

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

EDVAR YURI PACHECO SCHUBACH

**AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE CÃES SORONEGATIVOS E
SORODISCORDANTES PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO DISTRITO
FEDERAL**

RIO DE JANEIRO

2020

EDVAR YURI PACHECO SCHUBACH

**AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE CÃES SORONEGATIVOS E
SORODISCORDANTES PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO DISTRITO
FEDERAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo e Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach

Rio de Janeiro

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Schubach, Edvar Yuri Pacheco.

Avaliação da evolução sorológica de cães soronegativos e sorodiscordantes para leishmaniose visceral no Distrito Federal / Edvar Yuri Pacheco Schubach. - Rio de Janeiro, 2020.

41 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientador: Fabiano Borges Figueiredo.

Co-orientador: Armando de Oliveira Schubach.

Bibliografia: f. 34-40

1. Cães. 2. Leishmaniose visceral. 3. Diagnóstico. 4. Leishmania infantum. I. Título.

EDVAR YURI PACHECO SCHUBACH

AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE CÃES SORONEGATIVOS E SORODISCORDANTES PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO DISTRITO FEDERAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro Celio de Almeida Marzochi (Presidente)
Doutor em Parasitologia Aplicada
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Vinícius Silva Belo
Doutor em Epidemiologia em Saúde Pública
Universidade Federal de São João Del Rei

Prof.^a. Dra. Monique Paiva de Campos
Doutora em Pesquisa Clínica das Doenças Infecciosas
Instituto Carlos Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel
Doutora em Medicina
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a. Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião (Revisora)
Doutora em Ciências
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha existência;

À minha esposa e filhos por estarem sempre ao meu lado;

Aos meus pais, sogros e familiares por todo carinho;

Aos amigos por acreditarem em mim;

Ao Prof. Dr. Laurício Monteiro Cruz por todo apoio;

A todos os amigos da Gerência de Vigilância de Zoonoses do DF por terem coletados as informações;

A Vinícius Belo por ter realizado as análises estatísticas,

Aos meus orientadores Fabiano Figueiredo e Armando Schubach, por terem me aceitado como aluno e serem os meus exemplos profissionais, assim como minha mãe Tânia Pacheco.

Schubach, Edvar Yuri Pacheco. **Avaliação da evolução sorológica de cães soronegativos e sorodiscordantes para leishmaniose visceral no Distrito Federal**. Rio de Janeiro, 2020. 33f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *Leishmania infantum* nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo. No Brasil, o Ministério da Saúde considera que, para reduzir a transmissão da doença, uma elevada proporção de cães infectados deve ser removida imediatamente após sua identificação. Atualmente, para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina são utilizados o teste imunocromatográfico ou “teste rápido” (TR) como triagem e o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) como exame confirmatório. Quando o resultado do TR é não reagente, o cão soronegativo é considerado não infectado. Quando o resultado TR e o ELISA são reagentes, o cão soropositivo é considerado infectado. Quando o resultado do TR é reagente e ELISA é não reagente, o cão é considerado não infectado para o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Entretanto, é possível que esses cães, classificados como sorodiscordantes no estudo, sejam reservatórios potenciais mantidos no ambiente. Segundo dados da Gerência de Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal - GVAZ, de 2018 a 2019, dos 5.467 exames realizados, 308 (5,6%) dos exames foram sorodiscordantes: dos 1.007 exames reagentes no TR, 30,6% foram não reagentes no ELISA e classificados como não infectados. Para avaliar a importância epidemiológica de cães sorodiscordantes mantidos no ambiente, foi realizado um estudo com o banco de dados da Unidade de Vigilância de Zoonoses do Distrito Federal (GVAZ), comparando a evolução sorológica de cães inicialmente soronegativos e sorodiscordantes que tiveram seu primeiro exame realizado no período de 01 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2019 e exames subsequentes realizados até 21 de maio de 2020. Os cães sorodiscordantes apresentaram 7,8 vezes mais chances de converter para soropositivos, além de converterem em menor período de tempo que cães soronegativos.

Palavras-chave: 1. Cães 2. Leishmaniose visceral 3. Diagnóstico 4. *Leishmania infantum*

Schubach, Edvar Yuri Pacheco. **Evaluation of serological evolution of seronegative e serodiscordant dogs for visceral leishmaniasis in the Brazilian Federal District.** Rio de Janeiro, 2020. 33f. Tese PhD [Science Thesis in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis is found in areas of transmission of *Leishmania infantum* in the Americas, Middle East, Central Asia, China e the Mediterranean. In Brazil, to reduce the transmission of the disease, a high proportion of infected dogs must be immediately removed after their identification according to the Brazilian Ministry of Health. Currently, for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, the immunochromatographic test or “rapid test” (TR) is used as a screening and the immunoenzymatic assay method (ELISA) as a confirmatory test. When the TR result is non-reactive, the seronegative dog is considered uninfected. When the TR and the ELISA results are reactive, the seropositive dog is considered infected. When the TR result is reactive e ELISA is non-reactive, the dog is considered uninfected for the Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Program. However, it is possible that these dogs, classified as serodiscordants in the study, are potential reservoirs maintained in the environment. According to data from the Zoonoses Surveillance Management of the Federal District - GVAZ, from 2018 to 2019, of the 5,467 exams performed, 308 (5.6%) of the exams were serodiscordant: of the 1,007 reagent tests in the TR, 30.6% were non-reactive in the ELISA and classified as uninfected. To assess the epidemiological importance of serodiscordant dogs kept in the environment, a study was conducted using the database of GVAZ, comparing the serological evolution of initially seronegative and serodiscordant dogs that had their first exam performed in the period from January 1, 2014 to December 31, 2019 and subsequent exams carried out until May 21, 2020. Serodiscordant dogs were 7.8 times more likely to convert to seropositive, besides converting in a shorter period of time than seronegative dogs.

