

Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo.

Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil.

RIALA6/1127

Márcia C BISUGO^{1*}, Maria de Fátima L ARAÚJO¹, Helena H TANIGUCHI¹, Elaine ACUNHA¹, Andréa A SANTOS¹, Mário SPESSOTO JUNIOR², Carlos N KANETO³, Cristiane VO CAMARGO², Milson A POLIZEL⁴, Marco AN VIGILATO⁵, Cláudia MS NEGREIROS⁶, Mashami OKAGIMA⁷, Nilton M GONÇALVES⁸, Larissa P LUNDSTEDT⁹, Andréa M ANDRADE¹⁰, Valéria MF LIMA³, J Eduardo TOLEZANO¹.

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Parasitoses Sistêmicas, Av. Dr. Arnaldo, 355 São Paulo/SP, CEP 01246-902, e-mail: mdcbisugo@hotmail.com.; ² Instituto Adolfo Lutz- Laboratório Regional de Araçatuba, SP; ³Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araçatuba, SP; ⁴Secretaria Municipal de Buritama, SP; ⁵Secretaria Municipal de Saúde de Birigui, SP; ⁶Secretaria Municipal de Promissão, SP; ⁷Secretaria Municipal de Saúde de Pereira Barreto, SP; ⁸Secretaria Municipal de Mirandópolis, SP; ⁹Secretaria Municipal de Penápolis, SP; ¹⁰Secretaria Municipal de Araçatuba, SP; Recebido: 25/04/2007 – Aceito para publicação: 30/08/2007

RESUMO

Em inquéritos caninos, realizados em municípios paulistas com autoctonia de leishmaniose visceral americana (LVA), o desempenho do teste rápido imunocromatográfico (formato “dipstick”) empregando antígeno recombinante K39 (rK39) foi realizado em amostras de sangue total e soro de cães. Este teste foi comparado com a técnica de RIFI e com ELISA as quais foram realizadas em amostras de soro. As amostras foram colhidas de 1.333 cães, sendo 1199 selecionados por sorteio em municípios com transmissão de LVA. O grupo controle foi constituído de amostras de 134 cães portadores de outras patologias ou residentes em áreas indenes para LVA, para avaliar a especificidade do teste rápido anti-rK39. Nos cães selecionados por sorteio, a positividade do teste rápido anti-rK39 foi de 31,3% nas amostras de soro e de 17,4% no sangue total; a RIFI e o ELISA detectaram anticorpos anti-*Leishmania* em 25,1% e 27,2% das amostras, respectivamente. Todas amostras do grupo controle apresentaram resultados negativos no teste rápido. O teste rápido realizado em amostras de soro apresenta-se como ensaio simples, rápido, de baixo custo e, portanto, adequado para ser empregado como técnica alternativa de triagem diagnóstica em função de sua especificidade para as espécies do complexo *Leishmania donovani*, responsáveis pela leishmaniose visceral.

Palavras-chave. Leishmaniose Visceral, proteínas recombinantes/imunologia, técnicas imunológicas, *Leishmania chagasi*.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) coexists with human visceral leishmaniasis (HVL) in Brazil. Dogs play an important role as reservoir of etiological agent, and for CVL dissemination. For diagnosing CVL, IFA and ELISA have been routinely employed. These assays have not been suitable for diagnosis studies owing to low sensitivity and/or specificity. The CVL diagnosis in different regions of São Paulo was assessed, comparing the performance of a immunochromatographic dipstick – based rapid test using K39 recombinant antigen (rK39RT) on whole blood and serum samples, and with IFI and ELISA on serum samples. The 1,333 samples dogs were tested including 1,199 samples from randomly selected dogs from eight municipalities with CVL transmission. The control group was comprised by samples

from 134 animals living VL-free area or from dogs with other diseases. Of 1,199 samples, 31.3% were positive by rK39RT on sera, and 17.4% on whole blood. Anti-*Leishmania* antibodies were detected in 25.1% and 27.2% of samples on IFA and ELISA, respectively. rK39RT revealed a low performance on whole blood, however on dog serum higher number of positive samples were detected. All samples from 47 dogs with other diseases were negative on rK39RT. The rK39RT is a simple, rapid, inexpensive, specific and sensitive, and suitable as an alternative screening testing.

Key words. Visceral leishmaniasis, recombinant protein/immunology, immunological techniques, *Leishmania chagasi*.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*¹, que podem afetar o homem. Animais silvestres e domésticos são os reservatórios mais comuns do parasita, que têm como vetores, insetos dípteros, da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae.

