

ANÁLISE COMPARATIVA DO TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO - TR-DPP® E IMUNOENZIMÁTICO - ELISA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Vanessa Paulino da Cruz Vieira¹
Selvino Eustáquio Mendes Silva²
Geraldo Rodrigues Gomes Neto³

RESUMO

Por meio de um estudo transversal, descritivo e quantitativo, objetivou-se realizar uma comparação entre os resultados obtidos no teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos) e no ensaio imunoenzimático (ELISA), no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) em Salinas, Norte de Minas Gerais. Participaram do estudo cães errantes apreendidos pela Vigilância em Saúde, submetidos ao TR-DPP® para triagem e ELISA para confirmação dos animais “suspeitos” de LVC. Realizou-se o TR-DPP® em 223 cães de ambos os sexos, raças e idades variadas. Os resultados revelaram 54 animais reagentes no TR-DPP®, sendo classificados como “suspeitos”, e desses, 22 foram confirmados pelo ELISA. O cálculo do Valor Preditivo Positivo (VPP) do TR-DPP® foi de 40,7%, utilizando o ELISA como padrão-ouro. O resultado do VPP demonstra que o TR-DPP® pode e deve ser usado como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico e controle da LVC em Salinas, Norte de Minas Gerais, tendo sua importância balizada na detecção precoce de uma possível disseminação da LVC, evitando a possibilidade de surtos. No entanto, enfatiza-se a necessidade de confirmação por métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, para a correta tomada de decisões acerca das ações em programas de saúde pública, no combate à LVC.

Palavras-Chave: Doença negligenciada, zoonoses, saúde pública, valor preditivo positivo.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST - TR-DPP® AND IMMUNOENZYMATIC - ELISA IN THE DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT

Through a cross-sectional, descriptive and quantitative study, the objective was to compare the results obtained in the rapid immunochromatographic test (TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos) and in the immunoenzymatic assay (ELISA), in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC) in Salinas, North of Minas Gerais. The study included stray dogs apprehended by Health Surveillance, submitted to TR-DPP® for screening and ELISA for confirmation of animals “suspected” of CVL. The TR-DPP® was carried out in 223 dogs of both sexes, breeds and different ages. The results revealed 54 reactive animals in the TR-DPP®, being classified as “suspicious”, and of these, 22 were confirmed by the ELISA. The calculation of the Positive Predictive Value (PPV) of the TR-DPP® was 40.7%, using the ELISA as the gold standard. The VPP result demonstrates that the TR-DPP® can and should be used as an auxiliary tool for the diagnosis and control of CVL in Salinas, North of Minas Gerais, having its importance based

¹ Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas.
*Correspondência: vanessa.vieira@ifnmg.edu.br

² Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - IFNMG- Campus Salinas. selvinoeustaquio@gmail.com

³ Discente do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - IFNMG, Campus Salinas. geraldorodrigues179@gmail.com

on the early detection of a possible dissemination of CVL, avoiding the possibility of outbreaks. However, the need for confirmation by more sensitive and specific diagnostic methods is emphasized, for the correct decision-making regarding actions in public health programs, in the fight against CVL.

Keywords: Neglected disease, zoonoses, public health, positive predictive value.

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO - TR-DPP® E INMUNOENZIMÁTICO - ELISA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA

RESUMEN

A través de un estudio transversal, descriptivo y cuantitativo, el objetivo fue comparar los resultados obtenidos en la prueba inmunocromatográfica rápida (TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos) y en el ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina (LVC) en Salinas, Norte de Minas Gerais. El estudio incluyó perros callejeros detenidos por Health Surveillance, enviados a TR-DPP® para detección y ELISA para confirmación de animales "sospechosos" de CVL. El TR-DPP® se realizó en 223 perros de ambos sexos, razas y diferentes edades. Los resultados revelaron 54 animales reactivos en el TR-DPP®, siendo clasificados como "sospechosos", y de estos, 22 fueron confirmados por ELISA. El cálculo del Valor Predictivo Positivo (VPP) del TR-DPP® fue del 40,7%, utilizando el ELISA como patrón oro. El resultado del VPP demuestra que el TR-DPP® puede y debe ser utilizado como herramienta auxiliar para el diagnóstico y control de LVC en Salinas, Norte de Minas Gerais, teniendo su importancia basada en la detección temprana de una posible diseminación de LVC, evitando la posibilidad de brotes. Sin embargo, se enfatiza la necesidad de confirmación por métodos diagnósticos más sensibles y específicos, para la correcta toma de decisiones en cuanto a acciones en programas de salud pública, en el combate a la LVC.

