

Jader Rogério Cappi Moraes

**IMUNOCROMATOGRAFIA, IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA, ELISA E
EXAME PARASITOLÓGICO “PÓS MORTEN” NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Epidemiologia

Orientador : Prof. Élvio Carlos Moreira

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2006

M827c Moraes, Jader Rogério Cappi, 1980-
Imunocromatografia, imunofluorescência indireta, ELISA e exame
parasitológico "pós mortem" no diagnóstico da leishmaniose visceral
canina / Jader Rogério Cappi Moraes. -2006.
69p. :il.

Orientador: Élvio Carlos Moreira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

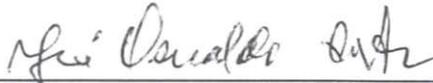
1. Cão – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Leishmaniose visceral -
Diagnóstico – Teses. 3. Epidemiologia – Teses. I. Moreira, Élvio Carlos.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 96

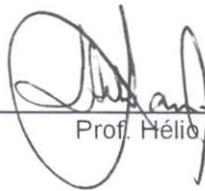
Dissertação defendida e aprovada em 05 de julho de 2006, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Élvio Carlos Moreira
Orientador



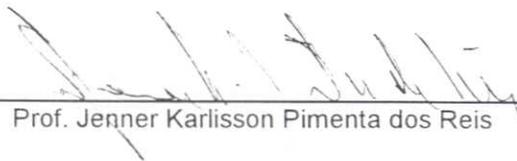
Prof. José Oswaldo Costa



Prof. Hélio Langoni



Dr. Guilherme Nunes Costa



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

A minha mãe e ao meu pai que nunca dosaram esforços para felicidade de seus filhos.

“Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”.

(Eclesiastes 3)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Cleuza, meu pai Eliseu e minha irmã Janaina pelo imenso amor e apoio incondicional.

Ao Professor Élvio pelo exemplo de cientista, com compromisso de colaborar sempre para o desenvolvimento do Brasil, sobretudo social. Ao amigo Élvio pelo exemplo de ser humano totalmente livre de preconceitos e sempre alegre na arte de viver.

A todos os professores da Epidemiologia, especialmente aos amigos José Ailton e José Newton, por transmitirem muitas virtudes, transpondo as barreiras acadêmicas.

A Juliana G. Machado, “Ju”, pela ajuda nos primeiros passos no “mundo das leishmanias”.

Aos atuais e antigos estudantes do departamento: Débora, Andreza, Lívia, Denise, Raquel, Rogério, Oliver, Felipe, Stefane, Daniela, Bárbara, George, Liz, Val, Bela e todos os outros pela amizade e boas conversas.

Aos amigos e funcionários “Toninho”, Ricardo, Nádia, Jorge, Mirle e Renata pelo apoio e carinho que tiveram por mim.

A “batalhadora” Suely Tocantins, minha amiga e “mãe” de muitos conselhos, que estará em meu coração quer onde eu esteja.

A Danielle, “Dani”, pela amizade e mesmo que sem ter consciência, transmite um pouco da gigantesca humildade que possui.

A Andréa, pelo amor, paciência e compressão “transcendental”.

Aos antigos amigos de “república” Tião e Rafa, pelo companheirismo, e aos novos, Jan, Carla, Paty, Sílvia e Leandro por me receberem nestes momentos finais.

Ao Roberto “*in memoriam*” pela ajuda com os antígenos e com as dúvidas técnicas.

A Funed pelo “kit” de Imunofluorescência Indireta Biomanguinhos.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, especialmente ao Adamastor pela grande ajuda nas coletas.

Ao Professor Daniel Roilim Stainki pela colheita e envios das amostras de soro em Uruguaiana –RS.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2 LITERATURA CONSULTADA	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Avaliação por Comitê de Ética.....	19
3.2 Amostras de soro.....	19
3.3 Técnica de colheita.....	20
3.4 Técnicas de diagnóstico.....	20
3.4.1 Exame parasitológico.....	20
3.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	20
3.4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	21
3.4.4 Teste Imunocromatográfico.....	22
3.5 Análise Estatística.....	25
3.5.1 Sensibilidade/ especificidade/ valores preditivos.....	25
3.5.2 Concordância.....	25
3.5.3 Teste de Wilcoxon.....	27
4 RESULTADOS	27
4.1 Amostras de soro não hemolisadas.....	27
4.2 Amostras de soro hemolisadas.....	39
4.3 Amostras colhidas em papel filtro.....	50
4.4 Exame parasitológico.....	60
4.5 Teste imunocromatográfico entre animais com sinais clínicos presentes ou ausentes.....	61
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
LISTA DE QUADROS	
Quadro 1. Critérios para interpretação do teste Kappa.....	27
LISTA DE TABELAS	
Tabela 1 Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	27
Tabela 2 Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	29
Tabela 3 Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (S7 [®] e <i>L. amazonensis</i>), RIFI (Biomanguinhos e <i>L. amazonensis</i>) e teste imunocromatográfico, de 120 amostras de soro caninas sem hemólise.....	31
Tabela 4 Distribuição em títulos dos resultados positivos para RIFI "kit" Biomanguinhos em amostras de soro sem hemólise.....	33
Tabela 5 Número de resultados falso-negativos do teste imunocromatográfico interpretado após 10 minutos, relacionados com os títulos da RIFI em amostras de soro sem hemólise.....	35
Tabela 6 Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos seis tempos de análise em amostras caninas de soro sem hemólise.....	36
Tabela 7 Valores Kappa, para leitor A, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.....	37
Tabela 8 Valores de Kappa, para leitor B, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.....	37
Tabela 9 Valores de Kappa, para leitor C, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.....	37

Tabela 10	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i> e S7 [®]), RIFI (Biomanguinhos e <i>L. amazonensis</i>) com o teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos com interpretação após 10 minutos em amostras caninas de soro sem hemólise.....	38
Tabela 11	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i> e S7 [®]), RIFI (Biomanguinhos e <i>L. amazonensis</i>) e exame parasitológico pós-mortem em amostras caninas de soro caninas sem hemólise	38
Tabela 12	Valores preditivos positivo de ELISA (<i>L. amazonensis</i> e S7 [®]), RIFI (Biomanguinhos e <i>L. amazonensis</i>) e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras caninas de soro sem hemólise.....	39
Tabela 13	Valores preditivos negativos de ELISA (<i>L. amazonensis</i> e S7 [®]), RIFI (Biomanguinhos e <i>L. amazonensis</i>) e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras caninas de soro sem hemólise.....	39
Tabela 14	Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores	41
Tabela 15	Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	41
Tabela 16	Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico, de 90 amostras caninas de soro hemolisadas.....	43
Tabela 17	Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos seis tempos de análise em amostras caninas de soro hemolisadas	47
Tabela 18	Valores de Kappa, para o leitor A, entre os tempos analisados em amostras caninas hemolisadas.....	48
Tabela 19	Valores de Kappa, para leitor B, entre os tempos analisados em amostras caninas hemolisadas.....	48
Tabela 20	Valores de Kappa, para o leitor C, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro hemolisadas.....	49
Tabela 21	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos após 10 minutos em amostras caninas de soro hemolisadas	49
Tabela 22	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame parasitológico pós-mortem de amostras caninas de soro hemolisadas	49
Tabela 23	Valores preditivos positivos de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras caninas de soro hemolisadas	50
Tabela 24	Valores preditivos negativos de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras de soro caninas hemolisadas	50
Tabela 25	Sensibilidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	51
Tabela 26	Especificidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	51

Tabela 27	Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico, 10 minutos após início do teste, de 90 amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	53
Tabela 28	Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos seis tempos de análise em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	57
Tabela 29	Valores de Kappa, para o leitor A, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	58
Tabela 30	Valores de Kappa, para o leitor B, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	58
Tabela 31	Valores de Kappa, para o leitor C, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	59
Tabela 32	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i>) e RIFI "kit" Biomanguinhos com o teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos após 10 minutos em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	59
Tabela 33	Teste Kappa de concordância entre ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame parasitológico pós-mortem de amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	59
Tabela 34	Valores preditivos positivos de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	60
Tabela 35	Valores preditivos negativos de ELISA (<i>L. amazonensis</i>), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.....	60
Tabela 36	Número de resultados falso-negativos pelo teste imunocromatográfico analisado em 10 minutos, com sinais clínicos presentes ou ausentes, entre os três leitores e três tipos de amostras analisadas.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do teste imunocromatográfico. A) Regiões do teste imunocromatográfico. B) Reações do teste.....	23
Figura 2	Testes imunocromatográficos. A) Reação positiva. B) Reação negativa.....	25
Figura 3	Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	29
Figura 4	Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	31
Figura 5	Curva ROC do teste de ELISA (<i>L. amazonensis</i>) em amostras de soro caninas sem hemólise.....	33
Figura 6	Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	41
Figura 7	Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	43
Figura 8	Curva ROC do teste de ELISA (<i>L. amazonensis</i>) em amostras de soro caninas hemolisadas.....	45
Figura 9	Sensibilidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	51

Figura 10	Especificidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.....	53
Figura 11	Curva ROC do teste de ELISA (<i>L. amazonensis</i>) em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro	55

RESUMO

A validação de um teste imunocromatográfico rápido em soros de cães no Brasil, em regiões consideradas endêmicas, será sua adoção pelos profissionais da clínica e do serviço público do controle da leishmaniose visceral canina. Nesta pesquisa comparou-se os resultados das técnicas de RIFI, ELISA, teste imunocromatográfico e exame parasitológico "pós-mortem" em amostras não submetidas à hemólise, hemolisadas e amostras de sangue embebidas em papel filtro. Para execução da pesquisa utilizou-se de 30 amostras de soros provenientes de Uruguaiana - RS (área livre de LV), 30 amostras negativas e 60 positivas provenientes de Belo Horizonte - MG, todas elas confirmadas por exame parasitológico. As melhores concordâncias entre os testes foram encontradas nas amostras de soro não submetidas ao processo de hemólise. O teste imunocromatográfico avaliado apresentou valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina que permitem a sua adoção no Brasil, podendo ser utilizado em substituição a RIFI, em amostras de soro sem hemólise, por não apresentar diferenças estatísticas significativas.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, diagnóstico, imunocromatografia, cão.

ABSTRACT

The analyse of a fast immunochromatographic test in samples of dogs that live in Brazil, in endemic regions, is very important to know the possibility to adopt the use for the veterinaries that work in clinics and work at the public health. This research compare the results among the immunochromatographic test, ELISA and indirect immunofluorescence in samples of serum in perfect conditions, hemolysed serum and blood in filter paper. There were 30 samples from Uruguaiana - Rio Grande do Sul - Brazil (leishmanias free area), 30 negative samples and 60 positive from Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil, all the samples were confirmed for parasitologics tests. The best agreement among the tests was when used serum samples without hemolysis. The immunocromatographic test analysed showed sensibility and especificity values that allow the use in Brazil, and it can substitute the immunofluorescence indirect, in serum samples without hemolysis, since there were not any statistics difference significant among them.

Key words: visceral leishmaniasis, diagnosis, immunocromatographic, dog.

1. INTRODUÇÃO

Recebe o nome de leishmanioses, o grupo de doenças causado por várias espécies do gênero *Leishmania*, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das principais zoonoses mundiais, com ocorrência de casos em 88 países de quatro continentes. A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada por protozoários heteroxenos, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e transmitida por vetores invertebrados, dípteros, hematófagos da família Phlebotomatidae, pertencente ao gênero *Phlebotomus*, com várias espécies no velho mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, como espécie vetora *Lutzomyia longipalpis*, no novo mundo (Neves, 2003). No complexo *Leishmania donovani* são reconhecidos três agentes etiológicos da doença: *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ross, 1903) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) no velho mundo e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Lainson e Shaw, 1987) no novo mundo.

Na área urbana, o cão (*Canis familiares*) é o principal reservatório da doença. Já no ambiente silvestre as raposas (*Dusicyon vetulus* – Lund, 1842 e *Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766) e o marsupial (*Didelphis albiventris* – Lund, 1840) são as principais fontes de infecção.

O ciclo acontece quando o vetor se alimenta de um reservatório e ingere macrófagos infectados com amastigotas. As amastigotas são liberadas no intestino do mosquito onde multiplicam-se como promastigotas, sendo o hospedeiro vertebrado infectado com esta forma quando picado pelo vetor. Elas penetram nos macrófagos circulantes, multiplicando-se como amastigotas. Quando ocorre a lise do macrófago essa formas invadem outras células.

Os períodos de incubação variam de 10 dias a 24 meses, com média de dois a seis meses no homem, e bastante variável no cão, de três meses a vários anos com média

de três a sete meses. O papel do cão na leishmaniose visceral como reservatório consiste na introdução, dispersão e manutenção da doença, como está ocorrendo no município de Belo Horizonte – MG desde a última década.

O controle da LVC preconizado pelo Ministério da Saúde baseia-se principalmente na eliminação de cães com exame sorológico positivo, tratamento dos humanos doentes e combate ao vetor. Todos esses métodos são utilizados como ferramentas de um sistema de vigilância e combate presentes nos municípios. Esta tríade quando executada apresenta eficiência no controle da doença (Silva et al., 2003).

No Brasil a doença vem ganhando destaque por abranger localidades consideradas livres da doença, causando sérios agravos à saúde pública, principalmente quando há infecção concomitante com outras doenças, especialmente as imunossupressoras como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) entre outras (Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV, 2004). O calazar encontra-se distribuído em 19 unidades federadas, com média anual de 3.500 casos e uma taxa de letalidade de 6%, sendo que no ano de 2004 houve um aumento dessa taxa para aproximadamente 8% (Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 2004).

Em Belo Horizonte, no ano de 2005, em 145.220 amostras coletadas a prevalência foi 8,2% (Ações..., 2006).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral em cães é difícil de ser realizado, pois não há sinais patognômicos da doença e muitos cães (63,2%) são assintomáticos (Mattos et al., 2004), necessitando de métodos laboratoriais para o diagnóstico. Dentre os métodos laboratoriais estão às técnicas de diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular, apresentando valores de

sensibilidade e especificidade distintos (Machado, 2004).

A leishmaniose visceral induz altos títulos de anticorpos, o que facilita o seu diagnóstico por testes sorológicos, sendo esta técnica utilizada para detectar animais infectados pelos inquéritos epidemiológicos. Os métodos de diagnóstico sorológico utilizados são: reação de fixação de complemento (RFC); reação de imunofluorescência indireta; "direct agglutination test" ou teste de aglutinação direta (DAT); hemaglutinação indireta (HAI); imunodifusão (ID); "enzyme linked immunosorbent assay" ou teste imunoenzimático (ELISA) e o teste imunocromatográfico. Inicialmente o teste de diagnóstico utilizado em inquéritos era a RFC, que foi substituída posteriormente pela RIFI (Costa et al., 1991). Atualmente o Ministério da Saúde recomenda a utilização do ELISA como triagem, sendo um teste de maior sensibilidade, confirmando as amostras positivas pela RIFI.

As técnicas sorológicas de RIFI e ELISA são técnicas que oferecem boa sensibilidade e especificidade, mas requerem estruturas e insumos caros, recursos humanos especializados. A instabilidade de seus reagentes em temperatura ambiente e longo período de tempo entre colheita, processamento da amostra e a emissão de resultado são também fatores limitantes dessas técnicas. Diante dessa realidade e necessidade de simplificar as provas sorológicas, o teste imunocromatográfico seria o instrumento que melhor se adaptaria por ser de fácil execução e realizado a campo.

O teste imunocromatográfico em questão utiliza o antígeno recombinante k39, que é um epítipo encontrado em espécies de *Leishmania* que causam a leishmaniose visceral (Sundar et al., 2002), cuja sensibilidade em ELISA foi de 97,1% e especificidade de 99,4% (Scalone et al., 2002). Atualmente nenhum teste imunocromatográfico para diagnóstico sorológico da LVC é comercializado no Brasil, por ausência de registro perante o

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

A validação de um teste imunocromatográfico rápido em soros de cães criados no Brasil, em regiões consideradas endêmicas seria fundamental para verificar a possibilidade da sua adoção para os profissionais da clínica e do serviço público do controle da LVC. Para isso, objetivou-se neste trabalho, fazer a comparação dos resultados obtidos nas técnicas sorológicas oficiais de RIFI e ELISA em um painel de soros comprovadamente positivos e negativos, utilizando-se amostras de soros sanguíneos com e sem hemólise, e amostras sanguíneas em papel filtro.