Keywords: 1. Dogs 2. Visceral leishmaniasis 3. Diagnosis 4. *Leishmania infantum*

LISTA DE SÍMBOLOS

CEUA/ Fiocruz - Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz

DF – Distrito Federal

DPP - Teste Imunocromatográfico Rápido de Plataforma de Duplo Percurso (“Dual Path Platform”)

ELISA - Reação de ensaio imunoenzimático

GVAZ - Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MS – Ministério da Saúde

PVCLV – Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RA – Região administrativa

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SRD – Sem raça definida

TR – Teste rápido

UVZ – Unidade de Vigilância de Zoonoses

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 EPIDEMIOLOGIA	9
1.2 MEDIDAS DE CONTROLE	10
1.3 DIAGNÓSTICO	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO GERAL	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 LOCAL DE ESTUDO	16
4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	16
4.3 DESENHO DO ESTUDO	16
4.4 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DOS CÃES	18
4.5 ESTRATÉGIA DE ENTRADA DE CÃES NA GVAZ	18
4.6 SOROLOGIA	18
4.6.1 Teste imunocromatográfico rápido – TR	19
4.6.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	19
4.7 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	20
4.7.1 Inclusão	20
4.7.2 Exclusão	20
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	21
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidos através do repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados. Existem duas doenças distintas, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar, mais grave e com alta letalidade em pacientes não tratados, e a leishmaniose tegumentar (LT), mais branda e cuja forma cutânea pode regredir espontaneamente. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram entre 700 mil e um milhão de novos casos a cada ano, com 26 mil a 65 mil mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

A transmissão da LV ocorre de duas formas: antroponótica e zoonótica. A transmissão antroponótica ocorre quando o flebotomíneo faz o repasto sanguíneo em uma pessoa infectada, adquire a infecção e transmite para outra pessoa. Essa forma de transmissão ocorre principalmente na Índia e Leste da África. A transmissão zoonótica ocorre quando o flebotomíneo adquire a infecção de um animal infectado e transmite para uma pessoa. Essa forma de transmissão ocorre principalmente nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

Na América Latina, a LV é causada por *L. infantum* e habitualmente transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. O ciclo para manutenção de *L. infantum* envolve tanto populações de animais silvestres (raposas, gambás e roedores) quanto de cães domésticos (AFONSO *et al.*, 2012; CARRANZA-TAMAYO; WERNECK; ROMERO, 2016; LAINSON; SHAW; LINS, 1969; NAVEA-PÉREZ *et al.*, 2015; QUINNELL, R J; COURTENAY, 2009; SCHALLIG *et al.*, 2007). No Brasil, a LV é um problema de saúde pública cada vez maior devido à elevada prevalência e expansão para novos territórios (MS, 2014). O cão doméstico é considerado o principal reservatório da doença urbana, com importante papel em sua epidemiologia (BANETH *et al.*, 2008; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; MS, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A prevalência de infecção canina está associada com aumento de risco para infecção em seres humanos (BELO *et al.*, 2013; COSTA, DANIELLE NUNES CARNEIRO CASTRO *et al.*, 2018; MARCONDES; DAY, 2019; MS, 2014;

ROCHA, M. A.N. *et al.*, 2018; ROCHA, MARÍLIA FONSECA *et al.*, 2020; WERNECK *et al.*, 2007).

1.2 MEDIDAS DE CONTROLE

No Brasil, as medidas de controle usadas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) estão focadas na busca ativa e tratamento de pacientes, educação em saúde, diagnóstico e eutanásia dos cães infectados, além de dedetização de domicílios e canis (LACERDA, 1994; MS, 2014). Para que o controle seja efetivo, uma elevada proporção de cães infectados deve ser removida imediatamente após detecção (COURTENAY *et al.*, 2002; QUINNELL, R J *et al.*, 1997). Assim, o estudo de Costa *et al.* (2013) sugere que, dependendo da intensidade da transmissão canina, aplicando os métodos citados de forma contínua, juntamente com remoção dos cães infectados em até quatro meses após diagnosticados, pode-se reduzir com relevância a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) ao longo do tempo e, conseqüentemente, reduzir a infecção em seres humanos.

Outras formas de prevenção e controle são o tratamento, vacinação e uso de coleiras impregnadas com inseticida. O tratamento é controverso, pois apesar do cão apresentar melhora clínica, não apresenta cura parasitológica, permanecendo com potencial para infectar o vetor e perpetuar o ciclo da doença (REGUERA *et al.*, 2016; TRAVI, BRUNO L. *et al.*, 2018). A vacinação como medida de controle coletiva não é utilizada pelo PVCLV devido à falta de evidências científicas sobre sua eficácia na redução da incidência da doença em cães e seres humanos (MARCONDES; DAY, 2019; TRAVI, BRUNO L., 2014). Uma estratégia que apresentou bons resultados para redução da prevalência canina e com impacto na incidência humana foi a utilização de coleira impregnada com inseticida em cães (KAZIMOTO *et al.*, 2018; SEVÁ *et al.*, 2016). Em 2020, o Ministério da Saúde (MS) adquiriu e começará a implantar o uso dessas coleiras em áreas prioritárias em 2021, porém, é necessário tempo para saber como essa ferramenta irá funcionar no dia-a-dia dos serviços e qual será o impacto real na incidência da leishmaniose visceral humana (LVH).

Na prática, o PVCLV não funciona conforme recomendado na maioria dos municípios brasileiros. Isso ocorre pela falta de testes precisos para identificar infecção canina; a rápida substituição de cães infectados por uma nova população de cães suscetíveis que são rapidamente infectados em áreas altamente endêmicas; o longo período de tempo entre a identificação de um cão soropositivo e sua remoção do meio ambiente; além do alto custo de manutenção de um programa que exige vigilância constante e pessoal bem treinado (COSTA, DANIELLE NUNES CARNEIRO CASTRO *et al.*, 2020; DANTAS-TORRES *et al.*, 2019; DE SOUSA-PAULA *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2008; QUINNELL, R J; COURTENAY, 2009; ROMERO; BOELAERT, 2010).

1.3 DIAGNÓSTICO

Uma limitação do PVCLV é o diagnóstico de cães, que pode ser realizado por métodos parasitológicos, moleculares e sorológicos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). O diagnóstico parasitológico é considerado padrão ouro, por sua elevada especificidade (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Entretanto, a baixa sensibilidade, a demora para liberação do resultado a depender da técnica, a necessidade de experiência do microscopista, além da necessidade de aspirado de medula óssea ou de gânglio por médico veterinário, impedem que o exame direto seja utilizado de forma corriqueira. Os diagnósticos moleculares apesar das elevadas sensibilidades e especificidades não são adotados como prática dos serviços por não haver padronização e cada laboratório possuir um protocolo diferente, pelo risco de resultado falso positivo por contaminação, elevado custo e necessidade de estrutura laboratorial complexa (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Conseqüentemente, o diagnóstico sorológico é adotado pelo PVCLV para uso em inquéritos sorológicos por sua rapidez, simplicidade, praticidade, necessidade de pequena amostra de sangue total, soro ou plasma, além de exigir estrutura laboratorial de menor complexidade ou nem exigir estrutura laboratorial, quando se trata de teste imunocromatográfico, também conhecido como “teste rápido” (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; MS, 2011, 2014).

