

Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina: novas diretrizes para interpretação dos resultados de ELISA

Prof. Ms. João Carlos Toledo Júnior (*Diretor CDMA, Professor PUC Minas, Mestre em Patologia, Médico veterinário pela UFMG*)

Profa. PhD. Josiane Tavares de Abreu (*Diretora CDMA, Professora PUC Minas, Doutora em Microbiologia e pós doc em Medicina Veterinária Preventiva, Médico veterinário pela UFMG*)

Ms. Adrienny Trindade Reis (*Diretora CDMA, Mestre em Medicina Veterinária Preventiva, Médico veterinário pela UFMG*)

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é complexo e desafiador, pois não existem testes 100% sensíveis e específicos. No Brasil, divergências de opiniões sobre métodos de diagnóstico para LVC têm sido cada vez mais frequentes. Além disto, a presença de cães infectados que não manifestam sintomas dificulta o diagnóstico clínico, pois não levantam a suspeita do proprietário que, às vezes, desconhece a existência da doença mesmo residindo em área endêmica. Contudo, dois fatores são importantes a considerar quanto ao diagnóstico de LVC no país: (1) no Brasil, a legislação vigente prevê a eutanásia como método de controle da doença; (2) existe uma grande dificuldade em padronizar o diagnóstico da LVC na rotina clínica de médicos veterinários, pois cães apresentam respostas imunológicas diferentes. Por isso, a necessidade de obter testes confiáveis é essencial para não sacrificar cães falso-positivos, nem submeter cães com diagnóstico duvidoso a tratamentos desnecessários.

O tempo médio de soroconversão em cães é relativo, podendo ser entre 2 a 3 meses após infecção, mas estudos têm demonstrado cães com períodos mais longos (janela imunológica), podendo chegar a até 2 anos. Visando facilitar o estudo de populações e a obtenção de resultados mais rápidos de animais suspeitos o Serviço Oficial alterou por meio da Nota Técnica N° 01/2013 SDP/ DECD/ IOM/ FUNED a avaliação por meio de exame sorológico de triagem feito pela plataforma dupla de imunocromatografia (k28 TP - DPP®) e a confirmação pelo ELISA (kit registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA). O RIFI foi substituído então, por ser considerado mais oneroso financeiramente, além de ser mais complexo e demorado. Para melhorar este controle dos testes realizados e criar um padrão único de resposta frente a população e aos clínicos, o Serviço Oficial elegeu, além de seus laboratórios, quatro outros da rede privada para compor a Rede Estadual de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LACEM - Resolução SES/ MG N° 3.709, de 17 de abril de 2013) sendo o CDMA integrante da mesma. Estes laboratórios privados, além da FUNED, podem realizar os exames em âmbito nacional, sendo o resultado válido em toda a federação. Para estes laboratórios foi disponibilizado até meados de 2014 o DPP, sendo posteriormente descontinuado este fornecimento e mantido somente nos laboratórios públicos (Memorando SDP N° 069/2014). Para os laboratórios privados, é considerado como resultado oficial o ELISA associado ao laudo do clínico do veterinário sobre o estado clínico do animal. Entretanto, alguns laboratórios, como o CDMA, mantiveram o uso também do RIFI e de outras técnicas para dar suporte ao clínico, visto que para acompanhamento do paciente testes qualitativos não garantem a plena avaliação sorológica do animal, em virtude de sua menor sensibilidade e especificidade, em comparação com testes quantitativos.

Considera-se como testes qualitativos aqueles que somente oferecem resultados (1) Reagente e (2) Não Reagente, incluindo-se nestes os testes rápidos. Sabendo que inúmeros cães podem apresentar resultados divergentes entre teste rápido e Elisa e muitas vezes também ao RIFI, principalmente em cães assintomáticos, se faz necessário a inclusão de testes quantitativos acerca do diagnóstico, afim de se obter maior fidelidade e acurácia, ainda mais em casos onde o proprietário procura a clínica para realizar a

vacinação . Grimaldi Jr. et al. (2012) encontraram baixa sensibilidade do DPP utilizado para confirmar animais positivos para LVC porém assintomáticos, sendo este índice de 47% dos animais testados.

