
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS SOROLÓGICOS EM CÃES DE ÁREA INDENE DO RIO GRANDE DO SUL NO BRASIL

Lourdes C. Hirschmann¹, Claudiomar S. Brod², Jaqueline Radin³, Caroline F. Simon³ e Ana Lúcia C. Recuero⁴

RESUMO

Neste estudo foi realizado um levantamento da presença de cães soropositivos em canis de 12 municípios do Rio Grande do Sul, comparando-se métodos e protocolos de diagnóstico. Com isso, pode-se detectar precocemente uma possível disseminação da doença e, conseqüentemente, incentivar campanhas de controle e prevenção e evitar futuros surtos. Este estudo foi realizado em uma área do RS sem diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC), sendo avaliado um total de 165 cães. A pesquisa sorológica foi realizada por meio das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e Dual Plate Plataforma (DPP). Constataram-se taxas de 33,9% (56/165) na IFI, 6,7% (11/165) no DPP, 3,0% (5/165) na IFI e DPP e 6,1% (10/165) no ELISA. Dentre os resultados confirmados no ELISA, cinco (5/10) foram reagentes na IFI, dos quais, desconsiderando-se os dois que foram soropositivos apenas no ELISA e IFI, resultaram três cães (3/10) soropositivos no DPP e ELISA, conforme o protocolo atual preconizado pelo Ministério da Saúde. Também foi feita a comparação entre os testes de diagnóstico para verificar acurácia e valor kappa. Ao considerar somente resultados positivos no DPP e IFI, a acurácia aumentou para 94,6%, com um valor Kappa=0,375, ou seja, com uma concordância considerável. Conclui-se que a pesquisa em áreas do RS sem diagnóstico de LVC revelou a presença de cães sororreagentes em quatro municípios do estado: Cachoeira do Sul (2), São Francisco de Assis (1), Dom Pedrito (1) e Rio Grande (1).

DESCRITORES: *Leishmania chagasi*; zoonoses; diagnóstico.

1 Doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, RS, Brasil.

2 Centro de Zoonoses, UFPeL, Pelotas, RS, Brasil.

3 Doutorandas em Parasitologia, UFPeL, Pelotas, RS, Brasil.

4 Medicina Veterinária, UFPeL, Pelotas, RS, Brasil.

Endereço para correspondência: lourdescaruccio@gmail.com

Recebido para publicação em: 18/10/2014. Revisto em: 14/12/2014. Aceito em: 18/12/2014.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis: Comparison of serological methods in dogs of unsurveyed area of Rio Grande do Sul in Brazil

This study surveyed the presence of seropositive dogs in kennels of twelve municipalities of Rio Grande do Sul (RS), comparing methods and diagnostic protocols. Using this approach we could detect a possible spread of the disease, consequently encouraging prevention and control campaigns, and preventing future outbreaks. This study was conducted in an undiagnosed area for canine visceral leishmaniasis (CVL) of RS and a total of 165 dogs were evaluated. Serological analysis was performed using the indirect immunofluorescence (IIF), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Dual Plate Platform (DPP). A rate of 33.9% (56/165) in the IIF, 6.7% (11/165) in DPP, 3.0% (5/165) in IIF and DPP and 6.1% (10/165) in ELISA was observed. Among the results confirmed by ELISA, five (5/10) were positive by IIF, of which, disregarding two of these five that were seropositive only by ELISA and IIF, three dogs (3/10) were seropositive by DPP and ELISA, according to the current protocol recommended by the Ministry of Health. Comparisons between the diagnostic tests to verify accuracy and kappa value were also made. When considering only the results positive in DPP and IIF, the accuracy increased to 94.6%, with a kappa value of 0.375, therefore, with considerable agreement. It is concluded that the research in undiagnosed areas of RS revealed the presence of seropositive dogs in four municipalities of the State: Cachoeira do Sul (2), São Francisco de Assis (1) Dom Pedrito (1) and Rio Grande (1).