2. LITERATURA CONSULTADA

Badaró et al. (1983) determinaram qual morfologia (promastigota ou amastigota) e espécie de *Leishmania* (*Leishmania chagasi* ou *Leishmania mexicana*) apresentam melhores resultados através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), na detecção de anticorpos em 30 pacientes com leishmaniose visceral americana, 30 indivíduos saudáveis e 10 com doença crônica de Chagas. Entre os soros de indivíduos com leishmaniose visceral americana, títulos de anticorpos acima de 1/64 foram encontrados nas duas espécies de antígenos e nas duas morfologias analisadas. Os menores títulos foram detectados com amastigotas de *L. chagasi* e promastigotas de *L. mexicana*. A fluorescência sempre foi maior nas formas amastigotas em comparação as promastigotas. A RIFI com amastigotas de *L. mexicana* foi positiva em doze soros de pacientes saudáveis. A sensibilidade de promastigotas de *L. chagasi* e amastigotas de *L. mexicana* foi a maior encontrada. Reação cruzada nos dez soros de pacientes com doença de Chagas ocorreu nas duas espécies utilizadas como antígenos, sendo que o antígeno de promastigota de *L. chagasi* apresentou maior especificidade, com títulos menores ou iguais a 1/128. Através dos resultados os autores concluíram que antígeno de promastigotas fazendo uso de *L. chagasi* foi o mais sensível e específico com relação aos

outros antígenos, sendo recomendado pelos autores para o diagnóstico da leishmaniose visceral pela RIFI.

Reed et al. (1990) relataram o aperfeiçoamento do método substituindo o anti-IgG conjugado com proteína A ou proteína G conjugado para o aumento da sensibilidade e versatilidade do ELISA utilizando o antígeno recombinante gp63 para todos conjugados testados. A proteína A apresentou força de ligação superior em comparação ao anti-IgG conjugado, pode ser utilizando soro ou sangue íntegro, capacidade de detectar soros de diferentes espécies, com pelo menos dois sítios de ligação na porção Fc da imunoglobulina G. Já a proteína G pode se ligar com maior número de imunoglobulina G de mamíferos que a proteína A, porém a proteína A liga-se a diferentes classes de imunoglobulinas, enquanto que a proteína G liga-se somente a IgG. O uso da proteína A aumentou de maneira significativa a diferença entre os valores de absorbância positivo e negativo ou fracamente reagente, permitindo até mesmo uma distinção visual, propondo o seu uso no campo sem auxílio de leitores de absorbância específicos. Após o relato os autores propõem o uso do ELISA utilizando proteína A como ferramenta para sorodiagnóstico e soro-epidemiologia na avaliação de diferentes espécies de mamíferos envolvendo a ecologia da leishmaniose.

Oliveira et al. (1993) acompanharam oito cães inoculados experimentalmente e sete animais controle, para avaliação das alterações anatomo-patológicas e aspectos laboratoriais. Durante 25 meses em que os autores acompanharam os animais, nenhum cão apresentou sinais clínicos da doença, com alterações histopatológicas características, mas sem diferenças significativas nos aspectos laboratoriais como hemograma, contagem diferencial de células e urinálise. Os títulos da RIFI variaram de 1/320 a 1/1280, exceto por um cão que apresentou título de 1/40. Formas amastigotas foram encontradas em aspirados de medula óssea em seis dos oito cães infectados.

Mancianti et al. (1995) coletaram sangue de 290 cães, 186 infectados por *Leishmania infantum* e 104 animais controle negativos, que foram triados para detectar a presença de anticorpos em Toscana, Itália. Os autores compararam as técnicas RIFI e ELISA, utilizando o mesmo antígeno de *Leishmania infantum*. O ELISA foi desenvolvido usando detergente solúvel (Triton X-100) e inibidores de protease, permitindo que mais antígenos sejam obtidos e aumentasse as chances de detecção de anticorpos no soro. A sensibilidade foi de 98,4% para o RIFI, e 99,5% para o ELISA, e a especificidade de 100% e 97,1% para RIFI e ELISA respectivamente (IC =99%). Os autores concluíram que a RIFI e o ELISA utilizando detergentes solúveis, obtiveram resultados similares, sendo o ELISA de mais fácil execução e maior reprodutibilidade quando comparado a RIFI.

Vercammen et al. (1997) compararam o ELISA utilizando como antígeno a *L. infantum*, com a microimunodifusão, imunoeletroforese, DAT e RIFI. Os autores utilizaram soros de 20 cães positivos (seis confirmados parasitologicamente), 12 cães negativos e oito com outras doenças. Todos os testes obtiveram sensibilidade de 100%, enquanto que a especificidade foi de 95% para a DAT e de 100% para os outros testes. Devido ao reduzido número de animais confirmados pelo teste parasitológico a sensibilidade foi calculada pela combinação dos resultados sorológicos positivos nos testes de imunodifusão e eletroforese. Os autores concluíram que é importante inativar a enzima fosfatase alcalina endógena o mais breve possível pela fixação das promastigotas com formaldeído e acetona, para evitar reações falso-positivas e negativas entre o antígeno e substrato.

Andrade et al. (1998) desenvolveram um teste baseado na técnica de ELISA, utilizando como antígeno "carboxi-terminal (78%)", uma porção recombinante do antígeno *Leishmania chagasi* HSP-70, comparando com ELISA convencional (antígenos de promastigotas sonificados), em 421 soros provenientes de várias cidades

do Brasil, com a maioria sendo de Natal, Rio Grande do Norte. Dos 421 soros testados, os ELISA (convencional e com antígeno recombinante) concordaram em 320 (76,0%) amostras, sendo 12 (2,85% positivas) e 308 (73,15%) negativas. Das 101 amostras restantes, 76 (18,05%) foram negativas no ELISA recombinante e positivas no ELISA convencional e as outras 25 amostras (5,94%) foram positivas no ELISA recombinante e negativas no ELISA convencional. Os autores concluíram que o ELISA recombinante mostrou uma boa performance, com possibilidade de uma boa especificidade e preciosa identificação dos cães infectados.

Braga et al. (1998) compararam as prevalências da eliminação precoce dos cães infectados (sete dias), utilizando o ELISA (material soro) como método de diagnóstico, e a eliminação tardia (80 dias) realizando a triagem pela RIFI (material papel de filtro). Os autores selecionaram 28 localidades no município São Luís do Curú, Ceará, sendo 14 para cada grupo, compondo 402 domicílios para o grupo de eliminação precoce e 468 para eliminação tardia. A prevalência do calazar canino foi medida nas duas áreas, antes e 10 meses após a medida inicial. Na área de eliminação tardia, a prevalência houve decréscimo de 9%, enquanto na de eliminação rápida o decréscimo foi de 27%, sendo esta última significativamente maior ($p=0,0015$). Os autores concluíram que para um programa de controle se tornar viável, é necessário rapidez na eliminação dos cães infectados e uma técnica com grande sensibilidade.

Sundar et al. (1998) realizaram um estudo com pacientes humanos na Índia, utilizando o teste imunocromatográfico com antígeno rK-39. Dos 250 pacientes que foram submetidos a aspirado de baço, 127 tiveram resultado positivo, sendo todos também positivos ao exame imunocromatográfico com sangue total, apresentando uma sensibilidade de 100%. Quatro pacientes tiveram resultado positivo no teste imunocromatográfico, com aspirado negativo de baço, os outros 217 indivíduos, incluindo 25 controles saudáveis, 73

pacientes com malária ou tuberculose e os outros 119, com aspirado negativo de baço, foram negativos para o teste imunocromatográfico, determinando uma especificidade de 98% (IC = 95%). Tais resultados preliminares, segundo os autores, sugerem que o teste imunocromatográfico pode ser utilizado na rotina diagnóstica da leishmaniose visceral humana.

Jelinek et al. (1999) analisaram 96 soros de pacientes humanos utilizando o teste imunocromatográfico rK-39 (Ancon Leishmania; Ancon Laboratories, USA). Quatorze pacientes foram confirmados com exame parasitológico e todos com títulos altos no teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando antígenos de amastigotas de *Leishmania donovani*. As outras 82 amostras foram confirmadas como negativas pela RIFI. Das 14 amostras positivas, o teste imunocromatográfico confirmou o diagnóstico em 10 amostras, 71,4% de sensibilidade e das 82 amostras negativas, o teste imunocromatográfico confirmou todas como negativas, ou seja, 100% de especificidade. Segundo os autores, a falta de sensibilidade suficiente é um entrave para sua utilização como ferramenta de triagem, devendo ser utilizado para os casos de suspeita clínica e confirmação dos positivos da triagem.

Zijlstra et al. (2001) utilizaram soros de 55 pacientes humanos, 20 de área epidêmica do sul do Sudão e 35 de área endêmica do leste do mesmo país, que estavam positivos ao exame parasitológico de aspirado de medula, baço ou linfonodo. Realizaram o teste imunocromatográfico rK-39, o teste de aglutinação direta (DAT – com títulos $\geq 1/1600$ e $\geq 1/6400$) e o teste de ELISA rK-39 com conjugado anti-IgM e anti-IgG. Os autores relataram que no teste imunocromatográfico, algumas linhas fracas na faixa positiva provocaram dúvida na interpretação. A sensibilidade do teste imunocromatográfico foi de 67% e do DAT (título $\geq 1/1600$) 90%, sendo que em somente 69% dos pacientes houve concordância entre o teste imunocromatográfico e o DAT (título

≥1/1600), não havendo correlação entre os dois testes, sugerindo uma complementaridade. Em todos os 55 pacientes o teste de ELISA anti-IgG foi positivo, ou seja, 100% de sensibilidade, enquanto o teste de ELISA anti-IgM em apenas 31 pacientes o teste foi positivo, com 56% de sensibilidade. Em geral os estudos do teste imunocromatográfico relatam uma leitura entre cinco e 10 minutos após iniciado o teste, mas quando a leitura do resultado foi efetuada em 30 minutos e 24 horas, a sensibilidade subiu para 72 e 78% respectivamente. Neste trabalho os autores relatam que o teste imunocromatográfico pode ser utilizado a campo, mas devem-se respeitar suas limitações e ser usado com cautela, sempre observando ou não a presença de sinais clínicos nos pacientes.

Brandonisio et al. (2002) compararam a performance do teste imunocromatográfico utilizando como antígeno rK-39 (Rapyd Test, Intersept[®], UK) com o clássico teste de imunofluorescência indireta (antígeno promastigotas de *Leishmania infantum*) em 143 pacientes humanos, sendo 69 pacientes com sinais clínicos suspeitos de leishmaniose (11 confirmados por exame parasitológico), 23 com hipergamaglobulinemia e 51 pacientes como controle negativos. As duas técnicas concordaram em todos os resultados, com exceção de duas amostras com resultados de imunofluorescência positivo (provenientes de um paciente apresentando mononucleose e outro com pneumonia bacteriana) e com teste imunocromatográfico negativo. O teste imunocromatográfico confirmou como positivo as 11 amostras com resultado positivo no teste parasitológico. Os autores concluíram que neste estudo o teste imunocromatográfico é um bom teste para ser utilizado de maneira preliminar e juntamente com métodos quantitativos acompanhar os pacientes durante o período doente.

Reithinger et al. (2002) realizaram estudo comparando a imunocromatografia (antígeno recombinante rK-39) com os testes de ELISA e PCR. Para tanto

utilizaram-se de 148 cães do município de Capitão Enéias, Minas Gerais, e 40 controles negativos, provenientes do Pará (n=12), do Peru (n=17) e Reino Unido (n=11). Os 10 controles positivos utilizados, confirmados por exame parasitológico, foram provenientes de Marajó, Pará. Nenhum dos 40 controles negativos foi positivo para o ELISA e PCR, mas 10 foram positivos para o teste imunocromatográfico, havendo uma especificidade para ELISA, PCR e imunocromatografia de 100, 100 e 75% respectivamente. A sensibilidade foi de 100% para o ELISA e teste imunocromatográfico e 80% para o PCR. Entre as amostras de campo, 53% apresentaram resultado positivo para o teste imunocromatográfico, 37% para o ELISA e 24% para o PCR. Os autores concluíram que a especificidade do teste imunocromatográfico ainda é pequena, havendo necessidade de aprimoramento da técnica para ser utilizada definitivamente a campo.

Iqbal et al. (2002) compararam as técnicas de reação de RIFI (RIFI; bioMerieux sa, Marcy l'Etoile, France), hemoaglutinação indireta (IHA; Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) e o teste imunocromatográfico rK-39 (strip test; Intersep Ltd, Berkshire, United Kingdom) em 323 pacientes humanos, incluindo 21 pacientes com casos documentados, 72 com casos suspeitos, 155 com outras infecções e 75 indivíduos controle negativos. A maior sensibilidade foi do IHA (100%), seguida da RIFI (86,6%) e do teste imunocromatográfico (80,0%), enquanto que a maior especificidade foi da imunocromatografia (100%), seguido da RIFI (93,0%) e IHA (86,0%). De acordo com os resultados os autores concluíram que o IHA é a técnica de escolha para triagem de indivíduos com suspeita de leishmaniose visceral.

Sundar et al. (2002) testaram o teste imunocromatográfico rK-39 (Inbios[®]) em 143 pacientes indianos com suspeita de leishmaniose visceral por meio de uma gota de sangue do dedo. Em 120 a imunocromatografia foi positiva, com cura após tratamento com anfotericina B em 119

pacientes. De 23 testes imunocromatográficos negativos, 16 possuíam outras doenças diagnosticadas, quatro responderam ao tratamento para malária, dois pacientes com sinais clínicos para LVH foram confirmados com diagnóstico por aspirado de baço e um paciente desenvolveu dor abdominal e foi a óbito, com autópsia não realizada. A sensibilidade do teste imunocromatográfico ficou estimada em 98% e especificidade de 99%. Os autores concluíram que na Índia, onde a LV é prevalente, o teste imunocromatográfico é uma ferramenta promissora no diagnóstico de pessoas com suspeita de LV.

Lemos et al. (2003) avaliaram o desempenho do teste rápido imunocromatográfico utilizando o antígeno rK39 (Kalar Detected® InBios International, Seattle, WA, USA) e um teste de ELISA utilizando antígeno total para o diagnóstico de leishmaniose visceral em 128 pacientes confirmados por exame parasitológico ou em cultura. Como controle negativo 10 pacientes saudáveis e 50 portadores de outras infecções foram utilizados: malária (10), hanseníase (9), doença de Chagas (10) e leishmaniose cutânea (11). A sensibilidade do teste rápido com rK-39 e ELISA foram 90% e 89%, enquanto a especificidade foi de 100% e 98% respectivamente. Segundo os autores o estudo confirmou a validade do teste rápido com antígeno rK-39 para diagnóstico de pacientes apresentando leishmaniose visceral, HIV negativos em uma população com alta prevalência da doença.

Boleart et al. (2004) compararam a validade da pancitopenia, formol-gel teste (FGT), imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta e o teste imunocromatográfico r-K39 em 310 pacientes humanos com estado febril e esplenomegalia. O teste parasitológico foi positivo em 184 (59,4%) dos pacientes, e utilizando este teste como referência a sensibilidade e especificidade foram de 16,3 e 96,8% para a pancitopenia, 39,9 e 95,2% para o FGT, 28,4 e 94,4% para a RIFI, 95,1 e 77,8% para o DAT e 87,4 e 77,0% para o teste imunocromatográfico rK-39 (IC =

95%). Os autores colaboraram para o conhecimento da sensibilidade e especificidade do DAT e do teste imunocromatográfico rK-39, e propuseram o uso das técnicas principalmente em localidades de serviço de saúde periférico, com poucas possibilidades de execução do exame parasitológico.

Machado (2004) avaliou cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina em Belo Horizonte-MG. Analisou a eficiência das técnicas de RIFI, ELISA e a concordância entre os laboratórios utilizando-se de 86 soros de cães positivos e 57 negativos. Os resultados demonstraram que sensibilidade da RIFI e do ELISA dos laboratórios variou de 98,8% a 100%, a especificidade da RIFI de 94,7 a 100% e do ELISA de 96,5 a 100%, sendo estas diferenças estatisticamente não significativas ($p > 0,05$). As concordâncias entre as técnicas do mesmo laboratório e entre eles variaram de ótimas a perfeitas, de acordo com o índice Kappa. O valor preditivo positivo (VPP) nas prevalências de 2, 5, 8, 10 e 20% variaram de 27,5 a 100% e o valor preditivo negativo (VPN) nas mesmas prevalências variou 99,71 a 100%. As amostras positivas apresentaram maiores frequências nos títulos de 1/320 a 1/1280. A autora concluiu que existe alto grau de concordância entre os laboratórios testados.