O ELISA e o RIFI são considerados testes quantitativos. Apesar dos resultados do ELISA serem expressos de forma qualitativa, o ELISA pelo princípio da técnica apresenta resultados quantitativos, o que pode facilitar o inquérito clínico, principalmente quando realizado dois testes em tempos diferentes, a cada 30 dias (sorologia pareada), considerando que este seja realizado pelo mesmo kit e sob as mesmas condições.

Para facilitar o entendimento, vamos exemplificar:

IMPORTANTE:

OD = densidade óptica obtida após leitura por espectrofotômetro em comprimento de onda pré-determinado. Quanto maior a OD para testes de ELISA indiretos maior a quantidade de anticorpos na amostra avaliada

A OD dos controles modifica de acordo com a execução do ELISA podendo apresentar valores máximos e mínimos (range) aceitos pelas determinações do kit já validado. Como controle interno do laboratório é importante inserir no teste soros com títulos sabidamente conhecidos e validados. Como está OD pode então modificar o Cut off também varia de acordo com o teste de ELISA realizado.

Para facilitar o entendimento, vamos exemplificar:

Exemplo:

OD controle negativo = 0,042

OD controle positivo = 0,281

Cut off para negativos < 0,150: o ponto de corte que classifica a amostra sendo negativa considerando as ODs obtidas acima

Indeterminado (ou zona cinza): entre 0,150 a 0,180: zona de indefinição para a amostra analisada considerando as ODs obtidas acima

Cut off para positivos > 0,180: quaisquer valores obtidos acima deste ponto são considerados reagentes para aquela amostra considerando as ODs acima

Amostras avaliadas (exemplo):

Animal 1: OD 0,210 (Reagente com baixo título)

Animal 2: OD 0,170 (Indeterminado ou suspeito)

Animal 3: OD 0,789 (Reagente com alto título)

Sendo assim, vamos interpretar os dados da seguinte forma:

Um cão assintomático apresentando os seguintes resultados (baseado nos valores do exemplo acima):

Resultado de ELISA (primeiro teste)

OD: 0,210

Este resultado se apresentado de forma qualitativa seria REAGENTE. Entretanto, os valores obtidos são bem próximos ao ponto de corte, ou seja, do limite inferior. Se caso este mesmo animal fosse submetido após 30 dias novamente ao teste de ELISA e apresentasse este resultado:

Resultado de ELISA (segundo teste)

OD: 0,834

Este resultado se apresentado de forma qualitativa seria REAGENTE, porém desta vez a presença de altos títulos, ou seja, valores superiores ao ponto de corte classificaria este animal sendo reagente com altos títulos.

Mas e se:

Este animal mantivesse a OD de 0,210 e o Cut off para positivos aumentasse para $> 0,220$ devido as variações inerentes da técnica? Ele seria considerado indeterminado

Percebam que animais com títulos bem próximos do limiar do Cut off podem “flutuar” em termos de resposta dependendo dos pontos de corte obtidos e isso pode dificultar a leitura se estes dados não estão presentes.

Sendo assim, respondendo a seguinte pergunta:

Por quê o animal que era Reagente tornou-se Não reagente?

Porque o Cut off do teste variou de uma análise para outra e pelo fato do primeiro resultado estar no limiar para ser considerada uma amostra Reagente, numa outra análise com pontos de corte distintos ele pode ser classificado numa outra categoria. Neste caso é importante que outros resultados sejam avaliados como o título de RIFI, exames parasitológicos, de imunistoquímica e/ ou PCR, além da avaliação do estado clínico do animal e seus parâmetros hematológicos, bioquímicos e de urinálise.

PARTICULARIDADES DAS ANÁLISES REALIZADAS:

O kit ELISA padrão adotado por todos os laboratórios pertencentes à Rede Oficial de Diagnóstico da LVC é o de fabricação da empresa BIOGENE® que contém na sua formulação como antígeno a proteína recombinante “S7”. Os critérios de expressão dos laudos seguem criteriosamente as recomendações do fabricante.

Possibilidades de expressão dos resultados no método ELISA:

- ELISA Não Reagente;
- ELISA Indeterminado;
- ELISA Reagente.

IMPORTANTE: verificar os pontos de corte no resultado emitido e a OD da amostra. As análises pareadas precisam ser feitas sempre com o mesmo kit e no mesmo laboratório, pelo fato das condições de manuseio serem levemente diferentes entre os mesmos (tipos de pipetas e ponteiras,

tipos de equipamentos – lavadoras de placas, leitoras de ELISA – condições de incubação - tempo e temperatura, executor).