KEY WORDS: *Leishmania chagasi*; zoonoses; diagnosis.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária crônica cuja forma visceral (LV), no Brasil, é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (14). A LV já foi uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Recentemente, expandiu-se para áreas urbanas e tornou-se um problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (6).

O diagnóstico baseia-se nos dados epidemiológicos (área endêmica ou área silenciosa) tendo por base aspectos clínicos e exames laboratoriais. Os exames sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde até 2011 eram ELISA, como teste de triagem, e IFI, como confirmatório. A partir de 2012, o Ministério da Saúde emitiu uma nota técnica orientando a utilização de um teste rápido imunocromatográfico como triagem e ELISA como teste confirmatório da doença, sendo este protocolo o que apresentou maior eficácia (4).

Até novembro de 2008, o Rio Grande do Sul era considerado área sem ocorrência de LV quando foi notificado um caso suspeito de LVC em um cão proveniente de São Borja. Desencadeou-se, então, uma investigação epidemiológica neste e em outros municípios, registrando a presença de *Lutzomyia longipalpis* e de cães sororreagentes com caracterização de *Leishmania chagasi*. Os municípios de São Borja e Uruguaiana foram considerados área de transmissão, sendo

encontrado o vetor e registrados casos de LV em humanos e caninos autóctones com caracterização do parasito (7).

Neste trabalho foi realizado um levantamento da presença de cães soropositivos em área indene no estado do RS, no Brasil, especificamente de municípios da região sul até os municípios da fronteira oeste do estado, onde ocorreram os primeiros focos da doença. Nesta área de 148.000 km², localizam-se 68 dos 496 municípios do estado do RS. Para determinar a área do estudo, fez-se contato telefônico com as secretarias de saúde de todos os 68 municípios: muitas alegaram que não possuíam canil público, outras se recusaram a participar da pesquisa motivadas pela preocupação em descobrir a presença da doença em seu território. Dos municípios contatados, somente 12 (17,6%) aceitaram participar da pesquisa: Alegrete, São Francisco de Assis, Santiago, Dom Pedrito, Bagé, Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Piratini, Arroio Grande, Capão do Leão, Rio Grande e Camaquã, nos quais foram coletadas amostras e avaliados 165 cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais estudados

Foram estudados cães procedentes de canis ou de ONGs de 12 municípios do Rio Grande do Sul. Foram selecionados aleatoriamente cerca de 15 cães por canil, utilizando-se apenas focinheira para a contenção dos animais. Estes foram identificados por coleiras numeradas e fotografados para posterior identificação. Este estudo foi aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPEL 2134).

Delineamento

Foi traçada uma linha imaginária do município de Rio Grande ao município de São Borja (540 km em linha reta), traçando-se duas linhas paralelas 137 km acima e abaixo da linha imaginária, resultando em uma área de cerca de 148.000 km² conforme demonstra o mapa (Figura 1). Na área de estudo, foram selecionados 12 municípios, nos quais foi autorizada a pesquisa em canis municipais ou ONGs por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido. Os municípios consultados na área de estudo e que autorizaram a pesquisa foram: Alegrete, São Francisco de Assis, Santiago, Dom Pedrito, Bagé, Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Piratini, Arroio Grande, Capão do Leão, Rio Grande e Camaquã. A coleta de material biológico foi feita em 165 animais, não sendo possível realizar a pesquisa com um número maior de animais em razão da exiguidade do tempo e dos custos para a realização das análises.

