e sorologia, pois, os títulos elevados de anticorpos na RIFI nem sempre estão correlacionados com os sinais clínicos e o grau de parasitismo nem sempre está associado aos sintomas (MADEIRA et al., 2004; SOUZA et al., 2004). Braga et al. (1998), observaram em seus experimentos que o ELISA utilizando soro de cão, mostrou-se 4,6 vezes mais sensível que RIFI do eluato de papel filtro, pois detectaram maior número de cães precocemente infectados. Mesmo assim, ainda é um desafio a existência de um teste de fácil acesso a população que apresente, paralelamente, especificidade e sensibilidade elevadas (ROURA et al., 1999).

Ressalta-se ainda, que a especificidade dos testes sorológicos é comprometida quando são utilizados em áreas endêmicas para outras parasitoses, como a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar, uma vez que se observa uma elevada reatividade cruzada nas amostras de soro dos animais em relação aos antígenos dos parasitas (MANCIANTI et al., 1996; FERRER, 1999). Dessa forma, tais fatores vêm a acarretar taxas de infecções subestimadas e, conseqüentemente, permitir a manutenção dos animais infectados nas áreas endêmicas.

Durante a epidemia de 1993-1997 em Belo Horizonte-MG, foram realizadas pesquisas sorológicas para detecção de animais positivos pela RIFI e, dos 15.117 animais identificados como positivos, 12.925 seriam falsos positivos e, que, em função dos valores preditivos negativo (99,5%) e positivo (14,5%), existe uma elevada

confiança no resultado negativo de um animal, não sendo verdade tal assertiva para um que apresente exame com resultado positivo para LV pela RIFI. O autor completa dizendo que esses resultados demonstram a necessidade de um exame mais seguro e específico para o diagnóstico da leishmaniose canina, principalmente em áreas endêmicas que necessitam de uma ação da Vigilância mais eficaz no controle da doença (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Como visto, a RIFI é o teste padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana. Sendo assim, ELISAs utilizando antígenos quimicamente definidos e específicos do parasita têm sido propostos para o diagnóstico da LVC e LVH. O antígeno recombinante K39 (rK39), um epitopo imunodominante repetitivo em uma proteína relacionada a kinesina, e muito conservado entre as espécies de leishmanias viscerotrópicas, têm se mostrado sensível e específico para o diagnóstico da LVC e LVH (BADARÓ et al., 1996; SCALONE et al., 2002). Outro antígeno considerado candidato para o diagnóstico da LV é o recombinante A2. Este é expresso em amastigotas como uma família de proteínas que apresenta um número de repetições de dez aminoácidos (ZHANG et al., 1996). Estudos sugerem que o recombinante A2 é particularmente útil para o diagnóstico da LVC (CARVALHO et al., 2002).

Assim, visando encontrar uma alternativa à utilização do teste de RIFI isoladamente para execução de inquéritos em áreas endêmicas, para diagnóstico da LVC foi desenvolvido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ um kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos (FERREIRA et al., 2000). Uma avaliação desse *kit*, utilizando amostras de soro de cães com diagnóstico clínico presuntivo de LVC, mostrou 53,1% e 37,7% de resultados concordantes negativos e positivos, respectivamente (FERREIRA et al., 2000). No entanto, um estudo do referido *kit* utilizando amostras de soro de cães com diagnóstico clínico e parasitológico positivo, mostrou-se necessário para uma avaliação segura do desempenho do *kit*, principalmente quando se trata de áreas endêmicas como a cidade de Teresina-PI.

Este trabalho teve como objetivo verificar a eficácia do teste ELISA, para detecção de anticorpos contra *Leishmania sp* em cães, comparando-o com o RIFI e investigar o perfil sorológico desta zoonose na área endêmica de Teresina-PI.

A estrutura formal desta dissertação está distribuída da seguinte forma: resumo geral, seguido de abstract, uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos, e um artigo intitulado “Métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose

visceral canina”, a ser encaminhado para publicação na Revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” de acordo com as normas da revista e referências bibliográficas gerais.