Palabras-clave: enfermedad desatendida, zoonosis, salud pública, valor predictivo positivo.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC), conhecida popularmente como Calazar é uma doença parasitária distribuída no mundo todo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, América Central e América do Sul. Aproximadamente 300 mil novos casos ocorrem todos os anos, com 20.000 a 40.000 mortes anuais. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pelo vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (1).

Diversos fatores contribuem para a presença desta enfermidade, como o convívio muito próximo do ser humano e reservatório (cão), além do aumento da densidade do vetor, estado imunológico da população, associado à redução de investimentos na saúde e educação. Outro possível fator é a superpopulação canina, especialmente aqueles animais considerados semi-domiciliados, com trânsito livre e expostos ao vetor nos diferentes ambientes que possam perambular (2).

A LVC pode ser clínica e laboratorialmente confundida com uma ampla gama de patologias caninas, devido à possibilidade de reações cruzadas oriundas de anticorpos produzidos por outras infecções, que podem ser causadas por *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp., *Neospora* sp., *Trypanosoma cruzi*, *T. caninum* e outras espécies causadoras de leishmaniose tegumentar (3). O conhecimento de suas manifestações clínicas e de procedimentos

laboratoriais específicos e sensíveis para esse diagnóstico, são de grande importância para uma rápida confirmação e posterior a notificação do caso, contribuindo assim diretamente para o controle do foco (4).

Até 2012, a LVC era diagnosticada utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), um método recomendado para a confirmação de casos positivos detectados por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (5). Para melhorar a acurácia no diagnóstico da LVC, o Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral (PCVLV) recomenda a utilização de um teste rápido imunocromatográfico, compreendendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o DPP (Dual-Path Platform; Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para a triagem de cães infectados, e ELISA para confirmar os resultados positivos (6,7).

Dentre as formas de diagnóstico, pode-se destacar o teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina que é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-leishmania que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos K 26, K 39 e K9) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *Leishmania chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*). A presença de anticorpos anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatada reação cruzada com outros tripanossomatídeos (8, 9).

O ELISA, por sua vez, consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* spp. cultivadas in vitro, inativadas e adsorvidos nas cavidades das microplacas. Depois adiciona-se uma antiimunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos, se presentes. Para a evidência da reação utiliza-se tetrametilbenzina (TMB), formando um composto de coloração azul (10).

Ambos os métodos são compostos por proteínas recombinantes K28, derivadas de proteínas da família kinesina que possuem elevado potencial imunogênico. No entanto, estudos vêm demonstrando uma baixa sensibilidade do DPP® em cães clinicamente assintomáticos (8, 11).

Embora o método de maior especificidade para o diagnóstico de LVC seja o exame parasitológico, nem sempre ele é de fácil execução, e sua sensibilidade é relativamente baixa. Portanto, a incorporação de um teste rápido (DPP) no protocolo atual do PCVLV para detecção de LVC acelerou a implementação das medidas de controle em áreas endêmicas. O DPP é um procedimento que não requer equipamentos e suprimentos especializados e utiliza pequenas amostras de sangue. Já do ponto de vista da saúde pública, os resultados positivos em testes sorológicos são utilizados como critério, de acordo com o PNCVLV, para indicação de eutanásia em cães reagentes (5, 11).

No entanto, cabe ressaltar que, apesar da larga utilização dessa estratégia, muitos são os desafios na sua operacionalização e manutenção, bem como comprovação de sua eficácia enquanto método de controle da doença, além de questões éticas envolvidas, o que levou, em 2016, a regulamentação do fármaco miltefosina para o tratamento da LVC, que não é utilizado para o tratamento da doença em humanos, aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, havendo, a partir daí, muitos avanços na terapêutica e no prognóstico da doença (12, 13, 14, 15, 16,17).

De acordo com as Diretrizes do Brasileish, 2018, o tratamento da leishmaniose deve ser instituído apenas após um diagnóstico preciso, e possui como principais objetivos reduzir a carga parasitária do cão, neutralizando a sua capacidade infectante, restaurando adequadamente a sua resposta imune, promovendo a melhora clínica e prevenindo recaídas, possuindo uma tabela de recomendação de tratamento de acordo com cada estágio da doença, onde utiliza imunoterapia, imunomodulação, e medicamentos como domperidona, alopurinol e miltefosina. Entretanto, por ser caro e o cão necessitar de exames e consultas regulares, muitos donos abandonam o tratamento de seus animais (18, 19).