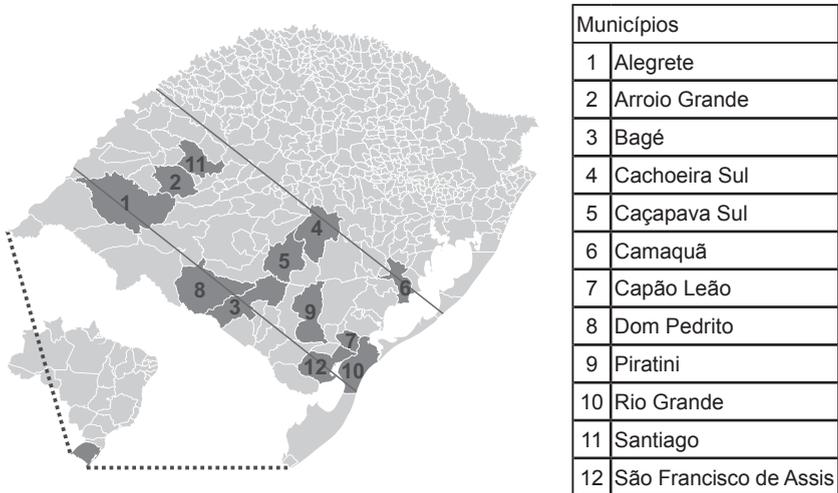


Figura 1. Extensão da área em estudo onde foi desenvolvido trabalho em campo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Sorologia

Para a análise sorológica, foram coletados 4 mL de sangue em tubos de coleta sem anticoagulante. Estas amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o laboratório do CCZ/UFPel, onde o soro foi separado e armazenado a -20°C até seu processamento.

Os soros foram avaliados pela imunofluorescência indireta (IFI), usando-se o kit de diagnóstico comercial IMUNOTESTE[®] que contém o substrato antigênico de *Leishmania chagasi*. Este teste foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Também recorreu-se ao método ELISA (EIE LVC Bio-manguinhos[®]), que contém antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like*, e ao teste rápido - DPP LVC Bio-manguinhos[®] (2), utilizando-se proteínas recombinantes K28 de *Leishmania chagasi* e a Proteína A Conjugada ao Ouro Coloidal, adsorvidos em Membrana de Nitrocelulose. ELISA e DPP foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante e do Ministério da Saúde do Brasil.

Análise estatística

Todos os resultados foram confrontados comparando-se os diferentes canis de cada região por meio do programa EpiInfo versão 6.04 (8), aplicando-se o teste χ^2 e análise multivariada nos fatores significantes no χ^2 , bem como as medidas

de associação (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente de correlação kappa). O nível de confiança das análises foi de 95%.

RESULTADOS

Foram realizados três testes – IFI, DPP e ELISA conforme o protocolo antigo e o protocolo atual descritos pelo Ministério da Saúde para LVC. Dos 165 cães avaliados, constatou-se que 33,9% (56/165) reagiram para *Leishmania chagasi* na IFI, 6,7% (11/165) foram reagentes no DPP, 3,0% (5/165) foram reagentes em ambos os testes (IFI e DPP) e 6,1% (10/165) no ELISA. Destes confirmados no ELISA, cinco (5/10) foram reagentes na IFI e apenas três (3/10) foram positivos no DPP, resultando em três cães soropositivos conforme o protocolo atual preconizado pelo Ministério da Saúde. Os três cães soropositivos nos testes ELISA e DPP (protocolo atual) eram provenientes de Dom Pedrito, Rio Grande e São Francisco de Assis. Os cinco cães positivos em ELISA e IFI (protocolo antigo) incluíam os três cães reagentes no protocolo atual e também dois cães de Cachoeira do Sul, que foram reagentes apenas no protocolo antigo (tabela 1). Depois de confirmados estes resultados, o serviço de vigilância epidemiológica foi notificado.

