

Adequação do ponto de corte do Ensaio Imunoenzimático para Leishmaniose Visceral à imunofluorescência indireta

Adjustment to the cutoff point of immunoenzymatic assay for Visceral Leishmaniasis to the indirect immunofluorescence

Alexander Amaral Medeiros¹

1. Centro de Controle de Zoonoses - Fortaleza-CE

Resumo

Introdução: A Leishmaniose Visceral (LV) está presente na maioria dos países tropicais e subtropicais. Estima-se que milhares de cães infectados são assintomáticos, mas constituem uma fonte de infecção para o vetor, fazendo-se necessário o emprego de testes sorológicos para a detecção da doença. Entretanto, a Imunofluorescência Indireta (IFI), considerada padrão ouro, só confirma cerca de 10% das amostras classificadas como reagente pelo ensaio imunoenzimático (EIE) utilizado para triagem. **Objetivo:** Observar a correspondência entre o teste de triagem e o confirmatório para LVC e realizar possíveis ajustes no ponto de corte do teste de triagem, otimizando recursos dos laboratórios. **Métodos:** Foram analisadas 1.336 amostras de sangue dessecado, em papel de filtro, utilizando os kits de EIE e IFI distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil, seguindo as instruções do fabricante. O ponto de corte do EIE foi calculado por uma curva ROC, tendo IFI como padrão. **Resultados:** Utilizando o ponto de corte do fabricante, o EIE classificou como reagentes 886 das 1.336 amostras (66,3%). Entretanto, apenas 142 (10%) foram confirmadas por IFI. Após a aplicação do ponto de corte proposto, 507 (38%) amostras submetidas à EIE apresentaram-se como reagentes. O teste apresentou sensibilidade de 98,59%, especificidade de 69,01% e precisão de 72,16%. **Conclusão:** A grande quantidade de amostras soro reagentes por EIE não confirmadas por IFI pode apresentar um custo extra aos laboratórios. A modificação do ponto de corte do teste de triagem pode ser uma boa estratégia para a diminuição dos custos de operação dos laboratórios públicos do País.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. Curva ROC. Técnicas Imunoenzimáticas. Microscopia de Fluorescência.

Abstract

Introduction: Visceral Leishmaniasis is present in most tropical and subtropical countries. It is estimated that thousands of infected dogs are asymptomatic (50%), but constitute a source of infection to the vector, making it necessary to employ serological tests for the detection of the disease. However, the IIF considered as the gold standard for VL, only confirms about 10% of the samples classified by the screening test as reagent. **Objective:** To observe the correlation between the screening and confirmatory test for CVL and make eventual adjustments to the cutoff point of the screening test, saving laboratories resources. **Methods:** A total of 1336 blood samples dried on filter paper, were analyzed by the EIA and IIF kits distributed by the Ministry of Health of Brazil, following the manufacturer's instructions. The cutoff point of EIA was calculated by a ROC curve, taking IIF as standard. **Results:** Using the manufacturer's cutoff, EIA rated as reagent 886 (66.31%) of 1336 samples. However, only 142(10%) were confirmed by IIF. After applying the proposed cutoff, 507 (38%) samples submitted to EIA presented it as reactants. The test presented a sensitivity of 98.59%, specificity 69.01% and 72.16% accuracy. **Conclusion:** A large number of serum samples reactive by EIA and unconfirmed by IIF bring an extra cost to the laboratories. Altering the cutoff point of the screening test seems to be a good strategy to reduce operating costs of public laboratories in the country.

Key-words: Leishmaniasis, Visceral. ROC Curve. Immunoenzyme Techniques. Microscopy, Fluorescence.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) atinge milhares de pessoas e animais e está presente principalmente no Brasil, na região do Mediterrâneo e na China¹. No Brasil, no ano 2009, foram notificados 3.693 casos humanos em 20 das 27 unidades da federação, e estima-se que, no País, milhares de cães estejam infectados².

A fim de diminuir o número de novos casos da doença, os programas de controle da LV baseiam suas ações no combate

à forma alada do vetor *Lutzomyia longipalpis*, no tratamento dos humanos e na remoção dos reservatórios infectados pelo parasito³. Entretanto, 50% dos cães, considerados o principal reservatório, não apresentam sinais clínicos, mas constituem uma fonte de infecção para o vetor⁴. Dessa forma, o sucesso dos programas de controle da LV depende da identificação de animais infectados por meio da utilização de testes laboratoriais rápidos e sensíveis.

Correspondência: code39@bol.com.br

Conflito de interesse: Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Recebido em 08 Jan 2013; Revisado em 11 Mar 2013; Aceito em 02 Maio 2013.

