

Juliana Giantomassi Machado

T636.08969

M 1494

2009



**Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral  
Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004.**

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

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Elvio Carlos Moreira

Co-orientador: Prof. Evaldo Nascimento

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2004

M149c

Machado, Juliana Giantomassi, 1979-

Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004 / Juliana Giantomassi Machado. - 2004. 48 p. : il.

Orientador: Elvivo Carlos Moreira

Co-orientador: Evaldo Nascimento

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Bibliografia: p.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Diagnóstico de laboratório - Teses. 3. Imunofluorescência - Teses. 4. ELISA - Teses. I. Moreira, Elvivo Carlos, 1939- II. Nascimento, Evaldo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Título.

CDD - 636.708 969

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
BIBLIOTECA  
DA UFMG

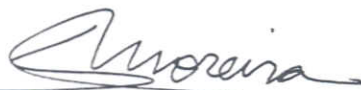
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

19/10/09

2214904-10

363239

Dissertação defendida e aprovada em 14 de julho de 2004, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Elvio Carlos Moreira  
(orientador)



Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo



Prof. José Oswaldo Costa



Prof. Romário Cerqueira Leite



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Dedico este trabalho a minha família que tanto amo (José, Marlene, Cris, Vó Gilda e Tia Sônia) e ao meu avô Antônio, "*in memoriam*", que sempre acreditou na sua neta caçula.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para buscar a perfeição e lutar por meus ideais, mesmo nos momentos em que pensava em desistir.

A minha família que, não dispensando esforços e carinho, tornaram possível a realização de todos os meus sonhos.

Ao Prof. Elvicio Carlos Moreira, pela orientação, amizade e ensinamentos.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia do ICB da UFMG, em especial ao amigo Roberto Teodoro da Costa, pela paciência e ensinamentos, e João Carlos França Silva, pelo apoio.

A família Moreira, pelo carinho e momentos de felicidade que me proporcionaram.

Aos meus pais de Belo Horizonte, Vanessa e Arthur, pelo cuidado e carinho.

À amiga Isabela Veloso, pela compreensão e apoio em todos os momentos, bons ou ruins.

Ao meu amigo Jader, pelo auxílio sem limites.

À dona Wanda e sr. José, “*in memoriam*”, pelo carinho.

Aos amigos Cássio, Ana Cristina, Fátima, Marcus, Débora, Andreza, Danielle, Val, Soraia, Simone Marrocos, Michael, Juliana, Christiana e Kelly, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFMG e do Centro de Controle de Zoonoses de BH, pela contribuição na coleta do material para realização desta pesquisa.

Aos laboratórios de diagnóstico sorológico de Leishmaniose Visceral Canina, que participaram da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Colegiado de Pós-graduação, pela paciência e apoio.

À professora Magda Barbosa Roquette de Pinho Taranto, pela correção gramatical.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 Amostras de soros.....	22
3.2 Laboratórios.....	22
3.2.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	22
3.2.1.1 Laboratório A.....	22
3.2.1.2 Laboratório B.....	23
3.2.1.3 Laboratório C.....	23
3.2.1.4 Laboratório D.....	23
3.2.1.5 Laboratório E.....	23
3.2.2 O teste imunoenzimático.....	23
3.2.2.1 Laboratório A.....	23
3.2.2.2 Laboratório B.....	24
3.2.2.3 Laboratório C.....	24
3.2.2.4 Laboratório D.....	25
3.2.2.5 Laboratório E.....	25
3.3 Análises estatísticas.....	25
3.3.1 Sensibilidade, especificidade, valores preditivos.....	25
3.3.2 Concordância.....	26
3.3.2.1 Teste de Kappa.....	26
3.3.2.2 Teste de Youden.....	27
3.3.3 Qui-quadrado.....	27
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Tabela de contingência 2x2.....	25
TABELA 2	Tabela para calcular teste de Kappa.....	26
TABELA 3	Critérios para a interpretação do teste de Kappa.....	26
TABELA 4	Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório A, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	27
TABELA 5	Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório A, Belo Horizonte-MG, 2003-2004	27
TABELA 6	Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório B, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	28
TABELA 7	Resultados da ELISA em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório B, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	28
TABELA 8	Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por leishmania, obtidos no laboratório C, Belo Horizonte-MG, 2003-2004...	28
TABELA 9	Resultados da ELISA em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório C, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	29
TABELA 10	Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório D, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	29
TABELA 11	Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório D, Belo Horizonte-MG, 2003-2004.	29
TABELA 12	Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório E, Belo Horizonte-MG, 2003-2004..	30
TABELA 13	Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por <i>Leishmania</i> , obtidos no laboratório E, Belo Horizonte-MG, 2003-2004..	30
TABELA 14	Sensibilidade, especificidade, falso-positivos, falso-negativos, testes de Kappa e de Youden da RIFI e do ELISA em cinco laboratórios de diagnóstico sorológico de LVC em Belo Horizonte-MG, 2003-2004.....	31
TABELA 15	Valores preditivos positivos da RIFI e do ELISA de cinco laboratórios de diagnóstico sorológico de LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004, de acordo com cinco prevalências estimadas da infecção por <i>Leishmania</i> em cães.....	31
TABELA 16	Valores preditivos negativos de RIFI e ELISA de cinco laboratórios de diagnóstico sorológico de LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004, de acordo com cinco prevalências estimadas da infecção por <i>Leishmania</i> em cães.....	32

TABELA 17	Frequência dos títulos da RIFI de quatro laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004.....	32
TABELA 18	Teste de Kappa de concordância entre as técnicas de RIFI e ELISA dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004.....	33
TABELA 19	Teste de Kappa de concordância entre as RIFI dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004	33
TABELA 20	Teste de Kappa de concordância entre os ELISA dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004.....	34
TABELA 21	Sensibilidade e especificidade da RIFI para a LVC, de acordo com cinco laboratórios de diagnóstico de Belo Horizonte-MG, em 2003-2004.....	34
TABELA 22	Sensibilidade e especificidade do ELISA para o diagnóstico de LVC, de acordo com cinco laboratórios de diagnóstico de Belo Horizonte-MG, em 2003-2004.....	34

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BH</b>	Belo Horizonte
<b>CCZ</b>	Centro de Controle de Zoonoses
<b>CO</b>	“Cut off”
<b>DAT</b>	“Direct agglutination test”
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucléico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>ELISA</b>	“Enzyme linked immunosorbent assay”
<b>FML</b>	Fucose manose ligante
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional da Saúde
<b>HAI</b>	“Hemaglutinação indireta”
<b>ICB</b>	Intituto de Ciências Biológicas
<b>ID</b>	Imunodifusão



<b>IFI</b>	“Indirect immunofluorescence”
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>LVA</b>	Leishmaniose visceral americana
<b>LVC</b>	Leishmaniose visceral canina
<b>LVH</b>	Leishmaniose visceral humana
<b>NNN</b>	“Mec Neal, Novy, Nicolle”
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>OPD</b>	O-fenilenodiamino
<b>PBS</b>	“Phosphate buffer saline”
<b>PBST</b>	“Phosphate buffer saline caseína tween”
<b>PCR</b>	“Polymerase chain reaction”
<b>PE</b>	Proporção de concordâncias esperadas
<b>PEG</b>	“Polythylene glycol”
<b>PO</b>	Proporção de concordâncias observadas
<b>RFC</b>	Reação de fixação de complemento
<b>RIFI</b>	Reação de imunofluorescência indireta
<b>RMBH</b>	Região Metropolitana de Belo Horizonte
<b>SMF</b>	Sistema mononuclear fagocitário
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VPN</b>	Valor preditivo negativo
<b>VPP</b>	Valor preditivo positivo

## RESUMO

Foram avaliados cinco dos oito laboratórios que realizam diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina em Belo Horizonte, Minas Gerais. Analisou-se a eficiência das técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) e a concordância entre os laboratórios utilizando-se 86 soros de cães positivos e 57 negativos. Os resultados mostraram que a sensibilidade da reação de imunofluorescência indireta e do ELISA dos laboratórios variou de 98,8 a 100%, a especificidade da imunofluorescência indireta de 94,7 a 100% e do "enzyme linked immunosorbent assay" de 96,5 a 100%. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p > 95\%$ ). As concordâncias entre as técnicas do mesmo laboratório e entre eles variaram de ótimas a perfeitas, de acordo com os critérios do teste de Kappa. Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foram calculados de acordo com as prevalências estimadas da leishmaniose de 2, 5, 8, 10 e 20%, sendo que o valor preditivo positivo variou de 27,95 a 100% e o negativo de 99,71 a 100% nas técnicas de todos os laboratórios avaliados. As amostras positivas apresentaram maior frequência nos títulos de 1/320 a 1/1280. Este estudo mostrou que existe alto grau de concordância entre os laboratórios na identificação dos soros de cães negativos e positivos para leishmaniose visceral canina.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral; diagnóstico; canino.

## ABSTRACT

Serological examination of visceral canine leishmaniose were performed by five laboratory in Belo Horizonte-MG. The efficiency and concordance of results using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IFI) methods were analyzed using blood sera of 143 dogs (respectively 86 positives and 57 negatives for visceral canine leishmaniose). Sensibility results varied from 98,8 to 100% in ELISA and indirect immunofluorescence tests among those labs. The specificity varied from 94,7 to 100% and from 96,5 to 100% for indirect immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assay, respectively. Sensibility and specificity differences were not statistically significant ( $p > 95\%$ ). According to the Kappa test the results obtained using both methods in each lab and among them were excellent. Positive predictable values (PPV) and negatives (NPV) were calculated to leishmaniasis estimated prevalences (2,5,8,10 and 20%). Positive predictable values varied from 27,95 to 100%; and negative from 99,71 to 100% in both techniques in all five labs examined. Titres from 1/160 to 1/1280 were the most frequent in positive sera. There was a high level of concordance among the tested labs identifying positive and negative sera of dogs for visceral canine leishmaniose.

**Key words:** visceral leishmaniasis; diagnosis; canine

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma zoonose com ampla distribuição, tanto no Velho Mundo como nas Américas. Ela é causada por um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). No complexo *Leishmania donovani*, atualmente são reconhecidas três espécies como 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, inclusive no Brasil. Alguns pesquisadores acreditam serem *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* a mesma espécie, em função de suas características bioquímicas e moleculares muito semelhantes (Maurício et al., 2000). Entretanto, outros autores baseados em diferenças ecológicas e epidemiológicas acreditam na hipótese de que a *L. (L.) chagasi* seja realmente uma espécie indígena e autóctone de nosso Continente, pois encontraram altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia (Lainson et al., 1987), posicionando este adotado para a definição do agente etiológico neste trabalho. Esses parasitos são heteroxenos, completando o seu ciclo de vida em dois hospedeiros: um vertebrado (canídeos, roedores ou humanos) e outro invertebrado (dípteros hematófagos da família Phlebotomidae, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, com várias espécies vetoras no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, com a espécie vetora *Lutzomyia longipalpis*, no Novo Mundo, embora recentemente tenha sido demonstrada a possibilidade de outras espécies de *Lutzomyia*, tais como a *Lu. evansi* e *Lu. cruzi*, agirem como vetores) - Travi et al., 1996; Galati et al., 1997.

Ocorrem dois ciclos epidemiológicos no calazar: o ciclo silvestre, cujos reservatórios são as raposas, e o ciclo doméstico ou peridoméstico, onde o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório, segundo a conclusão de vários pesquisadores na Europa e nas Américas. Esses dois ciclos podem se sobrepor quando raposas silvestres, por serem animais erráticos, visitam casas à procura de alimentos. Durante essas visitas, os flebotomíneos existentes no peridomicílio, ao sugarem o sangue desses animais silvestres, adquirem a infecção transmitindo-a aos cães. O cão é o reservatório

mais importante da leishmaniose visceral, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de calazar humano.

O ciclo no homem e nos animais vertebrados possui uma fase intracelular e outra extracelular. Nelas, formas amastigotas parasitam o interior de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos. Os órgãos ricos em macrófagos são muito parasitados. Ocorre divisão abundante no interior das células parasitadas, o que provoca a sua ruptura. As amastigotas livres são novamente fagocitadas ou podem ser ingeridas pelo vetor durante seu repasto sanguíneo. Dentro do tubo digestivo do vetor, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se, bloqueando o proventriculo do tubo digestivo do flebotomo, o que provoca regurgitamento de sangue, favorecendo a inoculação das formas infestantes em outro hospedeiro. No novo hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelas células do SMF e perdem o flagelo, transformando-se em formas amastigotas (Alencar, et al. 1991).

Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose visceral pode apresentar-se sob duas formas distintas: a zoonótica, como ocorre no Brasil e Mediterrâneo, onde os canídeos são as fontes de infecção para o vetor, e a antroponótica, como ocorre na África, Bangladesh, Índia e Nepal.

No Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA) é doença de notificação compulsória, sendo disciplinada a investigação epidemiológica para definir as medidas de combate. O programa de controle coordenado pela Fundação Nacional da Saúde (FUNASA)/Ministério da Saúde tem como objetivo reduzir as taxas de letalidade, grau de morbidade e riscos de transmissão, mediante controle da população de reservatórios, do vetor e através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos da doença.

A LVA era uma doença predominante das zonas rurais até o final da década de 1970, estando em franca expansão em áreas urbanas ou periurbanas. Sua importância em saúde pública é devida ao aumento do número de casos e à gravidade da doença. Estudos de casos humanos e caninos têm revelado a ocorrência da urbanização da leishmaniose visceral nas grandes cidades

brasileiras do Nordeste e, mais recentemente, do Sudeste (Badaro, 1988; Marzochi et al., 1994; Oliveira et al., 2001). Essa urbanização é consequência da migração de pessoas das regiões rurais endêmicas para a periferia dos grandes centros urbanos à procura de melhores condições de vida. Esses migrantes levam consigo animais como cães, galinhas e porcos, o que favorece a manutenção do ciclo de vida do inseto vetor (Tesh, 1995). A destruição do meio ambiente com o aumento das crises sociais e da migração são fatores que ajudaram a urbanização das leishmanioses em Minas Gerais.

Atualmente, a leishmaniose visceral humana (LVH) tem ampla difusão geográfica no país, registrada em 18 estados, onde cerca de 44.289 casos humanos foram notificados no período de 1980 a 2000, mais de 90% desses na Região Nordeste, compreendendo os estados do Ceará, Piauí, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Maranhão (Vieira e Coelho, 1998). A região Nordeste encontra-se com 65% do total de casos, seguida pela região Sudeste (14%), Norte (14%) e, finalmente, Centro-Oeste (7%) (Resende, 2004<sup>1</sup>).

Nos últimos anos, o número de casos humanos e caninos da LVA na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) tem aumentado, sugerindo aumento da taxa de transmissão da doença. Até 1999, 345 casos autóctones foram diagnosticados na RMBH, sendo 65% em Belo Horizonte. A taxa de letalidade e mortalidade nessa região entre 1994 e 1999 era de 11,5 e 10,6%, respectivamente (Silva et al., 2001a).

De acordo com Resende, 2004<sup>1</sup>, no ano de 2003 foram confirmados 346 casos de LVH com 28 óbitos em 62 municípios de Minas Gerais.

O principal reservatório da LVA em Belo Horizonte é o cão. Aparentemente, o papel do cão na introdução, dispersão e manutenção da leishmaniose visceral tem valor relevante, uma vez que a epidemia canina precedeu a humana; e os distritos de Belo Horizonte, com maiores coeficientes de incidência de calazar humano, sobrepuseram-se àqueles que apresentaram a doença canina no período de 1993 a 1997 (Belvilacqua et al., 2001).

De acordo com Wilke, 2004<sup>2</sup>, no ano de 2003 foi realizada a sorologia de 118.751 cães, onde

1. Resende, S. M., comunicação pessoal, Coordenadoria de Controle de Zoonoses, Secretaria de Estado da Saúde 15
2. Wilke, V. M. L., comunicação pessoal, Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal da Saúde de BH

10.034 foram reagentes, mostrando um percentual de 8,5% de cães positivos.

O padrão de sinais clínicos da doença em cães pode variar consideravelmente desde uma infecção inaparente (assintomáticos) até sinais clínicos como emagrecimento, perda do apetite, lesões de pele, onicogribose, epistaxe, anemia, lesões oculares, locais ou generalizadas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, que são os mais frequentes. Uma característica importante da leishmaniose em cães é a presença clinicamente inaparente da doença por longos períodos.

Os cães soropositivos e assintomáticos podem ser uma importante fonte de infecção para os flebotomíneos. Silva et al. (2001b) encontraram 60% de cães reagentes assintomáticos quando examinaram 1240 cães na Sociedade Mineira Protetora dos Animais de Belo Horizonte.

O diagnóstico da LVC é problemático e difícil. Os sinais clínicos são comuns a várias doenças prevalentes nos cães no Brasil e em outros países, mas ele pode ser feito por exames parasitológicos, técnicas moleculares e testes sorológicos que possuem sensibilidade e especificidade distintas, mas todos são importantes para que se faça o diagnóstico de certeza.

O diagnóstico parasitológico baseia-se na detecção da *Leishmania* por coloração de esfregaço ou cortes histológicos de órgãos como baço, linfonodos, medula óssea, fígado e pele e isolamento em meio de cultura, inoculação em animais de laboratório (Deane e Deane, 1955). No entanto, em alguns casos é impossível a detecção do parasito mesmo em animais infectados (Ferrer, 1992). Mesmo sendo o mais específico e com menor possibilidade de falso-positivo, o exame parasitológico não deve ser considerado exame de escolha, uma vez que, estando condicionado ao encontro do parasito, passa a ser bastante influenciado pela experiência de quem faz a leitura. Alguns trabalhos mostraram a sensibilidade do método parasitológico em cães sorologicamente positivos: 30% (Pozio et al., 1981), 58% (Gaskin et al., 2002) e 73,3% (Silva et al., 2001b).

Os métodos moleculares utilizados no diagnóstico de agentes infecciosos são técnicas baseadas na hibridização do ácido desoxirribonucléico (DNA)

ou na amplificação de fragmentos do DNA utilizando a "polymerase chain reaction" (PCR) - El-Hassan et al., 1993. O diagnóstico molecular através da PCR tem demonstrado elevada sensibilidade, podendo variar de 87 a 100%, e especificidade de 100% (Ashford et al., 1995). Apesar da PCR ser altamente sensível e específica, apresenta sérias limitações para uso, principalmente no que se refere a inquéritos epidemiológicos, é de pouca praticidade para as condições de campo, necessita de equipamentos e reagentes de custo elevado e de pessoas treinadas para a sua realização (Reed, 1996).

A leishmaniose visceral induz altos títulos de anticorpos, o que facilita o seu diagnóstico por testes sorológicos (Bray, 1980). Assim, métodos sorológicos são utilizados em inquéritos epidemiológicos no intuito de detectar animais infectados. Fatores que influenciam no resultado de um teste diagnóstico são a estabilidade e a especificidade do antígeno, a estabilidade dos reagentes e a possibilidade de uma leitura visual (Controle..., 1999). Mesmo com um método sorológico eficiente, provavelmente perdem-se mais de 20% de fase inicial ainda não estabelecidas (Dye et al., 1993), pois os animais podem estar no período de incubação ou de transição de soroconversão-negativo (Acedo-Sánchez et al., 1998). Como consequência, técnicas sorológicas deveriam ser complementadas por outros métodos atualmente em uso, quando a acurácia do diagnóstico se faz necessária (Campino et al., 2000), ou casos suspeitos soronegativos deveriam ser retestados depois de um período de tempo apropriado.

Para pesquisa de anticorpos utilizam-se como fonte de antígenos parasitos íntegros, particulados ou solúveis. Entre as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico, destacam-se: reação de fixação de complemento (RFC), "direct agglutination test" (DAT), hemaglutinação indireta (HAI), imunodifusão (ID), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e "enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Mais recentemente, foi descrito o uso de antígenos mais específicos na pesquisa de anticorpos anti-*L. chagasi*, como os purificados, produzidos a partir de métodos bioquímicos e preparações antigênicas elaboradas a partir de engenharia genética, como os antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos. Entre os testes destacam-se o ELISA e a imunocromatografia em papel.

A reação de fixação do complemento (RFC) foi o primeiro teste sorológico utilizado no diagnóstico da LV (Kar, 1995). No Brasil, essa técnica foi substituída pela RIFI na década de 80, pela necessidade de se utilizarem técnicas mais sensíveis e específicas (Braga et al., 1998).

A RIFI na leishmaniose foi recomendada por Bray (1976) e por Camargo (1994), pela facilidade de preparação e obtenção do antígeno e baixo custo. Essa reação vem sendo largamente utilizada no diagnóstico da LVC (Costa et al., 1991), pois se mostrou mais sensível ao ser comparada com RFC por Mayrink et al. (1967) e ser considerada como padrão-ouro por Grandoni (1999).

O maior problema dos testes diagnósticos na atualidade é a reatividade cruzada da *Leishmania* com outros microorganismos, particularmente *Trypanosoma*, micobactéria, *Plasmodium* e *Schistosoma*, o que dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, principalmente no que diz respeito a reações cruzadas entre *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (Costa et al., 1991). Esses dados demonstraram que a RIFI é um método que detecta resultados falso-positivos. Por outro lado, devido à sua alta sensibilidade, seu uso torna-se justificável quando empregado com o objetivo de detectar cães infectados em programas de controle para serem posteriormente eliminados. De acordo com Silva et al. (2001b), baixos títulos de anticorpos demonstrados pela RIFI podem estar relacionados a uma reação cruzada com outras parasitoses ou correspondem ao período inicial da doença no período pré-patente.

O teste ELISA foi descrito por Engvall et al. (1971) e introduzido por Hommel (1976) e Hommel et al. (1978) no diagnóstico da leishmaniose. Utiliza como fonte de antígeno, parasitos intactos, parasitos lisados ou, ainda, antígenos recombinantes, tornando-o mais sensível e específico (Hommel et al., 1978; Mohammed et al., 1986; Burns et al., 1993).

No Brasil, o diagnóstico sorológico canino era feito com a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), considerando-se reativos todos os soros que apresentassem positividade a partir da diluição 1/40, inclusive (Controle..., 1999). Em 2002, O Ministério da Saúde recomendou a introdução do teste ELISA para triagem e a imunofluorescência indireta (RIFI) para

confirmação dos positivos (Leishmaniose... 2002).

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral de 2003 do Ministério da Saúde, o diagnóstico da LVC representa um problema para os serviços de saúde pública, relacionado a três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes em outras doenças infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico sorológico 100% específico e sensível. O material recomendado para o diagnóstico sorológico da LVC é soro sanguíneo e, em algumas situações, o eluato de sangue embebido em papel de filtro. O manual afirma que os laboratórios particulares ou pertencentes a universidades e clínicas veterinárias que realizam o diagnóstico da LVC devem participar do programa de controle de qualidade preconizado pelo Ministério da Saúde, enviando os soros aos laboratórios de referência, estadual ou nacional, e quando ocorrerem resultados discordantes entre os laboratórios, o proprietário do animal deverá fazer contraprova sorológica no laboratório de referência.

Sabe-se que nos resultados de qualquer prova sorológica intervêm inúmeros fatores. Alguns, embora conhecidos, são de difícil ou impossível controle, outros são desconhecidos. Estão vinculados, em parte, a tipos de antígenos, reagentes, equipamentos e à qualificação e experiência dos técnicos responsáveis pelo diagnóstico, além dos erros pré e pós-analíticos.

Existem oito laboratórios em Belo Horizonte realizando diagnóstico de LVC com antígenos produzidos pelo próprio laboratório ou adquiridos de terceiros, com equipamentos e reativos diferentes, critérios de interpretação dos resultados de forma empírica, pessoal técnico e auxiliar com formação profissional diferenciada.

Nessas condições, tanto para verificar a eficiência das provas de RIFI e ELISA em relação à sensibilidade e à especificidade, assim como para obter resultados concordantes entre os laboratórios, existe a necessidade de desenvolver procedimentos para avaliação periódica dos laboratórios que realizam o diagnóstico de LVC.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o grau de concordância e acertos entre os laboratórios

que realizam o diagnóstico sorológico de LVC por RIFI e ELISA, utilizando soros de cães positivos e negativos, nos anos de 2003 e 2004, em Belo Horizonte-MG.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

Pozio et al. (1981) examinaram 171 cães em um inquérito de LVC em Monte Argentario, na Toscana, Itália. Desses, 41 eram positivos na RIFI, mas somente em 12 houve comprovação parasitológica. De 41 cães positivos pela RIFI, 41% eram sintomáticos e 59% assintomáticos. A evolução da leishmaniose um ano após o primeiro exame mostrou que 88% dos cães com sinais clínicos morreram, provavelmente da leishmaniose, enquanto 12% permaneceram mostrando sinais da doença. A evolução dos casos assintomáticos verificou-se mais complexa: 52% conseguiram aparentemente recuperar-se com o desaparecimento de anticorpos específicos no soro; 12% continuaram positivos na RIFI, mesmo sem sinais clínicos da doença; 18% desenvolveram a doença, manifestando sinal; e 18% morreram devido a uma leishmaniose grave. Esses autores também relataram uma relação comum entre o aumento do título de anticorpo, a gravidade dos sinais e o exame parasitológico positivo. Entretanto, alguns casos assintomáticos mostraram títulos de 1/640 e alguns casos oligossintomáticos parasitologicamente positivos mostraram títulos baixos (1/40 e 1/80). Eles afirmaram que seus resultados não tiveram concordância com os de outros autores que utilizaram a mesma técnica, pois os títulos de corte para considerar os animais positivos eram diferentes de 1/40, além disto, eles empregaram conjugados anti-soros em diferentes concentrações. Conseqüentemente, deveria ser feita uma padronização da RIFI para ser aplicada ao diagnóstico da LVC.