Aliado a isso, há a possibilidade de atribuir essa responsabilidade ao setor público, que por sua vez encontra dificuldade em realizar esse controle, pois esses animais, sem a devida proteção, acabam entrando em contato com locais de maior risco da presença dos vetores. Isso pode acabar levando ao abandono de seu animal de estimação, tornando-o um animal errante, facilitando sua contaminação pela leishmaniose e disseminação da doença (1).

Além do tratamento, a epidemiologia e medidas preventivas como a vacinação do cão em áreas enzoóticas, dependem de um correto diagnóstico. Porém, trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado variações na sensibilidade e especificidade dos testes empregados no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (20, 21). Existem poucos estudos sobre a utilização do teste rápido-TR, na prática e controvérsias quanto a sua eficiência como método de triagem (22).

Com isso, o objetivo deste estudo foi realizar uma comparação entre os resultados obtidos no teste rápido imunocromatográfico (DPP® LVC Bio-Manguinhos) e no ensaio imunoenzimático (ELISA), no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) em Salinas, Norte de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa trata-se de um estudo transversal, descritivo e quantitativo, realizado no município de Salinas, Norte de Minas Gerais, por meio do acompanhamento do trabalho da Vigilância em Saúde do município, na realização dos testes rápidos de triagem (TR-DPP®) para LVC, em cães errantes de ambos os sexos, raças e idades variadas, feitos pelos funcionários e o médico veterinário responsável pelo canil municipal, regido pela Secretaria Municipal de Saúde, no desempenho das atribuições diárias do controle de endemias e zoonoses, incluindo o encaminhamento de amostras reagentes para laboratório credenciado, a fim de se realizar a sorologia de confirmação pelo ELISA, como preconizado pelo PNCLVC.

A metodologia utilizada nesses procedimentos estava consoante com as medidas de controle de zoonoses preconizadas pelo Ministério da Saúde e por legislação vigente, realizados de acordo a lei e normas do atendimento prescrito no protocolo de conduta, tratamento e métodos do setor de Vigilância em Saúde do município.

Após a apreensão dos animais, realizou-se o TR-DPP® para triagem da LVC, pela coleta de uma amostra de sangue da ponta da orelha de cada animal, usando uma lanceta estéril, conforme a metodologia contida no “kit” TR-DPP® - Bio-Manguinhos. O resultado foi considerado reagente, sendo denominado “suspeito” quando duas bandas, uma sendo referente ao controle do teste e outra sendo referente à amostra testada, aparecessem dentro de 15 minutos. O teste foi considerado não reagente, quando apenas a banda referente ao controle apareceu. Caso nenhuma banda fosse visualizada, o teste era considerado inválido e deveria ser repetido, utilizando outro “kit”.

Para a realização da próxima etapa, sendo esta a comparação dos resultados no teste rápido com os resultados dos testes sorológicos confirmatórios, verificando a eficiência do teste rápido como ferramenta diagnóstica, após a realização do teste rápido DPP,

Os animais "suspeitos" no TR-DPP®, tiveram amostra de seu sangue coletada com seringa descartável e com agulha 25x7mm, de 2 a 3 ml, na veia cefálica, acondicionadas em tubo de ensaio pediátrico com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), devidamente identificados, sendo encaminhados ao laboratório da Vigilância em Saúde do município de Salinas para o preparo do soro, que foram enviados ao laboratório credenciado da Fundação Nacional Ezequiel Dias (FUNED) para a realização da sorologia de confirmação, pelo teste ELISA.

Os animais positivos no teste ELISA foram submetidos à eutanásia, seguindo o procedimento adotado pelos órgãos responsáveis pela prevenção e controle da doença no município.

Para comparação do TR-DPP[®] com o ELISA (considerado aqui como padrão-ouro), evidenciando o percentual de amostras que o teste rápido diagnosticou corretamente revelando casos verdadeiramente positivos, dentre os casos considerados "suspeitos", foi realizado o cálculo do Valor Preditivo Positivo (VPP) do teste rápido, a fim de estimar a validade desse teste em condições reais de pesquisa. Esse valor reflete a probabilidade de que cada "suspeito" no TR-DPP[®], seja verdadeiramente um caso de leishmaniose, ou seja, positivo no teste ELISA. Para isso utilizou-se a seguinte fórmula: $VPP = N^{\circ} \text{ de verdadeiros positivos} / \text{total de 'suspeitos' no teste} \times 100$ (23, 24).