A soroprevalência de LVC em áreas endêmicas do Brasil varia de 3,1% a 36,0%, dependendo da região, da população avaliada, do ano e do método sorológico empregado (ASHFORD *et al.*, 1998; BELO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2010). O desempenho dos testes varia conforme os sinais clínicos. A soropositividade varia de 88 a 100% nos cães com sinais clínicos e de 30 a 66% nos cães infectados sem sinais clínicos (MIRÓ *et al.*, 2008). Os cães sem sinais clínicos representam de 25% a 45% dos infectados (OLIVA *et al.*, 2006; SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2019). O estudo de Laurenti *et al.* (2013) sugere a necessidade de métodos diagnósticos mais acurados (com elevada sensibilidade e especificidade) para detectar precocemente o maior número de cães infectados no menor tempo possível (COURTENAY *et al.*, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

Um cão com LV pode ou não apresentar sinais clínicos, porém não há consenso sobre a relevância exata de cada apresentação clínica no ciclo de transmissão do parasita. Algumas evidências sugerem que a maioria dos eventos de transmissão para vetores resulta de uma pequena proporção de cães infectados com cargas parasitárias muito elevadas na pele e acometidos por doença grave (COURTENAY *et al.*, 2002, 2014; TRAVI, B. L. *et al.*, 2001). Por outro lado, cães assintomáticos também podem ser altamente infecciosos e ter participação na manutenção e disseminação do parasita em áreas endêmicas. Laurenti *et al.* (2013) observaram que a severidade clínica nos cães está inversamente correlacionada com as taxas de infectividade no vetor, ou seja, quanto menor a quantidade de sinais clínicos maior a probabilidade do flebotômíneo ficar infectado. Devido a tais resultados contraditórios, é prudente considerar que tanto cães sintomáticos quanto assintomáticos possam ser infectantes para os vetores. Portanto, até que marcadores de infecciosidade mais específicos e sensíveis estejam disponíveis, cães infectados sintomáticos e assintomáticos devem ser considerados igualmente ao se propor medidas de controle (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Em dezembro de 2011, o PVCLV substituiu o protocolo de diagnóstico sorológico em uso (reação de ensaio imunoenzimático - ELISA - como triagem, e exame confirmatório por reação de imunofluorescência indireta - RIFI) por um novo protocolo composto por teste rápido (TR) como triagem e ELISA como exame confirmatório (MS, 2011). O protocolo antigo foi alterado, pois demandava estrutura laboratorial complexa, pessoal altamente qualificado e logística para o transporte das amostras de municípios com baixa infraestrutura para municípios com melhor

infraestrutura laboratorial. Essa mudança reduziu o número de resultados falso-positivos, aprimorou o diagnóstico (FRAGA *et al.*, 2016), aumentou a capilaridade do diagnóstico, diminuiu o quantitativo de amostras transportadas, facilitou a logística, agilizou o tempo para liberação dos resultados e ampliou as ações de vigilância e controle.

Outros estudos referem que cães infectados, sem sinais clínicos, tendem a apresentar resultado sorológico não reagente, o que permitiria que tais animais permanecessem no ambiente (QUINNELL, RUPERT J *et al.*, 2013; SCHUBACH; FIGUEIREDO; ROMERO, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Apesar dos avanços, o novo protocolo apresenta algumas limitações para identificar cães nessa situação. Um cão é considerado infectado quando o TR é reagente e o ELISA feito subsequentemente para confirmação também é reagente. Se o TR é não reagente, o cão é considerado não infectado e nenhum exame confirmatório é requerido (MS, 2011). Com certa frequência, observa-se TR reagente e ELISA não reagente, e esses cães sorodiscordantes também são considerados não infectados. Em análise dos resultados sorológicos para LVC do banco de dados da Secretaria de Saúde do Distrito Federal - DF, entre 2018 a 2019, de um total de 5.467 exames, 308 (5,6%) foram sorodiscordantes. Entretanto, esses 308 exames correspondem a 30,6% dos 1.007 exames reagentes no TR, o que indica que a sorodiscordância entre os exames, dado que o TR esteja reagente, seja um fenômeno importante. É possível que parte desses cães estejam infectados por *L. infantum* e que, conseqüentemente, sejam reservatórios potenciais mantidos no ambiente.

2. JUSTIFICATIVA

O protocolo diagnóstico para LVC foi alterado pelo MS em 2011. Passados nove anos de sua implementação, com base na experiência de diferentes Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZ), a proporção de resultados discordantes entre o TR e o ELISA promove dúvida sobre a pertinência da permanência desses cães no ambiente. Não se sabe qual a participação desses animais no ciclo de transmissão, pois é possível que tenham maior probabilidade de estarem ou de se tornarem infectados.

Para responder a essa questão, no presente estudo, comparou-se a evolução sorológica de cães soronegativos e sorodiscordantes incluídos no banco de dados da UVZ do DF, que tiveram seu primeiro exame realizado no período de 01 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2019 e exames subsequentes realizados até 21 de maio de 2020, a fim de verificar a existência ou não de evidências que indiquem a sua importância epidemiológica.

3. OBJETIVO GERAL

Comparar a evolução sorológica de cães soronegativos e sorodiscordantes para LV no DF, que tiveram seu primeiro exame realizado no período de 01 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2019 e exames subsequentes realizados até 21 de maio de 2020.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O DF está localizado na Região Centro-Oeste do Brasil, possui uma população aproximada de 2.570.160 habitantes e uma área territorial de 5.760,783 km². Possui um sistema administrativo descentralizado, composto por regiões administrativas (RA) conforme disposto em Lei Federal nº 4545/1964.

Neste estudo foram incluídas RA com transmissão canina e humana de LV, de acordo com os critérios de área de transmissão do PVCLV (MS, 2014).

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população do estudo foi composta por cães com dois ou mais resultados de exames sorológicos realizados pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal - GVAZ, unidade de vigilância de zoonoses, que tiveram seu primeiro exame realizado no período de 01 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2019 e exames subsequentes realizados até 21 de maio de 2020.

Segundo o censo demográfico do IBGE de 2010, o DF possui uma população de 2.570.160 habitantes. A Organização Mundial de Saúde estima que a população canina varia de 10 a 20% da população humana. No DF, a GVAZ estima que esse percentual seja de 12%. Dessa forma, estimou-se uma população de 308.419 cães.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional longitudinal retrospectivo para avaliar a evolução dos resultados sorológicos para LV de cães com resultado laboratorial realizado pela GVAZ. O diagnóstico sorológico utilizado pela GVAZ foi TR como

triagem e ELISA como método confirmatório. Os insumos diagnósticos utilizados foram, respectivamente, o Teste Imunocromatográfico Rápido de Plataforma de Duplo Percurso (“Dual Path Platform”, DPP) e o Ensaio Imunoenzimático, ambos fabricados pelo laboratório Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz.

