

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS SOUSA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Wennia Mota Galdino

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

SOUSA, PB
2018

Wennia Mota Galdino

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das
exigências para a conclusão do Curso
de Graduação de Bacharelado em
Medicina Veterinária do Instituto
Federal da Paraíba, Campus Sousa.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sheila Nogueira Ribeiro Knupp

Coorientadora: Prof^ª. Msc. Roseane de Araújo Portela

Sousa, PB
2018

Wennia Mota Galdino

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em _____
pela Comissão Examinadora:

Orientadora:

Profa. Dra. Sheila Nogueira Ribeiro Knupp
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Departamento de Medicina Veterinária

Avaliadores:

Profa. Dra. Thais Ferreira Feitosa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Departamento de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Departamento de Medicina Veterinária

Sousa, PB

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que me guia em todos os sentidos. Aos meus pais pelo apoio de sempre, a Vítor e nossa filha Cecília que são os amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos que me dedicaram carinho e me incentivaram no decorrer dessa jornada, não me deixando faltar nada e me erguendo quando mais precisei.

Ao IFPB por ter dado as ferramentas que me permitiram chegar ao final desse ciclo de maneira satisfatória. Aos professores dessa instituição pelos ensinamentos em todo o meu percurso acadêmico, especialmente à minha orientadora professora Dra. Sheila Nogueira Ribeiro Knupp pelas orientações e paciência a qual me dedicou no decorrer da elaboração e execução deste trabalho.

Agradeço a Vítor por me acompanhar sempre e por me amar mesmo na minha imensa ausência em todos esses anos, me acalmando nos momentos mais difíceis. À sua família que me acolheu e me forneceram apoio sempre que precisei.

Aos amigos que fiz no decorrer do curso: Serginara, Gabriel, Déborah, Flávia, Paloma e Larissa que foram meu suporte nas dificuldades e que estiveram, em sua maior parte do tempo, presentes nos momentos bons e ruins e que, certamente, alguns continuarão presentes em toda minha vida.

A Samiran e Jôffre pela amizade e ajuda no transporte diário às aulas, ajuda essa que jamais esquecerei e serei grata sempre.

Aos meus amigos que me auxiliaram nessa pesquisa, pois sem eles não teria chegado onde cheguei.

E a todos que direta e indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigada.

RESUMO: A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma antropozoonose, conhecida popularmente como calazar, que vem ganhando destaque na sociedade devido a sua maior distribuição geográfica, afetando, inclusive, grandes centros urbanos. Para o controle dessa doença, é necessário que os testes sejam seguros e eficazes, portanto objetivou-se comparar quatro testes diagnósticos para leishmaniose, sendo eles: Teste Rápido Imunocromatográfico (TRI), Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e citologia. Para isso, foi realizada a coleta de 10mL de sangue da veia jugular externa de 36 cães de ambos os sexos, com raças e idades variadas, todos domiciliados no município de Sousa- PB, sendo também realizada a punção de linfonodos visando a identificação da forma amastigota do parasita. Os resultados dos diferentes testes foram comparados com o ELISA, sendo este preconizado como teste confirmatório para a doença pelo Ministério da Saúde. Os cães foram divididos em dois grupos (G1 e G2) em que o G1 contemplou animais com pelo menos um sintoma de LVC e o G2 os que não tinham sintomatologia sugestiva para a LVC. Dos 36 TRI-Alere® realizados, nove apresentaram resultados positivos, na citologia de linfonodos oito cães foram positivos, na sorologia RIFI 14 animais apresentaram resultados reagentes, e na sorologia ELISA 10 animais apresentaram resultados reagentes. No total 12 animais (33,33% - 12/36) receberam diagnósticos positivos para LVC. Conclui-se que o teste rápido da TRI-Alere® e o RIFI foram os testes que apresentaram maior concordância com o ELISA. No entanto, diante de algumas disparidades de resultados reafirma-se a necessidade da associação dos diferentes testes diagnósticos para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Palavras-chave: Antropozoonose. Calazar. Citologia. *Leishmania spp.* Sorologia. Testes imunocromatográficos.

ABSTRACT: Visceral Canine Leishmaniasis (VCL) is an anthroponosis, popularly known as calazar, which has been gaining prominence in society due to its greater geographical distribution, affecting even large urban centers. In order to control this disease, it is necessary that the tests be safe and effective, so we aimed to compare four diagnostic tests for leishmaniasis, such as: Rapid Immunochromatographic Test (RIT), Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay (ELISA), Indirect Immunofluorescence (IIFR) and cytology. For this, 10 ml of external jugular vein blood was collected from 36 dogs of both sexes, with races and varying ages, all domiciled in the city of Sousa, PB. A lymph node score was also used to identify of the parasite's amastigote form. The results of the different tests were compared with the ELISA, which was recommended as a confirmatory test for the disease by the Ministry of Health. Dogs were divided into two groups (G1 and G2) in which G1 included animals with at least one VCL symptom and G2 those who do not have suggestive symptoms for an VCL. Of the 36 TRI-Alere® tests performed, nine presented positive results, in lymph node cytology, eight patients presented in the IIFR serology 14 animals presented reactive results, and in the ELISA serology 10 animals presented reactive results. No total of 12 animals (33.33% - 12/36) were diagnosed positive for VCL. It is concluded that the TRI-Alere® rapid test and the RIFI were the tests that showed the highest concordance with the ELISA. However, in the face of some disparities in results, it is necessary to associate the different diagnostic tests to avoid false-positive or false-negative results.

Keywords: Anthroponosis. Calazar. Cytology. Immunochromatographic tests. *Leishmania spp.* Serology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. TRI-Alere® para LVC apresentando resultado negativo.....	21
Figura 2. TRI-Alere® para LVC apresentando resultado positivo.	21
Figura 3. Lâmina com parasitas do gênero Leishmania na forma amastigota (setas pretas)..	22
Gráfico 1. Prevalência de sinais de LVC nos animais pertencentes ao G1.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interpretação da análise comparativa pelo Índice Kappa de concordância.	23
Tabela 2. Resultados individuais dos quatro testes realizados para LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) nos 36 cães participantes da pesquisa, distribuídos de acordo com o grupo: com sintomatologia (Grupo 1); sem sintomatologia (Grupo 2).	26
Tabela 3. Comparação dos resultados individuais dos quatro testes realizados para LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) nos 36 cães em comparação com ELISA, distribuídos de acordo com o grupo: com sintomatologia (Grupo 1); sem sintomatologia (Grupo 2)	28
Tabela 4. Resultados dos quatro testes para LVC realizados nos 36 cães de acordo com seu diagnóstico de verdadeiros positivos e negativos e falsos positivos e negativos.	29
Tabela 5. Resultados de sensibilidade e especificidade dos quatro testes diagnósticos de LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) realizados.....	30
Tabela 6. Análise Kappa TRI-Alere® comparado com ELISA.....	31
Tabela 7. Análise Kappa da Citologia de linfonodo comparado com ELISA.....	31
Tabela 8. Análise Kappa dos resultados de RIFI comparado com a sorologia ELISA.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(C) – linha de Controle

(T) – linha de Teste

® - Marca registrada

µm - micrômetros

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DPP – *Dual Path Platform*

e - especificidade

ELISA – *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FN – Falso-Negativo

FP – Falso-Positivo

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

HV – Hospital Veterinário

IFN-γ – Interferon (gama)

IFPB – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MS – Ministério da Saúde

NEG - Negativos

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

POS - Positivos

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

s - sensibilidade

TRI – Teste Rápido Imunocromatográfico

VN – Verdadeiro-Negativo

VP – Verdadeiro-Positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1. Ciclo de vida de Leishmania spp.....	13
2.2. Distribuição geográfica e prevalência de casos de LV no Brasil.....	14
2.3. Métodos de diagnóstico de LV	15
2.3.1. Sensibilidade e especificidade	16
2.4. Controle e profilaxia da LV.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), conhecida popularmente como calazar, vem ganhando uma grande importância na sociedade, uma vez que esta antroponose está cada vez mais urbanizada, atingindo populações animal e humana, inclusive em grandes centros.