Nos animais negativos, foi realizado o acompanhamento da castração em uma parceria da Prefeitura Municipal de Salinas e o Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) Campus Salinas. Por fim, os animais castrados e negativos LVC foram devolvidos à população em feira de adoção com conscientização populacional sobre guarda responsável e bem-estar animal, ficando sob a responsabilidade do tutor, certificar-se dos documentos, dos tratamentos, condições e zelo, assinando um termo de responsabilidade pelo cão adotado, evitando o abandono em vias públicas, contribuindo para a redução do risco para disseminação da LVC e outras zoonoses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram do presente estudo 225 cães errantes e o TR-DPP[®] foi realizado em 223 animais, todos da espécie canina, de ambos os sexos, diferentes raças e faixa etária. Desses, 68 animais foram reagentes, sendo classificados como "suspeitos". Amostras de soros de 54 animais "suspeitos" foram encaminhadas para a FUNED, para realização do teste sorológico confirmatório ELISA. Os resultados revelaram 22 animais reagentes, sendo considerados positivos para LVC.

Assim, na comparação do TR-DPP[®] de triagem com o confirmatório ELISA, pôde-se evidenciar que o TR-DPP[®] diagnosticou corretamente 22 casos verdadeiramente positivos dentro de 54 casos considerados "suspeitos". O cálculo do VPP do teste rápido foi de aproximadamente 41%. Assim, pode-se inferir que a cada 100 resultados positivos em exames realizados utilizando o TR-DPP[®], serão identificadas de forma correta aproximadamente 41 amostras positivas.

Índice mais alto foi encontrado avaliando os fatores de risco da LVC na zona rural do município de Patos, PB, verificando que o TR-DPP[®] apresentou o VPP de 66,67% (25). E, valor mais baixo foi encontrado, comparando métodos sorológicos em cães do Rio Grande do Sul, demonstrando que a combinação recomendada pelo protocolo atual, que se trata do TR-DPP[®] como triagem e ELISA como confirmatório, apresentou um VPP de 27,3%. Ainda o mesmo trabalho comparando o protocolo antigo com o atual, verificou que o VPP que era de 8,9% subiu para 27,3% (26).

A performance do TR-DPP[®] também foi estudada por meio de inquérito em 488 cães em uma região endêmica de Fortaleza, Ceará. O padrão ouro utilizado foi composto do isolamento de *Leishmania* em cultura, histopatológico, e imunohistoquímica de 35 amostras de sangue periférico e fragmentos de pele. O VPP foi de 21,9%. Os autores explicam que o baixo VPP obtido foi decorrente da falta de sensibilidade do padrão ouro a qual possivelmente foi menor que a do DPP. Por isso, recomendam a utilização do TR-DPP[®] em combinação com outros testes (27).

Ainda assim, a utilização do TR-DPP[®] deve ser considerada um grande avanço, porque antes quando se utilizava ELISA e RIFI havia a consequência da espera de um longo tempo

para a entrega dos resultados. Entre a coleta de sangue para o diagnóstico sorológico e a retirada dos cães sororreagentes do ambiente, havia um período estimado de 30 a 80 dias. Essa permanência de cães infectados nas áreas urbanas permitia a manutenção do ciclo de transmissão da doença (28).

Diante disso, a utilização do TR-DPP® foi recomendada em alguns trabalhos como método confirmatório, após observarem valores de especificidade e valor preditivo positivo superiores ao ELISA, incluindo em áreas de alta demanda, devido a sua facilidade de uso e menor custo financeiro. Contudo é necessário enfatizar que no presente estudo não foi avaliada a ocorrência de reações cruzadas no TR-DPP® com outros hemoparasitos, fato que impossibilita uma avaliação precisa de sua especificidade (7,20).

Com isso, é preciso buscar testes mais sensíveis e específicos para o combate da LVC. Falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e, por outro lado, não detectar casos positivos (29). Observa-se então que, apesar da grande variedade de métodos disponíveis para diagnóstico canino, ainda não se dispõe de um método bastante sensível, simultaneamente específico e de fácil execução (30).

Há que se enfatizar que os programas de controle e prevenção contra a leishmaniose propõem interromper o ciclo de transmissão do parasito e diminuir a incidência de infecção nos cães e humanos, a partir do tratamento com medicamentos, vigilância sorológica e eliminação de animais soropositivos, proteção para os cães contra a picada do flebotômico e vacinação (31).

