

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ELISA, REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E IMUNOCROMATOGRAFIA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.

Daniel Leite da Silva; Mary Marcondes Feitosa; Maurício Franco Zanette; Márcia Dalastra Laurenti; Valéria Marçal Félix de Lima; Ludmila Silva Vicente Sobrinho – Clínica Veterinária – Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia – UNESP – Campus de Araçatuba.

I - INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antroponose, também conhecida como Calazar, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* que é transmitido entre os hospedeiros vertebrados pela picada do flebotômico hematófago *Lutzomyia longipalpis*.

No Brasil, esta enfermidade é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a qual já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores. O cão possui uma grande importância na manutenção do ciclo da doença, sendo considerado o principal reservatório epidemiológico no ambiente doméstico, o que gera dificuldades no controle da enfermidade. Essa importância advém do fato da leishmaniose visceral ser mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e pelo fato dos cães apresentarem uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, o que favorece a infestação dos vetores.

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é um desafio para o médico veterinário devido à variedade de sintomas, à grande porcentagem de cães assintomáticos e à inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível.

As estratégias de controle da leishmaniose visceral no Brasil, indicadas pelo Ministério da Saúde, consiste na eliminação do cão doméstico positivo, no controle do vetor por meio do uso de inseticidas e no tratamento e redução de risco de infecção em humana.

II - OBJETIVO

O presente projeto de pesquisa teve por objetivos avaliar e comparar a sensibilidade e a especificidade dos testes de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dois grupos de cães, de ambos os sexos e com idade variando entre um e oito anos. O primeiro foi constituído por amostras de soro de 50 cães naturalmente infectados pela *L. chagasi*, com diagnóstico confirmado parasitologicamente por exame citológico de punção biópsia aspirativa de linfonodo e/ou medula. O segundo grupo, constituído por amostras de soro de 45 cães clinicamente sadios provenientes da Cidade de Santos – SP, área considerada não endêmica para leishmaniose visceral ou tegumentar.

Os soros dos animais dos grupos 1 e 2 foram submetidos aos métodos de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia (rK39) para o diagnóstico de leishmaniose visceral, com o objetivo de se determinar a especificidade e sensibilidade de cada um dos testes mencionados.

A presença de IgG no soro, determinada por meio da técnica de ELISA, foi realizada em microplacas sensibilizadas com antígeno total de parasita, isolado de baço de hamster infectado cronicamente com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Para a realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral as lâminas foram sensibilizadas adicionando-se suspensão de parasitas em PBS em cada círculo. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluições iguais a 1:40, sendo as amostras soropositivas, nesta diluição, novamente testadas para determinação do título.

Para a realização da técnica de imunocromatografia utilizou-se um Kit comercial, que detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de animais. A fita apresenta uma membrana pré-

coberta com o antígeno recombinante (rK39) na região da banda teste e anti-proteína A na região da banda controle. Os resultados foram determinados individualmente, de forma qualitativa (positivo ou negativo).

Foram determinadas a sensibilidade, especificidade dos métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia considerando-se como referência os resultados obtidos no exame parasitológico para leishmaniose visceral canina. Utilizou-se o teste Qui-quadrado para verificar a existência de associação entre os resultados de sensibilidade e especificidade dos métodos estudados. O coeficiente Kappa, de acordo com Pereira (2001), foi utilizado para avaliar a concordância dos métodos de ELISA, RIFI e imunocromatografia com o exame parasitológico.

IV- RESULTADOS

A) Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral.

Todas as amostras de soro dos cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral foram submetidas à técnica de ELISA e imunocromatografia, e o número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na tabela 1 e 3 respectivamente.

Somente 49 amostras de soro foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e o número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 1 – Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA em número absoluto e percentagem de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).

ELISA	Número de animais	Percentagem
Positivo	47	94%
Negativo	3	6%
Total	50	100%

Tabela 2 – Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em número absoluto e percentagem de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).

RIFI	Número de animais	Percentagem
Positivo	48	98%
Negativo	1	2%
Total	49	100%

Tabela 3 – Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia em número absoluto e percentagem de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).

Imunocromatografia	Número de animais	Percentagem
Positivo	43	86%
Negativo	7	14%
Total	50	100%

B) Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras dos soros de animais sadios, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

As 45 amostras de soro dos cães de área não endêmica foram submetidas às técnicas de ELISA, RIFI e imunocromatografia, e o número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na tabela 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA, em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente saudáveis provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2006).

ELISA	Número de animais	Percentagem
Positivo	7	15,6 %
Negativo	38	84,4%
Total	45	100%

Tabela 5 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente saudáveis provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2006).

RIFI	Número de animais	Percentagem
Positivo	4	8,9%
Negativo	41	91,1%
Total	45	100%

Tabela 6 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente saudáveis provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2006).

Imunocromatografia	Número de animais	Percentagem
Positivo	4	8,9%
Negativo	41	91,1%
Total	45	100%

C) Determinação dos valores de sensibilidade e especificidade relativas dos métodos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

A sensibilidade e especificidade relativas dos métodos de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia, bem como o coeficiente Kappa, encontram-se apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas para as técnicas de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia empregadas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006)

	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
ELISA	94,0% ab	84,4% a	0,788
RIFI	98,0% a	91,1% a	0,893
Imunocromatografia	86,0% b	91,1% a	0,769

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as sensibilidades e especificidades pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$)

V- CONCLUSÃO

Com base nos valores de Kappa e na comparação entre os valores de sensibilidade e especificidade de cada método testado, o presente estudo permite concluir que a reação de imunofluorescência indireta apresentou melhor desempenho, seguida da técnica de ELISA e, por fim, pela imunocromatografia. No entanto, a escolha do melhor método sorológico para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina varia de acordo com cada realidade, levando em consideração a familiaridade que temos com a técnica já empregada, o conhecimento de suas limitações, a praticidade de execução do método e o custo.

Bolsa FAPESP

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.758-61, 1995.
- 2- BADARÓ, R.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n.1, p.72-78, 1986.
- 3- BERN, C.; JHA, S.N.; JOSHI, A.B.; THAKUR, G.D.; BISTA, M.B. Use of the recombinant k39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.63, n.3-4, p.153-157, 2000.
- 4- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.120p.
- 5- CARVALHO, S.F.G.; LEMOS, E.M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant k39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.3, p.321-324, 2003.
- 6- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.
- 7- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, anoV, n.28, p.36-44, 2000.
- 8- FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XI**, Philadelphia: W. B. Saunders, p.266-270, 1992.
- 9- FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**. Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.21-24.
- 10- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**. Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.7-14.
- 11- LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3., 2005. Italy. **Abstract book...Italy**, 2005. p.160.
- 12- MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: Congresso de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.
- 13- PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 596p.
- 14- RACHAMIN, N.; JAFFES, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; SCHNUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Annals of Tropical and Parasitology**, v.85, n.5, p.503-508, 1991.
- 15- REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2352-2356, 2002.
- 16- SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.275-285, 2002.