Entre os testes mais utilizados, os sorológicos são considerados os de eleição devido à alta sensibilidade e especificidade. A imunofluorescência indireta (IFI) é o método mais utilizado e considerado como padrão ouro⁵. Entretanto, a IFI não é facilmente aplicada a inquéritos em larga escala sendo necessário o emprego de um teste para a triagem de animais infectados. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a triagem sorológica por ensaio imunoenzimático (EIE) e a consequente confirmação por IFI dos soros reagentes em 100% da população canina de áreas endêmicas³.

Entretanto, apesar do EIE ser facilmente aplicável a grandes inquéritos sorológicos, os resultados apresentam grande discordância quando comparados aos obtidos por IFI, aumentando os custos e o tempo de expedição dos laudos pelos laboratórios públicos. Assim, um ajuste no cálculo do ponto de corte do EIE utilizado para a triagem sorológica pode ser uma estratégia adequada para diminuir o número de exames confirmatórios, desde que não prejudique a sensibilidade do teste.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo comparar os resultados obtidos pelos testes de triagem e confirmação realizados em amostras de sangue dessecado em papel de filtro e calcular um ponto de corte para o EIE que retorne menos amostras falso positivas quando comparado ao IFI para LVC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área

O estudo foi realizado no município de Fortaleza (3 45'47" S, 38 31'23" W), capital do Estado do Ceará, Brasil. A cidade é a quinta capital mais populosa do Brasil, com 7.786,52 habitantes/km² e ocupa 34Km de área costeira estendendo-se para o interior⁶. O clima é predominantemente equatorial e intertropical, com uma temperatura média de 27,5 ° C e umidade relativa de 77%. A precipitação média anual é de 1.378,3 mm, e a estação chuvosa ocorre de fevereiro a abril. Apresenta uma população canina estimada de 250.000 animais.

Amostras de sangue

Foram utilizadas amostras de sangue periférico coletadas em papel de filtro Klabi 80, através de punção auricular de 1.336 animais, provenientes do inquérito sorológico canino realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município de Fortaleza.

Testes sorológicos

A detecção da presença de anticorpos anti-leishmania foi realizada por meio da utilização de Kits de EIE e IFI para diagnóstico da LVC produzidos pela Bio-Manguinhos®/ FIOCRUZ e distribuídos à rede pública pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e em duplicata.

As amostras foram classificadas como reagentes ou não reagentes utilizando-se dois pontos de corte. O primeiro calculado de acordo com as instruções do fabricante e o segundo

a partir da área sob uma curva Receiver Operating Characteristic (ROC), utilizando-se os resultados obtidos por IFI como padrão.

As densidades óticas (DO) das amostras consideradas como reagentes ou não reagentes em cada ponto de corte foram comparadas. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, bem como a precisão dos testes foram calculados tomando os resultados obtidos por IFI como padrão.

Análise Estatística

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e de precisão como descrito previamente por Jekel⁷ (1999). Os valores de corte foram estabelecidos para as DOs obtidas por EIE por meio de uma curva ROC. Os resultados dos testes foram comparados com base na área sob a curva ROC (AUC), utilizando software MedCalc 8,0, Mariakerke, Bélgica.

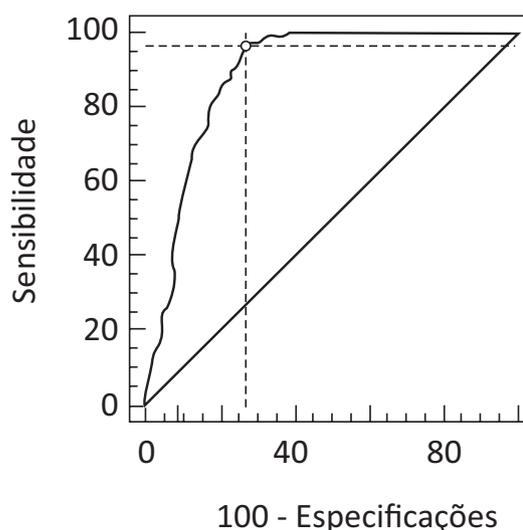


Figura 1. Na análise gráfica ROC observam-se os valores dos parâmetros de sensibilidade, representados no eixo Y, enquanto que no eixo X estão os valores correspondentes à especificidade. A análise gráfica ROC compara as DOs do EIE às leituras obtidas por IFI. O círculo branco mostra o melhor par sensibilidade/especificidade obtido pelo teste.