No entanto, é de extrema relevância ressaltar que nos últimos anos, apesar do número de casos em humanos permanecer estável, a leishmaniose visceral (LV) encontra-se em expansão geográfica no país. A falta de evidências concretas quanto à efetividade de estratégias propostas para seu controle, incluindo a eutanásia dos animais positivos, no que concerne à redução de casos humanos e caninos, suscitaram a necessidade de revisão das ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde (MS) (32).

Nos casos de animais que apresentam o exame parasitológico positivo e que não estejam em tratamento, o MS recomenda a prática da eutanásia. No entanto, a eliminação de cães tem o pior desempenho quando comparada com outras estratégias de controle, como o uso de inseticidas, por exemplo, além da vacinação, como medidas de proteção ao animal e população em áreas de risco. A vacinação canina é outra forma de prevenir a infecção, mas estudos científicos ainda avaliam o custo-benefício em programas de saúde pública (19). A estratégia de uso das coleiras impregnadas com deltametrina (4%) em cães, se baseia na abordagem Saúde Única, que visa proteger a saúde dos animais e dos seres humanos (32).

Nesse sentido, o Brasil é o primeiro país no mundo a incorporar essa tecnologia do encoleiramento como medida de saúde pública para o controle da leishmaniose. Essa incorporação se baseia em evidências científicas, com dados de estudos de efetividade e custo-efetividade e foi amplamente discutida com grupos de especialistas e com representantes das três esferas de Governo - Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde, Conselho Nacional de Secretários de Saúde (Conass) e Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (Conasems), tendo como expectativa a redução do coeficiente de incidência dos casos humanos e de prevalência canina (32).

O uso da coleira com efeito repelente é a medida complementar recomendada para minimizar a transmissão da leishmaniose visceral, com eficácia de mais de 90% contra a picada do flebotômico. “A utilização de coleiras impregnadas com deltametrina impede a picada por ação repelente e inseticida”. A atuação do médico veterinário na atenção básica à saúde e nos Núcleos de Apoio à Saúde da Família (Nasf) também são medidas que podem auxiliar no controle das zoonoses endêmicas no país (19).

No que concerne à vacinação, o Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) determinou a suspensão da fabricação e venda da vacina contra leishmaniose, a Leish-Tec. Após

fiscalização realizada entre os dias 08 e 11 de maio constatar desvio de conformidade do produto que pode ocasionar falta de eficácia da vacina, gerando risco à saúde animal e saúde humana, foi determinado o recolhimento de oito lotes. A empresa fabricante já iniciou o recolhimento do referido produto veterinário (33).

É importante ressaltar que este protocolo de diagnóstico da LVC (que é a utilização do TR-DPP® para triagem não deixa de ter sua relevância, uma vez que abriu novas perspectivas para o controle da doença, ao agilizar o diagnóstico, possibilitando maior rapidez na retirada dos cães sororreagentes do ambiente. Além disso, trouxe para as equipes de campo, um instrumento de trabalho na forma de um teste diagnóstico mais preciso, específico e confiável, possibilitando maior credibilidade para a população, visto que, pode ser realizado na frente do proprietário do cão. A transparência e a confiabilidade deste diagnóstico reforçam o trabalho das equipes de campo e as políticas de controle da LVC (34).

CONCLUSÃO

Os resultados da comparação realizada no presente estudo demonstram que o teste rápido pode ser usado como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico e controle da leishmaniose visceral canina em Salinas, Norte de Minas Gerais, necessitando de confirmação por testes mais sensíveis e específicos para a correta tomada de decisões acerca das ações direcionadas ao enfrentamento da LVC. É importante ressaltar que a resposta dos cães aos testes sorológicos ELISA e TR-DPP® diferem de acordo com a situação epidemiológica da região de onde provém, sendo de extrema importância as ações de educação em saúde relacionadas a triagem de amostras da LVC, para que o serviço seja executado de forma correta.