Tabela 1. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* na IFI (imunofluorescência indireta), DPP (Dual Plate Plataforma) e ELISA (ensaio imunoenzimático) em 165 cães pertencentes aos 12 municípios pesquisados no Rio Grande do Sul-RS, janeiro de 2011 a dezembro de 2012

CITIES	ELISA		IIF		DPP		IIF ¹	DPP ²	IIF ³	Prev ¹	Prev ²	Prev ³		
	Col.	Pos	Neg	Ind	Pos	Neg.	Pos	Neg.	ELISA				ELISA	DPP
Alegrete	15	0	15	0	3	12	2	13	0	0	0	0,00	0,00	0,00
A. Grande	15	0	14	1	6	9	3	12	0	0	2	0,00	0,00	13,33
Bagé	15	0	15	0	5	10	0	15	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Caçapava Sul	15	3	12	0	1	14	0	15	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Cachoeira Sul	9	2	7	0	6	3	0	9	2	0	0	22,22	0,00	0,00
Camaquã	17	1	16	0	6	11	1	16	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Capão Leão	18	0	17	1	6	12	1	17	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Dom Pedrito	14	1	13	0	3	11	2	12	1	1	1	7,14	7,14	7,14
Piratini	7	0	7	0	5	2	0	7	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Rio Grande	10	1	9	0	7	3	1	9	1	1	1	10,00	10,00	10,00
S. Fco. Assis	15	1	14	0	7	8	1	14	1	1	1	6,67	6,67	6,67
Santiago	15	1	12	2	1	14	0	15	0	0	0	0,00	0,00	0,00
TOTAL	165	10	151	4	56	109	11	154	5	3	5	3,03	1,82	3,03

¹ Protocolo Ministério da Saúde até 2012.

² Protocolo Ministério da Saúde depois de 2012.

³ Duas técnicas, usando o teste confirmatório IFI e o triagem teste rápido DPP.

Col. = número de coletas.

Tabela 2. Comparação de métodos sorológicos utilizando-se associações de protocolos dos testes IFI, DPP e ELISA, realizados nos 165 cães provenientes de área indene de leishmaniose visceral canina no estado do Rio Grande do Sul

DPP	IFI		TP	AP,	FP	FN	PPV	NPV	Se	Sp	A	K	DPP		Total
	Pos	Neg											Pos	Neg	
Pos	5	6											5	5	56
Neg	51	103											6	6	109
Total	56	109											11	11	165
IFI/DPP	33,94	6,67	54,54	33,12	45,45	66,88	8,93	94,50	65,45	0,042					
DPP/IFI	6,67	33,94	91,07	5,50	8,93	94,50	45,45	66,88	65,45	0,042					
ELISA/DPP	6,06	6,67	72,73	4,55	27,27	95,45	30,0	94,84	90,91	0,237					
ELISA/DPP/IFI	6,06	3,03	40,0	4,38	60,0	95,93	30,0	98,71	94,55	0,375					
ELISA/IFI	6,06	33,94	91,07	4,59	8,93	95,41	50,0	67,1	66,06	0,054					
ELISA2/DPP/IFI	6,21	3,11	40,0	4,49	60,0	95,51	30,0	98,68	94,41	0,374					
ELISA2/DPP	6,21	6,83	72,73	4,67	27,27	95,33	30,0	94,7	90,68	0,236					
ELISA2/IFI	6,21	34,78	91,07	4,76	8,93	95,24	50,0	66,23	65,22	0,052					

DPP	ELISA		DPP/IFI	Pos	Neg	Total
	Pos	Neg				
Pos	3	8	3	2	5	5
Neg	7	147	7	153	160	160
Total	10	155	10	155	165	165

DPP	ELISA2		DPP/IFI	Pos	Neg	Total
	Pos	Neg				
Pos	3	8	3	2	5	5
Neg	7	143	7	149	156	156
Total	10	151	10	151	161	161

IFI	ELISA		IFI	Pos	Neg	Total
	Pos	Neg				
Pos	5	51	5	5	56	56
Neg	5	104	5	104	109	109
Total	10	155	10	155	165	165

IFI	ELISA2		IFI	Pos	Neg	Total
	Pos	Neg				
Pos	5	51	5	5	56	56
Neg	5	100	5	100	105	105
Total	10	151	10	151	161	161

DPP/IFI= soros reagentes tanto na IFI quanto no DPP; Pos= Positivo; Neg = Negativo; PV = Prevalência Verdadeira, PA = Prevalência Aparente; FP= Falso Positivo; FN= Falso Negativo; VPP = Valor Preditivo Positivo; VPN = Valor Preditivo Negativo; Se = Sensibilidade; Es=Especificidade; A=Acurácia; K = coeficiente de correlação kappa; ELISA2=Resultado do ELISA não considerando os quatro soros com valor indeterminado.