De acordo com o Ministério da Saúde – MS, a LV é conhecida comumente como doença própria de área de clima seco com baixa precipitação pluviométrica anual, e de ambiente fisiográfico formado por vales e montanhas, onde se encontram os chamados “boqueirões” e “pés-de-serra” (BRASIL, 2014).

A LV está distribuída em 21 dos 27 estados no Brasil. Nos últimos anos, vem se distribuindo para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, sendo que até o final da década de 1990 cerca de 90% dos casos humanos se concentravam na região nordeste. Destaca-se, também, que a LV apresenta comportamento epidemiológico cíclico, ou seja, há elevação nos casos a cada cinco anos em média (BRASIL, 2015).

Os animais portadores de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) podem apresentar sinais variáveis como alterações cutâneas incluindo: pelame seco, prurido, alopecia, áreas de hiperqueratose e nódulos intradérmicos, sendo observados também apatia, linfadenomegalia, hepato/ esplenomegalia, onicogribose, emaciação, anemia, além de sinais oculares e emagrecimento. Porém, a maioria dos animais apresenta-se de forma assintomática, mas são igualmente reservatórios da doença, possuindo assim, importância significativa no ciclo de transmissão (ASSIS et al., 2010).

O diagnóstico de LVC pode ser realizado de diversas formas, dentre estas se destaca a utilização de testes rápidos imunocromatográficos que podem ser utilizados como testes de triagem, porém os resultados podem ser inconsistentes. Isto ocorre devido a possibilidade de haver reatividade cruzada com outras enfermidades, dificultando um diagnóstico preciso, fazendo com que os médicos veterinários utilizem ferramentas diagnósticas associadas (OLIVEIRA et al., 2008).

O teste rápido preconizado pelo MS é o DPP® - LVC da Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) é utilizado como triagem de amostras em inquéritos caninos (BISUGO et al., 2007). No entanto, atualmente a produção desse teste não está atendendo a demanda nacional de diagnóstico, necessitando assim, de outras alternativas diagnósticas para manter as atividades de vigilância e controle da LV e LVC (MARCELINO & SOUZA FILHO, 2015).

Para o diagnóstico da LVC podem ser realizados testes sorológicos como o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) que é utilizado como comprovação final no

diagnóstico da ocorrência ou não de anticorpos de *Leishmania* spp. e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que muitas vezes também é utilizado no diagnóstico de LVC. Sabe-se que a RIFI apresenta maior grau de especificidade de que o ELISA, porém o último apresenta maior grau de sensibilidade (TÁVORA et al., 2007).

Outro método diagnóstico é a citologia de linfonodos para visualização microscópica e identificação da forma amastigota do parasita, no entanto, apesar de sua alta especificidade, sua sensibilidade é muito variável, a depender da experiência profissional do avaliador e da qualidade da amostra coletada (BARROS, 2011).

Uma ferramenta diagnóstica que também pode ser utilizada é a PCR (Polymerase Chain Reaction), no entanto, esta apresenta dificuldade para ser realizada em laboratórios com poucos recursos, sendo pouco acessível à rotina clínica (LEMOS et al., 2003).

Deve-se considerar que os testes atualmente disponíveis no mercado apresentam sensibilidades e especificidades variáveis, podendo ocorrer resultados errôneos a partir de reações cruzadas com outras enfermidades, como por exemplo, a Tripanossomíase ou podendo ainda, haver a desconsideração de alguns casos positivos de LVC diante da resposta imunológica ao qual o animal esteja desenvolvendo ou não no momento do teste (SOUZA et al., 2013).

A realização de um diagnóstico seguro e o mais fidedigno possível é necessária para que os casos de LVC sejam identificados e, com isso, se possa contribuir no controle e profilaxia dessa doença, pois se evita que animais positivos sejam reservatórios e contribuintes na disseminação dessa enfermidade. Por outro lado, colabora também para evitar que animais sejam eutanasiados desnecessariamente por apresentarem um diagnóstico errôneo. Além disso, a identificação do teste ou da associação de testes mais precisos proporciona ao médico veterinário maior confiança para um eficiente diagnóstico dessa enfermidade, favorecendo na redução da incidência de reservatórios animais e, conseqüentemente, de casos em humanos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Ciclo de vida de *Leishmania spp.*

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, espécie *Leishmania infantum* (sin) *Leishmania chagasi* que mais recentemente, passou a ser conhecida como *Leishmania infantum chagasi* (SILVEIRA & CORBETT, 2010). Sua transmissão para os cães e seres humanos se dá através da picada do mosquito hematófago infectado, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, sendo os canídeos silvestres e domésticos os principais reservatórios destes protozoários (SILVA et al., 2016).

Outras espécies já foram indicadas como vetores da leishmaniose no Brasil, como carrapatos e pulgas. Também já foi descrita a transmissão venérea, transplacentária e por transfusão sanguínea, porém ainda são mecanismos de menor impacto epidemiológico (MARCONDES & ROSSI, 2013).

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo em hospedeiros vertebrados e invertebrados alternadamente, adaptando-se, assim, a diversas condições, apresentando dois estágios de desenvolvimento: a forma aflagelada ou amastigota e a forma flagelada ou promastigota, sendo a primeira encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e a segunda no tubo digestivo do vetor invertebrado (NEVES, 2011).

O mosquito transmissor pode ser encontrado nas diversas estações do ano, sendo até as décadas de 50 e 60 encontrados preferencialmente em período chuvoso nas áreas semi-áridas do Nordeste brasileiro. Entretanto, esse padrão alterou-se, havendo maior prevalência do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* na estação seca, quando há baixa precipitação pluvial (REBÊLO, 2001).

A infecção em cães está relacionada a manifestações clínicas diversas, podendo variar de uma infecção subclínica até uma doença visceralizante fatal, podendo esses animais apresentar sinais clínicos como linfadenomegalia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, febre, diarreia, letargia e perda de peso progressiva (NAUCKE & LORENTZ, 2012).

O desenvolvimento dos sinais clínicos nos animais está relacionado com a resposta imunológica que estes animais desenvolvem mediante o parasita, isto é, os anticorpos produzidos geram o processo inflamatório, desencadeando a maioria dos sinais observados (FREITAS et al., 2012).

O período de incubação da doença apresenta-se bastante variável tanto para o homem como para o cão. No humano esse período dura em média de dois a seis meses, e no cão três a sete meses, podendo variar até vários anos nesta última espécie. Não há diferença na susceptibilidade à doença entre raça, idade ou sexo para animais, porém em humanos, ressalta-se que crianças e idosos apresentam maior susceptibilidade (BRASIL, 2014).

2.2. Distribuição geográfica e prevalência de casos de LV no Brasil

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada uma antropozoonose de caráter endêmico no Brasil e de grande importância à saúde pública (SOUSA et al., 2014). Encontra-se atualmente entre as seis endemias prioritárias do mundo, sendo destacada como um problema de saúde pública em, no mínimo, 88 países (ALVARENGA et al., 2010).