Mohebal et al. (2004) compararam o Teste de Aglutinação Direta (DAT) com o teste imunocromatográfico (Cypress Diagnostic Company, Bélgica) em 116 cães clinicamente suspeitos, e 152 controles negativos de áreas endêmicas de Ardabil, províncias do leste do Azerbaijão e noroeste do Irã durante um ano. A sensibilidade da imunocromatografia foi de 70,9% e a especificidade 84,9%, quando o ponto de corte do DAT foi de 1:320 (IC = 95%). Os autores concluíram que o teste é muito simples e de fácil execução, que pode ser utilizado no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Toz et al. (2004) realizaram comparação entre o teste imunocromatográfico rK39 (InBios International, Inc., Seattle,

Washington), RIFI e exame parasitológico com punção de linfonodo e medula óssea, em 58 pacientes humanos da Turquia, que apresentavam sinais clínicos de kalazar e 22 cães de várias áreas endêmicas do mesmo país. Dos 58 casos humanos suspeitos, 13 foram positivos e 42 negativos em todos os métodos realizados, dois foram RIFI negativo, mas foram positivos no teste imunocromatográfico rK39 e exame parasitológico, e somente um caso obteve resultado negativo no exame parasitológico e positivo nos outros dois testes. Com relação as 22 amostras caninas, 11 foram positivas em todas as técnicas, e uma com resultado positivo na RIFI e teste imunocromatográfico rk39 e negativo ao exame parasitológico. Os autores concluíram que o teste imunocromatográfico é extremamente simples, não invasivo, podendo ser utilizado a campo, tanto para o diagnóstico canino, quanto para o humano.

Mettler et al. (2005) avaliaram os testes de ELISA (antígeno *L. infantum*), RIFI (antígeno *L. infantum*), teste imunocromatográfico rk-39 (DiaMed-Vet-IT Leish[®]) e teste gel (ID-PaGIA Canine leishamaniais antibody tests, Diamed AG[®]) em 48 amostras de soro canino de região não endêmica, 47 amostras de cães positivos confirmados por PCR ou isolamento (sendo 17 clinicamente sintomáticos e 30 assintomáticos), 50 amostras de animais saudáveis e 26 soros de cães com outras infecções (*Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis*). O ELISA obteve 100% de sensibilidade nos cães sintomáticos e 94,1% nos cães assintomáticos. A sensibilidade da imunofluorescência indireta foi de 90% para os sintomáticos e 29,4% para os assintomáticos. O teste rápido imunocromatográfico obteve sensibilidade de 97,6% nos animais sintomáticos e 52,9% nos animais assintomáticos, enquanto que o teste em gel obteve 76,5% nos assintomáticos e 100% com sinais clínicos. A especificidade foi alta para todos os testes, sendo no ELISA e na Imunofluorescência Indireta obtiveram 100%, e no teste imunocromatográfico e teste em gel 94 e 92% respectivamente. O maior número de reações cruzadas foi

encontrada no ELISA, seguido do teste em gel com 4,3%, teste imunocromatográfico 3,8% e a imunofluorescência indireta com nenhuma reação. Os testes rápidos mostraram-se bastante úteis na confirmação clínica dos animais suspeitos devido a sua alta especificidade nos animais assintomáticos.

Rosário et al. (2005) compararam o teste ELISA, utilizando antígenos de promastigotas lisadas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, e os antígenos recombinantes rK-39 e rK-26, utilizando soro e eluato em papel filtro em cães de áreas endêmicas de Minas Gerais. Para o propósito os autores utilizaram soro e sangue em papel filtro de 140 cães, 115 de animais positivos no teste de RIFI com título 1/40 e 25 de animais saudáveis do canil do Departamento de Parasitologia da UFMG, em adição mais 40 cães infectados com *Trypanosoma cruzi*, 24 com *Babesia canis* e 10 com *Dirofilaria immitis*. O exame parasitológico obteve 106 cães positivos e os animais negativos foram confirmados pelo mesmo teste, sendo considerados como padrão ouro para as demais análises. O ELISA rK-39 realizado com papel filtro obteve a menor sensibilidade (97,2%), enquanto o eluato com *L. chagasi* apresentou a menor especificidade (88,0%). O ELISA *L. amazonensis* obteve sensibilidade de 100% tanto para o soro quanto para o papel filtro, sendo a maior especificidade para rK-39 com também 100% para ambos materiais. Em relação à reação cruzada, o antígeno *L. amazonensis* mostrou reação cruzada com *T. cruzi* (25/40), *D. immitis* (6/10) e o antígeno *L. chagasi* foi reativo com soros de *T. cruzi* (34/40), *D. immitis* (4/10) e *B. canis* (1/24), os antígenos recombinantes não mostraram nenhuma reação cruzada. Os autores concluíram que a alta concordância entre soro e o papel filtro, confirma que o eluato pode ser utilizado para colheita de sangue nos inquéritos caninos, a principal limitação na utilização dos antígenos brutos são as reações cruzadas, sendo que os antígenos recombinantes podem ser utilizados em grande escala nos programas de controle da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação por Comitê de Ética

O projeto "Comparação entre a imunocromatografia, imunofluorescência indireta, ELISA e exame parasitológico "pos mortem" no diagnóstico da leishmaniose visceral canina", que originou a experimentação em questão, foi aprovada pelo "Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)" em reunião realizada no dia 15/07/2005, protocolo 071/04, estando de acordo com os princípios éticos estabelecidos.

3.2 Amostras de soros

Foram selecionados 120 cães, sendo 60 positivos e 60 negativos para leishmaniose visceral canina. Os animais positivos no teste sorológico foram confirmados após a necropsia, pela realização de exame parasitológico, realizado por aposição em lâminas de baço, fígado e linfonodo poplíteo. Os animais foram confirmados como positivos quando havia a presença de formas amastigotas em um ou mais órgãos analisados, com carga parasitária variável, visualizadas em campo claro, coradas pelo Panótico (Laborclin®), com objetiva de 100X. Das 60 amostras de soros negativos, 30 foram obtidos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Belo Horizonte - MG do período de janeiro de 2005 a dezembro do mesmo ano, de animais clinicamente saudáveis, negativos no teste imunoenzimático (ELISA) e ao exame parasitológico. Os 30 soros negativos restantes foram obtidos de cães nascidos e criados na cidade de Uruguaiana - RS, região livre de leishmaniose visceral canina e humana. Diante das amostras dos cães formaram-se quatro grupos subdivididos em subgrupos:

GRUPO A: foi composto por 30 cães totalmente assintomáticos que foram detectados como positivo nos inquéritos sorológicos realizados pelo CCZ e confirmados pelo teste parasitológico.

Subgrupo A1: composto por 30 amostras de soro devidamente colhidos não submetidos a hemólise.

Subgrupo A2: composto por 30 amostras de soro que foram submetidos ao processo de hemólise.

Subgrupo A3: formado por 30 amostras de sangue embebidos em papel filtro do tipo qualitativo 80 gramas Klabin®.

GRUPO B: integrado por 30 cães com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral canina, também detectados como positivos nos inquéritos sorológicos realizados pelo CCZ e confirmados nos testes parasitológicos. Os sinais clínicos analisados foram onicogribose, lesões cutâneas (descamação e eczema), áreas de alopecia, esplenomegalia e linfadenopatia.

Subgrupo B1: composto por 30 amostras de soro devidamente colhidos, não submetidos ao processo de hemólise.

Subgrupo B2: composto por 30 amostras de soro submetidas ao processo de hemólise.

Subgrupo B3: formado por 30 amostras de sangue de sangue embebidas em papel filtro do tipo qualitativo 80 gramas Klabin®.

GRUPO C: composto de 30 cães negativos no teste sorológico e parasitológico, obtidos no CCZ.

Subgrupo C1: composto por 30 amostras de soro devidamente colhidas, não submetidas ao processo de hemólise.

Subgrupo C2: composto por 30 amostras de soro submetidas ao processo de hemólise.

Subgrupo C3: integrado por 30 amostras de sangue embebidas em papel filtro do tipo qualitativo 80 gramas Klabin®.

GRUPO D: integrado por 30 animais nascidos e criados em Uruguaiana - RS, livre de leishmaniose visceral canina e humana.

3.3 Técnica de colheita

De todos animais obteve-se sangue por punção venosa, aproximadamente de 3 ml, utilizando-se seringa descartável que foi mantida em temperatura ambiente de duas à quatro horas para a obtenção de soro, depois de centrifugados a 3.000 rpm durante cinco minutos.

Das amostras colhidas no CCZ obteve-se sangue em papel filtro (qualitativo 80 gramas) com aproximadamente 3cm² de área e parte da amostra ainda sem centrifugação, foi submetida a temperatura de -20°C durante 12 horas, para que houvesse o processo de hemólise.

Para realização das necropsias, bem como a confecção das lâminas para diagnóstico sorológico, os animais sacrificados foram sedados previamente com acepromazina 0,2%, anestesiados em plano profundo com anestésico geral (tiopental 3 a 15 mg/kg de peso vivo, por via endovenosa a 2,5%) com posterior administração de cloreto de potássio (dose aproximada de 100mg/kg de peso vivo por via endovenosa). Após a morte, os animais foram submetidos à necropsia para a confecção de lâminas por aposição de baço, fígado e linfonodo poplíteo

3.4 Técnicas de diagnóstico

3.4.1 Exame parasitológico

Depois de constatadas a morte dos cães, foi realizada uma incisão de aproximadamente 20cm de extensão no abdômen dos animais para retirada de fragmentos de baço e fígado, bem como incisão de cerca de 5cm para exposição e retirada do linfonodo poplíteo. Os fragmentos dos órgãos designados para realização do exame parasitológico foram secados em papel toalha, para retirada do excesso de sangue, e logo após foram submetidos a impressão em lâminas de vidro, que foram corados por Panótico, Laborclin®.

As lâminas coradas foram analisadas em microscopia óptica, com aumento de 1000X,

percorrendo todos os campos da impressão. Animais positivos foram aqueles que no exame parasitológico foi possível identificar as formas amastigotas nas impressões de um ou mais órgãos, e negativos para aqueles de Belo Horizonte – MG, que não houve a identificação de formas amastigotas de *Leishmania sp* em nenhuma das impressões que compuseram o exame parasitológico.

O exame parasitológico foi utilizado como "padrão ouro" para este experimento, ou seja, somente compuseram o grupo de animais positivos, aqueles animais com resultado positivo no exame parasitológico, e o grupo negativo foi formado por animais saudáveis, capturados nas ruas de Belo Horizonte – MG pelo CCZ, com resultado negativo no teste de triagem (ELISA – fazendo uso de *Leishmania amazonensis*) e também negativos ao exame parasitológico. Os animais negativos de Uruguaiana –RS, que compuseram também o grupo negativo, não foram submetidos a necropsia, bem como a realização do exame parasitológico.

3.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI tem por finalidade detectar anticorpos imunoglobulina G (IgG) dos soros de cães. O teste realizado nesta pesquisa fez uso do "kit" de reação de imunofluorescência indireta de Biomanguinhos, utilizado em todos os tipos de amostras analisadas (com titulação somente nas amostras de soro não submetidas ao processo de hemólise) e "kit" produzido no Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG, que utiliza antígeno *Leishmania (L.) amazonensis* MHOM/BR/1960/BH6, sendo este "kit" usado somente nas amostras de soro não submetidas à hemólise.

O "kit de Bio-Manguinhos" fornece: lâmina (12 orifícios de 5mm cada), antígeno (*Leishmania major*), conjugado, glicerina tamponada, azul de Evans e protocolo de tampão fosfato para ser preparado no próprio laboratório. O conjugado (anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com isotiocianato de fluoresceína obtida de soro imune de coelho) foi titulado com

determinação de título ideal de 1/300. Nas lâminas depois de devidamente desengorduradas e limpas, foi pingado em cada orifício 10 µl de antígeno, deixando secar por duas horas a 37°C. Os soros a serem testados foram diluídos 1/40 (5µl de soro em 200µl de “phosfatase buffer saline tween” -PBS) e colocados nas lâminas com antígeno, junto com controles positivos e negativos (diluição 1/40). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e posteriormente lavadas três vezes em PBS em cubas de lavagem durante cinco minutos cada banho, e em seguida, lavadas em água destilada. Tais lâminas foram colocadas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secagem. O conjugado foi preparado de acordo com a diluição ideal e acrescentado 0,1% de azul de Evans. Foram adicionados 15µl dessa diluição em cada orifício das lâminas, posteriormente a incubação as lâminas foram lavadas durante 5 minutos em PBS. Por fim, adicionou-se duas gotas de glicerina tamponada, cobrindo as lâminas com lamínulas.

Para utilização do “kit” produzido no próprio laboratório de realização da pesquisa, foram utilizadas lâminas com 20 orifícios, com uma gota de antígenos adicionado em cada orifício, com período de fixação de aproximadamente 12 horas (“overnight”), sendo que depois do período de fixação, tais lâminas foram embrulhadas em papel absorvente e revestidas em papel alumínio, com estocagem a -20°C até o momento de sua utilização. A técnica foi realizada descongelando as lâminas contendo antígeno sob a temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas as amostras e os controles positivos e negativos. O restante da técnica é idêntico ao realizado pelo “kit” Bio-Manguinhos. O conjugado utilizado foi uma anti-imunoglobulina de cão, marcada com isitiocianato de fluoresceína (Biomanguinhos), titulado com soros já conhecidos, com diluição ideal de 1/100.

Para o material colhido em papel filtro, uma amostra circular de 0,7cm de diâmetro foi cortada e adicionada em 200µl de PBS durante 12 horas (“overnight”) a 8°C para que houvesse a eluição do sangue presente

no papel filtro para o PBS. Posteriormente realizou-se os mesmos procedimentos efetuados com soro depois da diluição.

A leitura de ambos foi realizada com microscópio de imunofluorescência (marca Olympus, modelo BH2-RFCA) com aumento ocular de 40X, considerando os animais reagentes com título igual ou superior a 1/40.

3.4.3 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

Assim como a RIFI o teste de ELISA indireto tem por finalidade detecção de imunoglobulina G (IgG) em soro de animais infectados. Nesta pesquisa utilizou-se de “kit” produzido no Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG para todas as análises e “kit para Diagnóstico do Calazar Canino – ELISA/S7[®]” lote 04, fabricado 11/05, produzido por Biogene Indústria e Comércio Ltda ME para somente as amostras não submetidas à hemólise.

Para o “kit” produzido no próprio laboratório, placas de poliestireno de fundo chato sensibilizadas durante 12 horas com antígeno (*Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1960/BH6) e bloqueadas com “phosfatase buffer saline caseína” (PBSC) durante uma hora a 37°C, foram utilizadas neste experimento. O conjugado imunoenzimático usado foi uma anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, obtida de soro imune de coelhos e marcada com peroxidase (Sigma-Company USA). Este foi titulado com soros e conjugado já conhecidos chegando a um título ideal de 1/8000. Os soros foram diluídos em solução de “phosfatase buffer saline caseína tween” (PBSC) a 1/40, utilizando 200µl de PBSC e 5µl de soro. Para obtenção de um título de 1/80 na placa sensibilizada foram colocados 50µl de PBSC e acrescentado mais 50µl da solução da diluição de 1/40. Os controles positivos (dois), negativos (quatro) e branco (dois) foram acrescentados à placa. Esta ficou em estufa a 37°C durante 30 minutos. As placas foram lavadas manualmente com solução de lavagem para retirada do excesso de soro e incubadas com 100 µl em cada orifício de conjugado anti IgG de cão (a diluição ideal de 1/8000) por 30 minutos e

em seguida lavadas novamente 4 vezes em solução de lavagem. Adicionou-se às placas 100µl em cada orifício da solução de substrato (5mg de O-fenilenodiamino – OPD + 4 µl de H₂O₂ a 30% + 10ml de tampão citrato-fosfato), mantendo-as no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 30µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4N para interromper a reação.

O ELISA/S7[®] tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética. O “kit” é composto de quatro placas de ELISA de poliestireno e de todos os reagentes necessários a realização de 96 reações em cada placa. A sensibilização das placas consiste em distribuir 100µl da solução contendo o antígeno S7 por poço, incubando a 4°C por doze horas (“overnight”). Após a incubação as placas foram lavadas três vezes com “phosfatase buffer saline tween” (PBST), e bloqueadas com também 100 µl de PBST adicionado 2% de leite em pó. Depois do período de bloqueio as placas foram lavadas três vezes com PBST. Ao mesmo tempo em que se realizava a sensibilização e bloqueio das placas, os soros controles e amostras eram diluídos em solução de coleta (1/100) e incubados durante 12 horas a 4°C (“overnight”). Na placa já sensibilizada e bloqueada foram acrescentadas o branco (um), controle não reagente (dois) e controle reagente (um), assim como todas as amostras a serem testadas na diluição 1/100. Terminado o período de uma hora em temperatura ambiente (TA) a placa foi lavada manualmente como anteriormente e adicionado 100 µl de conjugado (Proteína A) na diluição de 1/10.000. Nesta etapa a incubação foi realizada durante 30 minutos à TA, seguida de três lavagens com PBS, quando depois de lavada, foi adicionado à placa 100 µl de solução de revelação. A solução de revelação consiste de 10 ml de tampão citrato, 100 µl de TMB (tetramethylbenzidine) e 50 µl de água oxigenada. Esta última incubação foi realizada no escuro durante 20 minutos a TA, com duas gotas de solução de parada em cada poço, depois de decorrido este período de revelação.