Na Tabela 2, podem ser observadas as medidas de efeito (valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, sensibilidade, especificidade, acurácia, coeficiente de correlação kappa) quando são confrontados os três testes de diagnóstico (ELISA, IFI e DPP). Foram avaliados os resultados de dois testes em série (triagem e confirmatório) e também da associação dos resultados positivos do teste confirmatório IFI, triagem com o teste rápido DPP e ELISA como teste padrão ouro.

Na análise das técnicas sorológicas, verificou-se que, ante os resultados positivos de dois testes DPP + IFI (DPPIFI) com o padrão ouro ELISA, constataram-se os seguintes percentuais: sensibilidade de 30,0%, especificidade de 98,7%, valores de VPP de 60,0% e VPN de 95,9%. A associação encontrou uma acurácia de 94,6% e um coeficiente de correlação kappa de 0,375, o que demonstra uma combinação melhor do que a recomendada pelo protocolo atual (DPP+ELISA) que apresentou sensibilidade de 30,0%, especificidade de 94,8%, valores de VPP de 27,3% e VPN de 95,5%. A associação encontrou uma acurácia de 90,9% e um coeficiente de correlação kappa de 0,237 (Tabela 2).

Nas figuras 2, 3 e 4, podem ser verificados os resultados positivos encontrados neste trabalho com a utilização dos testes IFI, ELISA e DPP, respectivamente. Na IFI, foram considerados positivos soros com títulos $\geq 1:40$, conforme preconizado pelo fabricante do *kit*. O ELISA foi considerado reagente (ou positivo) quando apresentou densidade óptica maior que o ponto de corte (*cut off*) encontrado por meio do leitor de placas. Para encontrar o ponto de corte, é feito o seguinte cálculo:

Cálculo do Cut-Off (CO)

XCN: Média da DO dos CN

$CO = XCN \times 2 = 0,186$

$FC = CO \times 1,2 = 0,223$

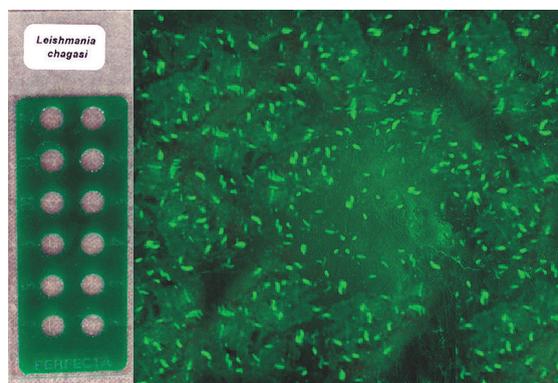


Figura 2. Lâmina de IFI LVC. IMUNOTEST®. Coloração Verde = reação positiva.

ADO entre 0,186 e 0,223 refere-se aos cães sororreagentes indeterminados, abaixo de 0,186 aos cães não reagentes e acima de 0,223 aos cães sororreagentes no ELISA incluídos nas amostras de cães de área considerada indene. Este teste foi realizado com apoio do LACEN/RS. No teste rápido, o resultado foi considerado positivo quando apareceram duas linhas, a linha do controle e a linha teste, e negativo quando só apareceu a linha do controle.