Grandes centros urbanos brasileiros são atingidos pela LV, promovendo a morte em mais de 90% dos casos quando não tratados de forma adequada (ZORZETTO, 2008). O Brasil é considerado um dos quatro países responsáveis por 90% do total de casos em humanos, constituindo-se um grave problema na saúde pública (FONTES & SILVA, 2011). Estima-se ainda que a incidência anual varie entre 200.000 a 400.000 novos casos no mundo (MARCONDES & ROSSI, 2013).

A LV vem ganhando cada vez mais importância na sociedade brasileira devido a sua ampliação geográfica que está relacionada à adaptação do vetor da doença aos locais urbanos com condições higiênicas e sanitárias precárias, atingindo principalmente, periferias de grandes centros urbanos, afetando cada vez mais a população humana e animal (BRASIL, 2006). A difusão desta enfermidade por estar associada a fatores socioeconômicos tende a aumentar com as crises econômicas do país (COSTA, 2005). O nordeste brasileiro constitui-se como uma região com a mais elevada prevalência no Brasil de casos de Leishmaniose tanto em humanos como em animais (BAVIA et al., 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde de 2007 a 2015 foram registrados 33.082 casos de LV em todo o Brasil, sendo 17.508 na região nordeste (52,92%), revelando que no estado da Paraíba houve um total de 344 casos confirmados (SINAN/SVS/MS, 2015). No entanto, estima-se que a ocorrência da LV seja ainda maior que a relatada, uma vez que, o diagnóstico muitas vezes é difícil de ser realizado, bem como há negligência das notificações compulsórias da doença (ANTAS, 2015).

Em se tratando de casos de LVC, ressalta-se a soroprevalência de 10,1% em 89 coletas de cães realizadas na cidade de Sousa - PB no ano de 2011, revelando uma elevada prevalência de casos nessa espécie (PINTO & MELO, 2011).

2.3. Métodos de diagnóstico de LV

O diagnóstico da LVC faz-se mediante associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, sendo os testes laboratoriais direcionados em duas vertentes: detectar o parasita (diagnóstico parasitológico) ou detectar a produção de anticorpos ou reações celulares, ou seja, identificar componentes da resposta imune (LEMOS et al., 2003).

Até a década de 30 o diagnóstico de LV era feito tanto em humanos como em cães a partir de exames diretos como a punção de fígado, de baço e o raspado de pele. Sugere-se que esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, porém não conseguem, isoladamente, ser eficazes para detecção de todos os animais positivos (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

De modo geral, a citologia aspirativa é considerada um método diagnóstico que se caracteriza como de fácil e rápida execução, sendo amplamente utilizado no diagnóstico, especialmente em clínicas veterinárias, pois apesar de ser uma técnica invasiva, apresenta baixa agressão tecidual (DOTTA et al., 2009). Por outro lado, é considerada uma técnica de menor aceitação pelos proprietários dos cães, além do mais, os resultados obtidos de acordo com a técnica, possuem elevada discordância, uma vez que as metodologias utilizadas variam enormemente para cada trabalho, além da falta de controle sobre variáveis como a carga parasitária e o grau de experiência do observador (SILVA, 2005).

Nesse tipo de diagnóstico pode-se observar as formas amastigotas que são demonstradas como corpos arredondados ou ovais, medindo em torno de dois a três μm , podendo ser encontradas extra ou intracelularmente em monócitos ou macrófagos (SUNDAR & RAI, 2002).

O teste rápido imunocromatográfico DPP® - LVC da Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) utiliza a proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) como antígeno e se tornou, a partir de 2011, o teste recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde no Brasil para a triagem de casos de LVC (HIRSCHMANN et al., 2015).

Está disponível comercialmente o Teste Rápido Imunocromatográfico (TRI) produzido pela empresa Alere®, que possui similaridade ao TRI – DPP® quanto à sua

composição antigênica, a proteína recombinante rK28, fornecendo uma nova opção de TRI para o diagnóstico da LVC (MARCELINO & SOUZA FILHO, 2015).

Até 2011, os exames sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde eram ELISA como teste de triagem e RIFI como confirmatório, porém a partir de 2012, o Ministério da Saúde passou a considerar o ELISA como teste confirmatório da LVC (TEIXEIRA & SILVA, 2016).

Os testes sorológicos de RIFI e ELISA representam os principais instrumentos usados no sorodiagnóstico da LV tanto humana quanto canina, sendo empregados nos programas de vigilância nacional e estaduais a fim da identificação de reservatórios infectados (LAURENTI, 2009).

O ensaio imunoenzimático ELISA atua expressando os níveis de anticorpos circulantes através da reação destes anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os anticorpos específicos presentes no soro vão se fixar aos antígenos, promovendo a visualização da reação que ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria (BRASIL, 2014).

A RIFI vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico da LV, sendo considerado o teste de eleição para inquéritos caninos, uma vez que apresenta várias vantagens como fácil execução, rapidez e baixo custo, sendo seu resultado considerado como sororreagente quando possui título igual ou superior a diluição 1:40 que é o ponto de corte (ROCHA, 2012).

A LV se caracteriza por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e elevada produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico pelos testes sorológicos (LUCIANO et al., 2009).

Por outro lado, o diagnóstico de LVC apresenta-se de forma complexa, pois, além da presença de sinais clínicos inespecíficos e uma elevada incidência de cães assintomáticos, há também a possibilidade de reação cruzada nos testes com outras enfermidades como a tripanossomíase, dificultando assim, a interpretação dos resultados (ASSIS et al., 2010).

2.3.1. Sensibilidade e especificidade

Entende-se por sensibilidade, a probabilidade de um teste apresentar resultado positivo em um indivíduo acometido verdadeiramente por uma determinada doença, já especificidade

pode ser definida como a probabilidade de um teste apresentar resultado negativo em um indivíduo sem essa doença (LOPES et al., 2014).

Os Testes Rápidos Imunocromatográficos para diagnóstico da LV demonstram especificidade média-alta e sensibilidade em torno de 30 – 70%, sendo considerados testes com sensibilidade baixa, podendo ocasionar em resultados falso negativos com maior facilidade (CASTAGNARO et al., 2007).

O diagnóstico parasitológico é um método seguro de diagnóstico para LV, pois seu resultado positivo é dado pela visualização direta de formas amastigotas, sendo esse um método de aproximadamente 100% de especificidade, porém sua sensibilidade varia de acordo com o grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e tempo de leitura das lâminas, sendo considerada a sensibilidade em torno de 80% para animais com sintomatologia clínica e sensibilidade menor para assintomáticos (ROCHA, 2012).

O método de diagnóstico da LV pela sorologia ELISA apresenta elevada sensibilidade (90 – 100%) e alta especificidade em torno de 85,9 – 100% (MATOS et al., 2006). É uma das provas sorológicas mais empregadas atualmente, entretanto, ainda assim pode apresentar resultados falsos-positivos ou falsos-negativos (SILVA, 2009).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), é um método sorológico que passou a ser utilizado a partir da década de 60 e demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

Apesar da RIFI ter uma especificidade consideravelmente alta, o risco de reatividade cruzada é eminente, fazendo com que cães não portadores de LVC sejam eutanasiados desnecessariamente, corroborando assim, para a utilização de mais testes para complementar um diagnóstico correto, tendo em vista que nenhum teste disponível atualmente apresenta 100% de sensibilidade e de especificidade (GONTIJO & MELO, 2004).