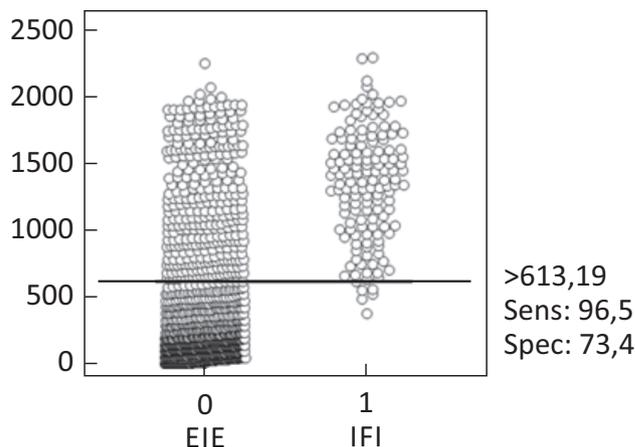


Figura 2. Distribuição de densidade ótica dos valores obtidos por EIE (0) e das amostras consideradas reagentes por IFI (1) quando testadas quanto à presença de anticorpos anti-L.major-like. A linha horizontal indica o ponto de corte com a melhor separação (mínimo de falsos negativos e falsos positivos) entre dois grupos.

RESULTADOS

O EIE quando realizado em sangue dessecado em papel de filtro e utilizando o ponto de corte determinado pelo fabricante, classificou como reagente 886 (66,31%) das 1.336 amostras analisadas. Entretanto, quando submetidas à IFI, apenas 142 (10%) foram consideradas reagentes em diluições iguais ou maiores a 1:40.

Após a aplicação do ponto de corte calculado pela curva ROC, a EIE considerou como reagente 507 (38%) amostras.

O ponto de corte do EIE, recomendado pelo fabricante, apresentou alta sensibilidade, entretanto, baixa especificidade e precisão. O cálculo do ponto de corte obtido por meio da curva ROC, retornou ao teste uma sensibilidade de 98,59%, especificidade de 69,01% e precisão de 72,16% (tabela 1).

Tabela 1. Valores obtidos para EIE utilizando-se diferentes pontos de corte em uma amostra de cães do Município de Fortaleza, Ceará, Brasil.

Testes	Ponto de corte fabricante X ² CN x 3; DO > 0,180	Ponto de corte curva ROC DO > 0,613
Sensibilidade	100,00%	98,59%
Especificidade	37,69%	69,01%
Valor preditivo -	100,00%	98,59%
Valor preditivo +	16,03%	27,45%
Precisão	44,31%	72,16%

DISCUSSÃO

Devido às diversas apresentações clínicas, que abrangem desde formas sintomáticas a assintomáticas, exames complementares são necessários para o diagnóstico da LVC, entre os quais os testes sorológicos destacam-se como os de eleição, pois apresentam alta sensibilidade, baixo custo e facilidade de execução^{8,9}. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a triagem sorológica por EIE confirmação das amostras reagentes por IFI³.

O IFI é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da LVC e, apesar da grande variação de dados, apresenta elevada especificidade (63% a 97%) e sensibilidade (95% a 99,5%)^{8,9}. Entretanto, o emprego desta metodologia na triagem sorológica em inquéritos de grade escala não é

aplicável, pois a técnica não permite automação, tem alto custo e depende da disponibilidade de técnicos treinados.

O EIE para LVC pode apresentar diferentes sensibilidades e especificidades a depender da natureza do antígeno empregado. Ferreira et al¹⁰ (2007) encontraram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96% utilizando antígenos de *L. donovani*. Outros valores de sensibilidade e especificidade foram encontrados para *L. major-like* (78,7% e 82,8%) e *L. braziliensis* (95,7% e 97,7%) quando utilizados na pesquisa de anticorpos contra leishmaniose tegumentar americana¹¹.

Quando comparado ao IFI, em estudo realizado por Carvalho et al¹² (2008) o EIE apresentou sensibilidade de 89,09%. Entretanto, apenas 25% das amostras testadas foram confirmadas por IFI. Aguiar et al¹³ (2010) também encontraram resultados divergentes quando da comparação dos resultados do EIE (27,9%) e IFI (3,1%) em amostras de soro canino. Em outro estudo, Assis et al¹⁴ (2010), observaram especificidades mais próximas para o EIE e a IFI (65,0% e 56,0%). As diferenças observadas entre o EIE e a IFI oneram os laboratórios que trabalham com um grande número de amostras fazendo-se necessário, ajustes no ponto de corte do teste de triagem.