Foram considerados **soronegativos** os cães com TR não reagente. Conforme recomendações do PVCLV, esses cães não realizaram ELISA. Foram considerados **soropositivos** os cães com TR e ELISA reagentes. Para esse estudo, os cães com TR reagente e ELISA não reagente foram considerados **sorodiscordantes**. Os cães selecionados foram distribuídos em dois grupos: um grupo controle composto por cães soronegativos e um grupo caso composto por cães sorodiscordantes. Os grupos foram avaliados de duas maneiras: na primeira, foram separados de acordo com o resultado inicial, sendo observados a cada exame até o último resultado disponível no banco de dados e permaneceram no mesmo grupo até o fim. Os cães foram avaliados comparando o resultado do primeiro exame e do segundo exame, do primeiro e do terceiro exame, e assim por diante. Na segunda maneira, os cães foram agrupados em sorodiscordantes e soronegativos conforme a evolução sorológica: a cada resultado de exame os cães mudavam de grupo, e um mesmo cão podia compor o grupo sorodiscordante e o grupo soronegativo em épocas diferentes. Por exemplo, um cão com primeiro exame soronegativo, segundo exame sorodiscordante e terceiro exame soropositivo, foi alocado no primeiro momento no grupo soronegativo e no segundo momento foi alocado no grupo sorodiscordante. Em ambas as formas de agrupamento, os cães soropositivos foram retirados do estudo por obterem o desfecho final. Cada resultado sorológico foi comparado com o resultado subsequente para verificar possíveis alterações de *status* descritas a seguir:

a) Grupo Controle (soronegativo):

- Permanecer soronegativo;
- Converter para sorodiscordante;
- Converter para soropositivo.

b) Grupo Caso (sorodiscordante):

- Converter para soronegativo;
- Permanecer sorodiscordante;
- Converter para soropositivo.

As variáveis sexo, idade, tamanho de pelagem e raça foram avaliadas para verificar possíveis associações e fatores de risco.

4.4 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DOS CÃES

A partir do banco de dados da GVAZ, foram selecionados os animais com dois ou mais resultados sorológicos com pelo menos 21 dias de intervalo. Esses foram separados em grupo controle, composto por cães com resultado soronegativo, e grupo caso, composto por cães com resultado sorodiscordante.

4.5 ESTRATÉGIA DE ENTRADA DE CÃES NA GVAZ

As amostras de sangue para realização do diagnóstico de LVC na GVAZ foram coletadas a partir de busca ativa de cães em áreas endêmicas, principalmente áreas com casos humanos nos últimos 3 anos e áreas com histórico de elevada prevalência canina. Os sangues coletados foram levados ao laboratório de leishmaniose visceral canina da GVAZ para realizar TR e ELISA em amostra de soro. Outra forma de entrada dos cães ocorreu quando o tutor levou o cão para realizar diagnóstico de LVC na GVAZ. O TR foi realizado com sangue total e o resultado não reagente foi disponibilizado no momento ao tutor. Os cães com resultados TR reagente tiveram a amostra encaminhada ao laboratório de leishmaniose da GVAZ para realizar ELISA, com tempo de liberação do resultado conforme atividades de rotina do serviço.

Em ambas as formas de entrada dos cães, o sangue foi coletado por punção venosa dos membros dianteiros ou traseiros, não sendo utilizado sangue periférico de ponta de orelha.

4.6 SOROLOGIA

4.6.1 Teste imunocromatográfico rápido – TR

O TR utilizado foi o teste imunocromatográfico rápido de plataforma de duplo percurso – DPP LVC fabricado por Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz. O TR emprega uma combinação de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes para *Leishmania* K28 (é a fusão dos fragmentos K26, K39 e K9) que são ligados à fase sólida de uma membrana de nitrocelulose, para detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em sangue total, soro ou plasma. O conjunto diagnóstico é composto por uma plataforma de base plástica com dois poços que dão acesso a uma tira cada. A primeira é a condutora da amostra, sendo composta por leito de aplicação da amostra e membrana e cartão laminado (S1). A segunda tira detecta anticorpos da amostra, sendo composta por leito com conjugado, membrana de absorção residual e cartão laminado (S2). Além disso, o kit é composto também de um frasco de solução tampão, alça para coleta da amostra e lanceta. A tira S1 serve para conduzir a amostra à tira S2, onde a reação imunocromatográfica acontece. A tira S2 possui uma linha transversal com complexo antígeno-anticorpo que se liga ao conjugado formado por partículas do ouro coloidal e anticorpos da amostra, produzindo uma coloração rosada, classificando a amostra como reagente. Na ausência dessa, não se observa a coloração. As partículas que não se ligaram continuam o percurso ao longo da membrana e passam por uma área com proteína A, correndo a região de controle. Este controle serve para demonstrar que a amostra e os reagentes foram devidamente aplicados e que migraram através do dispositivo. O tampão facilita o fluxo lateral e promove a ligação dos anticorpos aos antígenos.

O TR foi realizado com amostra de sangue total ou soro sanguíneo, conforme conveniência do serviço e seguiu as instruções de realização do fabricante.

4.6.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A metodologia de Ensaio Imunoenzimático - ELISA utilizada neste estudo foi desenvolvida por Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz. Foram diluídos em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100), 5 µL dos controles fornecidos pelo

fabricante e 5 µL das amostras de soros. Foram distribuídos 100 µL em placas e incubados a 37°C por 30 minutos, seguido de seis lavagens com solução tampão. Foram adicionados em cada poço e incubados 100 µL do conjugado diluído e homogeneizado. Cem µL do substrato foram rapidamente distribuídos em todos os orifícios e incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. A reação foi bloqueada adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. A leitura e estabelecimento das densidades óticas de cada soro testado foi realizada em espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm e sem a utilização de filtro de referência (620-630 nm). A densidade ótica de cada soro foi utilizada para a construção da curva *receiver operating characteristic* (ROC). O *cut-off* foi de duas vezes a média da densidade ótica dos controles negativos presentes na placa, conforme recomendação do fabricante.

4.7 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

4.7.1 Inclusão

Foram incluídos cães:

- Com dois ou mais resultados sorológicos realizados pela GVAZ com intervalo mínimo de 21 dias;
- Classificados como soronegativos ou sorodiscordantes na primeira coleta.

4.7.2 Exclusão

Foram excluídos do estudo os cães:

- Com alguma inconsistência no banco de dados que inviabilizou as análises;

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi elaborado em planilha excel. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar as distribuições dos acontecimentos nos grupos, a fim de avaliar se as proporções observadas destes eventos mostraram ou não diferenças significativas. O teste Mann Whitney foi utilizado para comparar as idades dos animais que converteram para soropositivo. O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para avaliar distribuição no tempo até à ocorrência do desfecho final. Foram consideradas significantes as diferenças com valor de $p < 0,05$.

4.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob o protocolo 52/19.1. No entanto, houve dispensa de submissão do referido estudo, tendo em vista que este utilizou somente informações referentes aos animais provenientes de bancos de dados.