Além desse percalço, é insatisfatório o desempenho dos métodos de diagnóstico de LVC, uma vez que esses subestimam o número de cães infectados, dificultando também, controle da doença, requerendo para tanto, métodos de diagnóstico mais confiáveis, sendo atualmente empregados uma diversidade de antígenos em métodos variáveis de diagnóstico da LVC, mas, não havendo disponível ainda, um antígeno altamente específico e que seja um método facilmente executado (FARIA & ANDRADE, 2012).

2.4. Controle e profilaxia da LV

As medidas de controle da LV preconizadas pelo Ministério da Saúde têm por estratégias: o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; o controle vetorial; a identificação e o controle populacional dos reservatórios domésticos; além de atividades de educação em saúde, visando reduzir as taxas de mortalidade e o grau de morbidade desta enfermidade (BRASIL, 2006). Entretanto, essas medidas de controle não estão se demonstrando eficazes para reduzir a incidência da doença, necessitando-se, com isso, reavaliar essas medidas de controle propostas (AMÓRA et al., 2006).

A eutanásia dos animais infectados ainda é tida como uma importante forma de se realizar o controle da LV, a fim de se reduzir a incidência da doença tanto em animais quanto em humanos (OLIVEIRA et al., 2008).

Por outro lado, estudos apontam que a eutanásia de cães positivos, mesmo quando realizada de forma adequada, não reduz a incidência da LV, devendo ser utilizadas estratégias combinadas para controle dessa enfermidade que envolvam campanhas educativas de orientação à população sobre o combate ao vetor; profilaxia das residências (medidas de higiene do ambiente); uso de coleiras repelentes para os cães; investimento em pesquisa para elaboração de vacinas; conscientização sobre o perigo da doença e medidas de combate à pobreza (MACHADO et al., 2016).

O tratamento dos cães infectados não é uma estratégia eficaz de controle, sendo que este não é recomendado no Brasil, pois apesar dos animais serem clinicamente curados, podem haver recaídas frequentes, fazendo com que os cães recuperem a infectividade semanas após o tratamento, continuando como reservatórios para os mosquitos transmissores (FARIA & ANDRADE, 2012). Porém, algumas drogas vem sendo empregadas para o tratamento da LVC e de acordo com o protocolo, podem apresentar significativa porcentagem de sucesso na redução dos sinais clínicos, dentre essas drogas destacam-se o antimoniato de n-metilglucamina, o alopurinol, e a combinações dos dois, além da anfotericina B, pentamidina, aminosidina, miltefosine, dentre outras, no entanto, pouco se avalia quanto à cura desses animais (SCHIMMING & PINTO E SILVA, 2012).

Diversas vacinas contra LVC vem sendo testadas incluindo as vacinas vivas ou inativadas, frações purificadas de *Leishmania*, antígenos recombinantes, expressão do antígeno e DNA plasmidial de *Leishmania* através de bactéria recombinante, sendo no Brasil a Leishmune a vacina comercializada que consiste em uma fração glicoproteica purificada que é um antígeno presente sobre a superfície do parasita (LIMA et al., 2010).

Foi verificado uma alta taxa de eficácia da vacina Leishmune que alcançou 95% de soropositividade para a fração glicoproteica purificada em quatro cães vacinados e quatro cães controle que foram analisados individualmente num período de 41 meses após a vacinação. (BORJA-CABRERA et al., 2002).

Há comercialmente também, a vacina anti-leishmânia canina Leish-Tec® que de acordo com o seu manual promove respostas imune celular, humoral, parasitológica e clínica de cães imunizados com o antígeno recombinante A2, associado ao adjuvante saponina. Cães imunizados com essa vacina apresentam uma elevada produção de IFN- γ e significativamente maior de IgG2, específico à A2, permitindo a diferenciação sorológica entre animais vacinados e animais infectados (HERMONT, 2008).

Em um estudo feito com 1.650 cães vacinados com a Leis-Tec®, 96% permaneceram não infectados no período de um ano demonstrando uma eficácia vacinal de 71% baseando-se nos resultados de cultura de aspirado de medula óssea. Entre os animais que apresentaram anticorpos anti-A2 em resposta à Leish-Tec®, foi encontrado 82% de eficácia vacina (FERNANDES et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA) do Hospital Veterinário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (HV-IFPB), campus Sousa – PB.

Os tutores que autorizaram que seus animais participassem do estudo foram informados quanto à realização do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) padronizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-IFPB).

Foram avaliados 36 cães atendidos na rotina clínica médica de pequenos animais, sendo estes de ambos os sexos, com idades e raças variadas e todos domiciliados no município de Sousa – PB. Estes animais foram distribuídos em dois grupos: G1 – Cães com sintomatologia de Leishmaniose Visceral Canina (LVC); G2 – Cães sem sintomatologia de LVC.

Os animais do G1 foram incluídos de acordo com a presença de alguma característica clínica sugestiva de LVC: pelame seco, prurido, alopecia, áreas de hiperqueratose, nódulos intradérmicos, apatia, linfadenomegalia generalizada, hepato/esplenomegalia, onicogribose, emaciação, anemia ou presença de sinais oculares. Os animais do G2 foram aqueles que não apresentaram sintomas clínicos sugestivos de LVC.

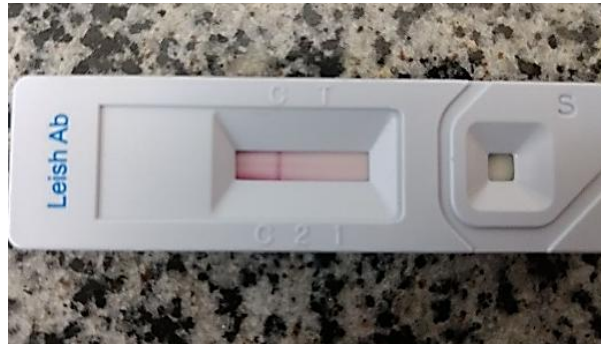
Os animais passaram por avaliação clínica, seguida de coleta de 10mL de sangue por punção da veia jugular externa, além de punção de linfonodos, sendo selecionados preferencialmente os linfonodos mais hipertrofiados.

O sangue dos animais foi processado no setor de Parasitologia Veterinária do HV-IFPB realizando-se a centrifugação para separação do soro sanguíneo para realização dos testes rápidos de LVC em todos os animais incluídos no experimento. Foi utilizado o kit TRI-Alere® que se constitui em um método de triagem para o diagnóstico da LVC, sendo produzido pelo Instituto Octávio Magalhães – Fundação Ezequiel Dias.

O teste rápido da Alere® pode ser realizado a partir de amostras de soro, plasma ou sangue total, fornecendo resultados qualitativos, ou seja, positivos ou negativos. Nesse estudo realizou-se o imunoenensaio com amostras de soro, seguindo os procedimentos estabelecidos na bula do kit que consistiu na remoção do cassete da embalagem, colocando-o sob uma superfície plana e seca, adicionando 10µL de soro utilizando a pipeta capilar no orifício marcado com a letra “S” no cassete de teste e, em seguida, adicionando duas gotas da solução tampão nesse mesmo orifício. Após a deposição dessa solução, observou-se a reação em cor rosa movendo-se pela janela de resultado no cassete.

A interpretação dos resultados ocorreu em até 20 minutos como recomenda o fabricante, sendo visualizada uma linha marcada na parte esquerda da janela (C) – linha de controle, indicando que o teste está funcionando adequadamente. Quando apenas essa linha C aparecia marcada, indicava-se, então, que o resultado era negativo (Figura 1).