A leishmaniose visceral (LV) apresenta ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo, situando-se entre as sete endemias prioritárias de atenção da Organização Mundial da Saúde; afeta 500 mil pessoas por ano e, aproximadamente, 90% de todos os casos notificados no mundo provêm de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão². No Novo Mundo a doença é conhecida como calazar neotropical ou leishmaniose visceral americana (LVA).

A LVA tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e em praticamente todas as áreas de ocorrência da doença, *Lutzomyia longipalpis*³ é identificado como espécie vetora⁴.

A doença é restrita ao Novo Mundo e ocorre em 11 países: Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, Panamá, México, Belize, Guatemala, Paraguai, Bolívia, Colômbia.

De um padrão de epidemia tipicamente rural, vem assumindo perfis epidemiológicos distintos, sendo apontada como uma doença emergente, atingindo com maior frequência e intensidade, áreas urbanas e suburbanas de várias capitais e cidades de médio porte do país^{5,6,7}.

No Brasil, a transmissão autóctone de LVA está registrada em 20 dos 27 estados em aproximadamente 1.600 municípios. Até meados da década de 1990 cerca de 90% dos casos humanos ocorriam na região nordeste⁸. A partir de então, as outras regiões geográficas mostraram significativo aumento do número de novos casos anuais. Assim, no ano de 1993, enquanto a região nordeste foi responsável por 93,7% da LVA notificados no país, 3,3% foram da região norte, 0,7% do centro-oeste e 2,3% da região sudeste. Com a expansão da transmissão para diferentes áreas do território brasileiro, em 2004, de um total de 3267 notificações, 53,2% procediam do nordeste, 16,1% do norte, 8,0% do centro-oeste e 22,6% do sudeste do Brasil⁹.

As ações do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil visam os três elementos da cadeia de transmissão: o vetor, o reservatório principal (o cão doméstico) e o homem doente^{10,11}.

O cão doméstico é a principal fonte de infecção de *Leishmania*, pode apresentar alto parasitismo cutâneo o que facilita a infecção dos flebotomíneos^{12,13}, exercendo papel fundamental na introdução da doença em áreas novas^{6,14}. Diante de sua importância no ciclo de transmissão da LVA, a principal medida de controle, no Brasil, tem sido sua eliminação quando identificado como infectado e/ou soropositivo^{2,15}.

No Brasil a LV canina coexiste com a LV humana em todos os focos conhecidos e ela precede a ocorrência de casos humanos^{16,17,18}.

Os cães infectados e/ou com títulos de anticorpos específicos podem não apresentar sintomas da doença, mas o parasitismo de vísceras e de pele pode ser intenso, tornando-os bons reservatórios mesmo em fase precoce da infecção¹¹.

Na LV canina, a detecção do parasita pode ser feita no baço, fígado, medula óssea, linfonodo e pele aparentemente sadia, já que os parasitas podem ser facilmente encontrados nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), porém a sensibilidade pode variar de acordo com a condição clínica, densidade parasitária, material biológico, técnica diagnóstica e qualidade da coleta¹⁸.

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido descritas como sensíveis para a detecção de *Leishmania*, porém não tem aplicação na rotina diagnóstica ou em larga escala.

Na impossibilidade de realizar provas para detecção do parasita nos inquéritos epidemiológicos recomenda-se a utilização de métodos de detecção de anticorpos específicos, empregando-se métodos sorológicos, entretanto, em situações de gravidade da LV canina, Ashford et al.¹⁹ descreveram a ausência de anticorpos. A experiência clínica em países onde a doença é endêmica, também evidenciou que muitos animais infectados podem permanecer soronegativos²⁰.

Diversas técnicas têm sido avaliadas ou utilizadas na detecção de anticorpos no diagnóstico do calazar canino: imunoenzimáticas^{21,22,23,24}, testes de aglutinação direta (DAT)²⁵ e testes imunocromatográficos e imunoenzimáticos que utilizam como antígenos, proteínas recombinantes derivadas de leishmanias, como a K39^{26,27,28,29}.

Contudo, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) continuam sendo as provas sorológicas mais utilizadas. Ambas são consideradas limitadas quanto à especificidade e reprodutibilidade: devido apresentarem reatividade cruzada com outras patologias como

a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e doença de Chagas; por utilizarem parasitas íntegros ou solúveis como antígeno que limitam a padronização dos testes sorológicos; impossibilitando o diagnóstico da infecção durante o período de soroconversão e em cães infectados em que não esteja estimulada a produção de anticorpos específicos. Outrossim, os resultados da RIFI são influenciados pela subjetividade na leitura das reações^{30,31,32}.