Para as amostras colhidas em papel filtro foram cortadas amostras circulares com

0,7cm de diâmetro e adicionadas em 200µl PBSCT durante 12 horas (“overnight”) a 8°C, para que a amostra de sangue em papel filtro fosse eluída no PBSCT. Posteriormente foram realizados os mesmos procedimentos executados para as amostras de soro.

A leitura foi feita em leitor de ELISA (marca Labsystems Multiskan MS, modelo Version 4.0, ano 1994) a 492 nm para o “kit” produzido no laboratório e a 450 nm para o “kit” ELISA/S7[®]. Os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO), calculados pela curva ROC (receiver operator characteristic curve) em programa Win Episcopy 2.0 para o “kit” do laboratório e a média aritmética dos controles negativos, acrescida do fator 0,142 para o ELISA/S7[®].

3.4.4 Teste imunocromatográfico

O teste imunocromatográfico é um teste qualitativo, de fácil execução e resultado rápido, que tem como objetivo detectar anticorpos para leishmaniose visceral em soros de cães, sendo o teste utilizado nesta pesquisa o “Kalazar Detect[®]” fabricado por InBios International (Seattle, WA) que em seu “kit” é dotado, além do teste propriamente dito, de solução tampão usada durante a execução.

O teste é constituído por uma membrana de nitrocelulose, medindo 7,8 cm de comprimento e 0,4 cm de largura, sendo constituído por 4 partes principais: região de aplicação das amostras de soro, banda de revelação de reatividade, banda de revelação controle e haste para fixação do teste durante a execução. Para o perfeito funcionamento do teste é fundamental tocar com os dedos na fita somente na haste de fixação e manter sempre o teste na posição vertical com a região de aplicação do soro voltada para baixo.

Na região onde são aplicadas as amostras de soro, já estão presentes a proteína A e ouro coloidal associados (conjugado marcado), com função de detectar porções Fc das imunoglobulinas (Reed et al., 1990).

Para a região onde há revelação de banda de reatividade é fixado o antígeno rK-39 ocorrendo a ligação das imunoglobulinas contra este antígeno, caso o soro contenha anticorpos contra leishmaniose visceral. A 0,9 cm de distância da banda de revelação de reatividade esta a banda controle onde estão presentes imunoglobulinas contra proteína A ouro coloidal associadas, sendo obrigatório a revelação desta banda indicando que houve boa migração do soro e tampão pela fita teste (Sundar et al., 1998) (Figura 1).

Durante o teste 20µl de soro e duas gotas da solução tampão (fornecida pelo fabricante) foram adicionados a região de aplicação das amostras, que juntos migraram pela da membrana cromatográfica por capilaridade, revelando a banda de reatividade quando amostra positiva e banda controle (Figura 2).

A leitura (interpretação) do teste em questão foi realizada por três pessoas distintas e em tempos diferentes, em intervalos de 5, 10,

15, 30, 60 minutos e 24 horas após o início da execução, com a finalidade de análise das variações de sensibilidade e especificidade entre os leitores e tempos, no entanto, as instruções que acompanham o teste imunocromatográfico em questão recomendam a interpretação em 10 minutos após início do teste. Os três leitores que realizaram a interpretação do teste eram duas do sexo masculino e uma do sexo feminino, dois com formação superior e o restante com ensino médio completo. Todos os participantes possuíam experiência em laboratório de diagnóstico sorológico veterinário.

Para as amostras em papel filtro, uma amostra circular de 0,7cm foi cortada e adicionada a 200µl de PBS durante 24 horas ("overnight") para que ocorresse a eluição do sangue. Posteriormente 20µl da eluição foram adicionados no teste imunocromatográfico com os mesmos procedimentos adotados para as amostras em soro.

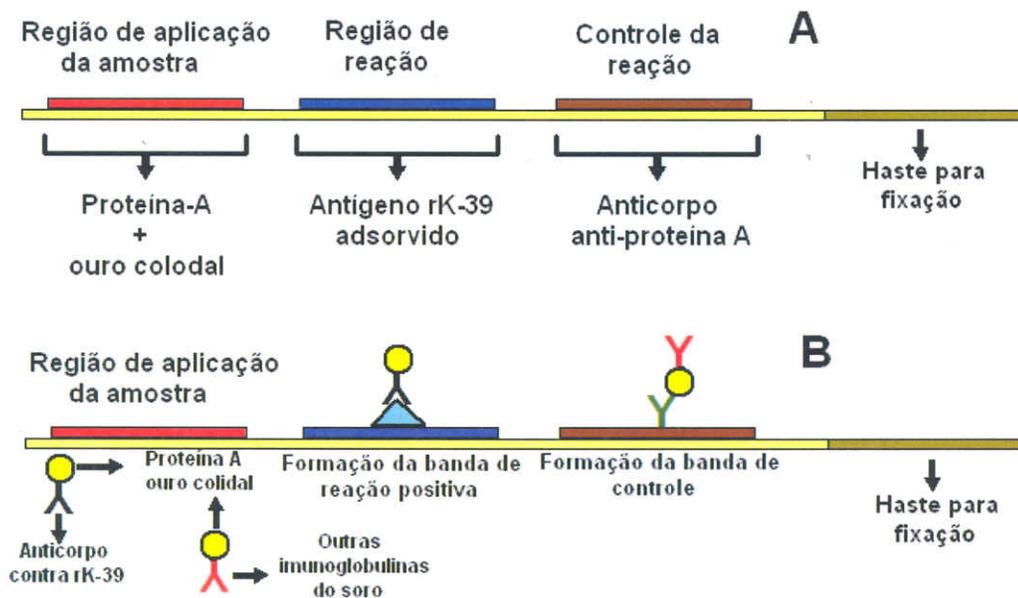


Figura 1 Esquema do teste imunocromatográfico. A) Regiões do teste imunocromatográfico. B) Reações do teste.

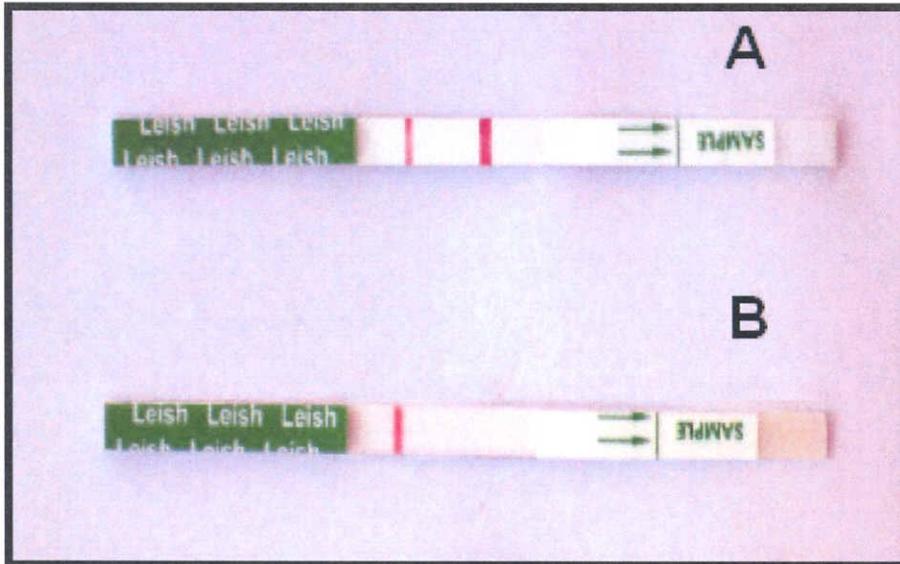


Figura 2 Testes imunocromatográficos. A) Reação positiva. B) Reação negativa.

3.5 Análise estatística

3.5.1 Sensibilidade / especificidade / valores preditivos

A sensibilidade e especificidade foram determinadas segundo o “padrão ouro” que considera o teste parasitológico para as amostras positivas e negativas colhidas no CCZ e amostras de soro provenientes de Uruguaiana, município do Rio Grande do Sul na fronteira com a Argentina. Os resultados foram registrados numa tabela de contingência (2 X 2) para o cálculo dos índices de sensibilidade e especificidade de acordo com Buck e Gart (1966), sendo os valores de predição obtidos como descrito por Vecchio (1996). O programa Win Episcope 2.0 foi utilizado para processar a estatística e realizar as análises propostas pelos autores anteriores. Para determinar o verdadeiro valor da porcentagem de soros positivos e negativos em cada teste usado,

ou seja, diferenças entre os valores de sensibilidades e especificidades encontrados, foi utilizado o erro padrão conforme descreve Camel (1968), fixando-se o nível de aceitação da hipótese de diferença entre eles de $p < 0,05$ de confiança.

3.5.2 Concordância

A concordância foi estimada de acordo com o teste Kappa descrito em Sacket et al. (1991), também fazendo uso do programa Win Episcope 2.0. Este método estatístico foi adotado para avaliar a concordância entre os testes de diagnóstico, entre os diferentes tempos analisados para cada leitor e entre leitores em um mesmo momento do teste, com nível de confiança de $p < 0,05$. A interpretação do teste Kappa é realizada de acordo com os critérios apresentados no quadro abaixo:

Quadro 1. Critérios para interpretação do teste Kappa.

Kappa	Concordância
0,00	Ruim
0,01 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Adaptado de JR Landis e GG Koch, *Biometrics*, 1977;33:159-174.

3.5.1 Teste de Wilcoxon

O teste Wilcoxon descrito por Sampaio (2002) é realizado para estatística não paramétrica, relacionando dois casos em amostras dependentes. O teste em questão foi utilizado para avaliação se há ou não diferença estatística significativa entre as amostras falso-negativas, nos cães com a presença ou ausência de sinais clínicos pelo método imunocromatográfico, com nível de confiança de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Amostras de soro não hemolisadas

As amostras de soro não submetidas à hemólise foram testadas pelas técnicas de

ELISA, utilizando antígeno de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6), ELISA/S7[®], teste de imunofluorescência indireta, utilizando antígeno *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6), teste de imunofluorescência indireta “kit” Biomanguinhos e o teste imunocromatográfico “Kalazar Detect” InBios[®], interpretado por três diferentes leitores nos seis tempos de análise distintos.

As Tab. 1 a 3 e as Fig. 3 a 5 apresentam os valores de sensibilidade e especificidade para os teste de diagnóstico, utilizando soros não submetidos a hemólise, com o padrão ouro para calcular os valores de sensibilidade, especificidade e curva ROC para ELISA utilizando antígeno de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6).

Tabela 1 Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Sensibilidade (%)						
	5	10	15	30	60	1440	Média
LA	88,33	93,33	95,00	95,00	95,00	95,00	93,61
LB	86,67	93,33	93,33	93,33	95,00	98,33	93,33
LC	85,00	90,00	90,00	91,67	93,33	93,33	90,55
Média	86,67	92,22	92,78	93,33	94,44	95,55	92,50

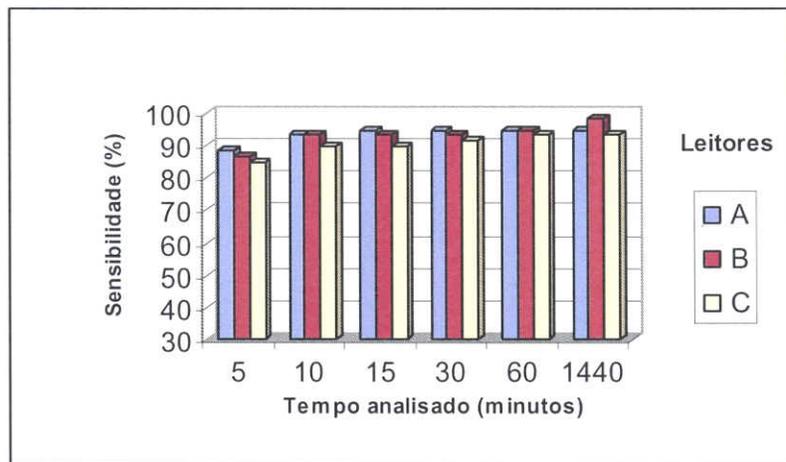


Figura 3 Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

A Tab. 1 e a Fig. 3 mostram que a sensibilidade dos três leitores do teste imunocromatográfico aumenta com os tempos analisados, atingindo o ápice de sensibilidade com 1440 minutos

(24 horas) após o início do teste, sendo o maior valor de sensibilidade neste tempo de análise atingido pelo leitor B.

Tabela 2 Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Especificidade (%)						Média
	5	10	15	30	60	1440	
LA	100	100	100	100	98,33	93,33	98,61
LB	100	100	100	100	100	90,0	98,33
LC	100	100	100	100	100	93,33	98,89
Média	100	100	100	100	99,44	92,22	98,61

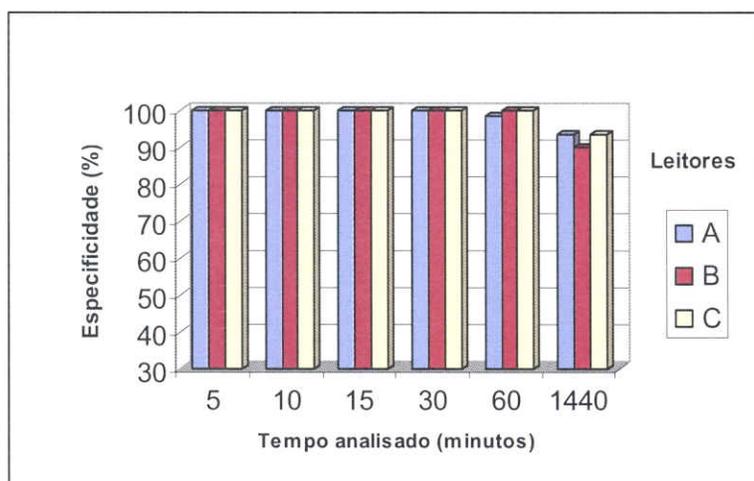


Figura 4 Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros sem hemólise, de 60 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Na Tab. 2 e Fig. 4 observa-se que a especificidade reduz com o tempo decorrido da análise, apresentando uma especificidade de 100% para os três leitores nos tempos de análise de cinco a 30

minutos. Com a interpretação em 1440 minutos (24 horas), os leitores A e C apresentam 93,33% de especificidade e o leitor B 90,00%.

Tabela 3 Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (S7[®] e *L. amazonensis*), RIFI (Biomanguinhos e *L. amazonensis*) e teste imunocromatográfico, de 120 amostras de soro caninas sem hemólise.

Técnicas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
ELISA <i>L. amazonensis</i>	100	100
ELISA/S7 [®]	73,33	100
RIFI Biomanguinhos	93,33	95,00
RIFI <i>L. amazonensis</i>	90,91	84,61
Imunocromatografia	92,22	100

A Tab. 3 revela que o teste de maior sensibilidade e especificidade é o teste de ELISA (*L. amazonensis*). Este teste apresenta diferença estatística significativa, em um nível de confiança $p < 0,05$ para sensibilidade entre todos os outros testes analisados e diferença significativa de especificidade para a RIFI adotando *L. amazonensis*, com o mesmo nível de confiança. O teste de menor sensibilidade é o teste ELISA/S7[®] e o de menor

especificidade é o RIFI (*L. amazonensis*), também com diferença estatística significativa, com nível de confiança de $p < 0,05$, para os outros testes analisados. Os demais testes apresentaram diferenças nos valores de sensibilidade e especificidade devido ao acaso. Os valores de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico apresentados na Tab. 3, referem-se a média dos três leitores em 10 minutos após o início do teste.