Guimarães (1983), através de relatos de pesquisadores, chamou a atenção para fatores que poderiam interferir nos resultados dos testes sorológicos realizados com amostras de sangue embebido no papel filtro durante sua coleta, transporte e armazenamento. Ele ressaltou a possibilidade de perda do material, erros na identificação, contaminação por fungos e bactérias, desnaturação dos anticorpos eventualmente presentes e estimativa incorreta na diluição do eluato, pois isto depende da

quantidade de sangue depositada no papel. Apesar dessas limitações, concluiu que se trata do método mais recomendável para inquéritos soropidemiológicos, pela sua maior aplicabilidade nas populações-alvo devido ao seu baixo custo.

Badaró et al. (1983) fizeram um estudo para determinar qual forma morfológica e espécie de *Leishmania* são mais apropriadas para a detecção de anticorpos nos soros de pacientes com leishmaniose visceral americana, utilizando a RIFI. Testaram 30 soros de indivíduos com LVA, 30 de indivíduos não infectados e 10 com a doença de Chagas. Promastigotas e amastigotas de *Leishmania mexicana* e *Leishmania chagasi* foram utilizadas como antígeno. Afirmaram que a sensibilidade e a especificidade da RIFI são influenciadas pelo estágio e espécie do parasita utilizado. A promastigota de *L. chagasi* mostrou menos reação cruzada com portadores da doença de Chagas, por isto esse antígeno seria interessante no diagnóstico da LVA em áreas endêmicas de tripanosomíases. Observaram títulos altos quando utilizaram forma amastigota de *L. mexicana* e os menores títulos foram detectados com as formas amastigotas de *L. chagasi* e formas promastigotas de *L. mexicana*. Verificaram fluorescência mais intensa nas formas amastigotas do que nas promastigotas. A RIFI com promastigotas de *L. chagasi* e amastigotas de *L. mexicana* foi mais sensível do que com amastigotas de *L. chagasi* ou promastigotas de *L. mexicana*. Além disto, promastigotas de cepas homóias têm melhor especificidade. Encontraram sensibilidade e especificidade maior utilizando a forma promastigota da *L. chagasi* como antígeno (100 e 98%, respectivamente), independentemente do título de corte utilizado na RIFI, sendo assim recomendado para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

Badaró et al. (1986) fizeram um estudo para avaliar o ELISA no diagnóstico da leishmaniose visceral humana usando diferentes antígenos de *Leishmania* e uma cepa de *Trypanosoma cruzi*. Duas *Leishmanias chagasi* isoladas na Bahia e Maranhão, uma *Leishmania donovani* do Sudão, uma *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Eles utilizaram 375 soros humanos, incluindo indivíduos com LVA, indivíduos não infectados e com outras doenças. Os antígenos *L. chagasi* (Bahia) e *L. amazonensis* mostraram alta

sensibilidade (98 e 99%, respectivamente) para detectar anticorpos de indivíduos com LV. Entretanto, a especificidade da *L. chagasi* (Bahia) foi melhor que a da *L. amazonensis* (96 e 86%, respectivamente). Nenhum indivíduo testado com outras doenças (sem ser *Leishmania* ou Chagas) apresentou resultado positivo. Esses autores afirmaram que os dois antígenos foram proveitosos para a demonstração de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de calazar. A técnica de micro ELISA aplicada na LV descrita por Hommel (1978) mostrou uma crítica sobre a especificidade. A sensibilidade do ELISA revelou-se alta, mesmo quando outra *Leishmania* ou tripanossoma foi utilizada como antígeno, entretanto, para aumentar a especificidade, a seleção cuidadosa do parasita é essencial. Afirmaram, ainda, que para melhorar a técnica, a escolha da placa é importante, pois uma mesma placa pode mostrar variações críticas na absorvância medida e, além disto, o sistema conjugado-substrato deve estar estável.

Evans et al. (1990) examinaram 405 cães no Ceará através da RIFI e do ELISA. Desses cães, 8% foram positivos na RIFI obtida do eluato de sangue coletado em papel filtro, 17% no soro e 38% na técnica ELISA, que utilizou soro. Foram sacrificados 35 cães soropositivos em uma ou mais técnicas, sendo que alguns órgãos foram preparados e depois cultivados em meio Mec Neal, Novy e Nicolle (NNN). O ELISA reconheceu todos os animais com a infecção comprovada. A RIFI soro detectou 10 de 12 e a RIFI papel detectou nove de 12. Animais soropositivos e soronegativos na necropsia negativa poderiam ter sido infectados no passado e se autocurado. Esses autores observaram que a RIFI, quando realizada em eluato de sangue no papel de filtro, apresentou sensibilidade muito baixa quando comparada com o ELISA realizado no soro. O ELISA proporcionou mais resultados falso-positivos na LVC devido à sua maior sensibilidade. Essa técnica identifica mais cães positivos que a RIFI e também proporciona uma alta porcentagem de casos confirmados parasitologicamente após a necropsia dos cães. As vantagens de sua utilização são: não consumir mais tempo; não ser mais labor-intensivo que a RIFI; o resultado final é menos subjetivo.

Costa et al. (1991) realizaram um estudo comparativo da RIFI em eluatos de sangue de cães infectados experimentalmente com diferentes

tripanosomatídeos. Utilizaram como antígeno promastigotas de *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Os resultados mostraram sensibilidade de 87,5% para o diagnóstico do calazar canino, independentemente do antígeno empregado, e que ocorrem reações cruzadas com a leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com doença de Chagas canina em 83%. Esses autores não detectaram diferença significativa na sensibilidade entre as três espécies utilizadas. Do ponto de vista técnico, o fato é interessante, pois facilita a execução da técnica, mesmo em laboratórios que não contam com facilidades para cultivar diferentes espécies de *Leishmania*. Assim sendo, sugeriram que seja utilizada a *L. mexicana*, pela facilidade do seu cultivo *in vitro*.

Ashford et al. (1993) compararam o FAST-ELISA, o ELISA padronizado e a RIFI na avaliação da LVC em condições de campo, utilizando amostras de soro de 161 cães no estudo longitudinal em Jacobina, Bahia, Brasil. Encontraram sensibilidade de 88% e especificidade de 90% usando como antígeno o lisado de *L. chagasi* no FAST-ELISA; sensibilidade de 75% e especificidade de 93% na RIFI; e no ELISA-padrão sensibilidade e especificidade de 90 e 85%, respectivamente.

Vexenat et al. (1993) examinaram sorologicamente 49 cães do grupo-piloto e 60 cães do grupo-controle para verificar a presença de LVC. Utilizaram DAT, RIFI, ELISA e DOT-ELISA. Quando a detecção do parasita em biopsia de pele, aspirado de medula ou cultura de medula óssea foi considerada padrão para a comparação dos testes, a sensibilidade do DAT foi de 75% e da RIFI, do ELISA e do DOT-ELISA de 100%. A especificidade do DAT, da RIFI, do ELISA e DOT-ELISA foi de 93, 41, 55 e 48%, respectivamente. Na combinação dos três testes sorológicos positivos considerados padrão, a sensibilidade estimada foi de 61, 100, 97, 100% e a especificidade de 100, 75, 94 e 88% no DAT, RIFI, ELISA e DOT-ELISA, respectivamente. Concluíram que: o DAT é menos sensível que os outros testes; a sorologia no papel filtro é menos sensível que no soro; RIFI, ELISA e DOT-ELISA detectaram todos os animais que estariam parasitologicamente positivos; a compatibilidade entre RIFI, ELISA e DOT-ELISA e os altos títulos de anticorpos foram concordantes para o conhecimento da pouca sensibilidade do exame parasitológico.

Oliveira et al. (1993) descreveram aspectos laboratoriais e anatomopatológicos da leishmaniose visceral subclínica em cães. Oito animais foram infectados com *Leishmania chagasi* e sete foram usados como controle. Durante os 25 meses de estudo, os animais infectados permaneceram sem sinal clínico da doença, mas com lesões histopatológicas características. A RIFI desses animais apresentou níveis altos de anticorpos contra *Leishmania*, variando de 1/320 a 1/1280, exceto em um cão, cujo título foi de 1/40. Amastigotas foram encontradas em seis dos oito cães.

Mancianti et al. (1995) compararam duas técnicas sorológicas para detectar LVC em 290 soros de cães (186 eram infectados e 104 controles) e a presença de anticorpos específicos para o antígeno *Leishmania infantum* na Toscana, Itália. As técnicas utilizadas foram a RIFI e o ELISA com um detergente usado para solubilizar o antígeno (promastigotas de *L. infantum*). Observaram forte correlação entre as duas técnicas. O ELISA apresentou sensibilidade maior que a RIFI (99,5 e 98,4%, respectivamente), enquanto sua especificidade foi mais baixa (97,1 e 100%, respectivamente), mas sem diferença estatística entre eles.

Mancianti et al. (1996) compararam o DOT-ELISA com a RIFI no diagnóstico da LVC. Os dois métodos foram testados utilizando soros de 149 cães infectados por *L. infantum*, 75 cães de uma área não endêmica e 11 com outras infecções. Quando compararam o DOT-ELISA com a RIFI (maior ou igual a 1/40), utilizando em ambas as técnicas antígenos de promastigotas de *L. infantum*, verificaram que a sensibilidade do DOT-ELISA foi similar à da RIFI (91,9 e 98,7%, respectivamente). Nesse estudo, a RIFI mostrou-se mais específica (100%) do que o DOT-ELISA (86%). Observaram valor preditivo positivo e negativo da RIFI de 100 e 97,7%, respectivamente, e eficiência de 99,1%.

Vercammen et al. (1997) desenvolveram uma técnica ELISA com promastigotas de *Leishmania infantum* e compararam com microimunodifusão, imunoeletoforese, DAT e RIFI, utilizando soros de 20 cães positivos (seis confirmados parasitologicamente), 12 cães negativos e oito com outras doenças. A sensibilidade de todos os testes foi de 100%. A especificidade da aglutinação direta foi de 95%, mas de 100% nos



outros testes. Houve correlação positiva e um alto nível de concordância entre os títulos medidos pelos diferentes testes. Por ter apenas seis animais com exame parasitológico positivo, a sensibilidade e a especificidade da RIFI, ELISA e DAT foram calculadas tendo como referência a combinação dos positivos sorológicos nos testes da imunodifusão e eletroforese, no qual se detectaram anticorpos específicos. Afirmaram 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 o substrato.

Fisa et al. (1997) calcularam sensibilidade e especificidade do DOT-ELISA proteína A e compararam essa técnica com a RIFI e o diagnóstico parasitológico, encontrando alta concordância. A sensibilidade do DOT-ELISA calculada com 31 cães positivos parasitologicamente foi de 90%, com o título de 1/800 ("cut off") e de 100% com o título de 1/400. A especificidade foi de 100% em ambos os títulos e esta foi calculada sobre uma população canina de uma área não endêmica. Esses autores afirmaram que um fator limitante dos imunodiagnósticos é o antígeno. Como em outras doenças de protozoários, o uso do antígeno inteiro nos diagnósticos sorológicos das leishmanioses tem mais vantagens que o uso de antígenos solúveis, por esta razão a RIFI tem sido mantida. Essa técnica apresenta falhas, pois precisa de aparelhos caros, denota dificuldade de automatização e a leitura é subjetiva. No DOT-ELISA e na RIFI, o antígeno é fácil de preparar e padronizar; os parasitas são obtidos da cultura, são lavados e fixados em solução de formaldeído. Os procedimentos utilizados não introduzem variações qualitativas ou quantitativas na composição do antígeno. Assim, os resultados obtidos por diferentes laboratórios são fáceis de serem comparados. Além disto, neste antígeno inteiro bruto as estruturas das moléculas não são modificadas pelo uso de detergentes e agentes de desnaturantes. A comparação dos resultados obtidos por DOT-ELISA e a RIFI resultou em associação significativa entre as técnicas ( $\chi^2 = 0,815, p=0,05$ ).