2. CAPÍTULO I

Avaliação dos métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Fernando Luiz Lima de Oliveira¹, Fernando Aécio Amorim Carvalho², Ivete Lopes de Mendonça³, Francisco Assis Lima Costa⁴

¹Gerência de Controle de Zoonoses de Teresina-GEZON, Rua Minas Gerais, 909, 64003-850 Teresina, PI, Brasil.

²Universidade Federal do Piauí/Departamento de Bioquímica e Farmácia/Centro de Ciências da Saúde.

³Universidade Federal do Piauí/Laboratório de Sanidade Animal/Centro de Ciências Agrárias.

⁴Universidade Federal do Piauí/Centro de Ciências Agrárias/Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Campus Socopo – 64049-550, Teresina-Piauí-Brasil, fassisle@gmail.com.

RESUMO

Visando analisar o desempenho dos kits RIFI e ELISA (Biomanguinhos/FIOCRUZ) usados na rotina de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, foram analisados 75 soros de cães parasitologicamente positivos para LV (esfregaços ou cultura de pele, medula ou linfonodos) atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFPI e 14 soros de cães de região indene para a doença em ambas as provas. A análise dos testes separadamente revelou uma sensibilidade (S) de 79% e uma especificidade (E) de 100% para o IFI e de 98% e 100% para o ELISA, respectivamente, com concordância Kappa de 0,83. Associados em paralelo, os testes obtiveram S=74% e E=100%, ao passo que em série os valores foram S=76% e E=98%, não mostrando diferença significativa das análises individuais dos mesmos. Como a associação dos testes concorre para a obtenção de resultados mais seguros, com menos falso-negativos e falso-positivos, recomenda-se o uso dos testes combinados em paralelo, fazendo a triagem inicial com ELISA e submetendo os negativos no primeiro teste ao IFI, diminuindo assim o tempo entre a coleta de sangue e a remoção e eutanásia do cão infectado.

Palavras-chave: sorologia, leishmaniose, cão

ABSTRACT

To study the performance of RIFI and ELISA kits (Biomanguinhos / FIOCRUZ) used in routine diagnosis of canine visceral leishmaniasis, were analyzed serum from 75 dogs with VL positive parasitologically (smear or culture of skin, bone marrow or lymph nodes) from the University Veterinary Hospital of the UFPI and 14 serum from dogs of region unaffected for the disease in both tests. A separate analysis of the tests showed a sensitivity (S) of 79% and specificity (E) of 100% for the RIFI and 98% and 100% for ELISA, respectively, with Kappa of 0.83. Associates in parallel, the tests obtained S = 74% and E = 100%, while in series the values were S = 76% and E = 98%, showing no significant difference in the individual analysis of the same. As the association of the tests compete to obtain more reliable results with fewer false negatives and false positives, we recommend the use of combined tests in parallel,

doing the initial screening with ELISA and subjecting the negatives in the first test to the RIFI thereby reducing the time between blood collection and removal and euthanasia of infected dogs.

Key words: serology, leishmaniasis, dog

2.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose endêmica em muitos países tropicais, sendo considerada uma doença emergente em expansão no mundo. Estima-se que em 60 países onde é considerada endêmica, cerca de 200 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirir a infecção (Dourado et al. 2007). Na América Latina 90% dos casos ocorrem no Brasil (Tesh 1995), tendo a doença sido registrada do norte do Pará ao sul do Paraná (Ministério da Saúde 2006). Entre 2001 e 2006, 20.530 casos de LV humana foram notificados pelo Ministério da Saúde. Na cidade de Teresina, capital do Estado do Piauí, no período de 2000 a meados de 2009, foram notificados 1.342 casos de LV humana, com 87 óbitos, com letalidade de 15,4% (SINAN-FMS 2009).

Em áreas endêmicas, cães domésticos representam o principal reservatório da doença, com uma prevalência que vai de 1% a 36% (Lira 2005). Tal importância parece ser devida ao alto parasitismo cutâneo, bem como pelo fato do cão apresentar-se infectado em quase todos os focos de LV humana no Brasil (Machado et al. 2008), por esse motivo, a identificação de cães infectados é importante no controle da doença humana (Ashford et al. 1998).