Em decorrência da dificuldade em implementar ações contra os vetores para o controle da LVA no Brasil, os Programas de Controle priorizam a eliminação de fontes de infecção, após a realização de inquéritos sorológicos em populações caninas em áreas com transmissão da infecção. O diagnóstico é realizado em amostras de soro ou em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, utilizando-se “Kits” de RIFI e ELISA fornecidos pelo Ministério da Saúde. Todos os cães soropositivos devem ser apreendidos e eutanasiados^{33,34}.

A superposição de áreas de ocorrência da LVA com LTA e doença de Chagas; o intervalo de tempo longo entre a coleta de material e o retorno dos resultados dos exames laboratoriais para os municípios com transmissão; a presença de cães que não soroconverteram na ocasião dos inquéritos soroepidemiológicos e os dados subestimados ou superestimados da prevalência e incidência da LV canina, interferem nos programas de vigilância, no conhecimento do risco da transmissão de *Leishmania* à populações humanas e caninas e no tempo de permanência dos cães infectados em áreas endêmicas.

Em 1997, pela primeira vez foi detectada a presença de *L. longipalpis* em área urbana do município de Araçatuba, na região noroeste do Estado de São Paulo e, em 1998 foram encontrados cães com quadro clínico e confirmação parasitológica de leishmaniose visceral, sendo posteriormente identificada a circulação de *L. (L.) chagasi*. Em 1999 foi relatado o primeiro caso humano autóctone no Estado de São Paulo³⁴.

Em São Paulo, a RIFI é utilizada nas investigações de foco e para a confirmação das amostras reagentes pelo ELISA. O ELISA é utilizado ainda para a triagem de amostras para identificação de resultados negativos em inquéritos caninos amostrais. Os “kits” utilizados para a realização destes testes pelos Laboratórios de Saúde Pública são fornecidos pelo Ministério da Saúde, os quais são produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz³⁴.

Neste contexto, face às limitações apontadas para a RIFI e o ELISA como testes padrão para o diagnóstico da LV canina, faz-se necessário o desenvolvimento ou padronização de novas técnicas com níveis adequados de sensibilidade e especificidade, de fácil execução e interpretação em campo e/ou em laboratório, eficiência elevada e que possibilitem a redução do custo operacional do diagnóstico da infecção na realização de inquéritos caninos.

Para Badaró et al.³⁵, o melhor caminho para melhorar a especificidade dos testes sorológicos é o uso de antígenos específicos. Os antígenos recombinantes, espécie-específicos, como o K39 e K26 são utilizados em ensaios imunoenzimáticos e em testes imunocromatográficos rápidos (dipsticks) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral em campo e em laboratório na África e Índia^{29,36}.

O antígeno K39 é uma proteína recombinante, de peso molecular de 39kDa, localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, constituinte de uma proteína de 230 kDa da família Kinesina. A proteína rK39 apresenta seqüência idêntica em sete espécies de *Leishmania*. A conservação de uma seqüência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epitopos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indicaria a infecção ativa. O ELISA com o emprego do antígeno rK39, apresentou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade na detecção de anticorpos específicos no calazar na África e na LVA^{29,35,37,38}.

Há poucos estudos que relatam o uso do teste imunocromatográfico rápido anti-rK39 no diagnóstico da LV canina em inquéritos caninos. Genaro et al.²⁷, França-Silva⁴² e Rocha⁴⁴ referiram sensibilidade e especificidade variáveis do teste rápido em estudos realizados em áreas endêmicas para LVA em Minas Gerais, Brasil.

No presente estudo, pretendeu-se avaliar o diagnóstico da LV canina em condições similares ao Programa de Vigilância e Controle da LVA do Estado de São Paulo, utilizando o teste rápido anti-rK39 realizado com sangue total, em condições de campo e com soro, em laboratório em inquéritos amostrais aleatórios realizados em municípios com transmissão de LVA no Estado de São Paulo; comparar o desempenho desse teste imunocromatográfico com os métodos RIFI e ELISA e; discutir a relevância e a viabilidade de seu emprego nos Programas de Controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Regiões e cães incluídos no estudo

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi pesquisada em amostras de sangue de 1333 cães, sendo 1199 amostras colhidas aleatoriamente por sorteio em municípios com transmissão autóctone de LVA da região noroeste do Estado de São Paulo. Os demais 134 animais compuseram grupos controle para a avaliação da especificidade do teste rápido dos quais 47 cães de município autóctone para leishmaniose tegumentar americana (LTA) e sem registro de transmissão da LVA, porém com registro da presença de *L. longipalpis*; 40 cães de município autóctone para LTA, mas sem registros de transmissão da LVA e da presença do vetor e; 47 cães portadores de outras patologias (erliquiose, babesiose, dirofilariose, toxoplasmose e LTA) (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos cães cujas amostras foram analisadas por meio do teste rápido para pesquisa de anticorpos anti-rK39 para o diagnóstico da LV canina.