Bernadina et al. (1997) utilizaram imunodifusão (ID) com "polyethylene glycol" (PEG) para detectar LVC e compararam com a RIFI e o ELISA. Utilizaram 44 (16 parasitologicamente

positivos) cães da Itália e oito cães estrangeiros do sul da Europa com LVC. O grupo-controle foi composto por 40 cães de região endêmica e 35 estrangeiros. Verificaram na RIFI utilizando o antígeno de *L. infantum* no imunodiagnóstico da LVC especificidade de 100%, ID de 98% e ELISA de 93.5 a 100%, pois este dependia da origem da amostra e da classificação das reações "border line". A sensibilidade em cães de estrangeiros foi de 100% no RIFI, ID e ELISA, mas teve alta variação entre os cães endêmicos.

Borja-Cabrera et al. (1999) padronizaram o ELISA fucose manose ligante (FML) para o diagnóstico sorológico da LVC e relataram alta sensibilidade comparada com a da RIFI em detectar cães assintomáticos. A sensibilidade na detecção da LVC do FML-ELISA foi de 100%; no ELISA com *L. mexicana* foi de 55.5%; e de 33.3% na RIFI com antígeno *L. chagasi* e *L. mexicana* utilizando 21 cães assintomáticos e seis cães sintomáticos soro-reativos para LVC. Afirmaram que o FML-ELISA representa um bom instrumento para o controle da LVC, baseado na detecção e eliminação dos cães infectados, pois tem alto valor preditivo, sensibilidade e especificidade.

Silva et al. (2001b) fizeram uma análise da população canina proveniente da Sociedade Mineira de pequenos animais através de exames clínicos e laboratoriais durante dois anos. A RIFI foi realizada em 1240 animais, onde 215 apresentaram título superior a 1/40. Dos positivos, 26.5% apresentaram título igual a 1/640, mostrando que altos títulos de anticorpos ocorrem em animais infectados, mesmo assintomáticos. Parasitas foram detectados através de mielograma e mielocultura em 73% de cães com sorologia positiva, apresentando títulos que variaram de 1/160 a 1/640. Não foi possível detectar parasitas em quatro cães que apresentaram título entre 1/40 e 1/80.

Sundar (2002), em revisão da literatura sobre técnicas de diagnósticos da leishmaniose visceral, relatou que a especificidade depende mais do tipo de antígeno usado no teste do que do protocolo adotado, sendo a sensibilidade influenciada pela metodologia. Na maioria dos testes sorológicos, os dados da sensibilidade e especificidade são comparados com a demonstração dos parasitas em vários tecidos. Além disto, afirmou que o ELISA é uma técnica

com alta sensibilidade, mas sua especificidade depende do antígeno utilizado.

Scalone et al. (2002) desenvolveram, otimizaram e avaliaram o teste ELISA com antígeno recombinante de *L. chagasi* rK39 usando soros de 6368 cães. As amostras de campo utilizadas para calcular a sensibilidade e a especificidade desse teste foram de 157 positivas e 258 negativas na RIFI. Esses autores observaram elevada sensibilidade (99,4%) e especificidade (99,6%) de ELISA rK39. Quando comparadas com o parasitológico positivo e cães normais, a sensibilidade e a especificidade foram de 97,1 e 98,8%, respectivamente. Observaram concordância entre a RIFI e o ELISA rK39 de 0,99 e o índice de Kappa de 0,89. Esse é um método relativamente simples e rápido para avaliar o estágio de infecção dos cães e é uma alternativa para a RIFI, especialmente para fazer "screening" de um grande número de amostras. A RIFI emprega antígenos brutos, como promastigotas inteiras ou seus extratos solúveis, no qual limita sua padronização e reprodutibilidade dos resultados.

Barbosa de Deus et al. (2002) utilizaram o antígeno LMS preparado da promastigota *Leishmania major*-Like no ELISA para o diagnóstico da LVC e LVH e compararam com a RIFI. Eles testaram 1822 cães, incluindo soros de cães positivos para LVC, cães com outras doenças e soros de cães saudáveis. Nas amostras de cães utilizando a RIFI como padrão, o ELISA mostrou sensibilidade de 98%, especificidade de 95% e concordância ("youliden") de 93%. Os valores preditivos positivos e negativos foram 66 e 100%, respectivamente. Nas amostras de humanos, demonstraram sensibilidade de 92%, especificidade de 100% e concordância de 92%. Afirmaram que os antígenos usados nos diagnósticos sorológicos na leishmaniose visceral têm sido problemáticos devido à baixa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade e não ficaram claras as razões dessas limitações.

Rosário (2002) avaliou a técnica de RIFI com antígeno de promastigotas integras de *L. amazonensis* e o teste ELISA com antígenos lisados de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e os antígenos recombinantes rK39 e rK26 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizando 115 cães positivos para LVC provenientes de Janaúba e 126 cães negativos

para LVC, incluindo outras doenças. A autora observou elevada sensibilidade e especificidade utilizando a *Leishmania amazonensis* como antígeno íntegro na RIFI (96,2 e 96%, respectivamente) e lisado no ELISA (100% em ambas). Quando utilizou *L. chagasi* lisado no ELISA, encontrou sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. No ELISA utilizando os antígenos recombinantes, verificou que o rK39 apresentou sensibilidade de 98,1% e especificidade de 100%, já o rK26 apresentou 99,1% de sensibilidade e 96% de especificidade. Quando utilizou eluato, observou sensibilidade e especificidade de 94,3 e 100% na RIFI; no ELISA com *L. amazonensis* encontrou sensibilidade de 100% e especificidade de 96%; e no ELISA com *L. chagasi* encontrou sensibilidade de 100% e especificidade de 88%. Foi observada ótima concordância (0,92) entre a RIFI e o ELISA. Os valores preditivos positivos nas prevalências de 5, 10 e 20% foram de 56, 73 e 86% na RIFI, 84, 92 e 97% no ELISA com *L. amazonensis* e 84, 92 e 96% no ELISA com *L. chagasi*. Esse estudo demonstrou que os diferentes testes usando antígenos lisados de promastigotas e recombinantes em soro e eluato apresentaram resultados concordantes na identificação de cães positivos e negativos, podendo ser utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Não se observou diferença significativa entre o título da RIFI nas diferentes formas clínicas de cães com LV e que o ELISA utilizando antígenos lisados de promastigotas detecta um grande número de cães infectados em suas diferentes formas clínicas.

Reithinger et al. (2002) compararam o teste de imunocromatografia, o ELISA e o PCR na detecção de infecção de *L. infantum* em cães de uma área endêmica do Brasil, utilizando 74 e 92 cães positivos (experimento 1 e 2, respectivamente) e 101 e 83 cães negativos (experimento 1 e 2, respectivamente). O teste de imunocromatografia apresentou especificidade de 61 e 75% e sensibilidade de 72 e 77%; o ELISA especificidade de 100% e sensibilidade de 71 e 88%; e o PCR especificidade de 100% e sensibilidade de 51 e 64%. Eles afirmam que a sensibilidade e a especificidade do ELISA dependem do tipo de antígeno utilizado (exemplo: espécie do parasita/ promastigotas ou amastigotas) e de mudanças no protocolo (exemplo: tempo de incubação, tipo de placas utilizadas, etc.).

Vercammen et al. (2002) monitoraram clínica e soroiologicamente com RIFI, ELISA e "western blotting" 14 cães naturalmente infectados com *L. infantum* tratados com allopurinol. Todos melhoraram clinicamente com a diminuição dos anticorpos específicos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de soros

Foram selecionados 143 cães, sendo 86 positivos e 57 negativos para leishmaniose visceral canina. De todos eles obteve-se soro sanguíneo por punção venosa. Os 86 considerados parasitologicamente positivos foram aqueles que, após a necropsia, tinham amastigota presente no baço, fígado ou medula óssea, corada pelo Panótico1 (Laborclin), visibilizada no microscópio de campo claro, com objetiva de 100X, com cargas parasitárias variadas. Entre os animais positivos, 47 (54,61%) eram cães sintomáticos, 25 (29,07%) assintomáticos e 14 (16,28%) sem informação sobre os sinais clínicos. Esses 86 cães foram eutanasiados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Belo Horizonte, no período de 25 de fevereiro de 2002 a abril de 2003 e apresentavam resultados sorológicos positivos por RIFI e ELISA, emitidos por vários laboratórios. Os 57 soros negativos foram obtidos de 23 cães errantes eutanasiados no CCZ, negativos nos testes de ELISA com o antígeno recombinante rK39 e que apresentaram resultados negativos nos exames das amastigotas no baço, fígado e medula óssea coradas pelo Panótico. Os 34 soros restantes foram de cães sem qualquer sinal clínico de doença, nascidos e criados na cidade de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, região livre da leishmaniose visceral canina e humana. Esses soros foram submetidos ao teste ELISA com antígeno recombinante rK39 e todos foram negativos. As amostras foram distribuídas em "Eppendorf" de 1,5ml, codificadas e encaminhadas para quatro laboratórios de Belo Horizonte em novembro de 2003 e um em fevereiro de 2004, junto com um questionário sobre como os exames foram realizados. Os soros foram caracterizados como padrão-ouro soroparasitológico.

#### 3.2 Laboratórios

Os cinco laboratórios que participaram da pesquisa estão localizados na cidade de Belo Horizonte e utilizam as técnicas de RIFI e ELISA na rotina, sendo quatro de instituições públicas: dois de Ensino e Pesquisa e dois de órgãos de Saúde Pública e um da iniciativa privada.

Foram assim codificados: laboratórios A, B, C, D e E.

#### 3.2.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

##### 3.2.1.1 Laboratório A

O processamento da RIFI foi realizado com a finalidade de detectar anticorpos imunoglobulina G (IgG) nos soros de cães. O antígeno utilizado (*Leishmania (L.) amazonensis* MHOM/BR/1960/BH6) adquirido no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) foi colocado em cada círculo (6mm) de lâminas adequadas para imunofluorescência e estas ficaram de um dia para o outro para que o antígeno secasse. Depois, foram embrulhadas em lenço de papel absorvente, revestidas com papel alumínio e estocadas a -20°C até o momento de uso.

O conjugado utilizado na RIFI foi uma antiimunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com isotocianato de fluoresceína (Biomanguinhos, RJ) obtida de soro imune de coelho. Este foi titulado com soros e conjugado já conhecidos. A diluição ideal de uso foi de 1/100. O "phosphate buffer saline" (PBS) foi feito no próprio laboratório.

Os soros foram diluídos a 1/40 no PBS utilizando 200µl de PBS e 5µl de soro.

A técnica foi realizada descongelando sob a temperatura ambiente as lâminas contendo antígeno. Em seguida, foram colocados as amostras e os controles positivos e negativos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida na estufa a 37°C por 30 minutos, lavadas com PBS e cobertas com PBS por cinco minutos, seguido de lavagem com água destilada. Elas foram secas no ventilador para, posteriormente, adicionar em

cada poço o conjugado total antiIgG de cão conjugado na diluição 1:100 + azul de Evans na diluição 1:50, a partir de uma solução estoque - PBS + 2% "Tween" 80, sendo a seguir incubadas por 30 minutos na estufa a 37°C. Por último, foram colocadas sobre elas glicerina tamponada e as laminulas. A leitura das lâminas foi realizada no microscópio de imunofluorescência (marca Olympus, modelo BH2-RFCA) com aumento da ocular de 20 e 40X. Animais com títulos de IgG iguais ou superiores a 1:40 foram considerados positivos e posteriormente diluídos até 1/1280. As pessoas responsáveis pelos exames possuíam nível superior.

### 3.2.1.2 Laboratório B

Esse laboratório teve o protocolo igual ao do laboratório A, onde foi utilizado o mesmo antígeno, mesmo conjugado com a diluição ideal de uso 1/100 e a mesma fórmula do PBS. A marca do microscópio foi a Olympus, modelo BH2-RFCA. A pessoa responsável pelos exames possuía nível superior.

### 3.2.1.3 Laboratório C

A RIFI foi realizada com o "kit" de imunofluorescência indireta da Biomanguinhos (2000 determinações), que forneceu: lâmina, antígeno (*Leishmania major*), conjugado, glicerina tamponada, azul de Evans e a fórmula do tampão fosfato para ser feito no próprio laboratório. De acordo com o protocolo, o conjugado (antiimunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com isotiocianato de fluoresceína obtida de soro imune de coelho) foi titulado e determinou-se o título ideal de 1/200. O antígeno foi pingado nas lâminas utilizadas (10 µl em cada círculo de 5mm) e estas foram deixadas na estufa a 32°C de um dia para outro para que secassem.