5. RESULTADOS

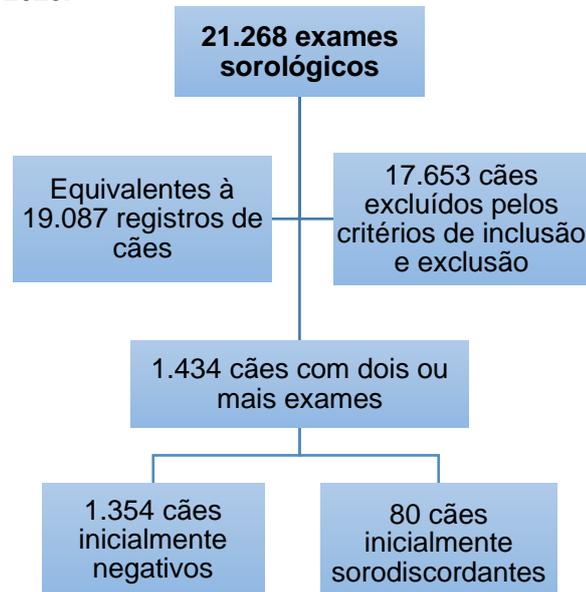
Foram analisados 21.426 registros de exames referentes ao período de 1º de janeiro de 2014 a 21 de maio de 2020. Desses, 158 foram descartados por inconsistências no preenchimento dos resultados laboratoriais, totalizando 21.268 exames. A prevalência de cães soronegativos, soropositivos e sorodiscordantes foi de 82,1%, 12,1% e 5,8% respectivamente (figura 1). Esses registros de exames equivaleram a 19.087 cães. Desses, 1.434 atenderam aos critérios de inclusão, e foram incluídos no estudo (figura 2).

Figura 1. Fluxo dos registros de cães com exames laboratoriais para leishmaniose visceral canina, incluídos no banco de dados da Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal, entre 1º de janeiro de 2014 a 21 de maio de 2020.



Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

Figura 2. Fluxo dos cães registrados com dois ou mais resultados laboratoriais para leishmaniose visceral, filtrados do banco de dados da Gerência de Vigilância Ambiental de zoonoses do Distrito Federal, utilizados para a avaliação da soroconcordância entre 1º de janeiro de 2014 a 21 de maio de 2020.



Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

Dos cães selecionados, 80 cães foram alocados no grupo sorodiscordante (grupo caso) e 1.354 cães foram alocados no grupo soronegativo (grupo controle). Do total de cães, 749 (52,2%) eram machos e 16 (1,1%) não tiveram a informação preenchida. No grupo caso, 51 (63,8%) dos cães eram machos e 29 (36,2%) fêmeas; no grupo controle 698 (51,6%) eram machos, 640 (47,2%) eram fêmeas e 16 (1,2%) não tiveram a informação preenchida. Foram classificados 794 (55,4%) cães como sem raça definida – SRD, 546 classificados com alguma raça e 94 (6,5%) não tiveram a informação preenchida. No grupo caso, 51 (63,8%) foram classificados como SRD e 29 (36,2%) classificados com alguma raça definida; no grupo controle 743 (54,9%) cães foram classificados como SRD, 517 (38,2%) foram classificados com alguma raça definida e 94 (6,9%) não tiveram a informação preenchida. Em relação ao tamanho da pelagem foram classificados 795 (55,4%) cães com pelagem curta, 292 (20,4%) cães com pelagem média, 183 (12,8%) com pelagem longa e 164 (11,4%) cães não tiveram a informação preenchida; no grupo caso, 47 (58,7%) cães foram classificados com pelagem curta, 16 (20,0%) cães com pelagem média, 7 (8,8%) cães com pelagem longa e 10 (12,5%) cães não tiveram a informação preenchida. No grupo controle, 748 (55,2%) cães foram classificados com pelagem curta, 276 (20,4%) cães com pelagem média, 176 (13,0%) cães com pelagem longa e 154 (11,4%) cães não tiveram a informação preenchida. A média de idade da amostra foi de 3 anos e 6

meses, e mediana de 3 anos; o tempo médio de seguimento no estudo foi de 385 dias e mediana de 301 dias.

A tabela 1 apresenta a evolução sorológica entre os grupos controle e caso, e o resultado do último exame realizado, considerado como desfecho final. Foi observado que 28,8% dos cães do grupo caso converteu para soropositivo, comparado com 5,3% do grupo controle. O teste de chi-quadrado obteve valor de $p < 0,0001$, indicando que o grupo caso teve maior chance de converter para soropositivo em exames posteriores quando comparados ao grupo controle.

Tabela 1 - Desfecho final dos grupos controle (inicialmente soronegativo) e caso (inicialmente sorodiscordante) em relação ao primeiro e último exame sorológico para leishmaniose visceral canina realizado pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal entre 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020.

		DESFECHO FINAL			
1º EXAME	GRUPO	SORODISCORDANTE (%)	SORONEGATIVO (%)	SOROPOSITIVO (%)	TOTAL
		SORODISCORDANTE	27 (33,8%)	30 (37,5%)	23 (28,8%)*
	SORONEGATIVO	65 (4,8%)	1.217 (89,9%)	72 (5,3%)	1.354
	TOTAL	92 (6,4%)	1.247 (87,0%)	95 (6,6%)	1.434

*Teste de McNemar's X^2 com $p < 0,0001$.

Sorodiscordante = cão com resultado do teste rápido reagente e ELISA não reagente; soronegativo = cão com resultado do teste rápido não reagente e ELISA não realizado; soropositivo = cão com resultado do teste rápido e ELISA reagente.

Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

A tabela 2 apresenta a evolução sorológica dos cães alocados nos grupos caso e controle de forma dinâmica. Observou-se que 29,0% dos cães que tiveram resultado sorodiscordante em algum exame converteram para soropositivo no exame subsequente quando comparados a 4,9% dos cães com resultado soronegativo que tiveram o mesmo desfecho. Essa diferença obteve significância no teste de qui-quadrado com valor de $p < 0,0001$.

Tabela 2 – Resultado do exame sorológico para leishmaniose visceral canina subsequente a algum exame sorodiscordante e soronegativo pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal entre 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020.

		EXAME SUBSEQUENTE			
EXAME	GRUPO	SORODISCORDANTE (%)	SORONEGATIVO (%)	SOROPOSITIVO (%)	TOTAL
		SORODISCORDANTE	30 (30,0%)	41 (41,0%)	29 (29,0%)*
	SORONEGATIVO	62 (4,6%)	1.206 (90,4%)	66 (4,9%)	1.334
	TOTAL	92 (6,4%)	1.247 (87,0%)	95 (6,6%)	1.434

*Teste de McNemar's X^2 com $p < 0,0001$.

Sorodiscordante = cão com resultado do teste rápido reagente e ELISA não reagente; soronegativo = cão com resultado do teste rápido não reagente e ELISA não realizado; soropositivo = cão com resultado do teste rápido e ELISA reagente.

Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

No comparativo entre os resultados do primeiro e segundo exames (tabela 3) entre os grupos foi observado que dos cães do grupo sorodiscordantes, 27,5% converteram para soropositivo, comparados com 4,3% dos cães do grupo soronegativo. Essa diferença obteve significância no teste de qui-quadrado com valor de $p < 0,0001$.

Ao comparar os resultados entre o primeiro e terceiro exame dos grupos, estavam disponíveis resultados de 393 cães (11 do grupo sorodiscordante e 382 do grupo soronegativo) (tabela 4). A conversão soropositiva dos grupos foi de 9,1 % e 2,6% no grupo sorodiscordante e soronegativos respectivamente. Desse exame em diante não foram realizadas comparações devido ao número reduzido de cães, não possibilitando haver diferença estatística. Alguns cães realizaram até 7 exames.

Tabela 3 - Desfecho final de exame sorológico para leishmaniose visceral canina dos grupos controle (inicialmente soronegativo) e caso (inicialmente sorodiscordante) em relação ao primeiro e segundo exames realizados pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal entre 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020.

		2º EXAME				
1º EXAME	GRUPO	SORO-DISCORDANTE (%)	SORO-NEGATIVO (%)	SORO-POSITIVO (%)	MISS (%)	TOTAL
		SORODISCORDANTE	31 (38,8%)	27 (33,8%)	22 (27,5%)*	0 (0,0%)
	SORONEGATIVO	65 (4,8%)	1.230 (90,8%)	58 (4,3%)	1 (0,1%)	1.354
	TOTAL	96 (6,7%)	1.257 (87,7%)	80 (5,6%)	1 (0,1%)	1.434

*Teste de McNemar's X^2 com $p < 0,0001$.

Sorodiscordante = cão com resultado do teste rápido reagente e ELISA não reagente; soronegativo = cão com resultado do teste rápido não reagente e ELISA não realizado; soropositivo = cão com resultado do teste rápido e ELISA reagente; miss = cão sem informação.

Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

Tabela 4 - Desfecho final do exame sorológico para leishmaniose visceral canina dos grupos controle (inicialmente soronegativo) e caso (inicialmente sorodiscordante) em relação ao primeiro e terceiro exame realizados pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020.

1º EXAME	GRUPO	3º EXAME			TOTAL
		SORODISCORDANTE (%)	SORONEGATIVO (%)	SOROPOSITIVO (%)	
	SORODISCORDANTE	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	11
	SORONEGATIVO	13 (3,4%)	359 (94,0%)	10 (2,6%)	382
	TOTAL	14	368	11	393

Sorodiscordante = cão com resultado do teste rápido reagente e ELISA não reagente; soronegativo = cão com resultado do teste rápido não reagente e ELISA não realizado; soropositivo = cão com resultado do teste rápido e ELISA reagente.

Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

O tempo para conversão dos soropositivos ocorreu de forma diferente entre os grupos (tabela 5). Dos cães que converteram para soropositivo no grupo caso, em 21,7% a soroconversão ocorreu em até 6 meses, enquanto no grupo controle, 13,9% converteram nesse mesmo período. Em até 12 meses, essa conversão ocorreu em 47,8% e 25,0% respectivamente.

Tabela 5 - Desfecho final do exame sorológico para leishmaniose visceral canina dos grupos controle (inicialmente soronegativo) e caso (inicialmente sorodiscordante) em relação ao tempo em dias acumulados dos exames realizados pela Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal entre 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020.

DESFECHO FINAL ACUMULADO							
GRUPO	SORO-DISCORDANTE	%	SORO-NEGATIVO	%	SORO-POSITIVO	%	TOTAL
SORODISCORDANTE (tempo em dias)	27		30		23		80
0-179	14	51,9%	14	46,7%	5	21,7%	33
180-359	20	74,1%	18	60,0%	11	47,8%	49
360-539	24	88,9%	24	80,0%	14	60,9%	62
540-719	25	92,6%	26	86,7%	18	78,3%	69
720-899	25	92,6%	29	96,7%	20	87,0%	74
900-1079	26	96,3%	30	100,0%	21	91,3%	77
1080-1259	26	96,3%	30	100,0%	23	100,0%	79
1260-1439	27	100,0%	30	100,0%	23	100,0%	80
SORONEGATIVO (tempo em dias)	65		1.217		72		1.354
0-179	18	27,7%	449	36,9%	10	13,9%	477
180-359	31	47,7%	709	58,3%	18	25,0%	758
360-539	48	73,8%	915	75,2%	31	43,1%	994
540-719	52	80,0%	1.041	85,5%	44	61,1%	1.137
720-899	61	93,8%	1.113	91,5%	54	75,0%	1.228
900-1079	63	96,9%	1.166	95,8%	63	87,5%	1.292
1080-1259	63	96,9%	1.178	96,8%	65	90,3%	1.306
1260-1439	63	96,9%	1.202	98,8%	71	98,6%	1.336
1440-1619	64	98,5%	1.205	99,0%	72	100,0%	1.341
1620-1799	65	100,0%	1.214	99,8%	72	100,0%	1.351
1800-1979	65	100,0%	1.217	100,0%	72	100,0%	1.354
Total Geral	92		1.247		95		1.434

Sorodiscordante = cão com resultado do teste rápido reagente e ELISA não reagente; soronegativo = cão com resultado do teste rápido não reagente e ELISA não realizado; soropositivo = cão com resultado do teste rápido e ELISA reagente.

Fonte: Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses no Distrito Federal.

A figura 3 apresenta a função de sobrevivência do período de seguimento dos indivíduos do grupo caso (sorodiscordantes em azul) e do grupo controle (soronegativos em verde), cujas curvas indicam os tempos de seguimento, os degraus indicam a conversão soropositiva e as cruzes indicam censuras (cães que não continuaram no estudo por outras causas). Os cães do grupo caso, além de terem chance maior de se tornarem positivos, o fizeram em menor tempo. O teste de Kaplan-Meier obteve valor de $p < 0,0001$, indicando que as diferenças entre os grupos apresentam significância estatística. Cães do grupo caso apresentaram 7,8 vezes mais chances de converterem para soropositivo em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Desde que o PVCLV alterou o protocolo diagnóstico da LVC em 2011 (MS, 2011), recomendando TR como triagem e ELISA como exame confirmatório, alguns estudos avaliaram a sensibilidade e a especificidade desses métodos (COURA-VITAL *et al.*, 2014; GRIMALDI *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2014; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015; SCHUBACH; FIGUEIREDO e ROMERO, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2019), estudos analisando cães sorodiscordantes foram menos comuns (BELO *et al.*, 2017; ROCHA, MARÍLIA FONSECA *et al.*, 2020).