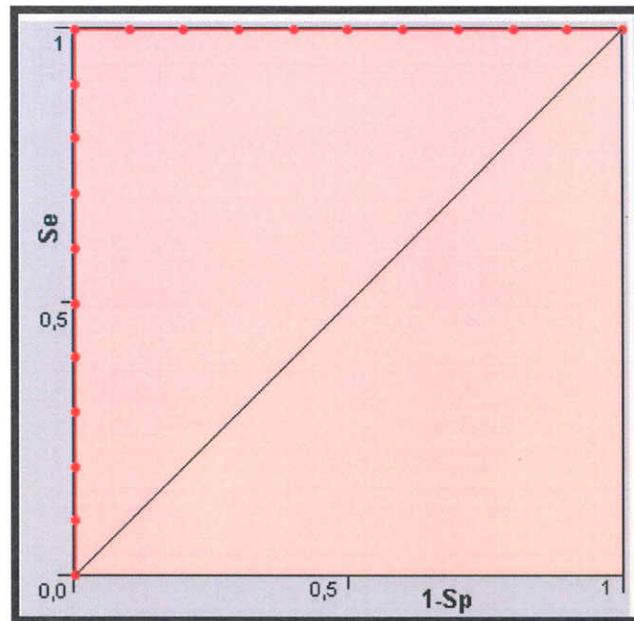


Figura 5 Curva ROC do teste de ELISA (*L. amazonensis*) em amostras de soro caninas sem hemólise.

A Fig. 5 apresenta área total igual a um, ou seja, o teste não possui erros, com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para o ELISA quando se utiliza o antígeno de *L. amazonensis*.

A distribuição dos títulos da RIFI "kit" Biomanguinhos em amostras de soro não submetidos à hemólise é apresentada na Tab. 4. Esta técnica sorológica apresentou quatro resultados falso-positivos no título 1/40 e três resultados falsos negativos, quando comparados com o padrão ouro.

Tabela 4 Distribuição em títulos dos resultados positivos para RIFI "kit" Biomanguinhos em amostras de soro sem hemólise.

Títulos da RIFI	Número de amostras	(%)
1/40	3	5,26
1/80	12	21,05
1/160	12	21,05
1/320	11	19,30
1/640	5	8,77
1/1280	9	15,79
1/2560	3	5,26
1/5120	2	3,51
Total	57	100

A Tab. 5 mostra a distribuição dos resultados falso-negativos no teste imunocromatográfico interpretado aos 10

minutos, comparados com os títulos da RIFI "kit" Biomanguinhos nas amostras de soro não submetidas à hemólise.

Tabela 5 Número de resultados falso-negativos do teste imunocromatográfico interpretado após 10 minutos, relacionados com os títulos da RIFI em amostras de soro sem hemólise.

Títulos da RIFI	Falso-negativos da Imunocromatografia		
	Leitor A	Leitor B	Leitor C
1/40	0	0	0
1/80	1	1	1
1/160	0	0	0
1/320	2	3	3
1/640	0	0	0
1/1280	1	0	1
1/2560	0	0	0
1/5120	0	0	0
Total	4	4	5

A amostra falso-negativa no teste imunocromatográfico com título na RIFI de 1/80 é a mesma amostra para os três leitores. Já para as amostras falso-negativas de título 1/320, duas amostras são as mesmas para os leitores A, B e C, e duas amostras falsa-negativas são distintas. As amostras falsa-negativas com título de 1/1280 são diferentes para os leitores A e C.

As Tab. 6 a 11 apresentam os índices Kappa calculados nas amostras de soro não

submetidas à hemólise. A Tab. 6 apresenta a concordância entre os três leitores em cada tempo de análise. As concordâncias entre os diferentes tempos analisados para cada leitor são apresentadas nas Tab. 7 a 9. A Tab. 10 apresenta os valores de Kappa entre os três leitores com interpretação a 10 minutos, com as demais técnicas sorológicas. O índice Kappa entre as técnicas sorológicas excluindo o teste imunocromatográfico é apresentado na Tab. 11.

Tabela 6 Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos seis tempos de análise em amostras caninas de soro sem hemólise.

Leitores	5 min			10 min			15 min			30 min			60 min			1440 min		
	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro
LA	0,949	0,932	0,883	0,967	0,966	0,933	0,983	0,950	0,950	0,983	0,967	0,950	0,983	0,967	0,933	0,833	0,833	0,883
LB	-	0,983	0,867	-	0,966	0,933	-	0,966	0,933	-	0,983	0,933	-	0,983	0,950	-	0,783	0,883
LC	-	-	0,850	-	-	0,900	-	-	0,900	-	-	0,917	-	-	0,933	-	-	0,867

LA = Leitor A LB = Leitor B LC = Leitor C

Os resultados expressos na Tab. 6 revelam concordância ótima entre todos os leitores nos tempos analisados, exceto entre os leitores B e C que no tempo de análise de 1440 minutos (24 horas) apresentaram

concordância boa. As concordâncias do teste imunocromatográfico, realizados pelos três leitores nos seis tempos de análise, com o padrão ouro (exame parasitológico) foram ótimas.

Tabela 7 Valores de Kappa, para leitor A, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.

Tempo (minutos)	Leitor A					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,950	0,933	0,933	0,916	0,834
10	0,950	-	0,983	0,983	0,967	0,883
15	0,933	0,983	-	1	0,983	0,900
30	0,933	0,983	1	-	0,983	0,900
60	0,916	0,967	0,983	0,983	-	0,917
1440	0,834	0,883	0,900	0,900	0,917	-

As concordâncias entre os tempos analisados, apresentados na Tab. 7 foram ótimas entre todos os tempos, exceto entre 15 e 30 minutos onde a concordância foi perfeita.

Tabela 8 Valores de Kappa, para leitor B, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.

Tempo (minutos)	Leitor B					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,933	0,933	0,933	0,916	0,786
10	0,933	-	1	1	0,983	0,851
15	0,933	1	-	1	0,983	0,851
30	0,933	1	1	-	0,983	0,851
60	0,916	0,983	0,983	0,983	-	0,867
1440	0,786	0,851	0,851	0,851	0,867	-

Para o leitor B, as concordâncias foram boas (5 e 1440 minutos), perfeita (10 e 15, 10 e 30 minutos) e ótima (demais tempos relacionados).

Tabela 9 Valores de Kappa, para leitor C, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro sem hemólise.

Tempo (minutos)	Leitor C					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,949	0,949	0,932	0,916	0,850
10	0,949	-	1	0,983	0,966	0,900
15	0,949	1	-	0,983	0,966	0,900
30	0,932	0,983	0,983	-	0,983	0,917
60	0,916	0,966	0,966	0,983	-	0,933
1440	0,850	0,900	0,900	0,917	0,933	-

As concordâncias encontradas pelo leitor C foram de perfeita entre 10 e 15 minutos e ótima entre os demais tempos analisados.

Tabela 10 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis* e S7[®]), RIFI (Biomanguinhos e *L. amazonensis*) com o teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos com interpretação após 10 minutos em amostras caninas de soro sem hemólise.

Leitores	ELISA	ELISA/S7 [®]	RIFI	RIFI
	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. amazonensis</i>	Biomanguinhos
L A	0,933	0,695	0,682	0,817
L B	0,933	0,695	0,682	0,817
L C	0,900	0,692	0,647	0,817

L A = Leitor A LB = Leitor B LC = Leitor C

Na Tab. 10 o teste imunocromatográfico mostra concordância ótima entre os leitores e os testes sorológicos ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e

exame parasitológico, enquanto para os testes ELISA/S7[®] e RIFI (*L. amazonensis*) a concordância foi boa.

Tabela 11 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis* e S7[®]), RIFI (Biomanguinhos e *L. amazonensis*) e exame parasitológico pós-mortem em amostras caninas de soro caninas sem hemólise.

Técnicas	ELISA <i>L. amazonensis</i>	RIFI Biomanguinhos	ELISA/S7 [®]	PARAS
ELISA <i>L. amazonensis</i>	1	0,883	0,733	1
RIFI <i>L. amazonensis</i>	0,750	0,734	0,642	0,750
ELISA/S7 [®]	0,733	0,718	1	0,733
PARAS	1	0,883	0,733	1

A concordância entre as técnicas sorológicas utilizadas, exceto o teste imunocromatográfico, foi perfeita entre ELISA (*L. amazonensis*) e exame parasitológico, ótima entre RIFI "kit" Biomanguinhos e ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame parasitológico, as demais concordâncias foram avaliadas como boa.

Na Tab. 12 são apresentados os VPP para todas as técnicas sorológicas testadas, em soros não submetidas à hemólise, estimando-se cinco prevalências (2, 5, 8, 10 e 20%) para infecção em cães por *Leishmania*. Para o teste imunocromatográfico o VPP e VPN foram calculados mediante as interpretações dos resultados decorridos dez minutos após início da análise.

Tabela 12 Valores preditivos positivo de ELISA (*L. amazonensis* e S7[®]), RIFI (Biomanguinhos e *L. amazonensis*) e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras caninas de soro sem hemólise.

Perv. (%)	ELISA		RIFI		Imunocromatografia		
	S7 [®] (%)	Am (%)	Biomang (%)	Am (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	100	100	27,59	10,75	100	100	100
5	100	100	49,55	23,72	100	100	100
8	100	100	61,88	33,93	100	100	100
10	100	100	67,47	39,63	100	100	100
20	100	100	81,63	59,62	100	100	100

Am = ELISA e RIFI realizados com antígeno de *Leishmania amazonensis*.

LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C

Os dois tipos de ELISA testados e o teste imunocromatográfico apresentaram VPP de 100%, enquanto a RIFI revelou os menores VPP, sendo o “kit” Biomanguinhos variando

de 27,59% a 81,63% e o RIFI (*L. amazonensis*) de 10,75% a 59,62%.

Semelhante a Tab. 12, a Tab. 13 apresenta os VPN para as mesmas prevalências.

Tabela 13 Valores preditivos negativos de ELISA (*L. amazonensis* e S7[®]), RIFI (Biomanguinhos e *L. amazonensis*) e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras caninas de soro sem hemólise.

Prev (%)	ELISA		RIFI		Imunocromatografia		
	S7 [®] (%)	Am (%)	Biomang (%)	Am (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	99,46	100	99,86	99,78	99,86	99,86	99,80
5	98,61	100	99,63	99,44	99,65	99,65	99,48
8	97,73	100	99,39	99,07	99,42	99,42	99,14
10	97,11	100	99,23	98,82	99,26	99,26	98,90
20	93,75	100	98,28	97,38	98,36	98,36	97,56

Am = ELISA e RIFI realizados com antígeno de *Leishmania amazonensis*.

LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C.

Conforme apresentado pela Tab. 13, somente obteve-se VPN de 100% para o ELISA utilizando *L. amazonensis* como antígeno, sendo os menores valores encontrados para o ELISA/S7[®].

4.2 Amostras de soro hemolisadas

As amostras de soro submetidas à hemólise foram avaliadas pelas técnicas de ELISA utilizando antígeno de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6), RIFI com o “kit”

Biomanguinhos e teste imunocromatográfico “Kalazar Detect” InBios[®] realizado por três diferentes leitores, em 6 tempos distintos de análise.

As Tab. 14 a 16 e Fig. 6 a 8 mostram a comparação entre as técnicas sorológicas, utilizando amostras de soro submetidas a hemólise, com o padrão ouro (parasitológico e sorológico) para determinar os valores de sensibilidade, especificidade e curva ROC para o ELISA.

Tabela 14 Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Sensibilidade (%)						Média
	5	10	15	30	60	1440	
LA	88,33	88,33	90,00	90,00	91,67	91,67	90,00
LB	83,33	83,33	85,00	88,33	88,33	87,93	86,04
LC	75,00	80,00	81,67	83,33	85,00	93,93	83,15
Média	82,22	83,89	85,56	87,22	88,33	91,18	86,39

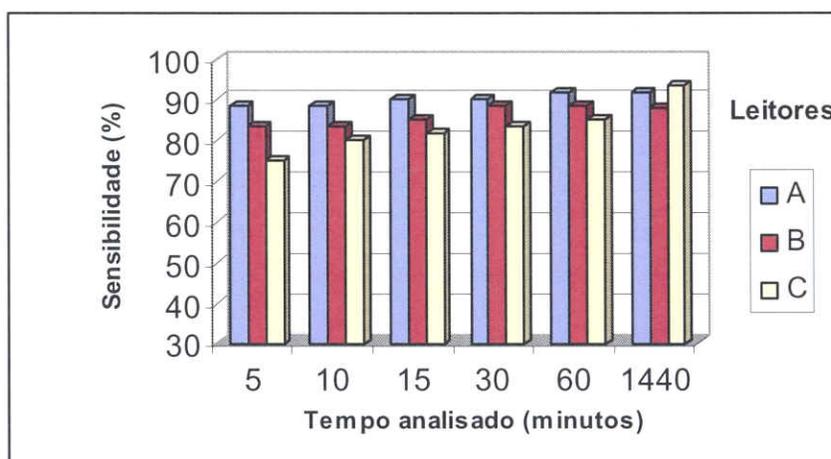


Figura 6 Sensibilidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

A Tab. 14 e Fig. 6 apresentam que o valor da sensibilidade aumenta com o tempo, partindo de 88,33% para leitor A, 83,33% para o B e 75,00% para o leitor C até atingir 91,67%, 87,93% e 93,33%, respectivamente, para os mesmos leitores.

Tabela 15 Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Especificidade (%)						Média
	5	10	15	30	60	1440	
LA	93,33	93,33	93,33	90,00	90,00	90,00	91,66
LB	100	93,33	93,33	90,00	90,00	100	94,44
LC	100	100	96,67	96,67	96,67	100	98,34
Média	97,78	94,64	94,44	92,33	92,22	96,67	94,81

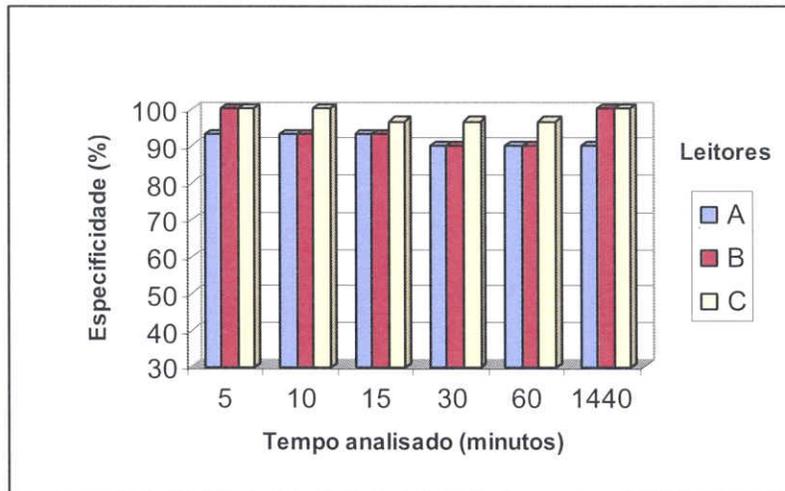


Figura 7 Especificidade do teste imunocromatográfico nos soros hemolisados, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

A especificidade dos três leitores, como mostra a Tab. 15 e Fig. 7, diminuiu no período de cinco a 30 minutos de análise, mantendo os mesmos valores de 30 minutos a 1440 minutos (24 horas) para o

leitor A, de 30 a 60 minutos para os leitores B e C. As especificidades dos leitores B e C retornaram os valores iniciais de 100% em 1440 minutos.

Tabela 16 Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico, de 90 amostras caninas de soro hemolisadas.

Técnicas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
ELISA <i>L. amazonensis</i>	75,00	100
RIFI Biomanguinhos	98,33	93,33
Imunocromatografia	83,89	94,64

Na Tab. 16 pode-se observar que a técnica sorológica de maior sensibilidade é a RIFI, enquanto a de maior especificidade é o ELISA. Foi encontrada diferença estatística significativa no nível de confiança de $p < 0,05$, entre a sensibilidade e especificidade do ELISA (*L. amazonensis*) e RIFI "kit" Biomanguinhos. A sensibilidade do teste imunocromatográfico diferiu com nível

de confiança $p < 0,05$ da sensibilidade da RIFI "kit" Biomanguinhos. As diferenças entre sensibilidade e especificidade dos demais testes analisados foram devidas ao acaso. Os valores de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico apresentados na Tab. 16, referem-se a média dos três leitores em 10 minutos de análise.

