



AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO TR-DPP® NO DIAGNÓSTICO DE CÃES SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

Nathália Lopes Fontoura Mateus¹, Paulo Eduardo de Oliveira Monteiro³, Lucas Bezerra Taketa³, Karina Franco³, Elisa Teruya Oshiro⁴, Jucelei de Oliveira Moura Infran⁴, Alessandra Gutierrez de Oliveira⁴, Eliane Mattos Piranda^{4,5}

¹Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS. E-mail: nathaliafontouraveterinaria@gmail.com

²Aluno do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, FAMED/UFMS.

³Aluno de Iniciação Científica, UFMS.

⁴Laboratório de Parasitologia Humana, Inbio/UFMS.

⁵Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS. E-mail: eliane.piranda@ufms.br

Resumo: O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é importante no controle da leishmaniose visceral americana, zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Entretanto, o diagnóstico da LVC é uma tarefa complexa que demanda associação de testes diagnósticos. O Ministério da Saúde utiliza o teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® como forma de triagem dos animais suspeitos; assim, este trabalho objetivou avaliar o desempenho desta técnica no diagnóstico de animais sintomáticos e assintomáticos provenientes de Campo Grande/MS, Brasil, área endêmica de alta transmissão de LVA. O TR-DPP® apresentou sensibilidade e especificidade de 0,85 e 0,80 respectivamente na amostra total, com sensibilidade inferior (0,67) nos animais assintomáticos e valores preditivos negativos (0,89) semelhantes entre os grupos avaliados. Estes resultados fundamentam a utilização da técnica como método de triagem no diagnóstico da LVC.

Palavras-Chave: Campo Grande, escore clínico, leishmaniose visceral canina, teste imunocromatográfico

EVALUATION OF TR-DPP® PERFORMANCE IN THE DIAGNOSIS OF SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania infantum*

Abstract: The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is important for the control of american visceral leishmaniasis (AVL), a zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum*. However, CVL diagnosis is a complex task that requires the association of diagnostic tools. The Ministry of Health uses the rapid immunochromatographic test TR-DPP® as a screening method for suspect animals; therefore, this study aimed to evaluate the performance of this technique in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic animals of Campo Grande/MS, Brazil, an endemic area of high transmission of AVL. TR-DPP® showed sensitivity and specificity of 0.85 and 0.80 respectively in general, with lower sensitivity (0.67) in asymptomatic animals and equal negative predictive values (0.89) among the studied groups. These results support the use of this technique as a screening method in the diagnosis of LVC.

Keywords: Campo Grande, clinical score, canine visceral leishmaniasis, immunochromatographic test

Introdução

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma enfermidade reemergente causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum*, transmitido durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) (Grimaldi & Tesh, 1993). Os cães ocupam um papel importante no ciclo epidemiológico desta enfermidade, sendo considerados o principal reservatório urbano do parasita devido ao elevado parasitismo cutâneo, mesmo quando assintomáticos (Laurenti et al., 2014).

Visto que a enzootia canina usualmente precede os casos humanos, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) constitui uma ferramenta importante no controle desta antropozoonose, podendo ser utilizado como um possível marcador de transmissão e (re)emergência da LVA. No Brasil, o Ministério da Saúde utiliza dois testes sorológicos para o diagnóstico da LVC, o teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform – TR-DPP® (Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) como forma de triagem dos animais suspeitos, constituído por uma fusão dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39. Já a reação de imunoadsorção enzimática (ELISA - Bio-Manguinhos/ Fiocruz/ Brasil) é tida como método confirmatório, o qual utiliza antígenos brutos solúveis de *L. major-like* (BRASIL, 2011). Desta maneira, o presente trabalho visou avaliar o desempenho do TR-DPP® no diagnóstico de



animais sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania* sp., utilizando como padrão ouro o exame parasitológico direto.

Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o protocolo número 645/2014. Foram coletadas 203 amostras provenientes de cães maiores que quatro meses de idade, cujos proprietários assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, atendidos no Hospital Veterinário da UFMS e em atendimentos particulares entre 2016 e 2017, no município de Campo Grande, localidade endêmica e de alta transmissão de LVA.