A prevalência média de 12% de LVC diagnosticada com métodos sorológicos no DF foi diferente dos 6,2% (3,9-9,2%) encontrados por Figueiredo *et al.* (2018) utilizando exames parasitológicos. Tal diferença pode ser explicada pelas diferentes sensibilidades das técnicas utilizadas entre os estudos.

Apesar do banco de dados da GVAZ possuir 21.268 registros de exames válidos, correspondentes a 19.087 cães, foram utilizados apenas os dados de 1.434 cães que preencheram os critérios do estudo. Para cadastramento dos cães no sistema da GVAZ, foram utilizados dados de cada animal como nome, sexo, raça e cor da pelagem, além do nome do responsável, número de telefone e endereço. Caso, no momento do exame, a pessoa responsável pelo cão fornecesse dados diferentes do registrado anteriormente no sistema, seria aberto um novo número de registro de forma equivocada, podendo haver múltiplos registros para o mesmo cão. É possível, portanto, que o número de cães com dois ou mais exames no banco de dados seja maior do que o apresentado.

Outra limitação está relacionada ao número baixo de cães acompanhados ao longo do tempo. O PVCLV recomenda a realização de inquéritos sorológicos censitários anuais nas áreas endêmicas. Porém, por questões internas, a GVAZ realiza coletas de sangue pontuais em regiões que tiveram caso de LVH em anos anteriores. As dificuldades para realizar as atividades do PVCLV são várias e ocorrem em diferentes UVZ (VON ZUBEN e DONALÍSIO, 2016). Esses ciclos de coletas podem levar mais de um ano para serem realizados novamente. Considerando a dinâmica populacional de pessoas do Distrito Federal (SARDINHA, 2014), assim como a taxa de mortalidade (BENTUBO *et al.*, 2007) e reposição de cães (ANDRADE *et al.*, 2007), é possível, que ao retornar a determinada casa para realizar nova coleta,

a família tenha mudado de endereço, o cão tenha ido a óbito ou tenha sido repostado. Essas questões podem ter contribuído para justificar a diferença entre o número de cães do banco de dados da GVAZ e o número de cães selecionados para esse estudo.

Estudos anteriores (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; GRIMALDI *et al.*, 2012; SCHUBACH; FIGUEIREDO e ROMERO, 2014) demonstraram que o desempenho do TR varia conforme os sinais clínicos, com melhor acurácia em cães sintomáticos. Não podemos descartar a possibilidade de parte dos cães desse estudo terem sido levados por seus tutores à GVAZ, ou terem permitido a coleta de sangue em domicílio, devido ao cão estar com algum sinal clínico, situação que poderia não acontecer caso o cão estivesse saudável. No sistema de informação utilizado pela GVAZ é possível inserir os sinais clínicos, mas esse dado é pouco preenchido por questões operacionais. Dessa forma, é possível que possa ter havido maior número de cães com sinais clínicos em um dos grupos, ou que esse viés tenha ocorrido de forma igual em ambos os grupos.

Neste estudo, os cães do grupo caso apresentaram chance de converter para soropositivo estatisticamente maior quando comparados aos cães do grupo controle. Foi observado que o grupo caso teve conversão significativa para soropositivo em maior proporção e em menor período de tempo que o grupo controle, com *hazard ratio* de 7,8. Esse achado sugere que o comportamento da conversão seja diferente entre os grupos, com maior tendência de conversão soropositiva em cães com resultado prévio sorodiscordante. Isso reforça a hipótese de Schubach, Figueiredo e Romero (2014) que o TR poderia ter desempenho melhor do que o descrito, pois poderia ter sensibilidade mais elevada que os métodos parasitológicos utilizados como padrão ouro para a validação do TR.

O TR foi realizado por observadores diferentes a depender da forma de entrada da amostra. Quando o cão foi levado à GVAZ para realizar diagnóstico para LVC, o TR foi realizado preferencialmente pelo profissional do laboratório, mas com frequência foi realizado por outro profissional capacitado. Quando a amostra foi proveniente de inquérito sorológico, o TR foi realizado por profissional do laboratório. Grimaldi *et al.* (2012) relataram que a inspeção visual e a interpretação do teste podem ser imperfeitas, pois variam de acordo com o treinamento, a experiência, a acuidade visual e as habilidades observacionais do examinador. Pelo fato de a GVAZ utilizar observadores com experiência distintas para realizar o TR, é possível que tenha

ocorrido alguma inconsistência nos resultados dos TR e que essa possa ter interferido nos achados desse estudo.

Embora os intervalos de tempo entre os exames não tenham sido padronizados, assim como a quantidade de exames realizada por cada cão, e não tenha sido possível obter uma média ou uma mediana do tempo para soroconversão de forma confiável, a conversão soropositiva foi 1,5 vezes maior no período de 180 dias e quase duas vezes maior no grupo caso no período de até 360 dias. Belo et al. (2017) observaram que em 17 cães sorodiscordantes, 6 (35,3%) converteram após novo exame de 3 a 4 meses subsequentes, dos quais 4 apresentavam TR reagente e ELISA indeterminado, enquanto os demais eram TR reagente e ELISA não reagente. Observaram que desses cães, os que apresentaram ELISA indeterminado converteram em maior proporção quando comparados com cães ELISA não reagente. No banco de dados da GVAZ, não foi possível realizar essa análise, pois ao se registrar as amostras no sistema de informação, os exames de ELISA indeterminados são computados como não reagentes. Por se tratar de um estudo de prevalência e não de incidência da LVC, por não haver acompanhamento contínuo, os cães indeterminados que converteram para soropositivo podem ter adquirido infecção entre o intervalo de tempo de um exame e outro, e não necessariamente terem soroconvertido no ELISA por já estarem previamente infectados. Rocha et al. (2020) observaram 641 cães sorodiscordantes em intervalos de 3, 6 e 9 meses, com conversão soropositiva de 29,4%; 11,5%; e 32,4% respectivamente. A conversão soropositiva ocorreu em 219 cães ao longo de 9 meses, representando 34,2% dos sorodiscordantes. Nesse mesmo estudo, demonstraram por xenodiagnóstico que cães sorodiscordantes apresentavam capacidade de infectar o vetor de modo semelhante a cães soropositivos. Os resultados de Belo et al. (2017) e Rocha et al. (2020) sugerem que cães sorodiscordantes convertam para soropositivo em menor tempo e em maior proporção e corroboram os resultados deste estudo, no qual encontramos uma chance 7,8 vezes maior em relação aos cães soronegativos.