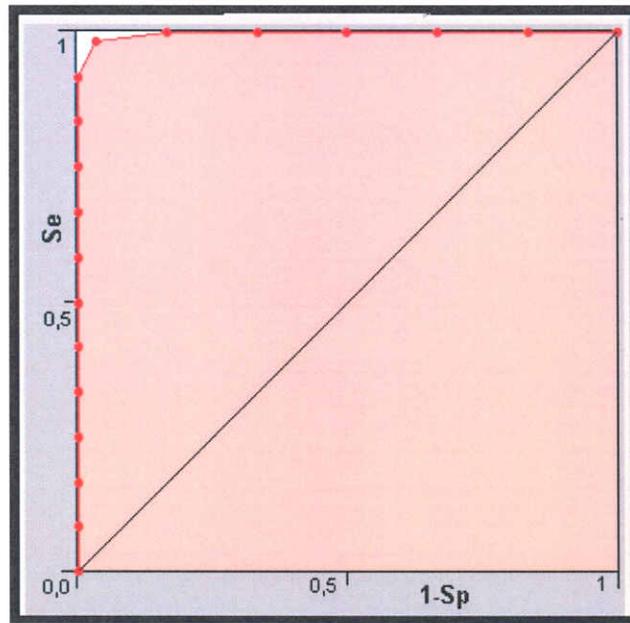


Figura 8 Curva ROC do teste de ELISA (*L. amazonensis*) em amostras de soro caninas submetidas hemolisadas.

A curva ROC apresentada na figura 8 apresenta área de 99,72%, devido a sua alta especificidade e sua sensibilidade de 75%.

As Tab. 17 a 22 apresentam o índice Kappa nas amostras submetidas à hemólise. A Tab. 17 apresenta a concordância entre os três leitores em cada tempo de análise. As concordâncias entre os diferentes tempos

analisados para cada leitor são apresentadas nas tabelas 18 a 20. A Tab. 21 apresenta os valores de Kappa entre os três leitores com interpretação 10 minutos após iniciado o teste, com as demais técnicas sorológicas. O índice Kappa entre as técnicas sorológicas, excluindo o teste imunocromatográfico, é apresentado na Tab. 22.

Tabela 17 Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos seis tempos de análise em amostras caninas de soro hemolisadas.

Leitores	5 min			10 min			15 min			30 min			60 min			1440 min		
	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro
LA	0,886	0,778	0,784	0,931	0,842	0,784	0,930	0,863	0,806	0,929	0,862	0,780	0,952	0,860	0,803	0,850	0,833	0,803
LB	-	0,889	0,769	-	0,910	0,719	-	0,932	0,740	-	0,885	0,758	-	0,908	0,758	-	0,900	0,822
LC	-	-	0,667	-	-	0,727	-	-	0,723	-	-	0,744	-	-	0,766	-	-	0,785

LA = Leitor A LB = Leitor B LC = Leitor C

De acordo com a Tab. 17 a concordância entre os leitores em todos os tempos analisados foi ótima, com exceção a concordância entre os leitores A e C em 5 minutos de análise, onde a concordância foi boa. As concordâncias do teste imunocromatográfico interpretado pelo leitor A e o padrão ouro foram boas em cinco, dez

e trinta minutos de análise, as demais concordâncias para este leitor foram ótimas. O leitor B apresentou concordância boa com o padrão ouro em todos os tempos, exceto em 1440 minutos com concordância ótima, já o leitor C apresentou concordância boa com o padrão ouro em todos os tempos analisados.

Tabela 18 Valores de Kappa, para o leitor A, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro hemolisadas.

Tempo (minutos)	Leitor A					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	1	0,886	0,908	0,929	0,905
10	1	-	0,977	0,953	0,929	0,929
15	0,886	0,977	-	0,976	0,952	0,904
30	0,908	0,953	0,976	-	0,976	0,928
60	0,929	0,929	0,952	0,976	-	0,952
1440	0,905	0,929	0,904	0,928	0,952	-

As concordâncias entre todos os tempos analisados na Tab. 18 foram ótimas, com exceção entre cinco e 10 minutos quando a concordância foi perfeita.

Tabela 19 Valores de Kappa, para leitor B, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro hemolisadas.

Tempo (minutos)	Leitor B					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,955	0,932	0,863	0,863	0,879
10	0,955	-	0,977	0,908	0,908	0,854
15	0,932	0,977	-	0,930	0,930	0,878
30	0,863	0,908	0,930	-	1	0,881
60	0,863	0,908	0,930	1	-	0,851
1440	0,879	0,854	0,878	0,881	0,851	-

A Tab. 19 apresenta concordância perfeita entre 30 e 60 minutos, as demais concordâncias foram ótimas.

Tabela 20 Valores de Kappa, para o leitor C, entre os tempos analisados em amostras caninas de soro hemolisadas.

Tempo (minutos)	Leitor C					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,933	0,889	0,867	0,844	0,861
10	0,933	-	0,955	0,933	0,910	0,930
15	0,889	0,955	-	0,977	0,955	0,953
30	0,867	0,933	0,977	-	0,977	0,953
60	0,844	0,910	0,955	0,977	-	0,976
1440	0,861	0,930	0,953	0,953	0,976	-

O leitor C apresentou concordância ótima entre todos os tempos analisados, de acordo com a Tab. 20.

Tabela 21 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos após 10 minutos em amostras caninas de soro hemolisadas.

Leitores	ELISA	RIFI
	<i>L. amazonensis</i>	Biomanguinhos
LA	0,556	0,710
LB	0,578	0,647
LC	0,578	0,659

A concordância entre os leitores e o ELISA foi regular, com as demais técnicas sorológicas a concordância foi boa, como apresentado na Tab. 21.

Tabela 22 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame parasitológico pós-mortem de amostras caninas de soro hemolisadas.

Técnicas	ELISA	RIFI	PARAS
	<i>L. amazonensis</i>	Biomanguinhos	
ELISA <i>L. amazonensis</i>	-	0,600	0,667
RIFI Biomanguinhos	0,600	-	0,924
PARAS	0,667	0,924	-

Como apresentado na Tab. 22 a concordância entre ELISA e RIFI, ELISA e parasitológico foi boa, enquanto a concordância entre RIFI e exame parasitológico foi ótima.

Na Tab. 23 são apresentados os VPP para todas as técnicas sorológicas testadas, em

amostras de soro submetidas à hemólise, estimando-se cinco prevalências estimadas (2, 5, 8, 10 e 20%) para infecção em cães por *Leishmania* sp. Para o teste imunocromatográfico o VPP e VPN foram calculados mediante as interpretações dos resultados decorridos 10 minutos de análise.

Tabela 23 Valores preditivos positivos de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras caninas de soro hemolisadas.

Prev (%)	ELISA	RIFI	Imunocromatografia		
	Am (%)	Biomanguinhos (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	100	23,13	21,28	20,32	100
5	100	43,69	41,07	39,67	100
8	100	56,18	53,52	52,07	100
10	100	62,09	59,54	58,13	100
20	100	78,65	76,80	75,75	100

Am = ELISA realizado com antígeno de *Leishmania amazonensis*.
LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C.

Na Tab. 23 o VPP foi de 100% para as técnicas de ELISA e teste imunocromatográfico para o leitor C, enquanto para a RIFI variou de 21,28 a 76,80%, para o teste imunocromatográfico realizado pelo leitor A, a variação foi de

21,28 a 76,80%, e para o leitor C de 20,32 a 75,75% nas prevalências testadas.

Semelhante a Tab. 23, a Tab. 24 apresenta os VPN estimando-se as mesmas prevalências anteriores.

Tabela 24 Valores preditivos negativos de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras de soro caninas hemolisadas.

Prev (%)	ELISA	RIFI	Imunocromatografia		
	Am (%)	Biomanguinhos (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	99,69	99,96	99,65	99,63	99,59
5	99,22	99,91	99,35	99,07	98,96
8	98,71	99,84	98,92	98,47	98,29
10	98,36	99,80	98,63	98,05	97,83
20	96,39	99,55	96,97	95,73	95,24

Am = ELISA realizado com antígeno de *Leishmania amazonensis*.
LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C.

Os menores VPN foram encontrados no teste imunocromatográfico interpretado pelo leitor C, enquanto que os maiores VPN foram também encontrados para o mesmo teste interpretado pelo leitor A.

4.3 Amostras colhidas em papel filtro

Para as amostras colhidas em papel de filtro foram realizadas as mesmas técnicas com os soros submetidos à hemólise, ou seja, ELISA utilizando adotando antígeno *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6), imunofluorescência indireta, utilizando "kit"

Biomanguinhos e teste imunocromatográfico "Kalazar Detect" InBios® realizado por três diferentes leitores distintos em seis tempos de análise.

As Tab. 25 a 26 e Fig. 9 a 11 compararam tais técnicas com o padrão ouro (parasitológico e sorológico) para determinar a sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico realizado por três examinadores (leitores) distintos em seis tempos diferentes, após início da técnica, nas amostras de soro colhidas em papel filtro.

Tabela 25 Sensibilidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Sensibilidade (%)						
	5	10	15	30	60	1440	Média
LA	90,00	94,62	91,67	96,67	98,33	98,33	94,94
LB	71,67	80,00	83,33	86,67	86,89	91,67	83,37
LC	71,67	80,00	81,67	81,67	86,67	93,33	82,50
Média	77,78	84,87	85,56	88,34	90,63	94,44	86,94

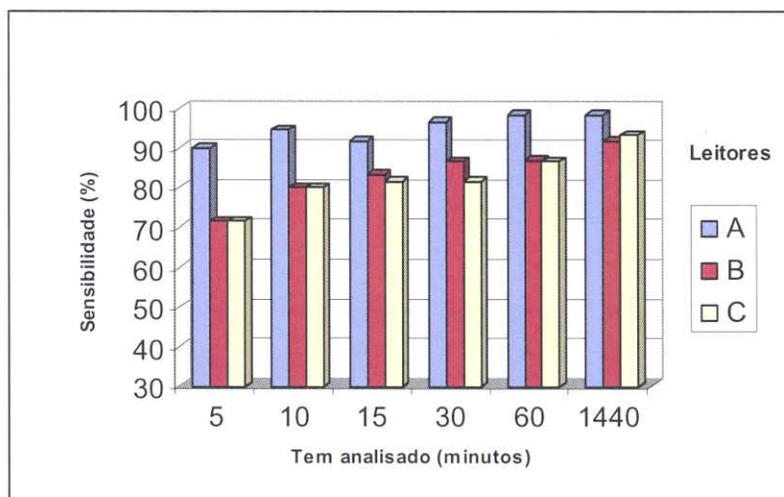


Figura 9 Sensibilidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 60 cães positivos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Em todos os leitores conforme apresentado na Tab. 25 e Fig. 9 a sensibilidade aumentou com tempo, sendo este aumento mais acentuado para os leitores B e C, pois

ambos partiram de sensibilidade de 71,67% em cinco minutos até 91,67 e 93,33% respectivamente para 1440 minutos (24 horas).

Tabela 26 Especificidade do teste imunocromatográfico em amostras de sangue colhidas em papel filtro, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Leitor/ tempo (minutos)	Especificidade (%)						
	5	10	15	30	60	1440	Média
LA	73,33	70,00	70,00	60,00	50,00	33,33	59,44
LB	86,67	83,33	83,33	83,33	76,67	63,33	79,44
LC	86,67	86,67	83,33	83,33	83,33	66,67	81,67
Média	82,22	80,00	78,89	75,55	70,00	54,44	76,52

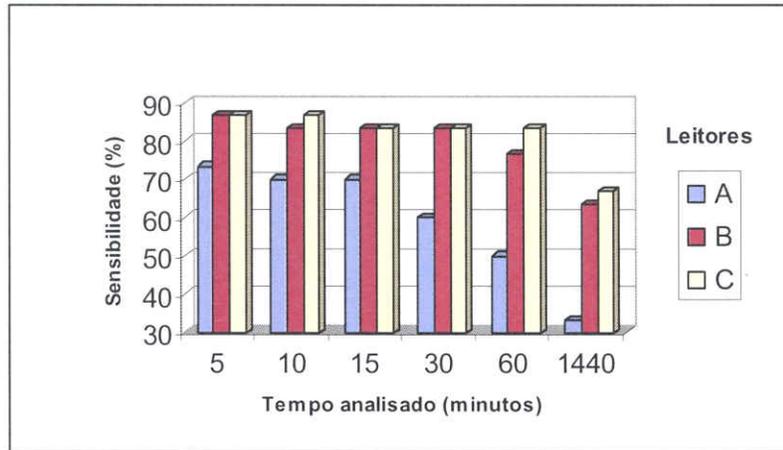


Figura 10 Especificidade do teste imunocromatográfico em amostras colhidas em papel filtro, de 30 cães negativos para LVC, de acordo com o tempo e leitores.

Assim como nas amostras de soro não submetidas à hemólise, a Tab. 26 e Fig. 10 apresentam uma queda na especificidade, sendo a maior queda encontrada para o leitor A, que aos cinco minutos possuía uma especificidade de 73,33% chegando a 33,33% em 1440 minutos.

A Tab. 27 apresenta a sensibilidade do ELISA e RIFI. O ELISA apresentou a maior especificidade, enquanto a RIFI a maior sensibilidade.

Tabela 27 Valores de sensibilidade e especificidade de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico, 10 minutos após início do teste, de 90 amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Técnicas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
ELISA	75	100
<i>L. amazonensis</i>		
RIFI	100	90
Biomanguinhos		
Imunocromatografia	84,87	80

A sensibilidade e a especificidade de todos os testes analisados em amostras colhidas em papel filtro apresentaram diferenças estatísticas com nível de confiança de $p < 0,05$. Os valores de sensibilidade e especificidade da imunocromatografia

apresentados na Tab. 27 são a média dos três leitores em 10 minutos de análise.

A Fig. 11 apresenta a curva ROC do ELISA realizados com amostras de sangue colhidas em papel filtro, com área de 99,72%.

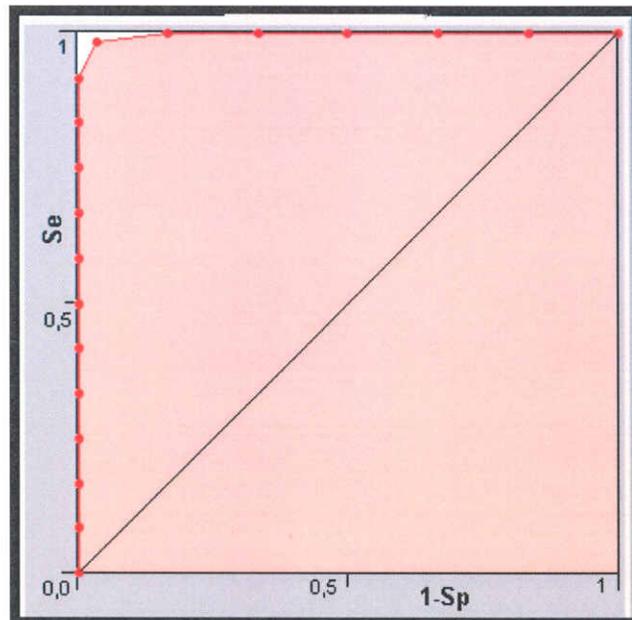


Figura 11 Curva ROC do teste de ELISA (*L. amazonensis*) em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

As Tab. 28 a 33 apresentam o índice Kappa das amostras colhidas em papel filtro. A Tab. 28 apresenta a concordância entre os três leitores em cada tempo de análise. As concordâncias entre os seis diferentes tempos de análise para cada leitor são apresentadas nas Tab. 29 a 31. A Tab. 32

apresenta a concordância entre o teste imunocromatográfico realizado pelos três leitores, com interpretação em 10 minutos, com as demais técnicas sorológicas. A Tab. 33 apresenta a concordância das técnicas sorológicas estudadas excluindo-se o teste imunocromatográfico.

Tabela 28 Valores de Kappa para o teste imunocromatográfico entre leitor A e B, leitor A e C, leitor B e C, leitores e padrão ouro nos 6 tempos de análise em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Leitores	5 min			10 min			15 min			30 min			60 min			1440 min		
	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro	LB	LC	Ouro
LA	0,616	0,616	0,644	0,736	0,715	0,638	0,779	0,757	0,638	0,661	0,600	0,618	0,583	0,544	0,547	0,416	0,485	0,376
LB	-	0,911	0,526	-	0,977	0,598	-	0,977	0,640	-	0,930	0,683	-	0,903	0,628	-	0,830	0,579
LC	-	-	0,526	-	-	0,625	-	-	0,619	-	-	0,619	-	-	0,683	-	-	0,632

LA = leitor A LB = leitor B LC = leitor C

As concordâncias entre os leitores A e B, e A e C foram boas até 30 minutos de análise, após 30 minutos a concordância foi regular. Entre os leitores B e C a concordância foi ótima em todo período de análise. As concordâncias entre o teste imunocromatográfico e o padrão ouro variou de boa a sofrível, sendo as melhores concordâncias encontradas pelos leitores C, B e A de forma decrescente. As concordâncias do teste imunocromatográfico interpretado pelo leitor

A com o padrão ouro foram boas em cinco, dez, quinze e trinta minutos, em 60 minutos a concordância foi regular e em 1440 minutos foi sofrível. O leitor B apresentou concordâncias regulares com o padrão ouro em cinco, dez e 1440 minutos, nos demais tempos analisados as concordâncias foram boas. Já para o leitor C a concordância com o padrão ouro foi boa em cinco minutos e regulares nos outros tempos comparados com o exame parasitológico.