Os soros testes foram diluídos a 1/40 (5 µl de soro em 200 µl de PBS) e colocados nas lâminas com o antígeno, junto com os controles positivo e negativo (1/40). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e posteriormente lavadas três vezes em PBS nas cubas de lavagem durante cinco minutos cada banho e, em seguida, lavadas com água destilada. Elas foram colocadas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secagem. O conjugado foi

preparado de acordo com a diluição ideal e acrescentado em 0.1% de azul de Evans. Foram adicionados 15 µl dessa diluição em cada orifício das lâminas. Por fim, adicionou-se de três a quatro gotas de glicerina tamponada sobre elas, cobrindo-as com a laminula. A leitura foi realizada no microscópio de imunofluorescência (marca Zeiss, modelo Axiolab HB 050) utilizando aumento da ocular de 40X, considerando os animais reagentes com título maior ou igual a 1/40, que posteriormente foram diluídos até 1/1280. As pessoas responsáveis pela realização dos exames possuíam nível médio e superior.

### 3.2.1.4 Laboratório D

Esse laboratório utilizou o mesmo "kit" do laboratório C. O antígeno é o mesmo, mas foi pingado nas lâminas e deixado de um dia para outro para que secassem. O título do conjugado foi de 1/800. O microscópio de imunofluorescência utilizado foi da marca Carl Zeiss, modelo HB 050, ano 1996. As pessoas responsáveis pela realização dos exames possuíam nível médio e superior.

### 3.2.1.5 Laboratório E

Esse laboratório utilizou o mesmo antígeno que os laboratórios A e B, mas o conjugado foi da marca Sigma, no qual o título utilizado foi de 1/40. O único item que diferiu dos laboratórios A e B foi quanto às lâminas, que foram enxaguadas com PBS e colocadas duas vezes na cuba de lavagem com PBS durante cinco minutos. O microscópio utilizado tem base INAL, mas o sistema de imunofluorescência foi NIKON modelo HBO 100. Os aumentos da ocular foram de 10, 20 e 40X. As pessoas responsáveis possuíam nível superior e nível técnico.

## 3.2.2 O teste imunoenzimático (ELISA)

### 3.2.2.1 Laboratório A

As placas de ELISA de poliestireno de fundo chato sensibilizadas com o antígeno (*Leishmania amazonensis* MHOM/BR/1960/BH6) foram adquiridas do Laboratório de Parasitologia do ICB. O conjugado imunoenzimático usado foi uma antiimunoglobulina 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 "phosphate buffer saline caseína tween" (PBSCT) a 1/40, utilizando 200µl de PBSCT e 5µl de soro. Para que ficasse uma diluição de 1/80 na placa sensibilizada, foram colocados 50µl de PBSCT e acrescentados mais 50µl da diluição de 1/40. Os controles positivos (dois), negativos (quatro) e brancos (dois) também foram acrescentados à placa. Esta ficou na estufa a 37°C durante 30 minutos. As placas foram lavadas (manualmente) com solução de lavagem para retirar o excesso de soro e foram incubadas com 100µl/orifício de conjugado antiIgG cão (a diluição ideal de 1/8000) por 30 minutos e em seguida lavadas novamente quatro vezes com solução de lavagem. Adicionaram-se às placas 100 µl/orifício da solução de substrato (5mg de -O-fenilenodiamino -OPD + 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% + 10ml de tampão citrato-fosfato), mantendo-as no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 30µl/orifício de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N para interromper a reação. A leitura da reação foi feita em leitor de ELISA (marca Labsystems Multiskan MS, modelo Version 4.0, ano 1994) a 492nm. Os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO).

O ponto de corte para o ELISA foi determinado de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{Ponto de Corte} = \frac{\text{média dos controles negativos} \times 2 \times 1,2}{1}$$

A pessoa responsável pela realização dos exames possuía nível superior.

### 3.2.2.2 Laboratório B

Esse laboratório utilizou o mesmo protocolo do laboratório A, o mesmo antígeno, as mesmas soluções e o mesmo conjugado, mas diluído a 1/10000. O leitor de ELISA foi o da marca BDSL immunoskan, modelo 340 e ano 1988. A pessoa responsável pela realização dos exames possuía nível superior

### 3.2.2.3 Laboratório C

O ELISA foi realizado com o "kit" da Biomanguinhos (384 reações), que forneceu: diluente da amostra /conjugado (5X), lectina de leite, tampão de lavagem (20X), diluente de substrato, cromógeno (TMB), substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido sulfúrico 2M, controle positivo, controle negativo, conjugado, molduras/"strips" duplas sensibilizadas com *Leishmania major* e folhas adesivas.

O primeiro passo foi preparar o diluente de amostras/conjugado, dissolvendo a lectina em água destilada (de acordo com o número de reações), para em seguida diluir em tubos, 5µl dos controles e das amostras de soros de cães em 500µl do diluente de amostra/conjugado (1/100). Logo após, no primeiro "strip", foram colocados 100µl dos controles (dois orifícios com o positivo e dois com o negativo), do branco (dois orifícios) e das amostras em questão. Os "strips" foram selados com folha adesiva e incubados a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi aspirado e eles foram lavados seis vezes com o tampão de lavagem (200µl/orifício), com um intervalo de 30 a 60 segundos entre cada lavagem (manualmente). O conjugado foi diluído na amostra/conjugado, de acordo com o número de reações. Depois de homogeneizado, foram distribuídos 100µl da diluição em cada orifício. Estes foram selados com folha adesiva e incubados a 37°C por 30 minutos. O substrato foi preparado alguns minutos antes do uso, utilizando o diluente do substrato, o cromógeno e a água oxigenada. As quantidades de cada um deles foram de acordo com o número de reações realizadas. Esse substrato foi distribuído rapidamente em todos os orifícios, com 100µl em cada, e incubado à temperatura ambiente, ao abrigo de luz durante 30 minutos. Logo após, a reação foi bloqueada adicionando-se 50µl de ácido sulfúrico 2N em todos os orifícios. Em seguida, a leitura foi realizada no leitor de ELISA (marca Automated Microplate Reader, modelo ELX 800), com o filtro 450nm. Os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO).

Cálculo do "cut-off" (CO):

$$\text{CO} = \frac{\text{média dos controles negativos} \times 2}{1}$$

Recomendações da bula:

O operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do

conjugado (branco) não poderá ser superior a 1.5 \ DO obtida para o soro controle negativo.

Recomenda-se a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada, neste caso, entre o valor obtido para "cut-off" e o valor obtido com a multiplicação deste por 1.2. Mantendo-se as amostras na "faixa cinza", após a repetição, recomenda-se a utilização de outras metodologias para confirmação desse resultado, que deverá ser designado como indeterminado. As pessoas responsáveis pela realização dos exames possuíam nível médio e superior.

### 3.2.2.4 Laboratório D

Esse laboratório utilizou o mesmo "kit" do laboratório C. O leitor de ELISA foi o da marca Labtec e do modelo Reader 230 S. As pessoas responsáveis pela realização dos exames possuíam nível médio e superior.

### 3.2.2.5 Laboratório E

Esse laboratório utilizou o mesmo protocolo dos laboratórios A e B, o mesmo antígeno, as mesmas soluções e o mesmo conjugado, mas 1/10000 como diluição ideal de uso. O leitor de ELISA foi o da marca Biotek, modelo ELX 800. As pessoas responsáveis possuíam nível superior e técnico.

## 3.3 Análises Estatísticas

### 3.3.1 Sensibilidade/especificidade/valores preditivos

A sensibilidade, especificidade e valores preditivos da RIFI e do ELISA dos laboratórios de diagnóstico da LVC foram avaliados tendo como padrão-ouro as associações RIFI e ELISA e parasitológico direto. Através da distribuição cruzada dos resultados das reações positivas e negativas, numa tabela de contingência (2 x 2) (TAB. 1), determinaram-se os índices de sensibilidade e especificidade de acordo com Buck e Gart (1966). Os valores de predição foram obtidos como descrito por Vecchio (1966).

TABELA 1 - Tabela de contingência 2x2

Laboratório	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Infectado: (padrão-ouro positivo): Resultados positivos sorológica e parasitologicamente.

Não infectado: (padrão-ouro negativo): Resultados negativos sorológica e parasitologicamente.

$$\text{Sensibilidade} = A/A+C$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = A/A+B$$

$$\text{Especificidade} = D/B+D$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = D/C+D$$

Os cálculos dos valores preditivos foram também corrigidos para prevalência de 2, 5, 8, 10 e 20%. Para tal utilizou-se o teorema de Bayes:

$$VPP = \frac{\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}}{(\text{Sens} \times \text{Prev}) + (1 - \text{Esp}) \times (1 - \text{Prev})}$$

$$VPN = \frac{(1 - \text{Prevalência}) \times \text{Especificidade}}{\text{Esp} \times (1 - \text{Prev}) + \text{Prev} \times (1 - \text{Sens})}$$

### 3.3.2 Concordância

A concordância foi estimada utilizando-se os testes de Kappa e Youden (J) - Sacket et al., 1991.

### 3.3.2.1 Teste de Kappa

Foram analisadas pelo teste Kappa as seguintes comparações:

- Padrão-ouro e os métodos de diagnóstico RIFI e ELISA de cada laboratório;
- RIFI e ELISA no mesmo laboratório;
- RIFI e ELISA entre os laboratórios;
- RIFI entre os laboratórios;
- ELISA entre os laboratórios.

O teste Kappa foi calculado de acordo com a tabela 2x2 (TAB. 2):

TABELA 2 - Tabela para calcular teste de Kappa

Ensaio 2	Ensaio 1		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

$$K = \frac{PO - PE}{1 - PE}$$

PO: Proporção de concordâncias observadas

PE: Proporção de concordâncias esperada

$$PO = \frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$PE = \frac{\{(A + B)(A + C)\} + \{(C + D)(B + D)\}}{(A + B + C + D)^2}$$

TABELA 3 - Critérios para a interpretação do teste de Kappa

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

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

### 3.3.2.2 Teste de Youden

O teste Youden foi realizado entre as técnicas de cada laboratório com o padrão-ouro.

$$\text{Teste de Youden (J)} = (A/A+C) + (D/B+D)-1$$

### 3.3.3 Qui-quadrado

As diferenças das frequências da sensibilidade e especificidade observadas em cada laboratório foram analisadas pelo teste do  $\chi^2$ , conforme descrito por Snedecor e Cochran (1970). Para aceitar a hipótese da existência de diferenças entre

os laboratórios, fixou-se o nível de significância estatística em  $p > 95\%$ .

## 4 RESULTADOS

Soros positivos e negativos para LVC foram enviados para cinco laboratórios (A, B, C, D e E) do município de Belo Horizonte, que fazem diagnósticos sorológicos dessa doença, para avaliar as técnicas utilizadas e a concordância entre elas. As TAB. 4 a 13 comparam o padrão-ouro (parasitológico e sorológico) com a RIFI e o ELISA de cada laboratório para calcular sensibilidade, especificidade, falso-positivos, falso-negativos, VPP, VPN, testes de Kappa e de Youden.