MUNICÍPIO	Nº DE CÃES EXAMINADOS	POPULAÇÃO CANINA ESTIMADA EM 2002 (*)	% DE ANIMAIS EXAMINADOS
CÃES ESCOLHIDOS POR SORTEIO EM MUNICÍPIOS COM AUTOCTONIA DE LVA E REGISTRO DA PRESENÇA DE <i>L. longipalpis</i>			
Araçatuba	451	28.000	1,61
Guararapes	100	9.000	1,11
Mirandópolis	99	6.000	1,65
Pereira Barreto	99	5.000	1,98
Penápolis	100	8.000	1,25
Birigui	150	14.000	1,07
Promissão	100	8.000	1,25
Buritama	100	3.000	3,33
SUB-TOTAL	1199	81000	1,48
MUNICÍPIO	Nº DE CÃES		
CÃES DOMICILIADOS EM MUNICÍPIOS AUTÓCTONES PARA LTA SEM TRANSMISSÃO DE LVA			
Itupeva (com registro da presença de <i>L. longipalpis</i>)	47		
Caraguatatuba e Ubatuba (sem registro da presença de <i>L. longipalpis</i>)	40		
CÃES PORTADORES DE OUTRAS PATOLOGIAS - babesiose, erliquiose, dirofilariose, toxoplasmose e LTA por <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>			
47			
TOTAL GERAL	1333		

(*) Informações fornecidas pelos Centros de Zoonoses Municipais.

LVA: Leishmaniose visceral americana. LTA: Leishmaniose tegumentar americana.

Amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cefálica dos cães, em tubos secos sem anticoagulante. Em condições de campo, de cada amostra foi retirada uma alíquota de sangue total (20-30 µl) que foi utilizada no teste rápido anti-rK39 e o restante do material foi transportado até o laboratório para a realização do teste rápido anti-rK39, RIFI e ELISA no soro dos animais.

Teste rápido anti-rK39

Foi utilizado o “Kit” de reagentes Kalazar Detect™ Rapid Test - InBios Inc-Seattle, WA-USA para a detecção de anticorpos para leishmaniose visceral nas amostras. A reação foi realizada segundo as instruções do fabricante. A reação final ocorre entre 1 – 10 minutos e a leitura é realizada após este período.

O teste rápido anti-rK39 com sangue total foi realizado nas 1199 amostras dos cães dos municípios autóctones para LVA e nas amostras de cães domiciliados em municípios autóctones para LTA (87); o teste rápido anti-rK39 com soro foi realizado em 1190 amostras dos cães dos municípios autóctones para LVA e nas 47 amostras dos cães portadores de outras patologias.

RIFI

Foi utilizado o “Kit” de reagentes IFI – Leishmaniose visceral canina produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, que utiliza como antígeno, formas promastigotas íntegras de *Leishmania*. A pesquisa de anticorpos foi realizada nas 1179 amostras de soro de cães escolhidos por sorteio em municípios

autóctones para LVA. Os soros com título 1:40 foram considerados reagentes.

ELISA

Foi utilizado o “Kit” de reagentes EIE - Leishmaniose visceral canina, produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BioManguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, que utiliza antígeno solúvel purificado de formas promastigotas de *Leishmania*, para a pesquisa de anticorpos em 997 amostras de soro dos cães escolhidos por sorteio em municípios autóctones para LVA. Os soros com títulos 1:100 foram considerados positivos.

Aspectos éticos

As coletas das amostras dos animais foram realizadas por técnicos especializados que empregaram material laboratorial apropriado e descartável, respeitando-se os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como solicitado o Termo de Consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL em 9 de janeiro de 2006.

RESULTADOS

O teste rápido anti-rK39 apresentou intensidade de reatividade positiva variável podendo ser forte ou fraco.