Todos os cães foram examinados clinicamente e classificados segundo Silva et al. (2017) com algumas modificações. Um conjunto de 15 diferentes sinais clínicos foram registrados para classificação dos cães conforme a presença ou gravidade dos sinais. De acordo com o escore total dos animais, estes foram classificados em assintomáticos (zero a três pontos) ou sintomáticos (mais de três pontos). Os pontos atribuídos a cada sinal clínico foram: a) sinais sistêmicos: estado nutricional: normal (0), magro (1), caquético (2); linfonodos: normais (0), um par aumentado (1), mais de um par aumentado (2); coloração das mucosas: normais (0), pálidas (1), congestionadas (2); sangramento: ausência (0), presença (1); b) sinais cutâneos: pelagem: boa (0), regular (1), ruim/opaca (2); lesão do focinho/orelha/lábio: ausência (0), presença (1), úlceras (2); unhas: normais (0), onicogribose (1); dermatite esfoliativa: ausência (0), localizada (1), generalizada (2); despigmentação do focinho/lábio: ausência (0), presença (1); alopecia: ausência (0), presença localizada (1), presença generalizada (2); c) sinais oculares: blefarite: ausência (0), presença (1); secreção ocular: ausência (0), serosa (1), mucopurulenta (2).

Cada animal teve 10mL de sangue periférico coletado por meio de venopunção jugular; o soro obtido dos indivíduos foi utilizado para a realização do teste rápido TR-DPP®, conforme instruções do fabricante. Foi realizado também punção aspirativa por agulha fina em linfonodo poplíteo ou submandibular, para a confecção de duas lâminas de esfregaço de aspirado de linfonodo, as quais foram fixadas com álcool metílico, coradas com Giemsa e submetidas à visualização por meio de microscopia de campo claro com objetiva de 100x para realização do diagnóstico parasitológico direto por meio da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp..

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, área sob a curva ROC e índice *Kappa* foram realizados com o auxílio do software MedCalc.

Resultados e Discussão

Do total de cães avaliados, o teste sorológico TR-DPP® obteve 45,32% de positividade, enquanto o exame parasitológico direto identificou apenas 38,92% dos animais como positivos. O diagnóstico parasitológico direto apresenta 100% de especificidade e é realizado observando-se formas amastigotas do parasita *Leishmania spp.* em algum tecido do animal (Gontijo & Mello, 2004). Apesar de ser considerado um método definitivo e padrão ouro; o desempenho inferior desta técnica poder ser explicado por sua baixa sensibilidade devido à distribuição dos parasitas nos tecidos não ser homogênea mesmo em cães sintomáticos e por diferir conforme a evolução da doença no animal. Além disso, amostras de linfonodo apresentam sensibilidade entre 40 e 50% para o exame direto, valores inferiores a outros tecidos como baço e sangue medular (Gontijo & Mello, 2004).

Todavia, o teste de triagem preconizado pelo Ministério da Saúde falhou em identificar 12 animais positivos para LVC, sendo sete destes assintomáticos, o que demonstra a ocorrência de resultados falsos negativos e, consequentemente, a manutenção de animais infectados no ambiente, os quais podem atuar como fonte de infecção para o vetor e contribuir para dispersão dos casos humanos e caninos de LVA (Laurenti et al., 2014). Esta falha pode ser justificada pela sensibilidade reduzida do TR-DPP® em detectar animais assintomáticos (Tabela 1).

Tabela 1. Desempenho do TR-DPP® no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães de Campo Grande/MS (n=203), considerando o parasitológico direto como padrão ouro.



Classificação	S	E	VPP IC95%	VPN IC95%	AUC IC95%
Sintomáticos	0,91	0,71	0,77	0,89	0,81
Assintomáticos	0,67	0,87	0,61	0,89	0,77
Total	0,85	0,80	0,73	0,89	0,82

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; AUC: *area under curve* (área sob a curva); IC: intervalo de confiança

A análise geral dos animais testados demonstra elevados valores de sensibilidade e especificidade para o TR-DPP®, corroborando com os valores encontrados por Laurenti et al. (2014), os quais relataram desempenho semelhante entre esta técnica e o ELISA (Biomanguinhos). Além disso, o TR-DPP® apresentou concordância forte ($kappa=0,628$; $p<0,0001$) (Landis & Koch, 1977) com a técnica padrão ouro, e manteve valores preditivos negativos iguais entre os grupos assintomáticos e sintomáticos, reforçando sua capacidade de detectar os animais verdadeiramente negativos, característica desejada em um teste diagnóstico de triagem.

Conclusões

Apesar do teste TR-DPP® ter desempenho inferior nas amostras assintomáticas, sua alta sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo, aliadas à praticidade da realização do teste a campo fundamentam a utilização do mesmo como método de triagem para o diagnóstico da LVC.

Literatura Citada

- BRASIL, Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública). Brasília. Ministério da Saúde, 2011.
- 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.
- GRIMALDI, J. R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v.36, p. 230-250, 1993.
- 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.; JUNIOR, M. V. S. L.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. L. R.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M. DA MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 2015, p. 444-450, 2014.
- SILVA, K. R.; MENDONÇA, V. R. R.; SILVA, K. M.; NASCIMENTO, L. F. M.; MENDES-SOUSA, A. F.; de PINHO, F. A.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. M. P.; CRUZ, M. S. P. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n.1, p. 53-62, 2017.