TABELA 4 - Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório A, Belo Horizonte-MG, 2003-2004

A (RIFI)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	2	88
Negativo	0	55	55
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%

Falso-positivos:  $2/57 = 3.5\%$

VPP:  $86/88 = 0.9773$

Testes de Youden: 0.9649 e Kappa: 0.9706 (ótima)

Especificidade: 96.5%

Falsos-negativos:  $0/86 = 0\%$

VPN:  $55/55 = 1$

TABELA 5 - Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório A, Belo Horizonte-MG, 2003-2004

A (ELISA)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	1	87
Negativo	0	56	56
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%

Falso-positivos:  $1/57 = 1.8\%$

VPP:  $86/87 = 0.9885$

Testes de Youden: 0.9825 e Kappa: 0.9854 (ótima)

Especificidade: 98.3%

Falso-negativos:  $0/86 = 0\%$

VPN:  $56/56 = 1$



TABELA 6 - Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório B. Belo Horizonte-MG. 2003-2004

B (RIFI)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	3	89
Negativo	0	54	54
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%  
 Falso-positivos:  $3/57 = 5,3\%$   
 VPP:  $86/89 = 0,9663$   
 Testes de Youden: 0,9474 e de Kappa: 0,9558 (ótima)

Especificidade: 94,7%  
 Falso-negativos:  $0/86 = 0\%$   
 VPN:  $54/54 = 1$

TABELA 7 - Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório B. Belo Horizonte-MG. 2003-2004

B (ELISA)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	85	2	87
Negativo	1	55	56
Total	86	57	143

Sensibilidade: 98,8%  
 Falso-positivos:  $2/57 = 3,5\%$   
 VPP:  $85/87 = 0,977$   
 Testes de Youden: 0,9533 e de Kappa: 0,956 (ótima)

Especificidade: 96,5%  
 Falso-negativos:  $1/86 = 1,2\%$   
 VPN:  $55/56 = 0,9821$

TABELA 8 - Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório C. Belo Horizonte-MG. 2003-2004

C (RIFI)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	0	86
Negativo	0	57	57
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%  
 Falso-positivos:  $0/57 = 0\%$   
 VPP:  $86/86 = 1$   
 Testes de Youden: 1 e de Kappa: 1 (perfeita)

Especificidade: 100%  
 Falso-negativos:  $0/86 = 0\%$   
 VPN:  $57/57 = 1$

TABELA 9 - Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório C. Belo Horizonte-MG, 2003-2004

C (ELISA)	Infectado	Não infectado	Total
<b>Positivo</b>	86	0	<b>86</b>
<b>Negativo</b>	0	57	<b>57</b>
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>57</b>	<b>143</b>

Sensibilidade: 100%                      Especificidade: 100%  
 Falso-positivos:  $0/57 = 0\%$               Falso-negativos:  $0/86 = 0\%$   
 VPP:  $86/86 = 1$                               VPN:  $57/57 = 1$   
 Testes de Youden: 1 e de Kappa: 1 (perfeita)

 TABELA 10 - Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório D. Belo Horizonte-MG, 2003-2004

D (RIFI)	Infectado	Não infectado	Total
<b>Positivo</b>	85	0	<b>85</b>
<b>Negativo</b>	1	57	<b>58</b>
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>57</b>	<b>143</b>

Sensibilidade: 98.8%                      Especificidade: 100%  
 Falso-positivos:  $0/57 = 0\%$               Falso-negativos:  $1/86 = 1.2\%$   
 VPP:  $85/85 = 1$                               VPN:  $57/58 = 0.9827$   
 Testes de Youden: 0.9884 e de Kappa= 0.9855 (ótima)

 TABELA 11 - Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório D. Belo Horizonte-MG, 2003-2004

D (ELISA)	Infectado	Não infectado	Total
<b>Positivo</b>	86	0	<b>86</b>
<b>Negativo</b>	0	57	<b>57</b>
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>57</b>	<b>143</b>

Sensibilidade: 100%                      Especificidade: 100%  
 Falso-positivos:  $0/57 = 0\%$               Falso-negativos:  $0/86 = 0\%$   
 VPP:  $86/86 = 1$                               VPN:  $57/57 = 1$   
 Testes de Youden: 1 e de Kappa: 1 (perfeita)

TABELA 12 - Resultados da RIFI em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório E. Belo Horizonte - MG. 2003-2004

E (RIFI)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	1	87
Negativo	0	56	56
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%  
 Falso-positivos: 1/57 = 1,8%  
 VPP: 86/87 = 0,9885  
 Testes de Youden 0,9825 e de Kappa = 0,9854 (ótima)

Especificidade: 98,3%  
 Falso-negativos: 0/86 = 0%  
 VPN: 56/56 = 1

TABELA 13 - Resultados do ELISA em soros de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, obtidos no laboratório E. Belo Horizonte - MG. 2003-2004

E (ELISA)	Infectado	Não infectado	Total
Positivo	86	1	87
Negativo	0	56	56
Total	86	57	143

Sensibilidade: 100%  
 Falso-positivos: 1/57 = 1,8%  
 VPP: 86/87 = 0,9885  
 Testes de Youden 0,9825 e de Kappa = 0,9854 (ótima)

Especificidade: 98,3%  
 Falso-negativos: 0/86 = 0%  
 VPN: 56/56 = 1

Nas TAB. 4 a 13 os valores preditivos positivos e negativos para LVC foram calculados sem levar em consideração as prevalências da doença em Belo Horizonte. Os VPP variaram de 96,6 a 100% e os VPN de 98,2 a 100%

A TAB. 14 resume os resultados das técnicas sorológicas utilizadas pelos cinco laboratórios testados para o diagnóstico da LVC em Belo Horizonte nos anos de 2003 e 2004. Nessa TAB. observam-se sensibilidade e especificidade altas nas duas técnicas em todos os laboratórios. A sensibilidade da RIFI foi de 98,8% no laboratório D e de 100% nos demais laboratórios (A, C, D e E). Registrou-se como indeterminada uma amostra positiva no laboratório D. A especificidade variou, os laboratórios C e D apresentaram 100% e os A, B e E apresentaram 96,5, 94,7 e 98,3%, respectivamente. Na RIFI, os

resultados falso-positivos e negativos variaram de 0 a 5,3% e de 0 a 1,2%, respectivamente. O ELISA apresentou, na maioria dos laboratórios, sensibilidade de 100%, pois apenas o B foi diferente (98,8%). A especificidade variou, sendo de 98,3, 96,5, 100, 100 e 98,3% em cada laboratório, respectivamente. Os resultados falso-positivos e negativos no ELISA variaram de 0 a 3,5% e de 0 a 1,2%, respectivamente. A sensibilidade das duas técnicas variou de 98,8 a 100%, mas o ELISA foi mais específico ou igual à RIFI nos laboratórios. De acordo com a classificação do teste de concordância Kappa, apenas a RIFI C, o ELISA C e o ELISA D tiveram concordâncias perfeitas com o padrão-ouro, no restante, foram ótimas. No teste de Youden, os valores oscilaram de 0,9474 a 1, indicando elevada concordância.

TABELA 14 - Sensibilidade, especificidade, falso-positivos, falso-negativos, testes de Kappa e de Youden da RIFI e do ELISA em cinco laboratórios de diagnóstico sorológico de LVC em Belo Horizonte-MG, 2003-2004

Técnicas	Laboratórios	Sensibilidade	Especificidade	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Kappa	Youden
RIFI	A	100%	96,5%	3,5%	0%	0,9706	0,9649
ELISA	A	100%	98,3%	1,7%	0%	0,9854	0,9825
RIFI	B	100%	94,7%	5,3%	0%	0,9558	0,9474
ELISA	B	98,8%	96,5%	3,5%	1,2%	0,9560	0,9533
RIFI	C	100%	100%	0%	0%	1	1
ELISA	C	100%	100%	0%	0%	1	1
RIFI	D	98,8%	100%	0%	1,2%	0,9855	0,9884
ELISA	D	100%	100%	0%	0%	1	1
RIFI	E	100%	98,3%	1,7%	0%	0,9854	0,9825
ELISA	E	100%	98,3%	1,7%	0%	0,9854	0,9825

Interpretação do teste de Kappa: 0,81 a 0,99 concordância ótima e 1 concordância perfeita

Na TAB. 15 são apresentados os VPP para a RIFI e o ELISA dos cinco laboratórios testados, considerando-se cinco prevalências estimadas de 2, 5, 8, 10 e 20%, respectivamente, da infecção em cães por *Leishmania*. As duas técnicas dos laboratórios C e D apresentaram VPP de 100% em todas as prevalências. O ELISA A, a RIFI E e o ELISA E apresentaram valores iguais em todas

as prevalências, aumentando proporcionalmente ao aumento da prevalência. A RIFI A e o ELISA B apresentaram valores muito parecidos, mas menores que os anteriormente citados. A RIFI B foi a que apresentou VPP mais baixos. Nas prevalências de 2, 5, 8, 10 e 20%, os VPP variaram de 28 a 100%; 50 a 100%; 62,3 a 100%; 67,9 a 100% e 82,6 a 100%, respectivamente.

TABELA 15 - Valores preditivos positivos da RIFI e do ELISA de cinco laboratórios de diagnóstico sorológico de LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004, de acordo com cinco prevalências estimadas da infecção por *Leishmania* em cães

P.E.	RIFI A	ELISA A	RIFI B	ELISA B	RIFI C	ELISA C	RIFI D	ELISA D	RIFI E	ELISA E
2%	36,8%	53,8	28%	36,5%	100%	100%	100%	100%	53,8%	53,8%
5%	60%	75%	50%	59,7%	100%	100%	100%	100%	75,1%	75,1%
8%	71,2%	83,3%	62,3%	71%	100%	100%	100%	100%	83,3%	83,3%
10%	76%	86,4%	67,9%	75,8%	100%	100%	100%	100%	86,4%	86,4%
20%	87,7%	93,5%	82,6%	87,6%	100%	100%	100%	100%	93,5%	93,5%

Na TAB. 16 são apresentados os VPN para a RIFI e o ELISA dos cinco laboratórios testados, considerando-se cinco prevalências estimadas da infecção da *Leishmania* em cães. Apenas o ELISA B e a RIFI D apresentaram VPN

diferentes de 100% em todas as prevalências, pois nas prevalências de 2, 5, 8, 10 e 20% apresentaram VPN de 99,98, 99,94, 99,89, 99,87 e 99,7%, respectivamente.

TABELA 16 - Valores preditivos negativos de RIFI e ELISA de cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004, de acordo com cinco prevalências estimadas da infecção por *Leishmania* em cães

P.E.	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA
	A	A	B	B	C	C	D	D	E	E
2%	100%	100%	100%	99,98%	100%	100%	99,98%	100%	100%	100%
5%	100%	100%	100%	99,94%	100%	100%	99,94%	100%	100%	100%
8%	100%	100%	100%	99,89%	100%	100%	99,89%	100%	100%	100%
10%	100%	100%	100%	99,87%	100%	100%	99,87%	100%	100%	100%
20%	100%	100%	100%	99,70%	100%	100%	99,71%	100%	100%	100%

A TAB. 17 apresenta a frequência dos títulos da RIFI de 1/40 a 1/1280 de quatro laboratórios de Belo Horizonte dos cinco avaliados, pois o laboratório E considerou reagente as amostras com título igual ou maior que 1/40. Todos apresentaram menores frequências nos títulos de 1/40 e 1/80, variando de 0 a 5,88%. Nos títulos

1/160, 1/320 e 1/640, o laboratório B encontrou frequências menores (5,62, 2,25 e 12,36%) que o A (9,09, 13,64 e 25%), o C (10,47, 15,12 e 31,39%) e o D (18,82, 25,88 e 38,82%). Já no título 1/1280, o laboratório B mostrou frequência maior (76,40%) que os laboratórios A (45,45%), C (39,54%) e D (7,06%).

TABELA 17 - Frequência dos títulos da RIFI de quatro laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004

Títulos	A		B		C		D	
	n	%	n	%	N	%	n	%
1/40	1	1,1	0	0	0	0	3	3,5
1/80	5	5,7	3	3,4	3	3,5	5	5,9
1/160	8	9,1	5	5,6	9	10,5	16	18,8
1/320	12	13,6	2	2,3	13	15,1	22	25,9
1/640	22	25	11	12,3	27	31,4	33	38,2
1/1280	40	45,5	68	76,4	34	39,5	6	7,1
Total	88	100	89	100	86	100	85	100

A TAB. 18 apresenta o teste de Kappa de concordância entre as técnicas utilizadas nos laboratórios testados. De acordo com a classificação desse teste, a concordância foi

perfeita entre RIFI C x ELISA C, RIFI E x ELISA E e RIFI C x ELISA D. No restante, as concordâncias foram ótimas.

TABELA 18 - Teste de Kappa de concordância entre as técnicas de RIFI e ELISA dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004

	ELISA A	ELISA B	ELISA C	ELISA D	ELISA E
RIFI A	0,9854	0,9558	0,9707	0,9707	0,9558
RIFI B	0,9705	0,9705	0,9559	0,9559	0,9409
RIFI C	0,9854	0,9561	1	1	0,9854
RIFI D	0,9708	0,9413	0,9855	0,9855	0,9708
RIFI E	0,9707	0,9413	0,9854	0,9854	1

Valores para interpretação do teste de Kappa: 0,81 a 0,99 concordância ótima e 1 perfeita

A TAB. 19 apresenta o teste de Kappa de concordância entre as RIFI utilizadas nos laboratórios testados. De acordo com a

classificação do teste de Kappa, a concordância foi ótima entre todas elas.

TABELA 19 - Teste de Kappa de concordância entre as RIFI dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG, em 2003-2004

	RIFI A	RIFI B	RIFI C	RIFI D	RIFI E
RIFI A	-	0,9852	0,9707	0,9561	0,9558
RIFI B	0,9852	-	0,9559	0,9414	0,9409
RIFI C	0,9707	0,9559	-	0,9855	0,9854
RIFI D	0,9561	0,9414	0,9855	-	0,9708
RIFI E	0,9558	0,9409	0,9854	0,9708	-

Valores para interpretação do teste de Kappa: 0,81 a 0,99 concordância ótima.

A TAB. 20 apresenta teste de Kappa de concordância entre os ELISA utilizados nos laboratórios. De acordo com o teste, a

concordância foi perfeita entre o ELISA D x ELISA C e no restante foram ótimas.