O teste rápido anti-rK39 foi sempre negativo nas amostras de cães domiciliados nos municípios autóctones para LTA e em cães portadores de outras patologias.

Ao final do estudo observou-se que o nível de positividade para anticorpos anti-Leishmania nos cães escolhidos por sorteio e domiciliados em regiões com transmissão de LVA variou em função do tipo de amostra, da técnica diagnóstica utilizada e também do município (Tabela 1).

O teste rápido realizado com soro detectou anticorpos para Leishmania em 31,3% do total das amostras processadas. Pelo ELISA, o percentual foi 27,2% e pela RIFI, 25,1%.

Em condições de campo, o teste rápido realizado com sangue total não demonstrou boa performance em detectar anticorpos anti-Leishmania em comparação ao teste rápido realizado em laboratório, com soro sanguíneo, à RIFI e ELISA. O percentual de positividade desse teste foi de apenas 17,4%, 44,4% menor do que os 31,3% verificados no teste rápido realizado no soro sanguíneo (Tabela 1).

A soropositividade canina variou de 3% a 38% entre os oito municípios com transmissão de LVA, tanto em função do tipo de teste diagnóstico como da amostra utilizados.

Em alguns municípios foram observados resultados com alto grau de discordância entre as metodologias e/ou técnicas diagnósticas utilizadas, tendo como referência, as proporções observadas nos resultados totais obtidos na pesquisa de anticorpos anti-Leishmania (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados obtidos nos testes diagnósticos utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* realizados nas amostras dos cães selecionados por sorteio domiciliados em municípios do estado de São Paulo com transmissão de LVA.

MUNICÍPIO	TESTE RÁPIDO ANTI-rK39 - SANGUE TOTAL		TESTE RÁPIDO ANTI-rK39 SORO			RIFI SORO			ELISA SORO		
	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO
ARAÇATUBA (451)	88 (19,5%)	363 (80,5%)	167 (37,0%)	279 (61,9%)	5 (1,1%)	152 (33,8%)	297 (65,8%)	2 (0,4%)	87 (19,3%)	167 (37,0%)	197 (43,7%)
PEREIRA BARRETO (99)	15 (15,1%)	84 (84,9%)	12 (12,1%)	87 (87,9%)	-	34 (34,3%)	65 (65,7%)	-	16 (16,1%)	83 (83,9%)	-
BIRIGUI (150)	25 (16,7%)	125 (83,3%)	54 (36,0%)	95 (63,3%)	1 (0,7%)	8 (5,3%)	128 (85,3%)	14 (9,4%)	21 (14,0%)	127 (84,7%)	2 (1,3%)
BJURITAMA (100)	3 (3,0%)	97 (97,0%)	25 (25,0%)	75 (75,0%)	-	8 (8,0%)	92 (92,0%)	-	34 (34,0%)	66 (66,0%)	-
GUARARAPES (100)	35 (35,0%)	65 (65,0%)	30 (30,0%)	68 (68,0%)	2 (2,0%)	38 (38,0%)	58 (58,0%)	4 (4,0%)	32 (32,0%)	67 (67,0%)	1 (1,0%)
MIRANDÓPOLIS (99)	18 (18,1%)	81 (81,9%)	33 (33,3%)	66 (66,7%)	-	29 (29,3%)	70 (70,7%)	-	29 (29,2%)	70 (70,8%)	-
PENÁPOLIS (100)	21 (21,0%)	79 (79,0%)	20 (20,0%)	79 (79,0%)	1 (1,0%)	15 (15,0%)	85 (85,0%)	-	27 (27,0%)	71 (71,0%)	2 (2,0%)
PROMISSÃO (100)	4 (4,0%)	96 (96,0%)	31 (31,0%)	69 (69,0%)	-	12 (12,0%)	88 (88,0%)	-	25 (25,0%)	75 (75,0%)	-
TOTAL (%)	209 (17,4%)	990 (82,6%)	372 (31,3%)	818 (68,7%)	9 (0,7%)	296 (25,1%)	883 (74,9%)	20 (1,7%)	271 (27,2%)	726 (72,8%)	202 (16,8%)
TOTAL	1199		1190		9	1179		20	997		202
			1199			1199			1199		

Entretanto, em sete municípios, foi verificado que o teste rápido anti-rK39 realizado com soro, detectou maior ou similar quantidade de amostras reagentes em relação ao ELISA

DISCUSSÃO

O conhecimento da prevalência real da infecção canina é essencial para a definição de estratégias de controle, adequadas e adaptadas, aos diferentes perfis epidemiológicos regionais. Em virtude da inexistência ou implementação de outras medidas que impeçam a infecção do vetor ou dos hospedeiros vertebrados, a realização de inquéritos caninos e eutanásia de cães soropositivos, até o momento, tem sido a única estratégia de controle disponível direcionada à população canina e adotada para execução em larga escala, embora limitada quanto à operacionalização e resultados efetivos.