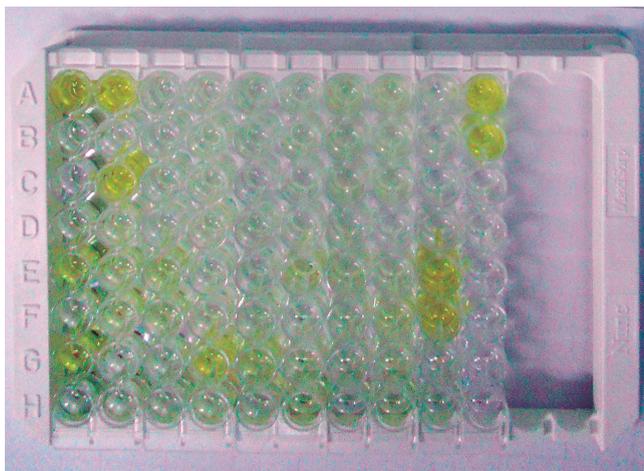


Figura 3. Placa de ELISA LVC Bio-maguinhos®. Coloração Amarelo = reação positiva.

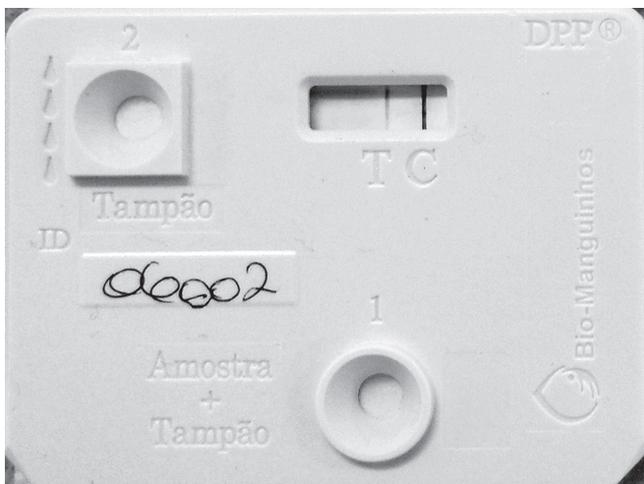


Figura 4. Teste rápido LVC DPP Bio-maguinhos®. A linha esquerda representa a banda de teste, indicando um resultado positivo.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da leishmaniose visceral na Região Sul do Brasil é raro e realizado a partir de focos endêmicos de outras regiões do País (16). Este estudo foi importante, pois registrou soropositividade em cães de regiões sem diagnóstico de LVC.

A prevalência de 3,1% (5/165) de cães soropositivos utilizando-se a associação ELISA (triagem) e IFI (confirmatório), segundo protocolo utilizado até 2012, e a prevalência de apenas 1,8% (3/165) de cães soropositivos utilizando-se DPP (triagem) e ELISA (confirmatório), segundo o protocolo utilizado atualmente, demonstraram que houve uma redução da sensibilidade do diagnóstico de leishmaniose visceral canina. É possível que estejam subestimados os casos de LVC ou o protocolo antigo estaria produzindo muitos resultados falso-positivos.

A prevalência de 33,9% (56/165) determinada somente pelo método de IFI em regiões não endêmicas pode indicar que este teste apresenta alta sensibilidade, entretanto resulta em muitos falso-positivos. A IFI tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, podendo ser observadas reações cruzadas principalmente entre leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar americana e doença de Chagas (5). No trabalho realizado por Lira et al. (2006), foi detectada reação cruzada na IFI para demodicose e ehrlichiose. Estas reações inespecíficas ocorrem por causa da complexidade antigênica dos tripanossomatídeos que compartilham vários epítomos comuns (1). Em contrapartida, Guimarães et al. (2009) demonstraram não haver reação cruzada entre *Babesia* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora* sp. e *Leishmania* spp. Oliveira et al. (2008) também concluíram não haver reação cruzada entre anticorpos para *Leishmania* spp., *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*. Silva (2009) concluiu que outra forma de reação cruzada pode ser causada por anticorpos vacinais.

Este estudo foi feito em região não endêmica em cães de canis municipais ou de ONGs, os quais não possuíam o protocolo de vacinação para as doenças mais frequentes. Portanto, provavelmente os resultados sorológicos desta pesquisa não entrariam neste parâmetro de falso-positivo pela vacinação.