A demonstração do parasito em esfregaços de baço, medula óssea ou fígado permite o diagnóstico definitivo da leishmaniose visceral canina (LVC), porém são métodos invasivos e de baixa sensibilidade, além de serem inadequados para inquéritos epidemiológicos. Métodos moleculares de alta sensibilidade detectam o DNA do parasito, mas são restritos a laboratórios de pesquisa (Lira 2005). O teste ideal para o diagnóstico da LVC deve ser barato, de simples aplicação, além de sensível e específico (Carvalho et al. 2002).

Pelo fato do cão com LV apresentar altos níveis de anticorpos, diversos métodos sorológicos têm sido empregados em inquéritos epidemiológicos. O Ministério da Saúde do Brasil recomenda a utilização do teste ELISA para triagem inicial e a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) para confirmação dos casos positivos e que esses métodos sejam testados e padronizados nas diferentes regiões endêmicas de ocorrência da doença (Ministério da Saúde 2006).

O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho do RIFI e do ELISA isolados e associados, em área endêmica para LVC, para padronização e utilização posterior pela Gerência de Zoonoses do município de Teresina, como forma de atender às recomendações do Ministério da Saúde.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Foram utilizados soros de cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos, atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), na cidade de Teresina, capital do Piauí, bem como amostras de soros de

cães importadas da cidade de Curitiba, capital do Paraná, região indene para leishmaniose visceral (LV).

As amostras oriundas do HVU foram coletadas no período de janeiro de 2008 a maio de 2009, obtidas da demanda espontânea de animais com sinais clínicos sugestivos de LV. Os soros dos cães de Teresina e de Curitiba foram cedidos gentilmente respectivamente pelas Professoras Ivete Lopes de Mendonça e Maria do Socorro Pires e Cruz, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, e, após coletados, foram armazenados a -20°C até o uso.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o guia brasileiro para cuidado e uso de animais de laboratório (Projeto número 3.964/97 – <http://www.planalto.gov.br>).

Formação dos grupos de animais

Os cães foram divididos em quatro grupos: grupo 1 (G1), cães infectados e sem sinais clínicos de LV (n=9); grupo 2 (G2), cães infectados e com apenas um sinal clínico (linfadenomegalia) para LV (n=38); grupo 3 (G3), cães infectados e com dois ou mais sinais clínicos para LV (n=28); e grupo 4 (G4) formado por cães não infectados e sem sinais clínicos (n=14). O exame parasitológico dos grupos consistiu de esfregaços combinado com cultura de pele, medula ou linfonodos.

Diagnóstico parasitológico

A coleta de material foi realizada por punção da medula do osso esterno com agulha 40x20 acoplada à seringa de 20 ml e aspirado de linfonodo poplíteo com seringa de 10 mL, acoplada à agulha 25x7. Em seguida foi feito esfregaço em lâmina corado pelo Giemsa e observado com objetiva de 100x. O material também foi semeado em meio de cultura NNN enriquecido com Schneiders (Sigma-Aldrich).

Diagnóstico sorológico

O diagnóstico de LVC foi confirmado pela detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, pelo teste de RIFI (lote 08ULC0127/Biomanguinhos/FIOCRUZ) e ELISA (098EL008Z/Biomanguinhos/FIOCRUZ), no Laboratório de Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPI, sendo feita a titulação dos soros na RIFI a partir de 1/40 até 1/640 e no ELISA a 1/100, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os kits foram cedidos pelo Laboratório da Gerência de Zoonoses de Teresina.

Análise estatística

A avaliação da sensibilidade e da especificidade, bem como dos valores preditivos positivo e negativo foram estimados segundo Ferreira e Ávila (2001), com a utilização de uma tabela de dupla entrada em que se relacionam diagnóstico da doença e o resultado do teste.