Figura 1. TRI-Alere® para LVC apresentando resultado negativo.



Na parte direita da janela há a linha de teste (T) que é marcada quando o teste se apresenta positivo, isto é, para que o teste seja considerado positivo, tanto a linha C, quanto a T ficam coloridas, independente da ordem de aparecimento (Figura 2).

Figura 2. TRI-Alere® para LVC apresentando resultado positivo.



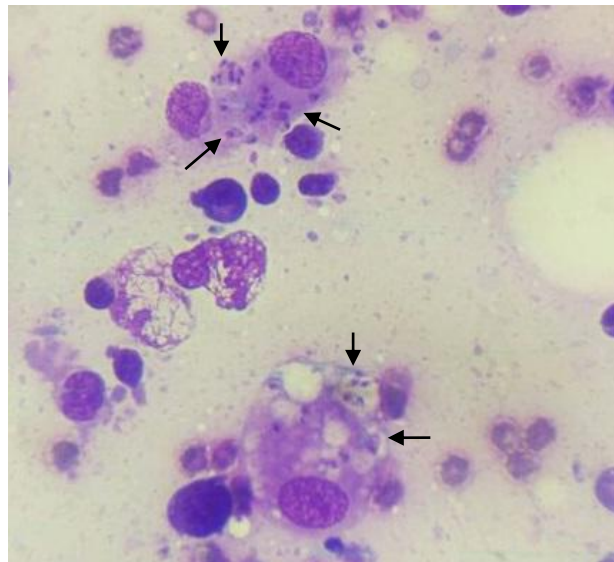
O soro de todos os cães foi utilizado para a realização dos testes sorológicos: Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em laboratório particular (TECSA), independentemente se apresentaram resultados positivos ou negativos no teste rápido TRI-Alere® para LVC. Os resultados das sorologias foram

repassados para os respectivos tutores, ficando uma cópia anexada nas fichas de cada animal registrados no HV-IFPB.

Foram realizadas punções de linfonodo e as lâminas obtidas a partir da punção de linfonodos foram coradas pelo método panótico® rápido e analisadas rotineiramente no laboratório de citologia do HV-IFPB por um médico veterinário qualificado e experiente na identificação da forma amastigota do parasita.

Foram consideradas positivas as lâminas que apresentavam no mínimo três parasitas do gênero *Leishmania* na forma amastigota (Figura 3).

Figura 3. Lâmina com parasitas do gênero *Leishmania* na forma amastigota (setas pretas).



Os resultados dos diferentes testes foram comparados com o ELISA, sendo o padrão ouro, uma vez que este é preconizado como o teste confirmatório para a doença pelo Ministério da Saúde.

Os tutores que tiveram cães confirmadamente positivos, seja na citologia do linfonodo ou na sorologia ELISA, foram informados e esclarecidos quanto à doença, sua forma de transmissão, sintomatologia e cuidados necessários até a realização da eutanásia desses animais. Os tutores que tinham outros cães foram alertados quanto à necessidade de avaliação clínica desses animais e sobre a necessidade de realização dos testes diagnósticos de LVC nos mesmos.

Os casos positivos foram notificados à vigilância sanitária do município de Sousa-PB. Os animais que apresentaram resultados negativos no ELISA, foram tratados conforme indicação médica veterinária e caso necessário, realizados outros exames.

As análises comparativas dos exames diagnósticos foram realizadas pelo Índice Kappa de concordância, para o intervalo de confiança de 95%, com a utilização do software estatístico SAS (9.2), por meio do PROC FREQ e TEST WTKAP.

Para a análise comparativa pelo Índice Kappa de concordância, utilizou-se como base a classificação feita por Landis & Koch (1977). A interpretação e análise comparativa por esse índice segue a descrição da tabela 1.

Tabela 1. Interpretação da análise comparativa pelo Índice Kappa de concordância.

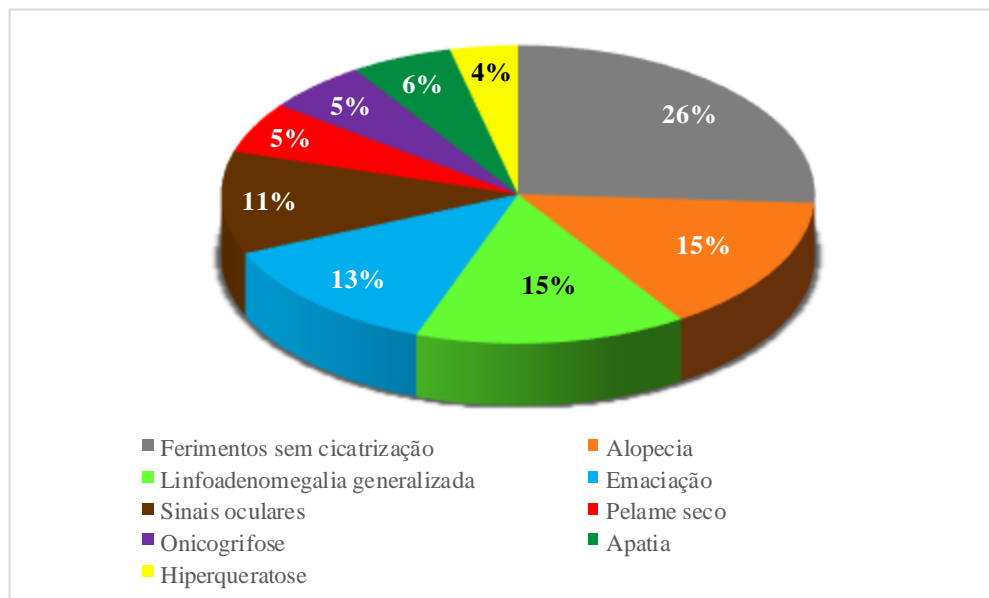
Valores de Kappa	Interpretação
<0	Concordância nula
0-0.19	Concordância baixa
0.20-0.39	Concordância razoável
0.40-0.59	Concordância moderada
0.60-0.79	Concordância alta
0.80-1.00	Concordância quase perfeita

Foi realizada também, uma análise de valor preditivo positivo e negativo, tendo em vista a sensibilidade e especificidade dos testes, aliada a prevalência dos casos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos animais participantes desse estudo, 16 foram agrupados no G1 (44,44%) e 20 no G2 (55,56%). Os sinais mais observados nos animais pertencentes ao G1 foram: ferimentos sem cicatrização (relatado 14 vezes) que incluíam ferimentos em focinho, ferimentos na região dorsal e em membros, além de ferimentos em ponta de orelha; alopecia (relatada oito vezes); linfadenomegalia generalizada (relatada oito vezes); emaciação (relatada sete vezes) e demais sinais relatados em menor proporção, como observado (Gráfico 1):

Gráfico 1. Prevalência de sinais de LVC nos animais pertencentes ao G1.



Dos 36 testes rápidos imunocromatográficos (TRI-Alere®) realizados, nove apresentaram resultados positivos e 27 negativos, correspondendo a 25 e 75%, respectivamente.

De acordo com a bula disponível no kit da ALERE S/A (referência 2104-7E), embora este seja um teste muito preciso na detecção dos anticorpos anti *L. infantum*, pode ocorrer uma incidência, mesmo que baixa, de resultados falsos, isso ocorre devido à fase da doença a qual o animal se encontra, necessitando-se, com isso, associar com outros testes clinicamente disponíveis como ELISA, ressaltando que o diagnóstico definitivo não deve basear-se apenas em um único teste.

