PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Avaliação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em regiões endêmicas do Estado de Pernambuco, Brasil

Otamires Alves da Silva¹, Edileide Diniz Silva¹, Alberon Ribeiro Araújo¹,
Geovania Maria da Silva Braga²

¹Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM/Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz Pernambuco.

²Profa Adjunta II Departamento de Biologia e Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA.

Resumo

O teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® (DiaMed IT-LEISH®) usando antígeno recombinante K39 (rK39) foi avaliado para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral (LV) em amostras de soros de cães suspeitos em área endêmica. O desempenho do teste foi comparado ao da Reação de Imunofluorescência Indireta, ao da Reação Imunoenzimática, usando-se antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* e ao Teste de Aglutinação Direta. O estudo incluiu 58 animais, com um quadro clínico sugestivo para LV, sendo 68,9% (40) do sexo masculino e 31,0% (18) do sexo feminino. A idade destes animais variou de seis meses a cinco anos. Do total de animais com diagnóstico confirmado por RIFI, o teste rápido apresentou positividade em 24,1 %.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, Diagnóstico, Avaliação.

Evaluation of test quick immunochromatographic IT-LEISH[®] for the diagnosis in dogs of visceral leishmaniasis in endemics regions of the state of Pernambuco, Brazil

Abstract

The rapid immunochromatographic test IT-LEISH[®] (DiaMed IT-LEISH[®]) using recombinant antigen K39 (rK39) was performed on serum samples from dog's suspected endemic area. The test performance was compared to the indirect immunofluorescence, imunoemzomatic the reaction, using soluble antigen of *Leishmania chagasi*, and the direct agglutination test. The study included 58 animals with clinical symptoms suggestive for LV. Of these 68.9% (40) were male and 31.0% (18) females. The age of animals ranged from six months to five years. Of a total of animals with diagnosis confirmed by IFAT, the rapid test was positive in 24.1%.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, Diagnosis, Evaluation.

Introdução

As leishmanioses são zoonoses causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que podem afetar o homem, sendo a Leishmaniose Visceral (LV) a que apresenta ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo, situando-se entre as sete endemias prioritárias de atenção da Organização Mundial da Saúde, afetando 500 mil pessoas por ano. Animais silvestres e domésticos são os reservatórios mais comuns do parasita que têm como vetores, insetos dípteros, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (LUTZ, 1912). Aproximadamente 90% de todos os casos notificados no mundo provêm de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2006). No Novo Mundo a doença é conhecida como calazar neotropical ou Leishmaniose visceral americana (LVA) que tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e em praticamente todas as áreas de

ocorrência da doença, o inseto *Lutzomyia longipalpis* é identificado como espécie transmissora desta enfermidade (LAINSON, 1978).

O cão doméstico, importante fonte de infecção de *Leishmania*, pode apresentar alto parasitismo cutâneo o que facilita a infecção dos flebotomíneos (DEANE e DEANE, 1954, 1955) exercendo papel fundamental na introdução da doença em áreas novas (BRASIL, 2003; MARZOCHI, 1997). Diante de sua importância no ciclo de transmissão da LV, a principal medida de controle, no Brasil, tem sido sua eliminação quando identificado como infectado e/ou soropositivo (WHO, 2006; MONTEIRO, 1994).

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido descritas como sensíveis para a detecção de *Leishmania*, porém não tem aplicação na rotina diagnóstica ou em larga escala. Na impossibilidade de realizar provas para detecção do parasita nos inquéritos epidemiológicos recomenda-se a utilização de métodos de anticorpos específicos, empregando-se métodos sorológicos, entretanto, em situações de gravidade da LV canina, Ashford et al., 1995, descreveram a ausência de anticorpos. A experiência clínica em países onde a doença é endêmica, também evidenciou que muitos animais infectados podem permanecer soropositivos (FERRER, 1999).