A análise dos testes associados, em paralelo e em série, foi realizada por meio das fórmulas utilizadas pelo programa estatístico WIN EPISCOPE 2.0. Considerou-se associação em paralelo quando a reação foi positiva em pelo menos um dos testes, e em série quando a reação foi positiva nos dois testes (Lira et al. 2005).

A concordância entre os testes IFI e ELISA nos grupos de animais foi avaliada por meio do indicador *Kappa* (K), onde a máxima proporção de concordância não devida ao acaso foi o máximo valor encontrado para k , ou seja, $k=1$. Para o cálculo, dividiu-se o número total de observações concordantes pelo número total de observações, classificando a concordância segundo Andrade e Zicker (1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de concordância do indicador *Kappa*

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhum
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Andrade e Zicker (1997)

2.3 RESULTADOS

Neste estudo foram diagnosticados parasitologicamente 75 cães com LV, dos quais nove não apresentaram sinais clínicos sugestivos da doença (constituindo o G1), e 66 apresentaram sinais clínicos, sendo 38 apenas com linfadenomegalia (G2) e 28 com dois ou mais sinais (G3). Formaram o G4 quatorze cães, caracterizando o grupo controle.

Com relação ao desempenho dos kits RIFI e ELISA, o primeiro apresentou uma sensibilidade de 79% e uma especificidade de 100%, enquanto que o segundo obteve 96% de sensibilidade e 100% de especificidade, quando analisadas todas as amostras em conjunto (tabela 2), evidenciando que os testes sorológicos tiveram desempenho semelhante para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*.

Tabela 2. Avaliação do RIFI e EIE-LV frente ao critério parasitológico

TESTES	Parasitológico			
	Positivo	Negativo	TOTAL	
IFI-LVC	Positivo	59	0	59
	Negativo	16	14	30
	TOTAL	75	14	89
EIE-LVC	Positivo	72	0	72
	Negativo	3	14	17
	TOTAL	75	14	89

RIFI-LVC = reação de imunofluorescência indireta-leishmaniose visceral canina; ELISA-LVC = ensaio imunoenzimático-leishmaniose visceral canina.

O valor preditivo positivo (VPP), que se refere à probabilidade de ter a doença se o resultado for positivo, foi de 100% para a RIFI e para ELISA, enquanto que o valor preditivo negativo (VPN), que se refere à probabilidade de não ter a doença quando o resultado for negativo, foi de 47% e 82% para RIFI e ELISA respectivamente.

A análise estatística dos testes associados em paralelo revelou uma sensibilidade de 74% e uma especificidade de 100%, e em série mostrou sensibilidade de 76% e especificidade de 98%.

A concordância dos resultados obtidos no RIFI e no ELISA, avaliada por meio do índice Kappa (K) foi de 0,83, considerada ótima pela escala de concordância do indicador Kappa. Analisada separadamente entre os diferentes grupos de animais, a concordância foi perfeita no G4 ($k=1$), ótima no G1 e G2 ($k=0,89$ e $k=0,86$ respectivamente) e regular no G3 ($k=0,5$).

2.4 DISCUSSÃO

Os relatos clínicos e os inquéritos sorológicos em cães realizados nas últimas quatro décadas avaliaram o aumento na transmissão humana da LV, colocando o Piauí entre os quatro estados do nordeste onde a população é mais parasitada, bem como identificando surtos epidêmicos a cada 5 ou 10 anos, como os ocorridos em Teresina entre 1980 e 1986 e entre 1992 e 1996 (Rey et al. 2005). A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários) é de grande importância no controle do reservatório em grandes áreas, bem como na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência. Por meio deles, foram detectados índices de 9,7% em Montes claros, Minas Gerais, e 40,3% em Paulista, Pernambuco. Em Cuiabá, Mato Grosso, estudos recentes revelaram uma queda na prevalência canina de 64% para 8,4% (Almeida et al. 2009).