A citologia de linfonodos apresentou resultados positivos para LVC em oito cães (22% - 8/36), e negativo em 28 cães (78% - 28/36).

Vale ressaltar que a realização da punção de linfonodo é apenas uma das várias técnicas para avaliação parasitológica, uma vez que essa pode ser realizada por punção esplênica, de medula óssea, biopsia hepática, entre outras técnicas, no entanto, ainda não há um acordo sobre qual deve ser a amostra padrão (COSTA, 2014).

Dos resultados obtidos por meio da sorologia RIFI, 14 animais apresentaram resultado reagentes (39% - 14/36) e 22 animais com resultados não-reagentes (61% - 22/36).

Já com relação aos resultados obtidos na sorologia ELISA, 10 animais (28% - 10/36) apresentaram resultados reagentes, isto é, positivos e 26 (72 - 26/36) apresentaram resultados não-reagentes, ou seja, negativos.

O teste sorológico ELISA é o teste mais utilizado para imunodiagnóstico de LV e por apresentar alta sensibilidade, pode permitir a detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (SOUZA et al., 2013). Porém alguns animais podem apresentar resultados não-reagentes nesse teste, mesmo quando são positivos na análise parasitológica, como ocorreu nesse estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados individuais dos quatro testes realizados para LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) nos 36 cães participantes da pesquisa, distribuídos de acordo com o grupo: com sintomatologia (Grupo 1); sem sintomatologia (Grupo 2).

	Animais/Testes	TRI - Alere®	Citologia de Linfonodo	RIFI	ELISA
GRUPO 1	Cão 1	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 2	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 3	NEG	NEG	POS	NEG
	Cão 4	NEG	POS	NEG	NEG
	Cão 5	POS	POS	POS	POS
	Cão 6	POS	POS	POS	POS
	Cão 7	POS	POS	POS	POS
	Cão 8	POS	NEG	POS	NEG
	Cão 9	POS	POS	POS	POS
	Cão 10	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 11	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 12	NEG	NEG	POS	POS
	Cão 13	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 14	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 15	POS	POS	POS	POS
	Cão 16	NEG	NEG	POS	NEG
GRUPO 2	Cão 17	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 18	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 19	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 20	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 21	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 22	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 23	NEG	NEG	POS	POS
	Cão 24	POS	POS	NEG	NEG
	Cão 25	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 26	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 27	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 28	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 29	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 30	NEG	NEG	POS	POS
	Cão 31	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 32	NEG	NEG	NEG	NEG
	Cão 33	POS	POS	POS	POS
	Cão 34	POS	NEG	POS	POS
	Cão 35	NEG	NEG	POS	NEG
	Cão 36	NEG	NEG	NEG	NEG
	POSITIVOS	09	08	14	10
	NEGATIVOS	27	28	22	26

No geral, os testes apresentaram divergência, tanto nos seus resultados positivos ou negativos, reagentes ou não-reagentes, mas também, entre si em cada animal. Dos nove testes positivos no TRI - Alere®, sete também foram positivos na sorologia ELISA, demonstrando, com isso, 77,78% de confiabilidade dos resultados positivos no TRI - Alere® quando comparado com ELISA, enquanto que dois (22,22%) dos nove positivos, foram considerados negativos no ELISA.

Dos 27 resultados negativos obtidos no TRI- Alere®, 24 (88,89%) também foram negativos no ELISA, mostrando assim, um resultado satisfatório no quesito triagem para este teste rápido imunocromatográfico, no entanto, ainda é considerado um teste de menor sensibilidade e especificidade, assim como demonstrado por outros autores (CASTAGNARO et al., 2007; ASSIS et al., 2010; FONTES & SILVA, 2011; FARIA & ANDRADE, 2012).

Em um estudo realizado, o teste rápido imunocromatográfico obteve sensibilidade baixa (30 – 70%) devido ser um teste de triagem, merecendo sempre associação com testes sorológicos (CASTAGNARO et al., 2007).

Dos oito resultados positivos na citologia, seis também se apresentaram positivos no ELISA, sendo assim 75% de igualdade entre os resultados positivos. Dois (25%) dos oito positivos na citologia de linfonodos foram demonstrados como não-reagentes no ELISA, passando esses cães a serem considerados positivos para LVC, uma vez que a visualização do parasita em lâmina histológica é suficiente para inferir o resultado positivo, já que a especificidade desse método de diagnóstico é de 100% (LAURENTI, 2009).

O fato de animais serem positivos na análise citológica e negativos na sorologia ELISA deve-se possivelmente ao estágio em que a doença esteja ocorrendo ou ao estado de imunidade desses animais, não gerando, assim, os resultados positivos no ELISA, uma vez que o animal passa a ser considerado sororreagente quando apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvio-padrões do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo na leitura feita por espectrofotometria. (BRASIL, 2014), ou seja, o nível de anticorpos nesses animais pode não ter sido suficiente para gerar um resultado reagente.

No presente estudo, observou-se que quatro animais apresentaram-se positivos para a RIFI e negativos para o ELISA, o caracterizando a RIFI como um teste menos sensível em comparação ao ELISA. A sorologia RIFI faz uma detecção parcial dos casos de LVC, com isso, muitos cães podem permanecer infectados e infectantes, o que contribui para a continuidade do ciclo de transmissão do parasito tanto para as populações caninas, como para a humana, devendo-se realizar a associação com a sorologia ELISA que é considerado um teste mais sensível (OLIVEIRA et al., 2005).

A sorologia ELISA passou a ser empregada pelo MS como teste confirmatório da LV a partir de 2012, sendo assim, todos os testes realizados nesse estudo foram comparados aos resultados oferecidos pelo ELISA, gerando, com isso, uma tabela em que se pode analisar a igualdade e divergência nos resultados (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados individuais dos quatro testes realizados para LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) nos 36 cães em comparação com ELISA, distribuídos de acordo com o grupo: com sintomatologia (Grupo 1); sem sintomatologia (Grupo 2)

	Animais/Comparação	TRI-Alere® X ELISA	Citologia X ELISA	RIFI X ELISA
GRUPO 1	Cão 1	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 2	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 3	IGUAL	IGUAL	DIVERGENTE
	Cão 4	IGUAL	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 5	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 6	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 7	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 8	DIVERGENTE	IGUAL	DIVERGENTE
	Cão 9	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 10	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 11	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 12	DIVERGENTE	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 13	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 14	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 15	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 16	IGUAL	IGUAL	DIVERGENTE
GRUPO 2	Cão 17	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 18	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 19	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 20	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 21	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 22	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 23	DIVERGENTE	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 24	DIVERGENTE	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 25	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 26	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 27	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 28	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 29	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 30	DIVERGENTE	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 31	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 32	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 33	IGUAL	IGUAL	IGUAL
	Cão 34	IGUAL	DIVERGENTE	IGUAL
	Cão 35	IGUAL	IGUAL	DIVERGENTE
	Cão 36	IGUAL	IGUAL	IGUAL

Quando realizada a comparação entre os resultados obtidos em cada teste com o ELISA, uma vez que este foi tido como padrão ouro, tem-se que entre TRI-Alere® e ELISA, a divergência dos resultados foi de 14%, sendo cinco dos 36 testes realizados apresentaram resultados diferentes entre si.

Vale destacar que os testes rápidos se configuram como triagem, pois apresentam sensibilidade e especificidade relativas, podendo ocorrer reações cruzadas com outras

enfermidades (OLIVEIRA et al., 2008) e com isso gerar a divergência nos resultados, como os observados nesta pesquisa.