Assim, testes diagnósticos mais sensíveis, específicos e de simples execução são imprescindíveis para os programas de vigilância e controle da LV canina e humana³⁹.

No presente estudo, níveis de positividade foram diferentes entre os municípios paulistas em que foram realizados os inquéritos amostrais. Este achado poderia ser explicado pelas variações da prevalência da LV canina em cada região.

Grandes variações de prevalência encontradas entre populações caninas separadas por poucos quilômetros, podem ser influência das condições ecológicas distintas que determinariam a abundância de flebotomíneos dentro de uma área endêmica, pela sobreposição da LTA ou ainda resultante das medidas de controle adotadas^{39,40,41,42,43}.

Entretanto, em alguns municípios, os valores de soropositividade verificados para os diferentes testes utilizados na detecção de anticorpos anti- *Leishmania* e tipo de amostra diferiram consideravelmente da positividade observada no total de amostras processadas (Tabela 1). Assim, no município de Pereira Barreto, a RIFI detectou aproximadamente o dobro de cães soropositivos comparada às outras técnicas; em Buritama os percentuais de positividade foram respectivamente de 3%, 8%, 34% e 25% no teste rápido realizado com sangue total, na RIFI, no ELISA e no teste rápido realizado com soro.

É lícito pensar que a existência de diferenças regionais e temporais na concentração de animais em distintos estágios clínicos da infecção e/ou distintos espectros imunitários possam ter atuado como interferentes explicando os achados acima registrados.

Tanto o teste rápido anti-rK39 realizado em amostras de sangue total e soro, quanto a RIFI e ELISA apresentam variações relativas à especificidade e a sensibilidade frente a diferentes antígenos e estágios da infecção^{27,44}.

A RIFI como técnica para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pode apresentar limitações quanto à capacidade de identificação da soroconversão em cães naturalmente infectados, demandando em algumas situações um intervalo de até oito meses de história⁴⁵.

Neste trabalho, o teste rápido anti-rK39 realizado em condições de campo, com sangue total, apresentou baixo desempenho em detectar cães soropositivos em comparação ao teste rápido realizado em laboratório, com soro e à RIFI e ELISA, corroborando os resultados obtidos por Genaro et al.²⁷ e Rocha⁴⁴. É relevante que o “Kit” utilizado neste estudo é recomendado para amostras de soro de cães.

Rocha⁴⁴ empregou o mesmo “kit” utilizado neste trabalho para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*. Os resultados revelaram baixa especificidade e alta fração de falso-positivos. A autora considerou a possibilidade de algum componente do sangue interferir na formação dos complexos dos anticorpos anti-*Leishmania* com a proteína-A ouro coloidal e/ou na sua migração até a região onde o antígeno K39 encontra-se fixado (linha teste); e também relatou a migração exagerada de hemácias na fita quando colocada uma amostra excedente de sangue, que dificultou a interpretação dos resultados. Porém, em nossa investigação, a concentração de hemácias nas fitas do teste rápido, realizado com alíquotas de 20-30 μ L de sangue total, não dificultou a observação dos resultados.

O teste rápido anti-rK39 realizado no soro detectou o maior percentual de cães soropositivos (31,3%), mas não muito superior daqueles encontrados na RIFI (25,1%) e ELISA (27,2%).

Badaró et al.³⁵ e Genaro et al.²⁷ referem o antígeno rK39 como indicador da presença de LV canina aguda e altamente específico, sendo que os primeiros autores avaliaram o teste ELISA-rK39 e Genaro et al.²⁷, o teste rápido anti-rK39 (TRALd). Entretanto, Rocha⁴⁴, verificou que mais de 89% dos cães assintomáticos, parasitologicamente positivos, apresentaram-se positivos no ELISA-rK39, no TRALd-campo e no TRALd-laboratório.

No Mediterrâneo, Chicharro et al.⁴⁶ investigaram 930 cães e encontraram 91 (9,8%) animais reativos no teste rápido anti-rK39. Destes, 42/91 (46%) eram sintomáticos; em 50/91 (56%) foram possíveis a detecção de DNA de *Leishmania infantum* e os parasitas foram isolados em 20/91 (22%) cães sintomáticos e em 14/91 (15,4%) assintomáticos.