Ajustes no ponto de corte podem ser aplicados ao EIE por meio da análise de uma curva ROC. Nesta curva, a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) é plotada contra o taxa de falsos positivo (100 - especificidade) obtendo-se diferentes pontos de corte. Cada ponto representa uma sensibilidade e especificidade correspondentemente a uma decisão limite específica¹⁵. Ao utilizar ponto de corte calculado por uma curva ROC (DO > 0,613), obtém-se um ponto de corte do EIE para LVC a partir dos resultados obtidos pelo teste padrão ouro e adequa-se a sensibilidade e especificidade. Este ajuste diminui a quantidade de testes confirmatórios, uma vez que o teste de triagem classificará menos amostras como reagentes.

Por outro lado a IFI, utilizada como padrão, pode estar resultando em um grande número de falsos negativos. Novos trabalhos devem ser realizados para comparar os resultados obtidos por EIE a novos métodos de detecção de anticorpos anti-leishmania ou que detectem a presença de parasitos como o RT-PCR. Entretanto, enquanto as confirmações da sorologia para LVC forem realizadas por IFI, o novo do ponto de corte proposto para o EIE poderá promover uma melhor aplicabilidade do teste, pois retornará um menor número de amostras para a IFI, trazendo agilidade e diminuição de custos.

REFERÊNCIAS

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1–88. Review. PubMed PMID:15504537.
- DATASUS [base de dados na internet]. Brasília: Ministério da Saúde. 2012 - Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009[acesso 2012 Nov5]; [cerca de 1 tela]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf.
- Ministério da Saúde (BR). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006 [acesso 2012 Dez 26].120p.Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf
- Abranches P, Santos-Gómes G, Rachamim N, Campino L, Schnur L, Jaffe C. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991Sep;13(5):537-50. PubMed PMID: 1956700.
- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol.* 2006 Aug 31; 140(1-2): 54-60. Epub 2006 Apr 18. PubMed PMID: 16621286.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –IBGE (BR). Rio de Janeiro: IBGE; 2010 [acesso 2012 Nov5]; [cerca de 1 tela].Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/Ceara.pdf.
- Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. *Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. 328 p.
- Rosypal AC, Tripp S, Kinlaw C, Sharma RN, Stone D, Dubey JP. Seroprevalence of canine leishmaniasis and American trypanosomiasis in dogs from Grenada, West Indies. *J Parasitol.* 2010 Feb;96(1):228-9.doi: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2238.1>. PubMed PMID: 19712013.
- Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG, Alves LC, Souza WV, Gomes YM. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the Leishmaniose- visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol.* 2006 Apr 15;137(1-2):11–6. Epub 2006 Jan 30. PubMed PMID: 16446034.
- Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM, Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 2007 May 31;146(3-4):235-41. Epub 2007 Apr 2. PubMed PMID: 17403582.
- Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubachb O, Santos GPL, Nascimento LD, Marzochib MCA, Marzochib KBF. Accuracy of EIE and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009Apr;103(4):383-9. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.019>. Epub 2009 Feb 10. PubMed PMID: 19211118
- Carvalho D, Oliveira TMFS, Baldani CD, Machado RZ. Aenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. *Pesq Vet Bras [Internet].* 2009 Feb [cited 2012 Dec 10];29(2):120-124. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000200006&lng=en&nrm=iso. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000200006>.
- Aguiar DM, Oliveira TM, Cavalcante GT, Labruna MB, Camargo LM, Machado RZ, Gennari SM. Seroprevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in rural dogs from the city of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet [Internet].* 2010 Jan-Mar;19(1):71-2. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612010000100015&lng=en. doi: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901014>. PubMed PMID: 20385065.
- Assis J De, Queiroz NMGP de, Silveira R de CV Da, Nunes CM, Oliveira TMF de S, Noronha Jr ACF De, Neves MF, Machado RZ, Buzetti, WAS. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online) [online].* 2010, vol.19, n.1 [cited 2013-05-14], pp. 17-25. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612010000100005&lng=en&nrm=iso. ISSN 1984-2961. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901004>.
- Zweig MA, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem [Internet].* 1993 Apr [cited 2012 Dec 10]; 39(4):561-77. Review. Erratum in: *Clin Chem* 1993 Aug;39(8):1589. Available from: <http://www.clinchem.org/content/39/4/561.long>. PubMed PMID: 8472349.

Como citar este artigo / How to cite this article:

Medeiros, A. Adequação do ponto de corte do Ensaio Imunoenzimático para Leishmaniose Visceral à imunofluorescência indireta. *J Health Biol Sci.* 2013 Abr-Jun;1(2):55-58.