Baseado no fato do cão ser considerado o principal reservatório urbano da doença, e a enzootia canina preceder a ocorrência de casos humanos, além de ter maior prevalência (Ministério da Saúde 2006), a identificação, remoção e eutanásia do animal com LV é medida recomendada pelo Ministério da Saúde para o controle da doença (Alves & Bevilacqua 2004). Alguns fatores dificultam a identificação de cães com LV em área endêmica: a semelhança com outras enfermidades, além da existência de um elevado número de cães assintomáticos e oligosintomáticos (Ministério da Saúde 2006). Dessa forma, para garantir que os cães positivos para LV sejam rapidamente removidos, é necessário o uso de testes de diagnóstico com resultados rápidos e seguros (Lira et al. 2005). Os testes utilizados neste estudo (RIFI e ELISA) apresentaram boa sensibilidade e especificidade, demonstrando que os mesmos podem detectar uma grande população de animais infectados e, assim, identificar a população de cães que deve ser retirada da área de ocorrência da enfermidade.

Em Teresina, onde o controle da LV está a cargo da Gerência de Zoonoses, no período de 1995-2006 foram diagnosticados pelo RIFI 296.729 cães, com um percentual de positividade de 5,31% (15.745 casos) e eutanasiados 54,90% dos diagnosticados, correspondendo a 8.645 animais (Aragão et al. 2006). Na epidemia de 1993 a 1997, em Belo Horizonte – MG foram examinados pelo mesmo método 415.683 cães, e 15.117 identificados como positivos. Segundo estudo de Alves e Bevilacqua (2004), 85,5% (12.925) dos 15.117 seriam falso-positivos, e 2.003, entre os 400.556 negativos, seriam falso-negativos.

O ELISA, em virtude de sua automação, melhor desempenho e uso de antígenos recombinantes ou purificados que melhoram sua sensibilidade e especificidade, eliminaria a subjetividade do IFI (Alves & Bevilacqua 2004).

O Ministério da Saúde (MS) recomenda o uso combinado da RIFI e do ELISA para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos, sendo o ELISA, por estar em fase de implantação, recomendado inicialmente para triagem e a RIFI para confirmação

dos cães sororreagentes ao teste ELISA, ou como uma técnica diagnóstica de rotina. Outra importante recomendação do MS é a realização periódica do controle de qualidade desses exames (Ministério da Saúde 2006), em área endêmica. Considerando que a Gerência de Zoonoses de Teresina executa diariamente cerca de 200 reações pela RIFI e ELISA, conforme recomendação do Ministério da Saúde, verificou-se a necessidade de avaliação dos kits disponibilizados para tal, tendo em vista que nenhum estudo neste sentido já foi feito, sendo este o primeiro a ser realizado no Piauí.

No presente trabalho, a análise do RIFI-LVC realizada nos quatro grupos mostrou uma sensibilidade de 79% e uma especificidade de 100%. Já para o ELISA-LVC, os valores encontrados para sensibilidade e especificidade foram de 96% e 100%, respectivamente. Em trabalho semelhante, realizado por Lira et al. (2005), analisando os mesmos kits na Região Metropolitana de Recife, área endêmica para LV, foram encontrados valores de 68% e 87,5% para as respectivas sensibilidade e especificidade no IFI-LVC, e de 72% e 87,5% para os mesmos parâmetros no ELISA-LVC. Os valores maiores de sensibilidade e especificidade em nosso estudo podem ser devido à casuística utilizada, vez que foram escolhidas para o estudo somente amostras parasitologicamente positivas para os grupos G1, G2 e G3, e somente amostras negativas para o G4.

Visando comparar os métodos de RIFI e ELISA realizados em cinco dos oito diferentes laboratórios de Belo Horizonte, MG, que os executam, foram enviadas a cada um deles 86 amostras de soros de cães com diagnóstico parasitológico positivo e 57 de cães com diagnóstico parasitológico e sorológico negativos, para que fossem processadas de acordo com suas respectivas rotinas. Em três laboratórios, a sensibilidade de ambos os métodos foi de 100%, e em dois laboratórios distintos foi de 98,8%. Houve variação na especificidade, sendo a da RIFI de 97,7 a 100% e de 96,5 a 100% no ELISA. O índice *Kappa* entre os métodos e diferentes laboratórios foi ótima ou perfeita (Machado et al. 2007), corroborando com a concordância diagnóstica encontrada neste estudo para as amostras totais.