Recentemente, a coleira impregnada com deltametrina foi adquirida pelo Ministério da Saúde e começará a ser utilizada em alguns municípios prioritários como nova ferramenta para controle da LVC. Com a implantação dessa ferramenta, é possível que no futuro próximo haja novas recomendações no PVCLV relacionadas principalmente à questão do reservatório urbano, o cão. A depender dos resultados obtidos nessa ação, há possibilidade de se manter a recomendação pontual da

eutanásia apenas para cães sintomáticos, em estágio avançado da doença, cujos responsáveis optem por realizar o procedimento. Assim, não haverá necessidade de realizar inquéritos sorológicos censitários, e a GVAZ poderá passar a realizar inquéritos sorológicos amostrais como forma de vigilância. É possível que um único método diagnóstico passe a ser utilizado nesse novo protocolo. Caso isso ocorra, um possível candidato é o TR, por apresentar boa acurácia, praticidade, rapidez para liberar o resultado, não necessitar de estrutura laboratorial, além de demandar fácil armazenamento e transporte. Tudo isso poderá contribuir para reduzir os custos operacionais e melhorar a aceitabilidade das ações do PVCLV frente à população.

Considerando que o DF é endêmico para LV; que a GVAZ possui estrutura laboratorial limitada e recursos humanos escassos; que existe intermitência do fornecimento de kits para diagnóstico; para fins do PVCLV, em situações excepcionais visando a saúde pública, este estudo oferece ao médico veterinário do DF uma nova informação para ser considerada no manejo de cães sorodiscordantes. É sugerido que novos estudos sejam realizados para determinar mais exatamente o período de tempo de conversão soropositiva de cães sorodiscordantes. Enquanto isso, é sugerido o acompanhamento periódico desses cães com realização de TR e ELISA em intervalo de tempo de três a nove meses (BELO *et al.*, 2017; ROCHA, MARÍLIA FONSECA *et al.*, 2020).

7. CONCLUSÃO

Na avaliação da evolução sorológica de cães diagnosticados para LVC entre 1º de janeiro 2014 e 21 de maio de 2020 no município de Brasília, Distrito Federal, os cães sorodiscordantes mostraram 7,8 vezes mais chances de converter para soropositivos, além de fazerem a conversão em menor período de tempo que cães soronegativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M. M. S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J. C. et al. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Journal of tropical medicine*, v. 2012, p. 858657, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3270439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H.; NUNES, G. R. et al. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, P. B. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*. [S.l: s.n.], 2008.

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l: s.n.], 2013.

BELO, V. S.; GREGÓRIO, E. A.; TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN; E. F. et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). *Ciência Rural*, 2007.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; WERNECK, G. L.; ROMERO, G. A. S. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 119–26, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867473>>. Acesso em: 2 maio 2016.

COSTA, D. N. C. C.; CODEÇO, C. T.; SILVA, M. A. et al. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, 2013.

COSTA, D. N. C. C.; BERMUDI, P. M. M.; RODAS, L. A. C. et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. *Revista de Saude Publica*, 2018.

COSTA, D. N. C. C.; CODEÇO, C. T.; BERMUDI, P. M. M. et al. Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. *Cadernos de Saúde Pública*, 2020.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M. 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*, v. 9, n. 3, p. e91009, 7 mar. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091009>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M. et al. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 9, p. 1314–20, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12402201>>.

COURTENAY, O.; CARSON, C.; CALVO-BADO, L. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BANETH, G. et al. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.], 2019

FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B.; MADEIRA, M. F. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 11, p. e180260, 2018.

FRAGA, D. B. M.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. e0004333, 5 jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004333>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*. [S.l: s.n.], 2005.

GRIMALDI JR, G.; TEVA, A.; SANTOS, C. B. 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 1, p. 54–9, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137538>>. Acesso em: 5 maio 2016.

KAZIMOTO, T. A.; AMORA, S. S. A.; FIGUEIREDO, F. B. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2018.

LACERDA, M. M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 489–95, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476238>>.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* (l) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 63, n. 6, p. 741–745, jan. 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920369901187>>. Acesso em: 3 maio 2016.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary Parasitology*, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAURENTI, M. D.; SANTANA LEANDRO JR, M. V.; TOMOKANE, T. Y. et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, v. 205, n. 3–4, p. 444–50, 15 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257505>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

LOPES, E. G. P.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A. et al. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2010.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*. [S.l: s.n.], 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica conjunta nº 01/2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS. Esclarecimentos sobre a substituição de protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde, 2011.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.], 2008.

NAVEA-PÉREZ, H. M.; DÍAZ-SÁEZ, V.; CORPAS-LÓPEZ, V. et al. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitology research*, v. 114, n. 6, p. 2363–70, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797596>>. Acesso em: 2 maio 2016.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F.; PAULA, H. B. et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2008.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, M. G.; PAGANO, A. et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1318–1322, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the. *Pan American Health*, n. March, p. 22–26, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. Site da Organização Mundial de Saúde, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & vectors*, v. 4, p. 197, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3214158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, v. 20, n. 3, p. 334–52, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403359>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. et al. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, v. 115 (Pt 2, n. 1979, p. 143–56, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190170>>.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v. 136, n. 14, p. 1915–34, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835643>>. Acesso em: 21 abr. 2016.

QUINNELL, R. J.; CARSON, C.; REITHINGER, R. et al. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 1, p. e1992, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3542187&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 maio 2016

REGUERA, R. M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. [S.l: s.n.], 2016

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*. [S.l: s.n.], 2018

ROCHA, M. A. N.; MATOS-ROCHA, T. J.; RIBEIRO, C. M. B. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in state of alagoas, northeast, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 2018.

ROCHA, M. F.; MICHALSKY, E. M.; LARA-SILVA, F. O. et al. Dogs with divergent serology for visceral Leishmaniasis as sources of leishmania infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america- a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

SARDINHA, L. M. V. Mortalidade infantil e fatores associados à atenção à saúde : estudo caso-controle no Distrito Federal (2007-2010). 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/16396>>.

SCHALLIG, H. D. F. H.; SILVA, E. S.; MEIDE, W. F. V. D. et al. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 7, n. 3, p. 387–93, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767408>>. Acesso em: 2 maio 2016.

SCHUBACH, E. Y. P.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 108, p. 568–574, 2014.

SEVÁ, A. P.; OVALLOS, F. G.; AMAKU, M. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS ONE*, 2016.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 179–86, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054496>>. Acesso em: 5 maio 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, v. 4, p. 86, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

SOUSA-PAULA, L. C.; SILVA, L. G.; SALES, K. G. et al. Failure of the dog culling strategy in controlling human visceral leishmaniasis in Brazil: A screening coverage issue? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; VITAL, T. et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e180452, 31 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30726343>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H. et al. Canine visceral leishmaniasis in colombia: Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomedica*, 2014.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A; DANTAS-TORRES, F. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l: s.n.]. , 2018.

VON ZUBEN, A. P. B.; DONALÍSIO, M. R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian visceral Leishmaniasis control program in large cities. *Cadernos de Saude Publica*, 2016.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D.F.H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*. [S.l: s.n.]. , 2015.

WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N.; WALKER, A. M. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection*, 2007.