REFERÊNCIAS

1. Anversa L, Montanholi RJD, Sabino DL. Avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral. Rev Inst Adolfo Lutz [Internet]. 2016 [citado 10 Ago 2022];75:1685. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1685.pdf
2. Galvão ACA. Diagnóstico de situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina em Rio Verde - GO [tese] [Internet]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2016 [citado 20 Abr 2022]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/136275>
3. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):951-8. doi: 10.1128/cdli.9.5.951-958.2002.
4. Guilloux AGA. Monitoramento da população de cães errantes na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2016 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-29092016-123219/pt-br.php>
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014 [citado 6 Ago 2021]. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf

6. Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 01/2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2011 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: https://crmvmms.org.br/wp-content/uploads/2019/10/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf
7. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GGA, Moreira ND, et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. PLoS One. 2014;9(3):e91009. doi: 10.1371/journal.pone.0091009.
8. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;106(1):54-9. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.001.
9. Fernandes MA. Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2016 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-09082017-084543/pt-br.php>
10. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA Bol Epidemiol Paul [Internet]. 2009 [citado 13 Ago 2022];6(67):13-23. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S18064272200900070002&lng=pt&nrm=iso
11. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. Epidemiol Infect. 2017;145(12):2436-44. doi: 10.1017 / S0950268817001443.
12. Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Rev Bras Cienc Farm [Internet]. 2004 [citado 31 Jul 2023];40(2):139-49. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322004000200003&script=sci_abstract&tlng=pt
13. Von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016;32(6):S0102-311X2016000600401. doi: 10.1590/0102-311X00087415.
14. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america: a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):e584. doi: 10.1371/journal.pntd.0000584.
15. Machado CJS, Silva EG, Vilani RM. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. Saude Soc. 2016;25(1):247-58. doi: 10.1590/S0104-12902016146918.

16. Silva STP, Marques LFV, Lamounier KCC, Castro JM, Borja-Cabrera GP. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. *Rev Bioet Derecho* [Internet]. 2017 [citado 14 Ago 2022];39:135-51. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872017000100009&lng=es
17. Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? *Cad Saude Publica*. 2016;32(6):eED010616. doi: 10.1590/0102-311X00ED010616.
18. Brasileish. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina [Internet]. Belo Horizonte: Brasileish; 2018 [citado 31 Jul 2023]. Disponível em: <https://www.brasileish.com.br/diretrizes.html>
19. Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. Leishmaniose permanece como doença infectocontagiosa de grande impacto [Internet]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2022 [citado 30 Jul 2023]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/leishmaniose-permanece-como-doenca-infectocontagiosa-de-grande-impacto>
20. Laurenti MD, Leandro MVS Jr, Tomokane TY, De Lucca HLR, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014;205(3-4):444-50. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.002.
21. Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health*. 2015;20(3):334-52. doi: 10.1111 / tmi.12429.
22. Queiroz EM Jr. Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação] [Internet]. Fortaleza: Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará; 2011 [citado 5 Jul 2022]. Disponível em: <https://siduece.uece.br/siduece/trabalhoAcademicoPublico.jsf?id=70140>
23. Almeida Filho NA, Rouquayrol MZ. Introdução à epidemiologia. 3a ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002.
24. Medronho RA, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. Epidemiologia. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2009.
25. Silva RBS, Mendes RS, Santana VL, Souza HC, Ramos CPS, Souza AP, et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq Vet Bras*. 2016;36(7):625-9. doi: 10.1590/S0100-736X2016000700011.
26. Hirschmann LC, Brod CS, Radin J, Simon CF, Recuero ALC. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. *Rev Patol Trop*. 2015;44(1):33-44. doi: 10.5216/rpt.v44i1.34799.
27. Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(9):568-74. doi: 10.1093/trstmh/tru109.

28. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol.* 2006;137(1-2):11-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.020.
29. Pinheiro PHC, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FAL, Katz S, Barbiéri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;162(1-2):32-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.011.
30. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2012;3(2):47-57. doi: [10.5123/S2176-62232012000200007](https://doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007).
31. Bastos TSA, Madrid DMC, Linhares GFC. Aspectos gerais da leishmaniose visceral. *Enciclopedia Biosfera [Internet].* 2015 [citado 31 Jul 2023];11(22):293-318. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/agrarias/Aspectos%20gerais%20da%20leishmaniose.pdf>
32. Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS. Trata-se da proposta de incorporação das coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) para o controle da leishmaniose visceral em municípios prioritários [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021 [citado 30 Jul 2023]. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/sei_ms-nota-tecnica-n-5_leishpdf.pdf
33. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose [Internet]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2023 [citado 31 Jul 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>
34. Funed. Fundação Ezequiel Dias. Manual do programa de avaliação da qualidade imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina [Internet]. Belo Horizonte: Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças; 2016 [citado 10 Ago 2021]. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/Manual-PAQ-Leishmaniose-Visceral-Canina.pdf>

Recebido em: 26/06/2023

Aceito em: 18/09/2023