O “DPP”, teste imunocromatográfico de plataforma dupla k28 (TR DPP K28) é um teste qualitativo e foi eleito como teste de triagem, devendo seu resultado ser confirmado pelo ELISA mesmo quando este der negativo. Foi desenvolvido pela empresa norte-americana Chembio e transferida para a empresa nacional, Biomanguinhos®.

É utilizado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* empregando a proteína recombinante K28 (fragmentos K26, K39 e K9) como antígeno. Tal 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*).

Possibilidades de expressão dos resultados no método “DPP” TR-DPP K28:

- TR DPP K28 Não Reagente;
- TR DPP K28 Reagente.

A metodologia RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) emprega extrato bruto de *Leishmania infantum* na lâmina e considera uma amostra reagente quando a mesma apresenta imunofluorescência superior ao controle positivo empregado, sendo que o controle negativo não pode apresentar fluorescência. O uso de um soro sabidamente positivo validado auxilia na leitura das lâminas.

Os kits comerciais variam em forma da *Leishmania* encontrada na lâmina (amastigota e promastigota), quantidade de parasitos por lâmina e tipo e diluição do conjugado. No CDMA o kit utilizado possui em sua formulação alta concentração de formas promastigotas por lâmina e **contraste vermelho** para evidenciar as amostras de soro não reagentes (Figura 1), facilitando a leitura das amostras. Ainda como medida de segurança as leituras são realizadas em sistema de dupla leitura cega (2 profissionais treinados que registram as leituras sem ter conhecimento da análise do outro). No caso de divergência, um terceiro leitor realiza a leitura como critério de desempate, diminuindo a subjetividade.

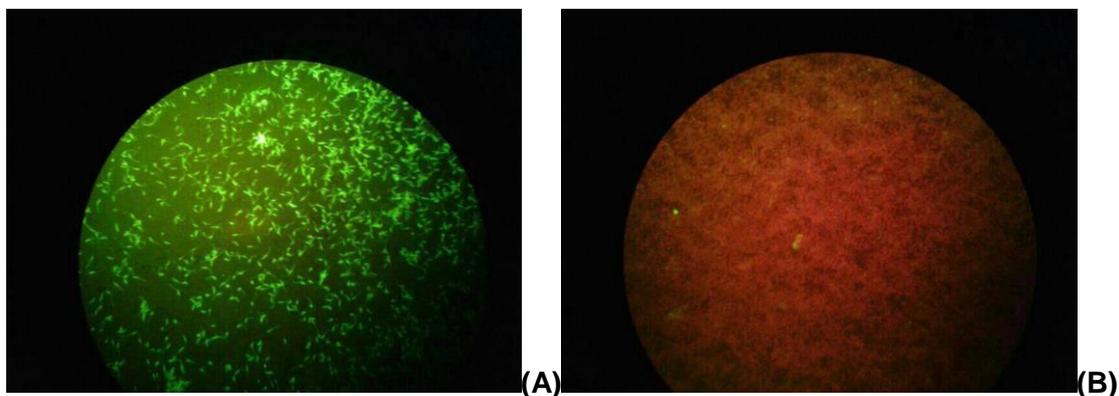


Figura 1: Reação de Imunofluorescência Indireta – Aumento de 40x, evidenciando campo Reagente – Verde Fluorescente (A) e Não Reagente – ausência de fluorescência em campo com contraste vermelho (B) na diluição de 1/40.

Fonte: Andrade, H. M. arquivo pessoal, 2013.

Possibilidades de expressão dos resultados no método RIFI (titulação até 1:80) no CDMA:

- RIFI *Reagente* apenas em 1:40
- RIFI *Reagente* nas duas titulações → “Reagente 1:80”;
- RIFI *Não Reagente* nas duas titulações → “Não Reagente até a diluição de 1:80”.

Em RIFI diluição total considera-se a seguinte interpretação:

Reagente 1:40 até 1:160: títulos baixos

Reagente 1:320 a 1:1280: títulos médios

Reagente acima de 1:1280: títulos altos.