Quando avaliados os resultados obtidos na citologia de linfonodos comparando-os com a sorologia ELISA, tem-se que dos 36 testes realizados, apenas seis apresentaram divergência (17%).

Dessas seis divergências apresentadas, quatro (66,67%) foram positivas no ELISA e negativas na citologia de linfonodo, e duas (33,33%) foram positivas na citologia de linfonodos, porém negativas no ELISA.

A baixa detecção de anticorpos, muitas vezes pode indicar que os animais estão em estágio inicial da infecção, não havendo ainda a soroconversão, porém apresentam os parasitas na avaliação citológica (QUEIROZ, 2008).

Ao se avaliar os resultados obtidos na RIFI em comparação com os obtidos no ELISA (Gráfico 8), houve divergência em 11%, ou seja, dos 36 testes apenas quatro divergiram entre si, revelando um resultado satisfatório, o que configura como o teste com menor divergência dentre os utilizados nesta pesquisa.

A divergência nos testes sorológicos, possivelmente, ocorre em consequência dos diferentes protocolos que são utilizados (ASSIS et al., 2010). Por outro lado, há a alta similaridade nos resultados devido ambos serem testes sorológicos com sensibilidade e especificidade alta, representando os principais instrumentos usados no sorodiagnóstico da LV tanto humana quanto canina (LAURENTI, 2009).

Foi realizada uma análise de valores verdadeiros negativos, verdadeiros positivos, falso positivos e falso negativos de acordo com os resultados apresentados nos testes (Tabela 4):

Tabela 4. Resultados dos quatro testes para LVC realizados nos 36 cães de acordo com seu diagnóstico de verdadeiros positivos e negativos e falsos positivos e negativos.

Resultados/Testes	TRI-Alere®	Citologia de Linfonodo	RIFI	ELISA
VP	08	08	10	10
VN	23	24	20	24
FP	01	00	04	00
FN	04	04	02	02

VP – Verdadeiros positivos; VN – Verdadeiros negativos; FP – Falsos positivos e FN – Falsos negativos

Com relação à sensibilidade e especificidade dos testes realizados (Tabela 5), os resultados foram obtidos através de equações sugeridas por Kawamura (2002) em que para sensibilidade tem-se:

$$s = \frac{VP}{VP + FN}$$

Sendo VP significa verdadeiro positivo e FN significa falso negativo.

Para especificidade tem-se:

$$e = \frac{VN}{VN + FP}$$

Entende-se por VN: verdadeiro negativo e FP: falso positivo.

Tabela 5. Resultados de sensibilidade e especificidade dos quatro testes diagnósticos de LVC (TRI-Alere®, Citologia de linfonodo, RIFI e ELISA) realizados.

Testes	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
TRI - Alere®	66,67	95,83
Citologia de linfonodo	66,67	100
RIFI	83,33	83,33
ELISA	83,33	100

O TRI-Alere® apresentou nesse estudo 66,67% de sensibilidade e 95,83% de especificidade aproximando-se com os resultados de alguns autores que consideram que os testes rápidos imunocromatográficos com sensibilidade entre 67 a 100% (REITHINGER et al., 2002). O valor de especificidade nesse teste concorda com Boelaert et al., (2014) que encontraram resultados para especificidade variando entre 85,6 e 96,8%, porém ambos os resultados (sensibilidade e especificidade) desse teste divergiram dos valores informados na bula de apresentação deste, que considera 98,2% para sensibilidade e 100% para especificidade.

A citologia de linfonodos apresentou 100% de especificidade, concordando com Carvalho (2009) e Rocha (2012) e valor de 66,67% para sensibilidade tendo relação semelhante com os valores obtidos por Laurenti (2009) em que a sensibilidade para amostras de linfonodo variou entre 30 e 85%.

Já a sorologia RIFI apresentou 83,33% de sensibilidade e mesmo valor para especificidade, concordando com resultados de outros autores que consideram que a sensibilidade varia entre 90 e 100% e especificidade entre 80 e 100% (LAURENTI, 2009). Como destaca Schimming & Pinto e Silva (2012), a RIFI possui uma série de vantagens, pois é de fácil execução e rapidez, possui baixo custo, e sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outras técnicas. Por outro lado, Dotta et al., (2009) ressaltam que os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis.

O teste sorológico ELISA apresentou 83,33% de sensibilidade, divergindo dos valores relatados por Oliveira et al., (2005), uma vez que esses autores consideram 90% de sensibilidade para esse teste. A sorologia ELISA apresentou 100% de especificidade, uma vez que este foi considerado o padrão ouro nessa pesquisa, sendo relatado esse mesmo valor por Oliveira et al. (2005).

Quando realizada a análise comparativa entre TRI-Alere® e ELISA, obteve-se Kappa geral de 0.643, caracterizando uma concordância alta entre esses testes (Tabela 6).

Tabela 6. Análise Kappa TRI-Alere® comparado com ELISA.

TRI Alere X ELISA	
Kappa geral	0.643
P-valor do Kappa	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0.969 inf: 0.317

Entre citologia de linfonodo e ELISA, obteve-se o valor de 0.557, considerando-se como uma concordância moderada (Tabela 7).

Tabela 7. Análise Kappa da Citologia de linfonodo comparado com ELISA.

Citologia de linfonodo X ELISA	
Kappa geral	0.557
P-valor do Kappa	0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0.88 inf: 0.234

Já quando comparado RIFI com ELISA (Tabela 8), o valor kappa foi de 0.753 demonstrando uma concordância alta, como era o esperado, por ambos serem testes sorológicos, com altos índices de sensibilidade e especificidade para LVC, no entanto, o Ministério da Saúde preconiza desde 2011 o ELISA como padrão ouro no diagnóstico de LV, isso se justifica pelo fato do mesmo ser um teste de fácil automação, com leitura espectrofotométrica o que proporciona objetividade na leitura, rápida execução, baixo custo e simplicidade técnica, tornando possível a realização de um elevado número de amostras em um mesmo ensaio (SILVA, 2005).

Tabela 8. Análise Kappa dos resultados de RIFI comparado com a sorologia ELISA.

RIFI X ELISA	
Kappa geral	0.753
P-valor do Kappa	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1.0 inf: 0.437

A separação dos animais em grupos (G1 e G2) foi realizada para demonstrar que tanto animais com sintomatologia como os sem sintomatologia de LVC podem ser positivos para esta enfermidade.

Esse estudo confirmou no total 12 animais positivos (33,33%) dos 36 participantes do projeto, sendo destes positivos, sete animais do G1 (58,33% - 7/12) e cinco do G2 (41,67% - 5/12), considerando-se, assim, um índice esperado devido ao HV – IFPB estar inserido em uma região endêmica que é a cidade de Sousa – PB, sendo esses resultados maiores que os observados por Pinto & Melo (2011) em que ressaltaram soroprevalência de 10,1% em 89 coletas de cães realizadas no ano de 2011 nesta mesma cidade.

Ressalta-se, portanto, a necessidade da avaliação de diferentes parâmetros sejam eles clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, ou sorológicos para o diagnóstico definitivo, disponibilizando resultados mais precisos e fidedignos (FARIA & ANDRADE, 2012).

5. CONCLUSÕES

Os testes mais sensíveis e específicos dentre os realizados no estudo foram o ELISA e o RIFI, no entanto, são testes que tendem a ser mais demorados em seus resultados, principalmente se o local de coleta for distante de centros/laboratórios que realizem os mesmos. Portanto, devido ao teste TRI-Alere apresentar também uma alta concordância com o ELISA e considerando sua praticidade e rapidez diagnóstica, também pode ser tido como um teste seguro e eficaz para LVC. No entanto, percebe-se a necessidade de realização de testes variados para diagnóstico dessa enfermidade, pois ainda houve animais que tiveram resultados divergentes em diferentes testes, além de animais que não apresentaram sintomatologia clínica, e que foram positivos.