Segundo Scalone et al.³², a eficácia do rK39 em detectar assintomáticos é diferente entre LV canina e humana. Os autores verificaram que o tempo de soroconversão e os resultados obtidos na RIFI e no ELISA com antígeno rK39 foram altamente concordantes no seguimento de um grupo de cães naturalmente infectados que fizeram parte de um estudo que envolveu 6368 animais.

Sendo assim, a superioridade e/ou a similaridade do teste rápido anti-rK39 realizado no soro na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* frente a RIFI e ELISA, constatada nesta investigação, sugere que a presença de anticorpos contra o antígeno recombinante k39 foi comum nos variados espectros imunológicos da LV canina.

A ausência de positividade nos cães residentes em municípios com transmissão autóctone de LTA ou portadores de outras patologias reforçam a indicação do teste rápido anti-rK39 como específico.

Muitos autores compararam a sensibilidade e a especificidade da RIFI e do ELISA no diagnóstico da LV canina, mas alguns resultados são contraditórios, inclusive quanto ao desempenho de uma mesma técnica diagnóstica e em função da localidade estudada. De um modo geral, os estudos disponíveis na literatura, caracterizam-se por incluir um número reduzido de amostras e animais comprovadamente infectados e/ou soropositivos, ou ainda em condições que não são reproduzidas em laboratórios que processam um grande número de amostras durante a realização de inquéritos caninos.

Ferrer et al.²⁰ e Courtenay et al.⁴⁷ atribuem baixa sensibilidade à RIFI, porém em muitos países do Mediterrâneo, a RIFI é considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico da LV canina e reconhecida como o teste mais sensível e específico⁴⁸.

Com base na literatura científica, na orientação (bula) que acompanha os “kits” de reagentes Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz - LV canina para RIFI e ELISA, é informado que o desempenho da RIFI para amostras de soro oscila em torno de 90% de sensibilidade e 80% de especificidade.

Para os cálculos de sensibilidade e especificidade do ELISA, a RIFI foi considerada o teste padrão e os seguintes índices foram obtidos: sensibilidade de 94,5% e 91,7% de especificidade para amostras de soro; 79,4% de sensibilidade e especificidade de 90,24% para amostras de eluato de sangue colhido em papel de filtro.

Em São Paulo, Camargo-Neves⁴⁰ verificou que a RIFI (“Kit” Bio-Manguinhos) foi pouco sensível em inquéritos realizados no município de Araçatuba entre 1999 e 2001, porém a técnica apresentou alta especificidade na detecção de animais infectados, visto que os resultados apresentaram boa concordância com o exame parasitológico.

Lira et al.⁴⁹ avaliaram a performance dos “Kits” Bio-Manguinhos para a RIFI e ELISA. O ELISA revelou sensibilidade de 72% e a RIFI, 68%; a especificidade foi de 87,5% para as duas técnicas diagnósticas. Esses percentuais ficaram aquém dos valores referidos pelo fabricante dos “Kits”.

No presente estudo foi observada similaridade no percentual de positividade na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* entre a RIFI e ELISA no total geral das amostras processadas, sendo que em seis, dos oito municípios incluídos no estudo, os percentuais de soropositividade do ELISA foram próximos ou superiores aos resultados obtidos com a RIFI. Relato semelhante foi descrito por Guimarães et al.⁵⁰ em estudo conduzido em duas vilas com casos de LVA, no Maranhão, em que o “Kit” Biomanguinhos foi utilizado apenas para a RIFI.

CONCLUSÕES

O teste rápido anti-rK39 realizado com sangue total, em condições de campo, apresentou baixo desempenho na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães, quando comparado ao teste rápido realizado com soro, à RIFI e ELISA.

No entanto, o teste rápido realizado com soro, apresentou-se como um método adequado tanto para o diagnóstico complementar como para a triagem de amostras na realização de inquéritos caninos em áreas endêmicas para LV canina. Considerando-se ainda que no mínimo, o teste foi capaz de detectar cães soropositivos tanto quanto as técnicas diagnósticas utilizadas pelo Programa de Controle da LVA, e permite o processamento de um grande número de amostras, com poucas exigências técnicas e com tempo e custo operacional reduzido.