Com o mesmo intuito, foram analisados por ELISA e RIFI 101 soros caninos provenientes da região metropolitana de Salvador, BA, sendo 30 soros com resultado parasitológico positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* em cultura esplênica e 71 soros de cães clinicamente saudáveis. Das 30 amostras de soro com resultado positivo em cultura, o ELISA detectou 27 amostras positivas e o RIFI detectou apenas 12. Entre as 71 amostras de soros de cães clinicamente saudáveis, o ELISA apresentou resultados negativos em todas elas e uma apresentou resultado positivo na RIFI, revelando uma sensibilidade e uma especificidade de 90% e 100% para o ELISA e de 40% a 98,6% para RIFI respectivamente, com uma concordância *Kappa* considerada moderada (0,5) entre os testes (Oliveira et al. 2005). Tal índice diverge do encontrado no presente estudo, quando analisamos as amostras de todos os grupos, porém se assemelha à concordância *Kappa* encontrada no G3, grupo mais heterogêneo em relação à presença de sinais clínicos. Os resultados dos estudos de Machado et al. (2007) e Oliveira et al. (2005) reforçam a necessidade de avaliação constante dos métodos de diagnóstico pelos laboratórios que os executam, uma vez que, além da casuística utilizada para os estudos, variações dessas técnicas, método de coleta e envio das amostras para o laboratório, bem como pressões ambientais a que estão sujeitos os elos da cadeia de transmissão da doença em cada localidade, podem alterar os resultados obtidos em cada um deles.

Não foi possível calcular especificidade nos três primeiros grupos pela ausência de animais parasitologicamente negativos, bem como a sensibilidade no G4 pela ausência de cães parasitologicamente positivos.

Como o emprego dos dois kits associados minimiza os resultados falso-positivos e falso-negativos (Thrusfield et al. 1995), foram testadas associações dos mesmos em série e em paralelo.

A análise dos testes em paralelo e em série não mostraram diferenças significantes, revelando o primeiro uma sensibilidade e especificidade de 74% e 100% respectivamente, enquanto que no segundo os números foram 76% e 98% para os mesmos parâmetros. Em termos de sensibilidade, nenhuma das associações foi superior ao desempenho dos testes separadamente, enquanto que a associação em paralelo obteve o mesmo valor de especificidade para ambos os testes separados. Estes resultados divergem dos de Lira et al. (2005), que obtiveram, na combinação dos testes em paralelo, uma elevação na sensibilidade, e na combinação em série, um aumento na especificidade. Como a associação de dois testes diagnósticos concorre para a obtenção de resultados mais seguros, diminuindo a ocorrência de falso-positivos e falso-negativos, a utilização da associação dos testes em paralelo com os Kits RIFI-LVC e ELISA-LVC seria mais efetiva, pois diminuiria o tempo entre a coleta de sangue e a remoção do cão. O emprego dos testes em série, como é recomendado pelo Ministério da Saúde, empregando o ELISA para triagem e o RIFI para confirmação, amplia ainda mais o tempo entre coleta, remoção e eutanásia do animal, tornando essa ação ineficaz para o combate à doença. Em estudo controlado, Costa et al. (2007) verificaram um efeito protetor na eliminação de cães infectados na incidência de infecção pela *Leishmania chagasi*, pois estaria reduzindo um pool de fontes de infecção para flebotomíneos, limitando a transmissão do parasito para humanos. Em contrapartida, estudando o impacto da eliminação de cães positivos para LV na ocorrência da doença em humanos, Aragão et al. (2006), concluíram que não houve correlação entre essas variáveis, embora não faça menção a outras variáveis que possam ter interferido nesse resultado. A reduzida eficácia da eliminação de cães soropositivos na incidência de casos humanos talvez seja explicada pela baixa sensibilidade do teste RIFI (Berrahal et al. 1996), com determinação apenas parcial dos casos caninos, resultando na permanência de animais infectados nas regiões investigadas, mantendo o ciclo de transmissão da *Leishmania* nesses animais e no homem (Courtenay et al. 2002). Sendo assim, os resultados dessa associação sugerem que os soros dos animais poderiam ser inicialmente analisados por ELISA-LVC e somente os negativos neste teste seriam submetidos ao RIFI-LVC, liberando os resultados em menor tempo, como é sugerido no estudo similar de Lira et al. (2005).