TABELA 20 - Teste de Kappa de concordância entre os ELISA dos cinco laboratórios de diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte-MG. em 2003-2004

	ELISA A	ELISA B	ELISA C	ELISA D	ELISA E
ELISA A	-	0,9707	0,9854	0,9854	0,9707
ELISA B	0,9707	-	0,9561	0,9561	0,9413
ELISA C	0,9854	0,9561	-	1	0,9854
ELISA D	0,9854	0,9561	1	-	0,9854
ELISA E	0,9707	0,9413	0,9854	0,9854	-

Valores de interpretação do teste de Kappa: 0,81 a 0,99 concordância ótima e 1 perfeita

As porcentagens de sensibilidade e especificidade da RIFI obtidas em cada um dos laboratórios não

revelaram diferenças estatisticamente significativas, como está registrado na TAB. 21.

TABELA 21 - Sensibilidade e especificidade da RIFI para a LVC. de acordo com cinco laboratórios de diagnóstico de Belo Horizonte- MG. em 2003-2004

Laboratórios	Porcentagem	
	Sensibilidade	Especificidade
A	100	96,5
B	100	94,7
C	100	100
D	98,8	100
E	100	98,3
Média	99,8	97,9

$\chi^2 = 0$  Sensibilidade  $\chi^2 = 0,06$  Especificidade

As porcentagens de sensibilidade e especificidade do ELISA obtidas em cada um dos laboratórios

não revelaram diferenças estatisticamente significativas, como demonstrá a TAB. 22.

TABELA 22 - Sensibilidade e especificidade do ELISA para o diagnóstico de LVC. de acordo com cinco laboratórios de diagnóstico Belo Horizonte-MG, em 2003-2004

Laboratórios	Porcentagem	
	Sensibilidade	Especificidade
A	100	98,3
B	98,8	96,5
C	100	100
D	100	100
E	100	98,3
Média	99,8	98,6

$\chi^2 = 0$  Sensibilidade  $\chi^2 = 0,02$  Especificidade

## 5 DISCUSSÃO

A sensibilidade da RIFI de todos os cinco laboratórios avaliados nesta pesquisa foi alta, pois em quatro foi de 100% e no laboratório D foi de 98,8%. Essa diferença submetida ao teste de Qui-quadrado não foi estatisticamente significativa no nível de  $p > 95\%$ . Esses resultados são similares aos de outros autores que encontraram sensibilidade de 98,4, 98,7 e 100% na RIFI utilizando *L. infantum* como antígeno (Mancianti et al., 1995; Mancianti et al., 1996; Vercammen et al., 1997). Rosário (2002), utilizando promastigotas de *L. amazonensis*, observou sensibilidade de 96,2% no soro e 94,3% no eluato. No entanto, outros autores encontraram sensibilidade menor, como Costa et al. (1991), que observaram sensibilidade de 87,5% usando eluatos de sangue, e Ashford et al. (1993), que encontraram sensibilidade de 75% utilizando soros caninos. Borja-Cabrera et al. (1999) registraram sensibilidade de 33,3% para a RIFI, sendo esta discrepante das citadas anteriormente. Neste estudo foram utilizados 21 animais assintomáticos e seis sintomáticos para determinar a sensibilidade das técnicas de FML-ELISA e RIFI, sendo que o FML-ELISA apresentou sensibilidade maior que a RIFI, principalmente na detecção de animais assintomáticos. A condição assintomática ou sintomática segundo Oliveira et al. (1993) não é um fator limitante para a detecção de anticorpos para *Leishmania*. Eles acompanharam durante 25 meses oito cães assintomáticos infectados experimentalmente que apresentaram títulos de 1:320 a 1:1280 e somente um teve título de 1:40 pelo teste de RIFI.

A sensibilidade da RIFI dos laboratórios foi semelhante. Esses achados seriam independentes da espécie de *Leishmania* utilizada, como também verificaram Costa et al. (1991) e Borja-Cabrera et al. (1999), que encontram sensibilidade igual quando testaram espécies de antígenos diferentes. Anteriormente, Badaró et al. (1983) tinham concluído que a sensibilidade e a especificidade dessa técnica eram influenciadas pelo estágio e espécie do parasita utilizado.

A especificidade encontrada na RIFI dos laboratórios foi elevada, variando entre 94,7 e 100%. Essas diferenças submetidas ao teste de Qui-quadrado não foram estatisticamente

significativas no nível de  $p > 95\%$ . As pesquisas sobre essa característica publicadas por Ashford et al. (1993); Mancianti et al. (1995); Mancianti et al. (1996); Bernadina et al. (1997); Rosário (2002) registraram valores de 93 a 100%. Entretanto, existe um resultado bem distinto constatado por Vexenat et al. (1993), que obtiveram especificidade de 41% quando usaram o teste parasitológico como padrão-ouro e de 75% com a combinação de três testes sorológicos (DAT, ELISA e DOT-ELISA). Esses resultados contraditórios servem de alerta para os profissionais responsáveis pela execução do diagnóstico de LVC com a técnica de RIFI. É fundamental seguir rigorosamente os protocolos emitidos pelo laboratório de referência, para evitar resultados divergentes.

A sensibilidade do ELISA dos cinco laboratórios avaliados foi elevada, variou de 98,8 a 100%. Essas diferenças submetidas ao teste de Qui-quadrado não foram estatisticamente significativas no nível de  $p > 95\%$ . Resultados próximos foram relatados por pesquisadores como Vexenat et al. (1993); Mancianti et al. (1995); Vercammen et al. (1997); Rosário (2002), que observaram sensibilidade de 97 a 100%. No entanto, Reitinger et al. (2002) relataram sensibilidade de 71 e 88% e Borja-Cabrera et al. (1999) de 55,5%.

A especificidade do ELISA dos laboratórios foi elevada, variando de 96,5 a 100%. Essas diferenças submetidas ao teste de Qui-quadrado não foram estatisticamente significativas no nível de  $p > 95\%$ . Os pesquisadores Vexenat et al. (1993); Manciant et al. (1995); Vercammen et al. (1997); Bernadina et al. (1997) verificaram que o ELISA teve especificidade entre 93,5 e 100%. A amplitude de variação das taxas de especificidade observada por diversos pesquisadores flutuou entre 55 e 100%. Entretanto, existe consenso entre os investigadores desse tema quanto à especificidade do ELISA estar em torno de 95 a 100%. Essa boa especificidade justifica a adoção do ELISA como um dos testes oficiais do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Canina no Brasil. Os servidores que labutam na Saúde Pública podem tomar decisões corretas no momento de recomendar a cutanásia de cães considerados reagentes no ELISA e na RIFI.

Os valores elevados da sensibilidade de RIFI e ELISA poderiam ter sido influenciados pelo



padrão-ouro, pois foram utilizados animais sintomáticos e assintomáticos, todos parasitologicamente positivos para o baço, medula ou fígado. Conforme relatado por Silva et al. (2001b), a detecção do parasito foi possível através de mielograma ou mielocultura em 11 cães com títulos que variaram de 1/160 a 1/640 na RIFI. Em quatro cães com títulos de 1:40 a 1:80 eles não conseguiram detectar o parasita. Verificou-se, por esses resultados, que os cães parasitologicamente positivos provavelmente teriam títulos mais altos de anticorpos, facilitando a detecção por testes sorológicos. Nesta pesquisa existiam de oito a 24 soros de cães positivos com títulos iguais ou menores que 1/160, dependendo do laboratório que realizou o teste.

A sensibilidade da RIFI e do ELISA foi igual e na especificidade o ELISA mostrou-se um pouco mais específico que a RIFI ao revelar menos resultados falso-positivos, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa no nível de  $p < 0.05$ . Esse resultado não era esperado, pois pesquisas anteriores como as de Evans et al. (1990) e Mancianti et al. (1995) haviam estabelecido que o ELISA, por ser mais sensível, era menos específico que a RIFI, sem apresentar diferença estatística entre eles. Essa diferença pequena entre as duas técnicas ocorre, segundo Sundar (2002), porque a especificidade depende mais do tipo de antígeno usado no teste do que do protocolo adotado, sendo a sensibilidade influenciada pela metodologia. Isto foi comprovado por Badaró et al. (1986), que afirmaram que *L. chagasi* é mais específica que a *L. mexicana* na técnica de ELISA, mas que os dois antígenos foram proveitosos na demonstração de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães com calazar. Embora Barbosa de Deus et al. (2002) tenham considerado que os antígenos utilizados nos diagnósticos sorológicos da leishmaniose visceral têm sido problemáticos devido à baixa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade e embora, ainda, não estejam claras as razões dessas limitações, deve-se salientar que esses fatos não ocorreram nesta pesquisa nos cinco laboratórios, onde foram obtidos índices elevados de sensibilidade e especificidade.

Os VPP variaram de 96,6 a 100% e os VPN de 98,2 a 100%. Sem considerar a prevalência da LVC, esses resultados foram parecidos com os observados por Mancianti et al. (1996), que

encontraram VPP de 100% e VPN de 97,7% em soros de cães positivos para LVC. Quando calculou-se o VPP estimado para as prevalências de 2, 5, 8, 10 e 20% com a RIFI e o ELISA, eles variaram de 28 a 100%. As baixas porcentagens foram devidas a animais falso-positivos que algumas técnicas apresentaram e foram aumentando à medida que a prevalência aumentou. Rosário (2002), calculando VPP com prevalência de 5, 10 e 20%, encontrou valores parecidos com os da RIFI do laboratório A; nas mesmas prevalências na técnica de ELISA encontrou valores maiores que os de ELISA dos laboratórios avaliados. Os VPN apresentaram valores elevados de 99,79 a 100%, pois apenas o ELISA B e a RIFI C apresentaram um animal falso-negativo. A porcentagem de cães positivos para LVC no ano de 2003 foi de 8% em Belo Horizonte (Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de BH). Com essa taxa, o VPP das técnicas dos laboratórios testados ficou entre 62,3 e 100%, como está registrado na TAB. 15.

Os laboratórios apresentaram alta frequência de títulos da RIFI maiores que 1/160 em relação aos títulos iguais a 1/40 e 1/80. Neste estudo os soros eram de 47 cães sintomáticos (54,61%) e 25 assintomáticos (29,07%) e os 14 restantes não tiveram informação clínica. Aceita-se que os cães sintomáticos apresentam títulos mais elevados de anticorpos, fato registrado por Pozio et al. (1981). Oliveira et al. (1993) afirmaram que mesmo os cães assintomáticos apresentam títulos que variam de 1/320 a 1/1280.

Nesta pesquisa observaram-se diferenças entre as frequências dos títulos entre os laboratórios. Isto pode ter sido influenciado pelas diferenças nos reagentes, pela maneira de titular o conjugado, pela subjetividade da técnica, pela experiência dos examinadores ou até pela potência e marca de cada microscópio.

As concordâncias observadas entre RIFI, ELISA e RIFI e ELISA de todos os laboratórios testados mostraram resultados que variaram nos testes de Youden e Kappa de ótimas a perfeitas. Autores como Mancianti et al. (1995) e Rosário (2002) também verificaram essas elevadas concordâncias. Na RIFI todas as concordâncias foram ótimas, independentemente do antígeno utilizado. O "kit" ELISA dos laboratórios C e D

foi o mesmo e a concordância foi perfeita. O E deve ter contribuído para a ótima concordância entre eles. A ocorrência de pequenas variações na concordância poderia estar associada aos modelos e marcas de aparelhos de cada laboratório, diferenças de protocolos, tipo de treinamento de cada técnico, utilização de "kits" com todas as soluções padronizadas, produtos químicos e antígenos de distintas origens. De acordo com Fisa et al. (1997), técnicas iguais à RIFI, que empregam antígenos inteiros e fáceis de preparar e padronizar, facilitam a comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios. Scalone et al. (2002) manifestaram opinião diferente ao afirmarem que a RIFI, por usar antígenos brutos como promastigotas inteiras ou seus extratos solúveis, teve sua padronização e reprodutibilidade prejudicados. Esses autores demonstraram que o ELISA com rk39 é uma alternativa para o "screening" de um grande número de amostras para detectar LVC, mas na rotina dos programas de controle onde são realizadas dezenas de milhares de exames seria inviável, devido ao alto custo. Assim, mesmo com antígenos brutos os laboratórios avaliados apresentaram resultados altamente satisfatórios de sensibilidade e especificidade

Apesar dos resultados desta pesquisa apresentarem alta concordância, conclusões discordantes entre laboratórios podem ocorrer, pois a LVC apresenta autocura do cão, onde desaparece o anticorpo específico no soro, como relatou Pozio et al. (1981), ou até mesmo variação do título, principalmente de cães tratados, pois estes apresentam baixos títulos detectáveis em técnicas convencionais, dificultando o diagnóstico conclusivo (Vercammen et al., 2002). A qualidade da amostra é outro fator importante para o diagnóstico seguro. Deve-se ressaltar a possibilidade de erros de identificação e contaminação das amostras de sangue embebidas em papel filtro por bactérias e fungos quando as

mesmo antígeno usado pelos laboratórios A, B e condições de armazenamento são adversas, como altas temperaturas e umidade. Esses elementos podem levar à desnaturação dos anticorpos eventualmente presentes, como chama a atenção Guimarães (1983), comprometendo a precisão dos testes de laboratório. As amostras de sangue embebidas em papel filtro podem influenciar no diagnóstico pela perda na sensibilidade (Evans et al., 1990) e também pela falta de padronização desse papel entre os veterinários clínicos. Além disso, a falta de padronização dos resultados emitidos pelos laboratórios de diagnóstico da LVC pode levar a dificuldades de interpretação dos resultados pelos veterinários, pois alguns laboratórios não consideram como reagente o título-corte preconizado pelo Ministério da Saúde.