REFERÊNCIAS

1. Ross R. Further notes on leishman's bodies. *Brit Med J* 1903; 2: 1401.
2. WHO. World Health Organization. The 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/ WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases 2006. [Acesso em 13/09/2006]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.htm>
3. Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912; 4: 84-95.
4. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W. Killick-Kendrick r. Ed. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press; 1987 v.1.
5. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(3): 338-48.
6. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2003.
7. Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose Visceral ou Calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 Supl 2: 85-92.
8. Simplício ACR, Furtado JBV, Monteiro OS, Garret D. Leishmaniose Visceral no Brasil. Análise epidemiológica nos últimos 16 anos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(I): 298.
9. Ministério da Saúde do Brasil. Sistema Único de Saúde –SUS. Indicadores de morbidade e fatores de risco. [Acesso em 02/04/07]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>
10. Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 30 (1): 223-8.
11. Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Visceral (calazar) – normas técnicas. Brasília (DF); 1996.

12. Deane LM, Deane MP. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. Hospital 1954; 46: 651-3.
13. Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. Hospital 1955; 48: 61-76.
14. Marzochi MCA, Marzochi KB. Leishmanioses em áreas urbanas. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30 (I): 162-4.
15. Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27 (Supl 3): 67-72.
16. Alencar JE. Leishmaniose Visceral no Brasil. Rev Med Univ Fed Ceará 1978; 17-18: 129-48.
17. Deane, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre os reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro; 1956.
18. Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Gimaldi Jr G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, Souza MA, Rangel Jr FB, Tramontano NC. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80 (3): 349-57.
19. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker JR, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1995; 53 (3): 251-5.
20. Ferrer L, Aisa M, Roura X e Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Vet Rec 1995; (136): 514-6.
21. Aisa MJ, Castillejo S, Galleo M, Fisa R, Riera MC, Colmenares M et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(2): 154-9.
22. Ashford DA, Badaró R, Eulálio C, Freire M, Miranda C, Zalis M e David Jr. Studies on the control of Visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay screening (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1993; (48):1-8.
23. Dietze R, Falqueto A, Valli, LCP, Rodrigues TP, Boulos M, Correy R. Diagnosis of canine Visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 1995; (53): 40-2.
24. Gulnara P, Cabrera B, Silva VO, Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Souza CB. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine Visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1999;61 (2), 296-301.
25. El Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, Korte P, Huigen E, Kolk AH. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir. J Clin Microbiol 1989; 27(10): 2252-7.
26. Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis. 1996; 2: 145-6.
27. Genaro O, Costa RT, França Silva JC, Reis AB, Vieira EP, Arias JR et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. Acta Parasitol Turcica 1997; 21(I): 93.
28. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; (9): 669-70.
29. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. Lancet 1998; 351(9102): 563-5.
30. Badaró, R. Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rK39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 1996.
31. Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. Epidemiol Infect 1993; 103: 647-56.
32. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C 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 2002; 104: 275-85.
33. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2006.
34. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo; 2006.
35. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire S, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1996; 173: 758-61.
36. Nakatani M, Miranda-Badaró R, Meireles A, Trigo J, Netto EM, Badaró R. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti-

- Leishmania* com o novo antígeno K26 adicionado ao K39. *Rev Bras Med Trop* 2001; Suplemento: 10.
37. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 775-9.
38. Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG et al. Rk39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 717-20.
39. Gradoni L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In Killick-Kendrick, R. (ed). *Canine leishmaniasis: an update*. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden; 1999: pp. 32-6.
40. Camargo – Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2004.
41. Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Harith AE, Killick-Kendrick M et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology (Lond)* 1992; 105: 35-41.
42. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet parasitol* 2003; 111: 161-73.
43. Solano-Galego L, Morell B, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in the area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 560-3.
44. Rocha MF. Validação do teste rápido para detecção de anticorpos anti-*Leishmania donovani* no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.
45. Quinzel, RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997; 115: 143-56.
46. Chicharro C, Nieto J, García E, Cruz I, Cañavate C, Flores M, Cuadrado J, Alvar J. Epidemiologia de la leishmaniasis canina em Ibiza (Islas Baleares): estudio comparativo de diferentes métodos de diagnóstico. *Enf Emerg* 2004; 6 (3): 189-200.
47. Courtenay O, Quinzel RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186(9):1314-20.
48. Gradoni, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 2002. Intervet International by, Boxmeer, The Netherlands.
49. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, FGC Abath, Alves LC et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Maguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Maguinhos Kits. *Vet Parasitol* 2006; 137: 11-6.
50. Guimarães KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra RMSNC, Costa ADC, Oliveira AS, Calabrese KS et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 131: 305-9.