É mais importante a definição de qual categoria se encontra do que buscar títulos exatamente iguais entre duas leituras, visto que diluição na base 2 em sorologia é muito baixa e facilmente variável dentro da técnica. Sendo assim, é mais interessante avaliar se de uma análise para outra (sorologia pareada considerando mesmo kit e feito nas mesmas condições) o título permaneceu na mesma categoria ou alterou de uma categoria para outra de baixos, médios e elevados títulos.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

Cada técnica utilizada envolve antígenos diferentes da *Leishmania sp* e ainda, levando em consideração que cada teste possui uma sensibilidade e especificidade diferentes, resultados discordantes entre técnicas podem ocorrer. Tal variável pré-analítica é dependente do(s) tipo(s) e concentração de anticorpo(s) circulante(s) produzido(s) pela resposta do indivíduo, presença de outras doenças e/ou anticorpos circulantes (materno derivados, co-infecções).

A qualidade da amostra está diretamente ligada à qualidade dos ensaios, portanto deve-se minimizar ao máximo a possibilidade de hemólise (no ato da coleta ou mesmo transferência do sangue coletado para o tubo), acondicionamento, conservação, transporte e, além disso, a realização de jejum dos pacientes (evitar lipemia).

Sugere-se que as análises sorológicas sejam realizadas pareadas (com intervalo de tempo entre um teste e outro de 30 a 60 dias) com o intuito de avaliar processos de soroconversão. Títulos ascendentes quer sejam no ELISA e/ ou RIFI indicam infecção ativa, mesmo que o animal seja assintomático. Isso é mais importante que saber um título de forma isolada, pois o animal pode ter entrado em contato com o patógeno mas não estar infectado. Estar infectado mas não estar doente.

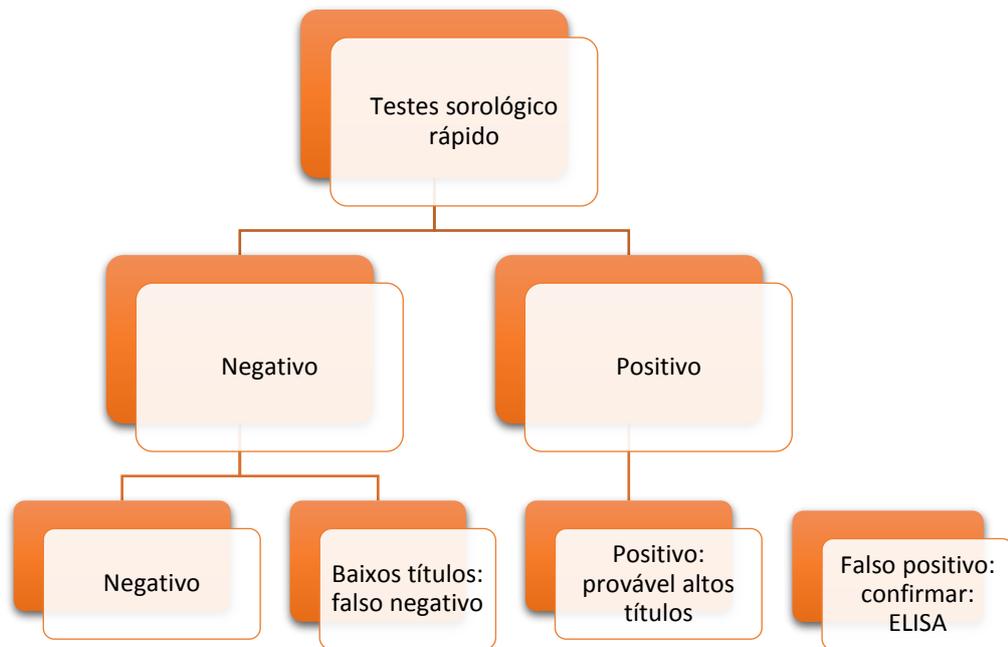
Exames hematológicos, urinálise e bioquímicos básicos como “*screening*” podem ser importantes inclusive no diagnóstico diferencial. Outros testes auxiliares como parasitológico direto, pesquisa imunodirecionada (imunoistoquímica de pele obtida de borda de orelha) ou mesmo PCR também constituem-se ferramentas para confirmação dos resultados sorologicamente positivos e nos casos de discrepância de testes sorológicos ou caso se suspeite que o animal esteja durante o período de janela imunológica.