Segundo Gonçalves (2010), podem apresentar resultados falso-negativos anticorpos inativos e janela imunológica e falso-positivos, sangue hemolisado e anticorpos persistentes de infecção antiga. Também pode acontecer de títulos baixos apresentarem reações cruzadas com outras parasitoses.

Na orientação fornecida pelo Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz, fabricante de IFI e ELISA para LVC, o desempenho da IFI para amostras de soro oscila em torno de 90% de sensibilidade e 80% de especificidade. Isso explicaria a prevalência maior em cães soropositivos quando se utilizam os testes de IFI e ELISA. Lira et al. (2006) demonstraram que, para obter maior sensibilidade, os *kits* (EIE-LVC e IFI-LVC) devem ser usados em paralelo; no entanto, para se conseguir maior especificidade, é melhor utilizá-los em série (EIE-LVC+IFI-LVC).

No estudo realizado por Silva et al. (2011), a associação de ELISA+IFI demonstrou moderada concordância, com coeficiente Kappa de 0,41. Gonçalves (2010) encontrou acurácia de 57,8% utilizando IFI e ELISA, com concordância considerável e coeficiente kappa de 0,24. Neste estudo em regiões não endêmicas, a combinação IFI+ELISA demonstrou acurácia semelhante de 66,1%, mas concordância pobre com valor kappa 0,054.

Segundo Boarino et al. (2005), a combinação de diferentes antígenos em um mesmo ensaio também é uma abordagem a ser explorada no diagnóstico da LVC. A formação de um antígeno quimérico, produzido por múltiplos epítomos, demonstrou sensibilidade e especificidade superiores a 95% quando aplicado em ELISA.

Conforme Grimaldi et al. (2012), o teste DPP[®], produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e que une dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26), apresentou potencial promissor. Entretanto, apresentou elevada sensibilidade apenas em cães sintomáticos (98%), sendo baixa (47%) nos assintomáticos. Isso indica ser necessário inserir mais antígenos no teste rápido para tornar a detecção de anticorpos anti-Leishmania mais eficaz na fase inicial ou assintomática da doença.

Neste trabalho, considerando DPP como triagem e ELISA como confirmatório, em um cenário de prevalência real de 6,1% e prevalência aparente de 6,7%, a sensibilidade foi de 30%, a especificidade de 94,8%, a acurácia de 90,9% e o valor kappa de 0,237. Na comparação entre o protocolo antigo e o protocolo atual, verificou-se que a sensibilidade do teste diminuiu em 20%, mas a especificidade aumentou em 27,7%. O número de resultados falso-positivos sofreu uma redução aproximada de 18%, o de falso-negativos permaneceu o mesmo. Entretanto, o VPP que era de 8,9% subiu para 27,3%.

Gonçalves (2010) obteve resultados semelhantes quando comparou isoladamente os testes de DPP e IFI: o teste rápido obteve 46,7% (21/45) de soropositividade, enquanto a IFI obteve 84,4% (38/45). Seu trabalho mostrou que o teste rápido apresenta sensibilidade mais elevada quando comparado com a IFI.

De acordo com Schubach (2011), DPP pode ser usado pelo Programa Nacional de Controle das Leishmanioses por ser de fácil execução e leitura e também por ser possível utilizá-lo em amostras de sangue total em campo, porém apresenta baixas sensibilidade e especificidade.

O Ministério da Saúde, por meio da Nota Técnica Conjunta 01/2011, substituiu o protocolo da LVC: passaram a ser utilizados o DPP[®] como teste de triagem e ELISA como teste confirmatório (4). Faria & Andrade (2012) sugerem que poderão ocorrer falhas nesses resultados, causando a eliminação de um número desconhecido de animais falso-positivos.

Segundo Gonçalves (2010), a associação DPP e ELISA demonstrou acurácia de 86,7% e valor de coeficiente kappa de 0,73, com concordância substancial, valor de acurácia aproximado ao observado no presente estudo (A=90,91%), porém K=0,237 foi diferente.