Sendo o diagnóstico de LVC realizado pela GEZOON, ideal seria que as amostras deste estudo tivessem sido dela provenientes, porém, dificuldades operacionais impossibilitaram a utilização dessa casuística, tais como: irregularidade no diagnóstico e remoção dos cães positivos para LV no período do estudo; dificuldades na participação dos proprietários de cães, principalmente os assintomáticos, em aceitar a coleta ou a remoção para eutanásia dos reagentes; dificuldades em encontrar cães com o perfil dos grupos a serem formados, ou seja, negativos e positivos assintomáticos, por se tratar de região endêmica para a doença, além de problemas de contaminação nos meios de cultura utilizados.

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados do desempenho dos kits RIFI-LVC (sensibilidade=79%; especificidade=100%) e ELISA-LVC (sensibilidade=96%; especificidade=100%) não tiveram diferenças significativas do ponto de vista estatístico.

A avaliação em paralelo dos kits RIFI-LVC e ELISA-LVC (S=74% e E=100%) e em série (S=76% e E=98%), não se mostraram superiores às encontradas nas análises isoladas de cada um deles (S=79% e E=100% para RIFI, e S=96% e E=100% para ELISA).

O uso associado em paralelo da RIFI e do ELISA no programa de controle da Leishmaniose visceral, com triagem inicial pelo ELISA-LVC e repetição dos negativos pela RIFI-LVC, é recomendado, pois, dessa forma os resultados seriam mais seguros, com menos falso-negativos e falso-positivos, e dariam maior rapidez na remoção do cão infectado e sua posterior eutanásia.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aragão LVO, Dourado JCL, Pacheco JJ. Leishmaniose visceral em Teresina. 1995-2006. Avaliação da eliminação de cães soropositivos como medida de controle.
2. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DC, Badaró R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59: 53-57.
3. Alves, AW, Bevilacqua PD, 2004. 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 Saúde Pública* 20: 259 – 265.
4. Almeida ABPF de, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Sousa VRF. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado do Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 156-159.
5. Berrahal F, Mary C, Roze M. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by PCR and immunoblotting. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 55: 273-274.
6. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1314-1320.
7. Costa CNH, Tapeti CMM, Werneck G. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 415-419.
8. Carvalho FAA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzineli RT, Fernandes AP. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diag Microb Infec Dis* 43: 289-295.
9. Dourado ZF, Silva HD, Silveira-Lacerda EP, García-Zapata MT. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). *Rev Pat Tropical* 36: 205-214.
10. Ferreira AGP, Silva ED, Araújo MFLA, Silva RM, Tanuguchi HH, Larosa R, Elias C R, Cunha EA, Bisugo MC, Tolezano JE. Kit EIE/LVA Canina/Bio-Manguinhos:

adaptação para processamento de amostras de sangue coletadas em papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop* 33(Supl II):75.

11. Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

12. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology* Petter, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.) Academic Press.

13. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED da, Abath FGC, Alves LC, Souza WV de, Gomes YM. Canine Visceral Leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology*, 2005.

14. Ministério da Saúde 2006. Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose Visceral. Brasília, 122 pp.

15. Machado JG, Troncarelli MZ, Hoffman JL, Camargo LB, Facciolo PY, Menozzi BD, Lanoni H. Comparison between enzyme linked immuno sorbent assay and indirect immunofluorescence techniques for visceral leishmaniasis diagnostic. *Vet e Zootec* 15: 85-90.

16. Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM de, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar PHP, Melo SMB, Franke CR. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira* 6: 41-47.

17. Rey LC, Martins VC, Ribeiro HB, Lima AAM. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. *J Pediatr (Rio J)* 81: 73-78.

18. Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Amer Journal of Trop Med and Hygiene* 52: 287-292.

19. Thrusfield M. V., 1995. *Veterinary epidemiology*. 2nd edition. Blackwell Science, Oxford, England. 479p.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, v. 77, p. 557-561, 1991.
- ADLER, S. et al. Investigations on Mediterranean kala-azar. VI. canine visceral leishmaniasis. *Proc R Soc Lond*, v. 110, p. 402-12, 1932.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública*, v. 20, p. 259-265, 2004.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasit*, v. 30, p.1269-1281, 2000.
- BADARÓ, R. et al. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 173, p. 758-761, 1996.
- BRAGA, M. D. M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 31, p. 419-424, 1998.
- BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde (MS)/Secretaria de vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2006.
- BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral. Ministério da Saúde. Brasília-DF. 2004.
- BRYDEN, S. L. et al. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diag Microbiol Infect Dis*, v. 43, p. 289-295, 2002.
- CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 43, p. 289-295, 2002.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, v. 141, p. 539-543, 1997.
- COSTA, C.A. et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 24, p. 21-5, 1991.
- COSTA, C.H.N. et al. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev. Saúde Pública*, v. 24, p. 361-72, 1990.

- COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F.; In: Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 34, n. 1, 223-228p, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p. 417-423, 1996.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis*, 27: 305-318, 2004.
- FERREIRA, A. G. P. et al. Kit EIE/LVA Canina/Bio-Manguinhos: adaptação para processamento de amostras de sangue coletadas em papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 33, p. 75, 2000.
- FERRER, L. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, v. 28, p. 342-343, 1991.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. In: PROCEEDING OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. *Anais...* Barcelona, 1999. p. 6-10.
- FLEMMINGS, B.J. et al. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement – fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 5, p. 553-9, 1984.
- FONT, A.; CLOSA, J.M. Ultrasonographic localization of a caudal vena cava thrombus in a dog with leishmaniasis. *Vet Radiol Ultrasound*, v. 38, p. 394-396, 1997.
- GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p 56-72.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Moving towards a solution. In: Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum, 2002, Sevilla, Spain, 2002. 8p. (simposio).
- GRIMALDI JR. G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, v. 6, p. 230-250, 1993.
- KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol*, v. 21, p. 74; 1984.
- LANOTTE, G. et al. Ecology of the leishmaniasis in the south of France. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. *Ann Parasitol Hum Comp*, v. 54, p. 277-295, 1979.
- LAURENTINO-SILVA, V. Imunologia aviária e aplicação da imunoglobulina Y(IgY) na soropidemiologia das leishmanioses caninas. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1999.

MADEIRA, M. F. et al. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 8, p. 440-444, 2004.

MANCIANTI, F. et al. Evaluation of dot enzyme linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescent assay. *Vet Parasitol*, v. 65, p.1-9, 1996.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: _____. *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2001, p 65-80.

MONTEIRO, P. S. et al. Controle da Leishmaniose no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, Rio de Janeiro, v. 27, p. 67-72, 1994.

OZENZOY, S. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59, p. 363-9, 1998.

ROURA, X. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec*, v. 144, p. 262-264, 1999.

SCALONE, A. et al. Evaluation of *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol*, Nova York, v.104, p. 275-285, 2002.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. *Rev Bras Saúde Prod An*, v. 5, p. 31-40, 2004.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes em paraffin-embbeded canine tissues. *J Immunol Methods*, v. 292, p. 17-23, 2004.

TAFURI, W.L. et al. Canine visceral leishmanioses: a remarkable hitopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, v. 96, p. 203-212, 2001.

TÁVORA, M. P. F. Inquérito sorológico para *Leishmania* sp em cães de rua apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2004.

World Health Organization. CTD internal document, the Leishmaniasis, meeting of interested parties on management and financing of the control of tropical diseases other than malaria, by Dr. P. Desjeux, Geneva, CTD/MIP/WP.93.8, 15 September 1993.
World Health Organization. The disease and its impact. World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2000.