Nos casos duvidosos, mesmo que permaneça a suspeita, deve-se considerar que em doença estabelecida, de curso crônico e ou carácter terminal, muitos indivíduos já não respondem imunologicamente ao estímulo constante do parasita, principalmente quando instalado em nível medular afetando a produção das células precursoras do sistema mononuclear fagocítico e conseqüentemente a apresentação de antígenos, comprometendo até o processo de expansão clonal e produção de imunoglobulinas por parte dos plasmócitos. Deve-se ainda lembrar do tempo médio dos anticorpos já formados, bem como a deposição em tecidos desencadeando processos deletérios imunomediados (ex.: DRC - Doença Renal Crônica por glomerulopatia imunomediada)

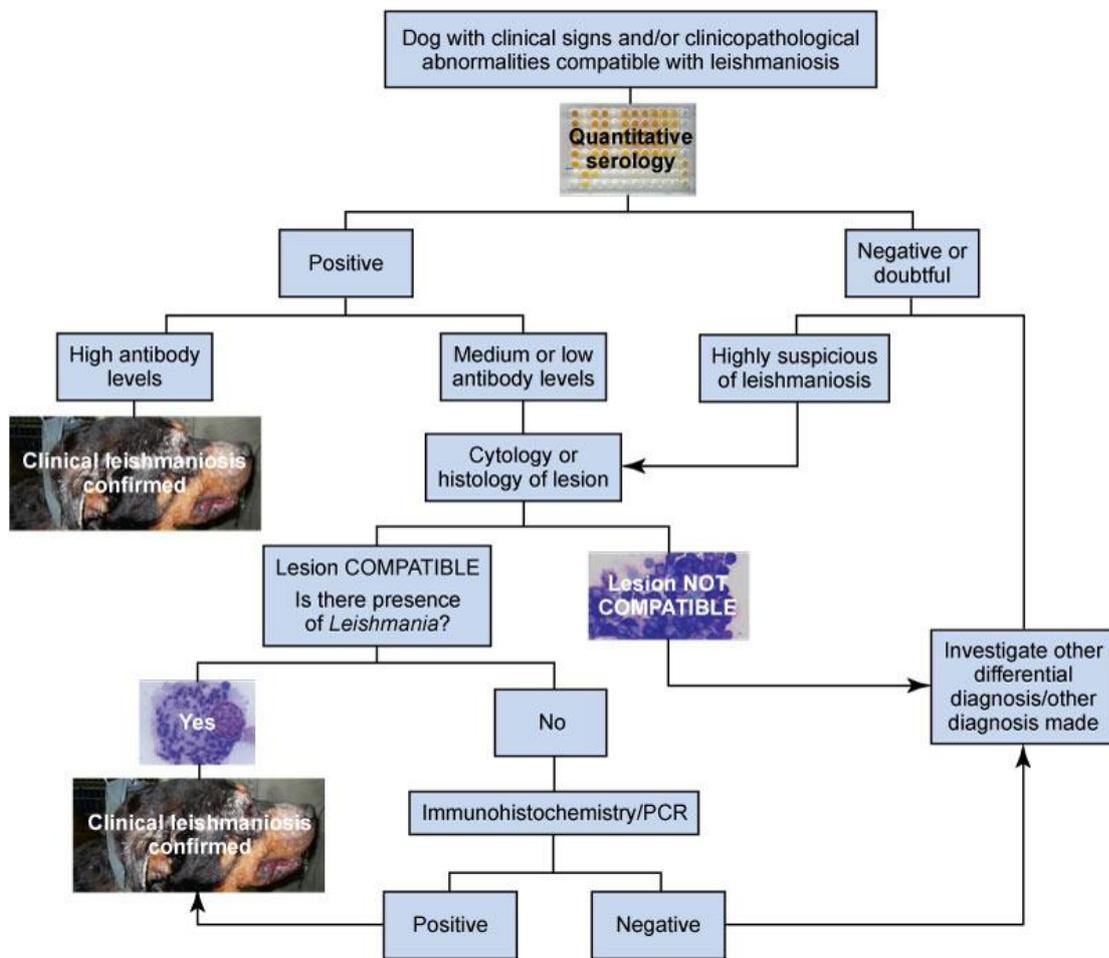
Sendo assim, pensar em sorologia pareada é mais interessante que a avaliação num único momento pois...

É mais fácil entender um filme que uma foto.