A utilização das técnicas imunocromatográficas abriu um novo panorama no diagnóstico realizado em campo. O MS substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC pelo DPP (imunocromatográfico) como opção de triagem e o ELISA como teste confirmatório. Entretanto, a sensibilidade dos antígenos empregados nessas técnicas ainda deixa a desejar, o que leva a crer que o uso de novos antígenos em tiras imunocromatográficas apresenta uma perspectiva bastante animadora para o desenvolvimento de testes de campo (9).

Neste trabalho, comparativamente, o melhor resultado apresentado foi a combinação dos resultados positivos DDP/IFI em série, com ELISA padrão ouro, resultando em aumento da especificidade do teste ($E_s=98,7\%$), melhor acurácia (94,6) e melhor coeficiente kappa (0,375).

Constatou-se a presença de focos de Leishmaniose visceral canina em quatro municípios do Rio Grande do Sul: Rio Grande, Dom Pedrito, Cachoeira do Sul e São Francisco de Assis.

Nossos resultados aumentam para oito o número de municípios sob investigação no RS, considerando que Cachoeira do Sul já estava incluída.

A doença demanda uma situação de alerta e vigilância em razão do registro de novos municípios com cães soropositivos.

O melhor desempenho dos resultados sorológicos foi verificado quando se associou em série os resultados positivos de DPP e IFI usando o ELISA como teste confirmatório.

É necessário o desenvolvimento de ensaios sorológicos baseados em mais antígenos definidos e específicos para melhorar os métodos diagnósticos para as leishmanioses.

AGRADECIMENTOS

À Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia da UFPel, à CAPES, ao Ministério da Saúde, ao LACEN/RS e à UNIPAMPA.

REFERÊNCIAS

1. Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 35: 72-78, 1986.
2. Bio-Manguinhos, Bula - *Manual de Instrução do Kit Teste Rápido LVC – DPP*. 2011.
3. Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, Giuffrida MG, Rosati S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 647-653, 2005.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. *Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SV/MS*, 2011.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília-DF, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>. Acesso em: 29 nov, 2012.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Doenças de A a Z. Leishmaniose visceral*. Brasília-DF, 2011a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561>. Acesso em: 27 nov, 2011.
7. CEVS/RS. *Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul*. Boletim epidemiológico. Porto Alegre-RS, v.13, n.1, 2011. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106_v.13,%20n.1,%20mar.,%202011.pdf. Acesso em: 30 nov, 2012.
8. Deam AG, Deam JÁ, Coulmobilier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Amer TJ. *Epi Info Version 6.0 A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., 1994.
9. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica Saúde* 3: 47-57, 2012.
10. Gonçalves BS. *Leishmaniose visceral canina na área urbana de Cuiabá-MT: comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico e caracterização da espécie de Leishmania circulante em amostra selecionada*. Fundação Oswaldo Cruz [Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - ENSP], 2010.
11. Grimaldi GJr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 54-59, 2012.
12. Guimarães AM, Rocha CMBM, Oliveira TMFS, Rosado IR, Morais LG, Santos RRD. Fatores associados à soropositividade para Babesia, Toxoplasma, Neospora e Leishmania em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 49-53, 2009.
13. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG, Alves LC, Souza WV, Gomes YM. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 137: 11-16, 2006.
14. Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24: 2941-2947, 2008.
15. Oliveira TMS. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet* 17: 7-11, 2008.
16. Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. 1997. In: Pocai EA, Frozza L, Headley SA, Graça DL. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 28: 501-505, 1998.
17. Schubach EYP. *Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em amostras de sangue total e soro*. Brasília [Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical – Faculdade de Medicina], 2011.
18. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 179: 257-261, 2011.
19. Silva SR. *Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina*. Fundação Oswaldo Cruz [Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Centro de Pesquisas René Rachou], 2009.