Diversas técnicas têm sido avaliadas ou utilizadas na detecção de anticorpos no diagnóstico do calazar humano e canino, tais como as imunoenzimáticas (AISA et al., 1998; ASHFORD et al., 1993; DIETZE et al., 1995; GULNARA et al., 1999) testes de aglutinação direta (DAT) (EL HARITH et al., 1989) e testes rápidos imunocromatográficos que utilizam como antígenos, proteínas recombinantes derivadas de leishmanias, como a K39 (ARIAS et al., 1996; GENARO et al., 1997; JELINEK et al., 1999; SUNDAR et al., 1998).

O diagnóstico da LV avançou pouco nas últimas décadas, sendo uma das maiores preocupações atuais em relação a sua elevada letalidade, sendo que no Brasil observa-se que vai além do relato na literatura mundial. As técnicas de diagnóstico parasitológico pressupõem procedimentos invasivos, requerendo laboratoristas experientes, são laboriosas e ainda assim não oferecem sensibilidades ideais (FERRER, 1995). As técnicas sorológicas

demandam tempo, equipamentos, infra-estrutura e laboratoristas bem treinados.

Metodologia

Sabendo-se que a LV humana é considerada precedente a população canina, foi realizada a coleta de amostras de sangue em cães, após uma avaliação clínica sobre a condição do animal, verificando a sua procedência, levando-se em consideração a zona endêmica da doença (BRAGA, 1998). Foram avaliados 58 cães naturais de área endêmica e realizado o diagnóstico laboratorial através das técnicas sorológicas convencionais (RIFI, ELISA e DAT), além do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® (DiaMed IT- LEISH®). O DiaMed IT-LEISH® que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania* sp. é composto de uma membrana de nitrocelulose acoplada a uma bandeja descartável, uma ampola contendo tampão, uma lanceta, um tubo capilar de plástico e álcool. Na membrana de nitrocelulose, são absorvidos o antígeno rK39, formando a linha-teste, e o anticorpo anti-IgG humano, constituindo a linha-controle.

Resultados

Cinquenta e oito cães provenientes de área rural foram incluídos no estudo. Como parâmetro foram utilizadas as diluições no teste de RIFI a partir de 1:40 até 1:1.280. Dos 58 reagentes para RIFI, 70.6 % (41) foram reagentes para ELISA, 87.9 % (51) para DAT e 24.1 % (14) para IT-LEISH®, demonstrando assim que, os testes de RIFI, ELISA e DAT apresentaram um maior percentual em relação ao teste rápido, como se observa na TAB. 1. Entretanto, o teste rápido não foi capaz de detectar infecção nos animais com títulos de RIFI baixos de 1:40.

Tabela 1. Resultados observados de acordo com os Métodos De Diagnóstico realizados para avaliação do Teste Imunocromatográfico Rápido It-Leish® para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em Regiões Endêmicas do Estado De Pernambuco, Brasil, 2010

Métodos avaliados	Reagentes	%	Não Reagentes	%
RIFI	58	100	0	0
ELISA <i>chagasi</i>	41	70.6	17	29.3
DAT	51	87.9	7	12.0
IT-LEISH®	14	24.1	44	75.8

Na TAB. 2 observa-se que o teste rápido apresenta um percentual melhor a partir da diluição 1:160, com algumas variações.

Tabela 2 - Resultados observados em comparação do Teste Rápido com os Testes Convencionais para avaliação do Teste Imunocromatográfico Rápido It-Leish® para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em Regiões Endêmicas do Estado De Pernambuco, Brasil, 2010

Diluições seriadas de RIFI	RIFI	%	ELISA	%	DAT	%	IT- LEISH®	%
1:40	40	68.9	24	41.3	35	60.3	2	3.4
1:80	6	10.3	6	10.3	5	8.6	2	3.4
1:160	5	8.6	4	6.8	4	6.8	3	5.1
1:320	3	5.1	3	5.1	3	5.1	3	5.1
1:640	1	1.7	1	1.7	1	1.7	1	1.7
1:1.280	3	5.1	3	5.1	3	5.1	3	5.1
Total	58		41		51		14	

Conclusão

Estudos vêm sendo realizados para melhor conhecimento do comportamento da leishmaniose visceral tanto humana, como canina em municípios pernambucano, por questões a serem esclarecidas necessitando melhores resultados, bem definidos para o planejamento e implementação de medidas de controle da referida enfermidade.