Tabela 29 Valores de Kappa, para o leitor A, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Tempo (minutos)	Leitor A					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,947	0,947	0,775	0,648	0,471
10	0,947	-	1	0,826	0,695	0,511
15	0,947	1	-	0,826	0,695	0,511
30	0,775	0,826	0,826	-	0,862	0,655
60	0,648	0,695	0,695	0,862	-	0,783
1440	0,471	0,511	0,511	0,655	0,783	-

As concordâncias como apresentadas na Tab. 29 variaram de regular a perfeita, passando por boa e ótima.

Tabela 30 Valores de Kappa, para o leitor B, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Tempo (minutos)	Leitor B					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,866	0,820	0,775	0,730	0,523
10	0,866	-	0,954	0,907	0,859	0,637
15	0,820	0,954	-	0,953	0,905	0,678
30	0,775	0,907	0,953	-	0,952	0,721
60	0,730	0,859	0,905	0,952	-	0,714
1440	0,523	0,637	0,678	0,721	0,714	-

A Tab. 30 apresenta concordância regular entre cinco minutos e 24 horas, boa entre cinco e 30 minutos, cinco e 60 minutos,

1440 minutos e 10, 15, 30 e 60 minutos. As demais comparações obtiveram concordância ótima.

Tabela 31 Valores de Kappa, para o leitor C, entre os tempos analisados em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Tempo (minutos)	Leitor C					
	5	10	15	30	60	1440
5	-	0,888	0,843	0,843	0,775	0,569
10	0,888	-	0,954	0,954	0,884	0,665
15	0,843	0,954	-	1	0,930	0,706
30	0,843	0,954	1	-	0,930	0,706
60	0,775	0,884	0,930	0,930	-	0,772
1440	0,569	0,665	0,706	0,706	0,772	-

As concordâncias entre os diferentes tempos para o leitor C foram regular entre cinco e 1440 minutos, boa entre cinco e 60

minutos, 10 e 1440 minutos, perfeita entre 15 e 30 minutos, as concordâncias restantes foram avaliadas como ótimas.

Tabela 32 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis*) e RIFI "kit" Biomanguinhos com o teste imunocromatográfico executado por três leitores distintos após 10 minutos em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Leitores	ELISA	RIFI
	<i>L. amazonensis</i>	Biomanguinhos
LA	0,356	0,563
LB	0,378	0,562
LC	0,400	0,587

Entre as técnicas sorológicas a melhor concordância encontrada foi regular entre as técnicas de RIFI e teste imunocromatográfico interpretado pelo leitor

C, sendo as concordâncias com o ELISA classificadas como sofríveis, conforme apresentado pela Tab. 32.

Tabela 33 Teste Kappa de concordância entre ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e exame parasitológico pós-mortem de amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Técnicas	ELISA <i>L. amazonensis</i>	RIFI Biomanguinhos	PARAS
ELISA <i>L. amazonensis</i>	-	0,662	0,667
RIFI Biomanguinhos	0,662	-	0,857
PARAS	0,667	0,857	-

De acordo com a Tab. 33, a melhor concordância entre as técnicas, excluindo o teste imunocromatográfico, é entre a RIFI e exame parasitológico, sendo esta concordância ótima. As demais técnicas obtiveram concordância regular.

Nas Tab. 34 e 35 são apresentados os VPP e VPN para todas as técnicas sorológicas

testadas, em amostras colhidas em papel filtro, estimando-se cinco prevalência (2, 5, 8, 10 e 20%) para a infecção em cães por *Leishmania*. Para o teste imunocromatográfico o VPP e VPN foram calculados mediante as interpretações dos resultados decorridos dez minutos do início da análise.

Tabela 34 Valores preditivos positivos de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução, em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Prev (%)	ELISA	RIFI	Imunocromatografia		
	Am (%)	Biomanguinhos (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	100	16,95	6,05	8,92	10,91
5	100	34,48	14,24	20,16	24,00
8	100	46,51	21,52	29,44	34,29
10	100	52,63	25,95	34,37	40,06
20	100	71,43	44,08	54,10	60,06

Am = ELISA realizado com antígeno de *Leishmania amazonensis*.

LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C.

De acordo com a Tab. 34 o teste de diagnóstico sorológico que atingiu o maior VPP, igual a 1, foi o ELISA, seguido da RIFI

e teste imunocromatográfico, leitores C, B e A em ordem decrescente.

Tabela 35 Valores preditivos negativos de ELISA (*L. amazonensis*), RIFI "kit" Biomanguinhos e teste imunocromatográfico realizado por três leitores distintos após 10 minutos de execução em amostras de sangue caninas colhidas em papel filtro.

Prev (%)	ELISA	RIFI	Imunocromatografia		
	Am (%)	Biomanguinhos (%)	LA (%)	LB (%)	LC (%)
2	99,49	100	99,84	99,51	99,53
5	98,70	100	99,60	98,75	98,80
8	97,87	100	99,34	97,95	98,03
10	97,30	100	99,15	97,78	97,50
20	94,12	100	98,11	94,34	94,55

Am = ELISA realizado com antígeno de *Leishmania amazonensis*.

LA = leitor A; LB = leitor B; LC = leitor C.

A técnica sorológica que atingiu o maior VPN foi a RIFI, seguida do teste imunocromatográfico, leitores A, C e B ordem decrescente, e ELISA conforme apresentado na Tab. 35.

4.4 Exame parasitológico

Dos 60 animais de Belo Horizonte – MG, que compunham os grupos de animais

positivos sintomáticos e assintomáticos, foram realizados os exames parasitológicos, com maior número de resultados positivos nas impressões realizadas com baço, sendo 56 impressões detectadas utilizando este órgão, ou seja, 93,33% dos animais puderam ser considerados positivos somente por esse tipo de exame. As impressões realizadas com fígado foram positivas em 47 amostras, com 78,33%,

seguidas das impressões realizadas com linfonodo poplíteo, que obtiveram resultado positivo em 30 impressões, 66,67%.

4.5 Teste imunocromatográfico entre animais com e sem sinais clínicos

Tabela 36 Número de resultados falso-negativos pelo teste imunocromatográfico analisado em 10 minutos, com sinais clínicos presentes ou ausentes, entre os três leitores e três tipos de amostras analisadas.

Material	Leitor A			Leitor B			Leitor C		
	Pres.	Aus.	total	Pres.	Aus.	Total	Pres.	Aus.	total
Sem hemólise	2	2	4	1	3	4	2	4	6
Hemolisada	3	4	7	5	5	10	5	7	12
Papel filtro	2	3	5	6	6	12	6	6	12

Pres. = presença de sinais clínicos. Aus. = ausência de sinais clínicos.

Valores de P Wilcoxon Test

Nível de confiança = 95%

Soros não submetidos à hemólise = 0,371

Soros submetidos à hemólise = 0,371

Papel filtro = 1,000

De acordo com a Tab. 36 o número de falso-negativos independe da presença ou ausência de sinais clínicos para cada tipo de amostra analisada, ou seja, esta diferença não foi significativa, com nenhum valor de $p < 0,05$ no teste de diferença de sinais de Wilcoxon.

5. DISCUSSÃO

Os valores médios de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico, entre os três leitores analisados em 10 minutos após início do teste (Tab. 1), são discrepantes aos resultados encontrados por Reithinger et al. (2002), que utilizaram amostras de soros de cães e obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 75%. A diferença encontrada poderia estar associada ao pequeno número de soros utilizados como controle positivo por Reithinger et al. (2002) e a inclusão de cães como controle negativo, provenientes de área endêmica para LVC em Belém do Pará, que não atendem aos fundamentos científicos que

A Tab. 36 apresenta o número de resultados falso-negativos, com sinais clínicos presentes e ausentes para cada leitor nos três diferentes tipos de amostras analisadas.

permitam sua aceitação como sendo os valores reais. Mohebbali et al. (2004) encontraram também resultados discordantes com a presente pesquisa, com sensibilidade de 70,9% e especificidade de 84,9%, porém as amostras de soro utilizadas foram de cães clinicamente suspeitos para controle positivo e cães saudáveis como controle negativo, proveniente de áreas endêmicas do Arzebajão, utilizando como padrão ouro o DAT com o título de 1/320 como ponto de corte.

Os diferentes valores de sensibilidade e especificidade encontrados podem estar relacionados com as condições em que são realizados os testes imunocromatográficos, como temperatura ambiente e umidade relativa do ar, que pode levar o tampão a secar antes mesmo da linha controle aparecer, fato relatado por Zijlstra et al. (2001), onde no Sudão é comum às temperaturas excederem os 40°C e a umidade relativa ser menor que 30%. No entanto, somente condições climáticas

extremas podem implicar em diferenças de resultados, a principal justificativa para os diferentes valores encontrados é principalmente devido a produção de "kits" imunocromatográficos ser realizada por empresas distintas, ou seja, utilização de diferentes técnicas para confecção das tiras.

Poucos trabalhos até o presente momento foram realizados utilizando o teste imunocromatográfico em amostras de soros caninas (Toz et al., 2004), sendo a maioria em soros humanos. Pesquisas realizadas com soros humanos apresentam resultados sempre duvidosos com relação a real sensibilidade e especificidade do teste, já que muitos adotam como padrão ouro aspirado de medula óssea e baço, que apresentam resultados de baixa e variável sensibilidade (Sundar et al., 2002; Boleart et al., 2004), podendo designar como padrão ouro amostras falso-negativas.

Em amostras de pacientes humanos a sensibilidade do teste imunocromatográfico variou de 67% (Zijlstra et al, 2001) a 100% (Sundar et al, 1998; Brandonisio et al, 2002), enquanto a especificidade 77% (Boleart et al, 2004) a 100% (Jelinek et al., 1999; Brandonisio et al., 2002; Iqbal et al., 2002; Lemos et al., 2003).

Os resultados encontrados por Lemos et al (2003) foram muito próximos aos encontrados por esta pesquisa, embora fazendo uso de amostras de soros humanos. Os testes foram realizados no mesmo país, estado do Espírito Santo e com "kit" de diagnóstico imunocromatográfico produzido pela mesma empresa (InBios®).

A sensibilidade do teste imunocromatográfico, nas amostras de soro não submetidas à hemólise, sempre foi crescente com o tempo, concordando com os achados de Zijlstra et al. (2001), mas o que o autor não relata é a queda da especificidade enquanto há o aumento da sensibilidade (Tab. 1 e 2; Fig. 3 e 4).

As concordâncias entre os leitores nos diferentes tempos analisados (Tab. 6), nas amostras não submetidas à hemólise, foram

avaliadas como ótimas (81 a 99%), exceto pelos leitores B e C em 1440 minutos onde a concordância foi boa (61 a 80%), apresentando somente pequenas variações entre os resultados positivos e negativos. Os mesmos resultados foram encontrados quando analisado o índice Kappa entre os tempos interpretados por um mesmo leitor, com exceção a concordâncias boa (61 a 80%) quando comparado cinco com 1440 minutos após o início do teste, para o leitor B.

Diante dos resultados o melhor tempo para a interpretação dos resultados neste tipo de amostra foi o de 30 minutos, onde foi obtida uma média de sensibilidade de 93,33% sem apresentar queda na especificidade de 100%, mesmo assim vale ressaltar que uma das vantagens do teste estudado é a facilidade proporcionada por apresentar resultados em períodos curtos de tempo, onde em 10 minutos após o início do teste, tempo padronizado pelo fabricante, apresenta média de sensibilidade de 92,22% entre os três leitores, 5,55% superior ao encontrado após cinco minutos e 1,11% inferior ao encontrado com 30 minutos de análise. Braga et al. (1998) relataram a necessidade de métodos de diagnósticos com resultados rápidos com a finalidade da diminuição do tempo de exposição dos susceptíveis aos reservatórios, o que foi amplamente alcançado pelo teste imunocromatográfico.

Não se conseguiu encontrar na literatura, pesquisas sobre o uso do teste imunocromatográfico com amostras de soro hemolisados ou absorvidos em papel de filtro, sendo essa prática de rotina nos inquéritos epidemiológicos. As amostras colhidas não submetidas ao processo de hemólise sempre apresentaram resultados de sensibilidade e especificidade superiores aos encontrados para as demais amostras analisadas. As amostras submetidas a processo de hemólise obtiveram médias de especificidade superior às amostras colhidas em papel filtro, porém a sensibilidade foi inferior, exceto pela média dos três leitores em cinco minutos após o início do teste onde a média foi superior e aos 15 minutos onde a média foi idêntica.

Diante dos resultados, para as amostras de soro submetidas a hemólise, deve-se considerar que o processo de hemólise em que as amostras foram submetidas foi muito intenso, onde na rotina nos laboratórios, com devida orientação certamente poucas amostras apresentam condições semelhantes. Nas amostras colhidas em papel filtro, talvez seja necessário ajustes na técnica, como no processo de eluição do sangue em papel, para que o teste possa atingir melhores resultados.

O comportamento dos valores de sensibilidade e especificidade foram muito semelhantes nos 3 tipos de amostras utilizadas, a sensibilidade foi sempre crescente com os tempos analisados e a especificidade decrescente, exceto para os leitores B e C nas amostras submetidas a hemólise em 1440 minutos, onde ocorreu um aumento na especificidade (Tab. 15).

A concordância entre os três leitores nas amostras submetidas à hemólise foi sempre ótima, exceto pela concordância boa dos leitores A e C em cinco minutos, já entre os tempos para o mesmo leitor variou de perfeita (100%) à ótima nos leitores A e B e ótima sem variação no índice Kappa para o leitor C (Tab. 17 a 20). Nas amostras colhidas em papel filtro a concordância entre os leitores variou de regular (41 a 60%) à ótima, já entre os tempos para um mesmo leitor variou de regular a perfeito (Tab. 28 a 31), portanto a concordância entre os leitores obteve piores resultados nas amostras em papel filtro e submetidas à hemólise, amostras estas que apresentaram menor desempenho de sensibilidade e especificidade quando comparada as amostras de soro não submetidas ao processo de hemólise.

Esta diminuição da sensibilidade, especificidade e menores valores concordância apresentados, quando o teste imunocromatográfico é analisado com o material diferente das amostras de soros devidamente colhidas, especialmente quando realizada a colheita em papel filtro, certamente proporcionará um entrave na utilização do teste imunocromatográfico. As colheitas em papel filtro, método adotado

pelos órgãos públicos, por ser prático e eficiente nos inquéritos sorológicos, pode ser comprometida para utilização do teste imunocromatográfico, diante dos resultados apresentados nesta pesquisa. Os brasileiros possuem uma afetividade muito grande com seus animais, seja de companhia ou de exploração econômica o que provoca resistência da população a entrega de seus animais para sacrifício, assim os testes de diagnóstico devem ter elevada especificidade. O sacrifício de um cão não infectado com resultado positivo em qualquer teste, quando este fato chega ao conhecimento dos proprietários, cria de imediato forte resistência contra as ações do programa de controle. A diminuição da sensibilidade deixa na população os falsos negativos mantendo e ampliando o número de animais que compõem o reservatório, elemento indispensável para a manutenção da endemia da LVC. Estas questões precisam ser respondidas por novas pesquisas que proporcionem melhorias na sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico com materiais colhidos em papel de filtro e mesmo com soros hemolisados.

Para solucionar problemas de sensibilidade e especificidade de exames sorológicos, é comum a realização das técnicas em associação, que aumenta a acurácia dos resultados, portanto o uso de outra técnica sorológica juntamente com o teste imunocromatográfico, principalmente quando é utilizado o papel filtro, pode aumentar a confiabilidade dos resultados, mas certamente irá prejudicar uma das principais características da imunocromatografia que é a emissão de resultados em curto período de tempo.

O teste imunocromatográfico não revelou diferença entre cães com ou sem sinais clínicos da doença (Tab. 36), em qualquer tipo de amostra em 10 minutos de análise, ou seja, os números de resultados falso-negativos foram muito próximos, diferentemente como foi relatado por Mettler et al. (2005), que observaram sensibilidade de 97,6% nos animais sintomáticos e 52,9% nos animais assintomáticos, também utilizando o teste imunocromatográfico em

cães. Oliveira et al. (1993) acompanharam 8 animais inoculados experimentalmente que não apresentaram sinais clínicos da doença, encontrando altos títulos na RIFI, variando de 1/320 a 1/1280, exceto 1 animal com título de 1/40, evento similar ao da presente pesquisa. Os testes de RIFI e ELISA também não discriminam diferenças entre os cães com ou sem sinais clínicos.