Destaca-se que a associação de testes ainda é a forma mais segura para se identificar os falsos-positivos e falsos-negativos para LVC, contribuindo assim, para obtenção de diagnósticos cada vez mais fidedignos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, D. G. DE; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V. DA; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194 – 197, 2010.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Revista Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259 – 265, 2004.
- AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G. DA; CALADRESE, K. DA S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 36, n. 6, p. 1854 – 1859, 2006.
- ANTAS, A. F. B. **Leishmaniose nas microrregiões do estado da Paraíba – Brasil no período de 2007 a 2013**. 2015. 35f. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba.
- ASSIS, J. DE; QUEIROZ, N. M. G. P. DE; SILVEIRA, R. DE C. V. DA; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; NORONHA JÚNIOR, A. C. F. DE; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. A. S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- BARROS, R. M. **Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília.
- BAVIA, M. E; CARNEIRO, M. T.; GURGEL, H. DA C.; MADUREIRA FILHO, C.; BARBOSA, M. G. R. Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parassitologia**, v. 47, p. 165 – 169, 2005.
- BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. DE F. L.; TANIGUCHI, H. H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A. A.; SPESSOTO JUNIOR, M.; KANETO, C. N.; CAMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. 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. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p.185-193, 2007.
- BOELAERT, M.; VERDONCK, K.; MENTEN, J.; SUNYOTO, T.; GRIENSVEN, J. V.; CHAPPUIS, F.; RIJAL, S. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014.
- BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N. N. C.; SILVA, V. O. DA; SOUZA, E. P. DE; SANTOS, W.R.; GOMES, E. M.; PALANTNIK, M.; SOUSA, C. B. P DE. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, p. 3277 – 3284.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV**. 1ª ed., rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília/DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ªed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CARVALHO, J. K. M. R. **Leishmaniose Visceral Canina: aspectos clínicos e de diagnóstico**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em saúde animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; FONDATI, A.; GRANDONI, L.; LUBAS, G.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINNI, E. Canine Leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. **Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)**, v. 21, n. 3, p.19 – 32, 2007.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3 – 17, Salvador – BA, 2005.

COSTA, K. F. DE L. **Percepção e diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em áreas ribeirinhas na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte**. 2014. 92f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

DOTTA, S. C. N.; LOT, R. F. E.; ZAPPA, V. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47 – 57, 2012.

FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI JUNIOR, G.; GAZZINELLI, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, p. 476 – 485.

FONTES, S. D.; SILVA, A. S. A.; Leishmaniose Visceral Canina. In: III SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA - SIMPAC, v. 3, n.1, Viçosa – MG. **Anais...** Viçosa – MG, 2011. p. 285 – 290.

FREITAS, J. C. C. DE; PINHEIRO, D. C. S. N.; LOPES NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A. DE; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. DE M.; OLIVEIRA, L. F. DE. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24 – 29, 2012.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338 – 349, 2004.

HERMONT, V. J.; Manual Técnico Leish-Tec, 2008. Disponível em: < <https://pt.scribd.com/document/236170032/Manual-Tecnico-Leish-Tec> > Acesso em fev. 2018.

HIRSCHMANN, L. C.; BROD, C. S.; RADIN, J.; SIMON, C. F.; RECUERO, A. L. C. Leishmaniose Visceral Canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene no Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 33 – 44, 2015.

KAWAMURA, T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um teste. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 437 – 441, 2002.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159 – 174, 1977.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.6, n. 67, p. 13 – 23, 2009.

LEMOS, E. M.; CARVALHO, S. F. G.; COREY, R.; DIETZE, R. Avaliação do Teste Rápido Utilizando o Antígeno Recombinante k39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, 2003.

LIMA, V. M. F. DE. IKEDA, F. A.; ROSSI, C. N.; FEITOSA, M. M.; VASCONCELOS, R. DE O.; NUNES, C. M.; GOTO, H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN- γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmune® in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 296 – 302, 2010.

LOPES, B.; RAMOS, I. C. DE O.; RIBEIRO, G.; CORREA, R.; VALBON, B. DE F.; LUZ, A. C. DA.; SALOMÃO, M.; LYRA, J. M.; AMBROSIO JUNIOR, R. Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. **Revista brasileira de oftalmologia**, v. 73, n. 1, p. 16 – 22, 2014.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181 – 187, 2009.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Revista Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 247 – 258, 2016.

MARCELINO, A. P.; SOUZA FILHO, J. A. DE. **Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**. Belo Horizonte – MG, 2015.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341 – 352, 2013.

MATOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 51 – 54, 2006.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 67, p. 1 – 5, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12.ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

OLIVEIRA, L. S. DE; JULIÃO, F. DA S.; SOUZA, V. M. M. DE; FREITAS, D. S.; SOUZA, B. M. P. DA S.; PAULE, B. J. A.; AGUIAR, P. H. P.; MELO, S. M. B.; FRANKE, C. R. A utilização da Imunofluorescência Indireta no diagnóstico de rotina da Leishmaniose Visceral Canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 41 – 47, 2005.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. DE; MACHADO, R. Z. A study of Cross-Reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesiacanis* and *Ehrlichiacanis* in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Fluorescent Antibody Test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7 – 11, 2008.

PINTO, N. F. DOS S.; MELO, M. A. DE. Levantamento epidemiológico da Leishmaniose Visceral Canina na mesorregião do serão Paraibano. **IX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande**. Patos – PB, 2011.

QUEIROZ, N. M. G. P. DE. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste**. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária.

REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae: Phlebotominae*) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 221 – 227, 2001.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 40, n. 7, p. 2352 – 2356, 2002.

ROCHA, A. G. DA. **Leishmaniose Visceral Canina no Rio Grande do Sul: Revisão Bibliográfica**. 2012. 47f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano X, n. 19, 2012.

SILVA, F. K. A. DA. **Leishmaniose Visceral Canina**. 2009. 35f. Monografia (Graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

SILVA, M. V. DA. **Avaliação de testes sorológicos para Leishmaniose Visceral Canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro**. 2005. 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUZA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625 – 629, 2016.

SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenously introduced? A brief review. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 143 – 147, 2010.

SINAN/SVS/MS. **Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil**. Brasília/DF, 2015.

SOUZA, R. A. DE; ALVES, N. M.; ALBANO, S. G. C.; RÊGO, G. M. S. DO; MACHADO, L. P. Teste rápido imunocromatográfico no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina no município de Bom Jesus, Piauí. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.19; p. 1733 – 1741, 2014.

SOUZA, Y. C. P. DE; CARVALHO, A. F. S. DE; CARVALHO, L. A. R.; MANSUR, V. F. R. Testes diagnósticos para Leishmaniose Visceral – atualidade e perspectivas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano XI, n. 21, 2013.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951 – 958, 2002.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. DA C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 482 – 483, 2007.

TEIXEIRA, D. DE A.; SILVA, I. E. Validação da técnica do Teste Rápido DPP® - LVC nos municípios sob jurisdição do laboratório macrorregional de Teófilo Otoni – MG no ano de 2015. **Revista UNIPAC**, 2016.

ZORZETTO, R. Uma doença anunciada. Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, v. 151, p. 47 – 51, 2008.