A implantação do Programa de Controle de Qualidade determinado pelo Ministério da Saúde, com a participação de laboratórios particulares, de universidades e de instituições públicas municipais e estaduais sob a Coordenação do Laboratório Nacional de Referência deverá contribuir para uniformizar os resultados em âmbito nacional.

## 6 CONCLUSÕES

A alta concordância entre os laboratórios no diagnóstico sorológico da LVC em Belo Horizonte favorece o Programa de Vigilância e Controle do Ministério da Saúde.

A alta sensibilidade observada nos testes de RIFI e ELISA em todos os laboratórios permitiu a detecção dos cães infectados por LVC.

A elevada especificidade dos testes de ELISA e RIFI obtida em todos os laboratórios reduziu a probabilidade da eutanásia de cães negativos para LVC.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEDO-SANCHÈS, C.; MORILLAS-MARQUES, F.; SANCHÍS-MARIN, S. J. Changes in antibody titers against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 75, n. 1, p. 1-8, 1998.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**, 8. ed., Editora Guanabara Koogan, 1991. Cap. 86, p. 706-717.
- ASHFORD, D.; BADARÓ, R.; EULÁLIO, C. et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 1993.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction and serology for the detection of canine leishmaniasis. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 8, p. 251-255, 1995.
- BADARÓ, R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, n. 4, p. 159-164, 1988.
- BADARÓ, R.; REED, S.G.; BARRAL, A.; et al. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection specific responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 1, p. 72-78, 1986.
- BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent 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.
- BARBOSA DE DEUS, R.; MARES-GUIA, M. L.; NUNES, A. Z. et al. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.
- BERNADINA, W. E.; LUNA, R. D.; OLIVA, G. et al. An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 73, n. 3/4, p. 207-213, 1997.
- BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.
- BORJA-CABRERA, G. P.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T. et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.
- 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 imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.
- BRAY, R. S. Immunodiagnosis of leishmaniasis. In: COHEN, S.; SADUN, E. H., (eds.) **Immunological of parasitic infections**. Oxford: Blackwell Scientific, 1976, p. 70-76.
- BRAY, R. S. Leishmaniasis. In: HOUBA, V., (ed.) **Immunological investigations of tropical parasitic diseases**, 5. ed., Edinburg: Churchill Livingstone, 1980, p. 65-83.
- BUCK, A. A.; GART, J. J. Comparison of a screening test and a reference test in

epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. **Am. J. Epidemiol.**, v. 83, n. 3, p. 586-592, 1966.

BURNS, J. M.; SHREFFER, W. G.; BENSON, D. R. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 775-779, 1993.

CAMARGO, M. E. Efeito da prevalência da doença sobre a acurácia dos exames sorológicos em levantamentos soro-epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 27, 1994, Suppl. IV.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RIÇA-CAPELA, M. L. et al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in canine model for leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 92, n. 4, p. 269-275, 2000.

CONTROLE, diagnóstico e tratamento de leishmaniose visceral (calazar): normas técnicas. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1999. 86p.

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. 4, p. 21-25, 1991.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **Hosp.**, v. 47, p. 75-85, 1955.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting as well as disease. **Epidemiol. Infect.**, v. 103, p. 647-656, 1993.

EL-HASSAN, A. M.; ZIJLTRA, E. E.; MEREDITH, S. E. O.; et al. A. Identification of *Leishmania donovani* using a polymerase chain reaction in patient and animal material obtained

from a area of endemic kala-azar in Sudan. **Acta Trop.**, v. 55, p. 87-90, 1993.

ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antigen and antibody-coated tubes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 251, p. 427-434, 1971.

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

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D., (eds.) **Current veterinary therapy XI**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992, p. 266-269.

FISA, R.; GALLEGO, M.; RIERA, C. et al. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 1997.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. B. L.; REGO, F. A.; et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GASKIN, A. A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J. et al. Visceral Leishmaniasis in New York Foxhound Kennel. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, n. 1, p. 34-44, 2002.

GRANDONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in Southern Europe. In: KILLICK-KENDRICK, R. (ed.) **Canine leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet. Wiesbaden, 1999, p. 339-342.

GUIMARÃES, M. C. S. Inquéritos soroepidemiológicos: coleta, transporte e

armazenamento de amostras. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 2, p. 93-96, 1983.

HOMMEL, M. Enzymoimmunoassay in leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 15-16, 1976.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 72, n. 3, p. 213-218, 1978.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters & Killick Kendrick. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic, 1987, v. 1, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA F. T. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 81, p. 517, 1987.

LEISHMANIOSE visceral. In: **GUIA de vigilância epidemiológica**. 5 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2002, v. 1, p.525-540.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELLI, C. et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** v. 59, p. 13-21, 1995.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet. Parasitol.** v. 65, n. 1/2, p. 1-9, 1996.

MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol Today**. v. 10, n. 1, p. 359-375, 1994.

MAURÍCIO, I. L.; STOHARD J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**. v. 16, p. 188-99, 2000.

MAYRINK, W.; ARAÚJO, F. G.; MAGALHÃES, P. A. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 9, n. 3, p. 172-174, 1967.

MOHAMMED, E. A.E. R.; WRGHT, E. P. RAHMAN, A. M. B.; et al. Serodiagnosis of sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA, immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.** v. 80, p. 271-274, 1986.

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, C. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. **Cad. Saúde Públ.** v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.

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.

POZIO, E.; GRANDONI, L.; BETTINI, S. et al. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (grosseto). **Acta Trop.**, v. 38, p. 383-393, 1981

REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clin. Dermatol.** v. 14, n. 5, p. 471-478, 1996.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dog: Comparative Study Using na Immunochromatographic Disptisck Test. Enzyme-Linked Immnosorbent Assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v 40, n. 7, 2352-2356, 2002.

ROSARIO, E.Y. Avaliação de testes sorológicos utilizando antígenos brutos e recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2002. 130f. Departamento de Parasitologia - Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação (mestrado)- Belo Horizonte.

ROSS, R. Notes on the bodies 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: 441p.

SCALONE, A.; DE 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, n. 4, p. 275-285, 2002.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. et al. Visceral Leishmaniosis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001a.

SILVA E. S.; ROSCOE, E.H.; ARRUDA, L. Q. et al. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Rev. Bras. Med. Vet.** v. 23, n. 3, p. 111-115, 2001b.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Métodos estadísticos aplicados a la**

**investigación agrícola y biológica.** 5 ed. México: Compañía Editorial Continental. 1970. 626p.

SUNDAR S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TESH, R. R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is a time to change strategies? **Am. J. Trop. Med Hyg.** v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

TRAVI B. L.; MONTOYA, J.; GALLEGU, J. et al. Binomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. **J. Med. Entomol.** v. 33, n. 3, p. 278-785, 1996.

VECCHIO, J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. **N. Engl. J. Med.** v. 274, p. 1171-1173, 1966.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; RAY, D. L.; et al. Development of a síide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Vet Rec.** v. 27, 1997.

VERCAMMEN, F.; FERNANDEZ - PEREZ, F. J.; CRISTINA DEL AMO, A. J. M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test. Elisa and Western Blot. **Acta Trop.**, v. 84, p. 175-181, 2002.

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.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E.. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 31, p. 85-92, 1998. Suppl. II.

**ANEXO 1**  
**QUESTIONÁRIO**

A) Laboratório Nº \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: R/Av \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Belo Horizonte-MG      Fones: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_      Fax: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_ Homepage \_\_\_\_\_

B) Equipamentos

ELISA

RIFI

Leitor/marca \_\_\_\_\_

Microscópio/marca \_\_\_\_\_

Modelo \_\_\_\_\_

Modelo \_\_\_\_\_

Ano fabricação \_\_\_\_\_

Ano fabricação \_\_\_\_\_

B) Antigenos

ELISA      Próprio    --  
             Phoneutra --  
             Fiocruz    --  
             Outro      \_\_\_\_\_

RIFI      Próprio    --  
            Phoneutra --  
            Fiocruz    --  
            Outro      \_\_\_\_\_

C) Conjugados

ELISA      Próprio    --  
             Fiocruz    --  
             Outro      \_\_\_\_\_

RIFI      Próprio    --  
            Fiocruz    --  
            Outro      \_\_\_\_\_

D) Soluções

ELISA (todas as utilizadas e se possível, suas composições)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

---

---

---

RIFI (PBS)

---

---

---

---

E) Lâminas do RIFI

Tamanho dos orifícios: \_\_\_\_\_ mm

F) Pessoal

Nível Superior

Nome: \_\_\_\_\_ idade \_\_\_\_\_

Formação profissional \_\_\_\_\_ Titulação acadêmica \_ Graduação  
\_ Mestre  
\_ Doutor

Nível de apoio

Nome: \_\_\_\_\_ idade \_\_\_\_\_

Formação: \_\_\_\_\_ escolaridade \_\_\_\_\_

Protocolo da técnica de RIFI

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---





## ANEXO 2

### Soluções Laboratório A

#### PBS – RIFI

NaCl	8,77 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,02 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,39 gramas
Completar com água destilada até 1 litro	

#### PBS – ELISA

NaCl	17 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,669 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,257 gramas
Completar com água destilada até 2 litros, pH 7,5	

#### PBSCT – ELISA

PBS ELISA pH 7.5	1000 litros
Caseína	2,5gramas
Tween 20	0,5 ml
Filtrar com papel filtro	

#### SOLUÇÃO DE LAVAGEM DO ELISA

NaCl	9 gramas
Tween 20	0,5 ml
Água destilada	1000ml

#### TAMPÃO SUBSTRATO DO ELISA

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,19 gramas
Ácido cítrico x H <sub>2</sub> O	5,7 gramas
Água destilada	1000 ml
pH 5	

### ANEXO 3

#### Soluções Laboratório B

##### PBS – RIFI

NaCl	8,5 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,22 gramas
Completar com água destilada até 1 litro	

##### PBS – ELISA

NaCl	17 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,669 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,257 gramas
Completar com água destilada até 2 litros, pH 7,5	

##### PBSCT – ELISA

PBS ELISA pH 7,5	1000 litros
Caseína	2,5gramas
Tween 20	0,5 ml
Filtrar com papel filtro	

##### SOLUÇÃO DE LAVAGEM DO ELISA

NaCl	9 gramas
Tween 20	0,5 ml
Água destilada	1000ml

##### TAMPÃO SUBSTRATO DO ELISA

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,19 gramas
Ácido cítrico x H <sub>2</sub> O	5,7 gramas
Água destilada	1000 ml
pH 5	

## ANEXO 4

### Soluções Laboratório C

#### PBS – RIFI

NaCl	8,77 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34gramas
Completar com água destilada até 1 litro	

## ANEXO 5

### Soluções Laboratório D

#### PBS – RIFI

NaCl	8,77 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,34 gramas
Completar com água destilada até 1 litro	

## ANEXO 6

### Soluções Laboratório E

#### PBS – RIFI

NaCl	8 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (fostato de sódio dibásico)	0,01gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (fostato de potássio monobásico)	0,12 gramas
Cloreto de potássio	0,20 gramas
Completar com água destilada até 1 litro	

**PBS – ELISA**

NaCl	17 gramas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,669 gramas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	0,257 gramas
Completar com água destilada até 2 litros, ph 7,5	

**PBSCT – ELISA**

PBS ELISA pH 7,5	1000 litros
Caseína	2,5gramas
Tween 20	0,5 ml
Filtrar com papel filtro	

**SOLUÇÃO DE LAVAGEM DO ELISA**

NaCl	9 gramas
Tween 20	0,5 ml
Água destilada	1000ml

**TAMPÃO SUBSTRATO DO ELISA**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,19 gramas
Ácido cítrico x H <sub>2</sub> O	5,7 gramas
Água destilada	1000 ml
pH 5	