Abaixo estão algumas sugestões de como conduzir o diagnóstico e o acompanhamento clínico do paciente

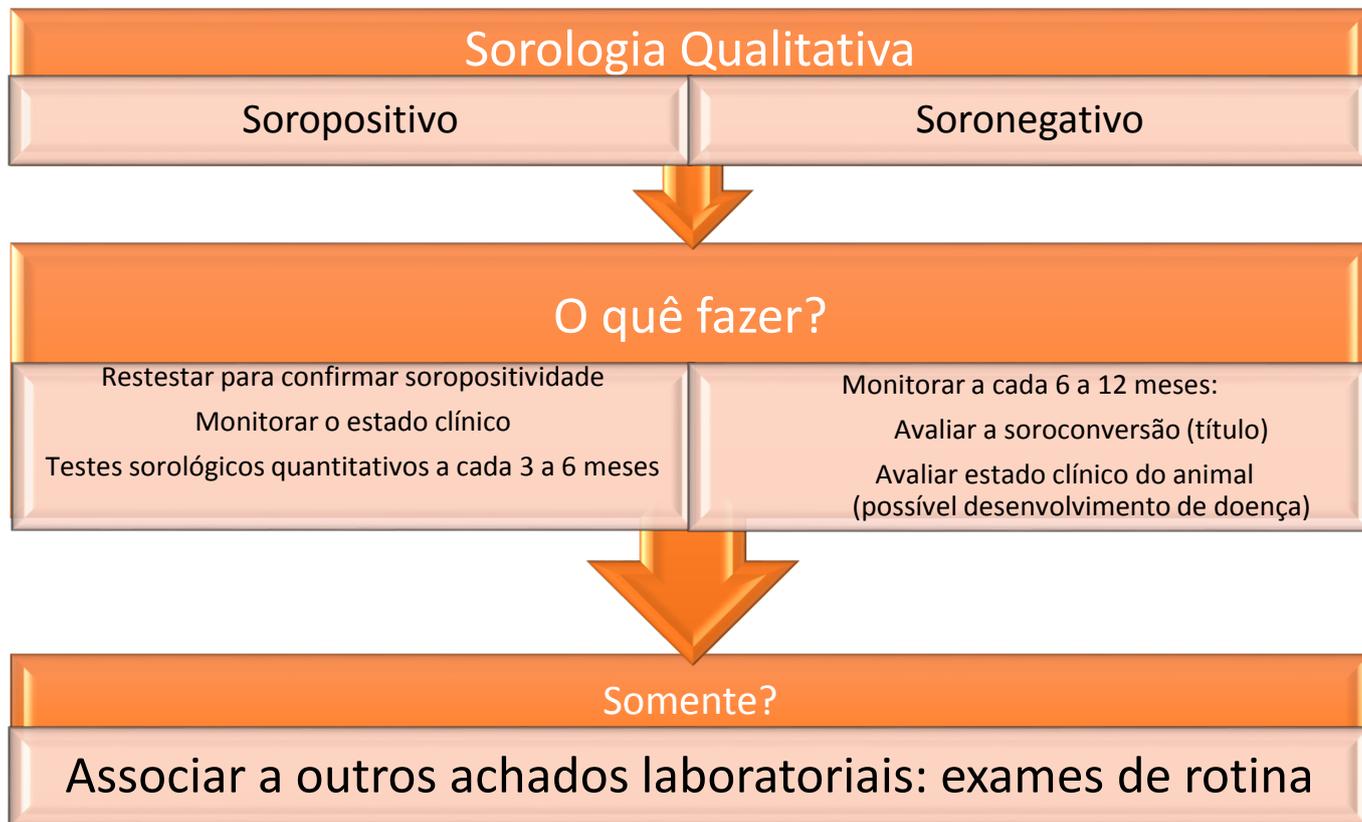


Fonte: Adaptado Solano-Gallego et al., 2011



Modified from Ref. 378.
 Greene: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th Edition
 Copyright © 2012, 2006, 1998, 1990 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Sugestão do acompanhamento dos pacientes com ou sem sinais clínicos e achados laboratoriais



Fonte: Adaptado Solano-Gallego et al., 2011

Referências bibliográficas:

GRIMALDI JR., G; TEVA, A; FERREIRA, A. L. 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, 0. 54-59, 2012.

LEMOS, M. E.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A. B. et al. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica*. V. 107, p. 205-207, 2008.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* V. 4, n. 1, e584 doi:10.1371/ journal.pntd.0000584 , 2010.

SOLANO-GALLEGO, MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. Review: LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v. 4. <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>, 2011