Assim como diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV, muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade.

O diagnóstico clínico da LV canina é muitas vezes um problema para o médico veterinário, pois existem um amplo espectro de sinais clínicos.

A avaliação de testes rápidos tem mostrado resultados variáveis, de acordo com a região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada. O uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que não necessitem de infra-estrutura laboratorial e profissionais especializados, deverá trazer benefício importante para o diagnóstico acurado e rápido da LV, principalmente nas localidades onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é limitado. Sendo um teste rápido, simples, de baixo custo e, portanto não necessita de equipamentos sofisticados, podendo ser realizado no campo, adequado para ser empregado como técnica alternativa de triagem diagnóstica em função de sua especificidade para a espécie *Leishmania chagasi*, responsável pela LV.

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas, constitui um instrumento importante no diagnóstico da LV canina. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A soro conversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos e alteram em detectar cães infectados no período pré-patente da doença.

SILVA, O.A. et al. Avaliação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em regiões endêmicas do Estado de Pernambuco, Brasil. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 4, Ed. 151, Art. 1013, 2011.

Animais com menos de três meses de idade não devem ser avaliados por meio de métodos sorológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos²². Existem contradições na literatura quanto à possível correlação entre os títulos de anticorpos e a severidade dos sintomas.

Referências

AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEO, M.; FISA, R.; RIERA, M. C.; COLMENARES, M. et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **American Journal Tropical Medical and Hygiene**. v. 58, S. 2, p. 154-9. 1998.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emergence Infectology Disease**. v. 2. p. 145-6, 1996.

ASHFORD, D. A.; BADARO, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M.; DAVID, Jr. Studies on the control of Visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay screening (FAST-ELISA) for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **American Journal Tropical Medical and Hygiene**. v. 48, p. 1-8, 1993.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, J. R.; BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal Tropical Medical and Hygiene**. v. 53, S. 3, p. 251-5. 1995.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 315, S. 5, p. 419-424. 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília – DF. 2003.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. **Hospital**. v. 46, p. 651-3. 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**. v. 48, p. 61-76. 1955.

DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C. P.; RODRIGUES, T. P.; BOULOS, M.; CORREY, R. Diagnosis of canine Visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal Tropical Medical and Hygiene**. v. 53, p. 40-2. 1995.

SILVA, O.A. et al. Avaliação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em regiões endêmicas do Estado de Pernambuco, Brasil. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 4, Ed. 151, Art. 1013, 2011.

EL HARITH, A.; SLAPPENDEL, R. J.; REITER, I.; VAN KNAPEN, F.; KORTE, P.; HUIGEN, E.; KOLK, A. H. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir. **Journal Clinical Microbiology**. v. 27, S. 10, p. 2252-7. 1989.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**. v. 136, p. 514-6. 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International CANINE Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain. **Canine leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel vet.** p. 6-10. 1999.

GENARO, O.; COSTA, R. T.; FRANÇA SILVA, J. C.; REIS, A. B.; VIEIRA, E. P.; ARIAS, J. R. et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Acta Parasitol Turcica**. v. 21, S. 1, p. 93. 1997.

GULNARA, P.; CABRERA, B.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine Visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medical and Hygiene**. v. 61, S. 2, p. 296-301. 1999.

JELINEK, T.; EICHENLAUB, S.; LOSCHER, T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **European Journal Clinical Microbiology Infectology Disease**. v. 9, p. 669-70. 1999.

LAINSON, R.; SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W. Killick-Kendrick r. Ed. The leishmaniasis in biology and medicine. London, **Academie Press**. v. 1. 1978.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 4. p. 84-95. 1912.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30; S. 1. p. 162-4. 1997.

MONTEIRO, O. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 27, S. 3, p. 67-72. 1994.

ROSS, R. Furtree notes on leishman's bodies. **Britannica Medical Journal**. v. 2. p. 1401. 1903.

SUNDAR. S.; REED, S. G.; SINGH, V. P.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet**. v. 351, S. 9102. p. 563-5. 1998.

WHO. World Health Organization. The 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO **Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases**. 2006.