Os valores encontrados para o índice Kappa, quando avaliado a concordância do teste imunocromatográfico com amostras não submetidas à hemólise, analisado 10 minutos após início do teste, com os dois tipos de ELISA testados, tiveram concordância ótima (81 a 99%) quando comparado com o ELISA utilizando antígeno bruto de *L. amazonensis*, sendo esta concordância a melhor com este tipo de material e concordância boa (61 a 80%) quando comparado ao ELISA/S7[®] para os três leitores testados. A menor concordância com o ELISA/S7[®] é devido, sobretudo a baixa sensibilidade apresentada (73,33%), sendo esta inferior à apresentada pelo teste imunocromatográfico (92,22%), o que é confirmado pela concordância boa entre os dois tipos de ELISA testados (Tab. 11), já que o ELISA utilizando antígeno bruto obteve 100% de sensibilidade e especificidade. Os resultados apresentados por Reithinger et al. (2002) são contrários aos encontrados, havendo uma diferença de especificidades, não de sensibilidades quando o teste imunocromatográfico é comparado com ELISA.

Valores de 100% de sensibilidade para o ELISA, usando o mesmo antígeno da presente pesquisa, bruto e lisado de *L. amazonensis*, foram encontrados por Rosário et al (2005) e Machado (2004). Para Mancianti et al. (1995) a sensibilidade foi de 98,4% e para Vercammen et al. (1997) de 100% com o antígeno *L. infantum*, já no trabalho de Andrade et al. (1998), não se pode determinar a correta sensibilidade de um ELISA que usa o antígeno recombinante HSP-70, o mesmo adotado pelo ELISA/S7[®], também avaliado nesta pesquisa, devido ausência de um painel de soros caracterizados como padrão ouro, constituído de teste parasitológico. O

mesmo conjugado presente no "kit" de ELISA/S7[®] foi utilizado por Reed et al. (1990) determinando melhor desempenho que o conjugado anti-IgG, portanto o valor de sensibilidade inferior encontrado pelo ELISA/S7[®], poderia estar associado ao antígeno HSP-70. Zijlstra et al. (2001) verificou diferença de 33,0% de sensibilidade quando comparou o teste imunocromatográfico (67%) com ELISA rK-39 (100% - conjugado anti-IgG), resultado superior a diferença de 7,78% encontrado por esta pesquisa, sendo que este autor verificou concordância de 69% entre o teste imunocromatográfico e o DAT.

As concordâncias encontradas pelo índice Kappa, entre o teste imunocromatográfico avaliado pelos três leitores e o ELISA, com antígeno bruto de *L. amazonensis*, em amostras de soro submetidas à hemólise e em papel filtro foram consideradas como regular, 41 a 60%, e sofrível, 21 a 40%, respectivamente. Essas baixas concordâncias encontradas entre os dois testes são devidas principalmente às quedas de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico especialmente quando realizado com papel filtro, bem como a queda de sensibilidade do teste de ELISA que foi reduzida em 25% nos dois tipos de materiais, com a especificidade mantida em 100% também em ambos os tipos. Os resultados em amostras colhidas em papel filtro discordam para o ELISA dos achados de Rosário et al. (2005), que obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 96% adotando o mesmo antígeno. Estas variações encontradas estão associadas aos diversos fatores que interferem no desempenho da técnica, sendo o ELISA dotado de grande amplitude de valores de sensibilidade e especificidade conforme pode ser facilmente encontrado na literatura científica que trata deste tema.

Os títulos encontrados para a RIFI (Biomanguinhos) em amostras não submetidas à hemólise foram de 1/40 a 1/5120 (Tab. 4), em amostras de soro não submetidas à hemólise, com maior número de amostras concentradas nos títulos de 1/80 a 1/320 (57,37%), com três resultados falso-positivos com título 1/40 e três

resultados falso-negativos, apresentando uma sensibilidade de 93,33% e especificidade de 95%. Cada partida do RIFI de Biomanguinhos é submetida ao controle por outro laboratório da rede Fiocruz o que acarreta divergências mínimas entre os laboratórios que utilizam este "kit" de diagnóstico. Os resultados de 100% de sensibilidade e especificidade foram obtidos por Machado (2004), adotando mesmo "kit" usado nesta pesquisa, o que comprova que é possível obter resultados semelhantes quando são realizadas medidas de padronização como são executadas pela Fiocruz.

A concordância do teste imunocromatográfico com a RIFI (Biomanguinhos) foi avaliada como ótima, pelos três leitores em 10 minutos após início do teste, nas amostras não submetidas à hemólise (Tab. 10), com valores de sensibilidade e especificidade muito próximos.

A RIFI realizada utilizando antígeno de *L. amazonensis*, também em amostras de soro não submetidas à hemólise, apresentou 90,91% de sensibilidade e 84,61% de especificidade. A concordância com teste imunocromatográfico foi avaliada como boa pelos três leitores, devido a baixo desempenho do antígeno *L. amazonensis* na RIFI (Tab. 10), o que levou a mesma avaliação da concordância entre as duas técnicas da RIFI realizadas (Tab. 11), o que discorda dos achados de Machado (2004) onde a concordância entre a RIFI (Biomanguinhos) e a RIFI adotando antígeno de *L. amazonensis* foi ótima. Entretanto a utilização de antígenos diferentes no diagnóstico sorológico para LVC proporciona valores de sensibilidade e especificidade distintos, principalmente nos títulos baixos, como relatado por Badaró et al. (1983), devido à exposição de diferentes epitopos entre as espécies.

A distribuição de resultados falso-negativos do teste imunocromatográfico (Tab. 5), após 10 minutos do início do teste nas amostras não submetidas à hemólise, quando comparados com os títulos da RIFI, concentrou-se nos títulos abaixo de 1/320,

exceto para o leitor C que apresentou um resultado falso-negativo no teste imunocromatográfico com título da RIFI de 1/1280, leitor este que apresentou sempre as menores sensibilidades e maiores especificidades para qualquer tipo de material analisado, ou seja, maior número de resultados falso-negativos e o menor de falso-positivos.

Nas amostras submetidas à hemólise a sensibilidade da RIFI (Biomanguinhos) foi de 98,33% e especificidade de 93,33%, ou seja, valor de sensibilidade surpreendentemente superior em 5% e 1,67% inferior de especificidade quando comparado às amostras não submetidas à hemólise. Nas amostras em papel filtro a sensibilidade foi de 100% e especificidade de 90%, sendo a técnica de RIFI (Biomanguinhos), a que apresentou menores variações de sensibilidades e especificidades quando comparada com as demais técnicas, o que favorece a sua utilização pelos laboratórios públicos, que recebe grande número de amostras em papel filtro, pela facilidade de colheita. Os valores de sensibilidade encontrados pela RIFI em papel filtro são semelhantes aos relatados por Rosário et al. (2005) com 94,3%, já a especificidade apresentou 10% de diferença quando comparado com a autora.

A concordância entre o teste imunocromatográfico e a RIFI utilizando amostras de soros hemolisadas foi boa e com o papel filtro a concordância foi regular, para os três leitores com análise do teste imunocromatográfico 10 minutos após início do teste (Tab. 21 e 32). Esses valores encontrados para as concordâncias são devidos principalmente e queda de sensibilidade e especificidade dos testes imunocromatográficos, já que a RIFI (Biomanguinhos) apresentou ser a técnica mais estável analisando as amostras submetidas à hemólise e em papel filtro como relatado anteriormente, o que superou a concordância entre o ELISA e o teste imunocromatográfico nestes dois tipos de materiais.

Os VPP foram de 100% nas prevalências testadas (2, 5, 8, 10 e 20%) para o teste imunocromatográfico, após 10 minutos do início do teste, nas amostras não submetidas à hemólise para todos os leitores testados, pois não apresentou resultados falso-positivos, com o mesmo resultado apresentado para ambos os testes de ELISA realizados (Tab. 12). Estes resultados demonstram a eficiência do teste imunocromatográfico e de ELISA, fazendo com que os cães que forem submetidos ao sacrifício sejam realmente positivos, o que aumenta a aceitação pela população a entrega de seus animais. Fazendo uso do mesmo tipo de material para análise, a RIFI (Biomanguinhos) variou de 27,59 a 81,63% e variação de 10,75 a 59,62% para o RIFI utilizando antígeno de *L. amazonensis* nas mesmas prevalências (Tab. 12). O único método de diagnóstico que apresentou 100% de VPN nas amostras não submetidas a hemólise foi o ELISA utilizando antígeno de *L. amazonensis* (Tab. 13), o que apresenta ser uma técnica perfeita de diagnóstico, com o atributo de não permitir a permanência de animais positivos na população em qualquer prevalência testada.

Nas amostras submetidas à hemólise, os testes de diagnósticos que apresentaram VPP de 100% em qualquer prevalência testada foram o ELISA e o teste imunocromatográfico, mas somente para o leitor C (Tab. 23) e nenhum teste para VPN (Tab. 24). Para as amostras colhidas em papel filtro somente o ELISA manteve os resultados anteriores para o VPP, ou seja, de 100% (Tab. 34), enquanto que entre os testes de diagnóstico o que obteve 100% de VPN foi a RIFI (Tab. 35).

Os resultados de VPP e VPN para o teste imunocromatográfico, nas amostras de soro submetidas à hemólise e em papel filtro, foram muito inferiores quando comparado com os resultados das amostras não submetidas à hemólise, o que leva a atribuir confiabilidade no teste somente quando utilizado em amostras de soro não hemolisadas e não colhidas em papel filtro.

O custo do teste imunocromatográfico é um fator importante que contribui para sua adoção na rotina de diagnóstico sorológico para a LVC, realizando a importação diretamente da empresa responsável pela produção dos testes utilizados nesta pesquisa, os valores são de \$1,5 a \$2,0 dólares a unidade, não adicionado os custos com transporte. Realizando a compra da empresa representante no Brasil, o valor unitário é de \$4,36 dólares, somado os custos de transporte. Como o preço das técnicas de ELISA e RIFI realizadas em conjunto pelos laboratórios de diagnóstico veterinário, é de aproximadamente \$ 10,0 dólares por amostra, o teste imunocromatográfico apresenta vantagem no custo com relação aos exames utilizados na rotina, não necessitando ainda de realização de outras provas sorológicas quando resultado positivo, pelo seu alto valor de especificidade, quando utilizado conforme indicado pela bula do fabricante. É importante salientar que outras empresas produzem testes imunocromatográficos para a LVC, com possíveis variações de custos.

Muitos esforços estão sendo realizados em pesquisas de métodos de diagnósticos que possam apresentar resultados rápidos, seguros e de fácil execução. O teste imunocromatográfico apresentou bom desempenho, quando em amostras devidamente colhidas e sem hemólise, necessitando que novas pesquisas contribuam para que o teste seja utilizado com outros tipos de amostras, como sangue embebido papel filtro e sangue íntegro, atendendo também as necessidades do setor público na realização dos inquéritos soro-epidemiológicos caninos.

6. CONCLUSÕES

O teste imunocromatográfico avaliado possui níveis sensibilidade e especificidade para o diagnóstico sorológico LVC que permitem a sua adoção no Brasil. Ele poderá ser usado em substituição a RIFI por não apresentar diferenças estatísticas significativas, quando o limite de leitura for de 30 minutos, utilizando soros sanguíneos sem hemólise.

Esse teste apresenta baixa sensibilidade e especificidade em detectar anticorpos nos soros sanguíneos de cães positivos remetidos em papel de filtro ou quando hemolisados.

O ELISA produzido com o antígeno *L. amazonensis* revelou ser o mais indicado devido sua alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LVC, quando se trabalha exclusivamente com soro sanguíneo sem hemólise e não embebido em papel de filtro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÇÕES de controle da leishmaniose visceral canina em Belo Horizonte no ano de 2005. Disponível em: <www.pbh.gov.br>. Acesso em: 24 de abril de 2006.

ANDRADE, P. P.; SANTOS, E. S. C.; KIDO, E. A. et al. Assessment of a recombinant *Leishmania* HSP70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem. Int. Oswaldo Cruz*, v. 93, suppl. 2, p. 217, 1998.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immuno fluorescenht antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, n. 3, p. 480-484, 1983.

BOLEART, M.; SUMAN, R.; REGMI, S. et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Hyg.*, v. 70, n.1, p. 72-77, 2004.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. L. 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 em papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Medic. Trop.*, v. 35, n. 5, p. 419-424, 1998

BRANDOSIO, O.; FUMAROLA, L.; MAGGI, P. Evaluation of rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Euop. J. Microbiol. Infect. Disease*, v. 21, p. 461-464, 2002.

BRAZ, R. F. S.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R. A. et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BUCK, A. A.; GART, J. J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Am. J. Epidemiol.*, v.83, n.3, p. 586-592, 1966.

CAMEL, F. V. *Estadísticas medicas y de salud publica*. Havana: Imprenta de la Universidad la Habana, 1968. 501 p.

COSTA, C., A.; GENARO, O.; LANA, M. et al. Leishmaniose Visceral Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1991.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil; assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, n. 2, p. 118-123, 1990.

IQBAL, J.; HIRA, P. R.; SAROJ G. et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 475-479, 2002.

JELINEK, T.; EICHENLAUB, S.; LOSCHER, T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eu. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 18, p. 669-670, 1999.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVERA, F. T. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 517, 1987.
- LEMONS, E. M.; CARVALHO S. F. G.; COREY, R.; DIETZE, R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 do diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, suppl. 2, p. 36-38, 2003.
- MACHADO, J. G. *Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004*. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) Escola de Veterinária, Universidade Federal, Belo Horizonte.
- MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELI, C.; POLI, A. Comparison between the enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 59, p. 13-21, 1995.
- MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.
- MANUAL de recomendações para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 72p.
- MATTOS, D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C.; COSTA D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, v. 56, n.1, p. 119-122, 2004.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK-39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol.*, v. 121, p. 239-245, 2004.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Dinâmica*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 474p.
- NICOLLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés in Tunisia. *Arch. Inst. Pasteur*, v. 3, p. 1-26, 1908.
- OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 2, p. 243-248, 1993.
- REED, S. G.; SHREFFLER, W. G.; BURNS, J. M. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Med. Hyg.*, v. 43, n. 6, p. 632-639, 1990.
- RETHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.
- ROSÁRIO, E., Y.; GENARO, O.; SILVA, J., C., F.; COSTA, R., T. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.
- ROSS, R. Notes on the bofies recently described by Leishman na Donovan. *Brit. Med. J.*, v. 2237, n. 2, p. 1261-1262, 1903.
- SACKETT, D. L.; GUYATT, G. H.; TUGWELL, P. *Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*. London: Little, Brown and Company, 1991; 441 p.

- SCALONE, A.; LUNA, R.; OLIVA, G. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, v. 104, p. 275-285, 2002.
- SIEGEL, S. *Nonparametric Statistics: for the behavioral sciences*. Tokyo: Kogakusha Company, Ltda, 1956; 312 p.
- SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.
- SUNDAR, S.; REED S. G.; SINGH V. P. et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.*, v. 351, p. 563-565, 1998.
- SUNDAR, S.; SAHU, M.; MEHTA, H. et al. Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. *Clinical Infect Diseases*, v. 35, p. 581-586, 2002.
- TOZ, S. O.; CHANG, K. O. Y.; ALKAN, M. Z. Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J. Parasitol.*, v. 90, n. 6, p. 1484-1486. 2004.
- VECCHIO, J. Predictive value of a single diagnosis test in unselected populations. *N. Engl. J. Med.*, v. 274, p. 1171-1173, 1996.
- VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T.; LE RAY, D. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Veterinary Record*, v. 141, n. 13, p. 328-330, 1997.
- VEXENAT, J. A.; FONSECA DE CASTRO, J. A.; CAVALCANTE, R. et al. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, NE Brazil. *Archs. Inst. Pasteur. Tunis*, v. 70, n.3-4, p. 467-472, 1993.
- VIANA, F. A. B. *Guia terapêutico veterinário*. Belo Horizonte: Gráfica e Editora CEM Ltda., 2003, 320p.
- WIN Episcopo Versão 2.0. Disponível em: www.clive.ed.ac.uk. Acesso em: 19 de dezembro de 2005.
- ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from Sudan. *Trop. Med.Int. Health.*, v. 6, n. 2, p. 108-113, 2001.