

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA E DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES*

YOSHIMI IMOTO YAMAMOTO
Professor Assistente
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da USP

VANIA LUCIA BRANDAO NUNES
Professor Titular
Centro de Ciências Biológicas
e da Saúde da UFMS

FRÉDERICO ALMEIDA DE REGO JUNIOR
Médico Veterinário
Departamento de Inspeção e Defesa
gropecuária de Mato Grosso do Sul - IAGRO

ELISA TERUYA OSHIRO
Técnico de Nivel Universitário
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde da UFMS

MARIA ELIZABETH M. CAVALHEIROS DORVAL
Professor Assistente
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde da UFMS

YAMAMOTO, Y.I.; NUNES, V.L.B.; REGO JUNIOR, F.A.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.M.C. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 25(1):143-152, 1988.

RESUMO: A sorologia da leishmaniose visceral em cães não teve, ainda, um estudo de padronização, embora esta espécie animal constitua importante reservatório de *Leishmania donovani*. Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e de hemaglutinação passiva (RHP) para o diagnóstico do calazar canino. Assim, 42 soros de cães com calazar compro-

vado clínica e parasitologicamente e 60 soros de cães clinicamente sadios foram testados. Analisou-se a distribuição de títulos e a eficiência dos testes para os diferentes níveis de limiar de reatividade. Para a eficiência máxima dos testes, o limiar de reatividade foi de 20 e 40 respectivamente para RIFI e RHP. Desta forma, a sensibilidade, a especificidade, a concordância ou a eficiência diagnóstica, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo foram de 0,952, 1,000, 0,983, 1,000 e 0,968 para RIFI e 0,857, 1,000, 0,941, 1,000 e 0,909 para RHP. Concluiu-se que tanto a RIFI quanto a RHP são eficientes para estabelecer o diagnóstico sorológico da leishmaniose canina.

UNITERMOS: Leishmaniose, cães; *Leishmania donovani*; Imunofluorescência; Hemoaglutinação

INTRODUÇÃO

O cão constitui importante elo no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral nas Américas, sendo um dos principais reservatórios de *Leishmania donovani*. Em nosso meio, realizam-se frequentemente inquéritos em cães para estudo da prevalência da leishmaniose, como também para finalidades profiláticas (1,2,3,5). Na década de 1950, utilizava-se exclusivamente a técnica parasitológica para esses propósitos. Mais tarde, a reação de fixação de complemento (RFC) foi introduzida como técnica alternativa para tal investigação, possibilitando o exame de grande número de cães, em tempo relativamente mais curto (3,6,15,21,22). Apesar de ser mais sensível que o exame parasitológico, a RFC apresenta a desvantagem de fornecer resultados inespecíficos anticomplementares em alguns casos de calazar, além de apresentar também uma execução complexa (12). Recentemente, técnicas mais simples que a RFC passaram a ser introduzidas no estudo sorológico do calazar canino, tais como a contraímunoeletroforese (16) e a reação de imunofluorescência indireta (18). Na reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico do calazar humano, os aspectos da padronização quanto a determinação do limiar de reatividade não se acham bem

* Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo e no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

definidos e, em se tratando do calazar canino, as informações a respeito são ainda mais escassas. Além disso, de acordo com a espécie animal, o comportamento do soro pode diferir consideravelmente em relação à sorologia humana, uma vez que são conhecidas algumas diferenças nas propriedades das imunoglobulinas de espécies diferentes, por exemplo quanto à capacidade de fixar complemento, de se ligar à Proteína A de *S.aureus*, de apresentar reações de precipitação, etc. (11,17). Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o desempenho das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e de hemaglutinação passiva (RHP) para a detecção de anticorpos anti *L.donovani* na espécie canina.

MATERIAL E METODOS

SOROS: foram utilizados 42 soros de cães provenientes de Corumbá, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, com calazar comprovado clínica e parasitologicamente, através da demonstração do parasita em material de linfonodo, baço, fígado, medula e de pele e/ou através do exame histopatológico.

Como controle foram analisados 60 soros de cães aparentemente saudáveis, atendidos no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, oriundos da cidade de São Paulo.

Foram também analisados 6 soros de cães com leishmaniose tegumentar americana e 1 soro de cão com *Trypanosoma evansi*.

Reação de Imunofluorescência Indireta: foi realizada com formas promastigotas de *Leishmania donovani*, amostra Co 42, isolada de cão de Corumbá em 1983, (19). Para preparação do antígeno, baço e fígado de hamster infectado foram homogeneizados e semeados no meio de NNN (Neal, Novy e Nicolle), com fase líquida constituída de infusão de cérebro e coração (BHI). Após 6 dias de cultivo a 28°C, as formas promastigotas foram lavadas em solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST) e tratadas com formolina a 2% em SST, à temperatura ambiente, por 24 horas. Para análise dos soros utilizou-se a técnica descrita por GUIMARAES et alii, 9, realizando-se diluições seriadas a partir de 1/5, com razão 2 e empregando-se o conjugado fluorescente antigamaglobulina de cão*. As leituras foram feitas em microscópio de

luz U.V., marca Nikon, sistema de epifluorescência com lâmpada de halogênio, filtro de excitação B, filtro de barreira 515 W, objetiva 40x e ocular 10x.

Reação de Hemaglutinação Passiva: foi utilizado um extrato protéico de *L.brasiliensis* cepa 49 para sensibilização das hemácias humanas. A preparação do reagente, bem como a técnica utilizada, foram processadas conforme descrito anteriormente (23). Os soros foram analisados em diluições seriadas, ao dobro, a partir de 1/5. Para a detecção de aglutininas inespecíficas utilizou-se uma suspensão constituída apenas de hemácias humanas taninizadas.

Média geométrica dos títulos:

Todos os títulos foram transformados em log 10 e a média aritmética foi convertida em correspondente anti-log.

Os índices de especificidade, sensibilidade, valor preditivo e de eficiência foram calculados segundo GALEN & GAMBINO, 7 e GRINER et alii, 8.

RESULTADOS

Os resultados das reações de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação passiva, obtidos em soros de cães saudáveis e de cães com calazar, estão expressos na Tab. 1 e nas Fig. 1 e 2. O coeficiente de correlação entre os títulos de RIFI e de RHP em soros de cães com calazar foi de $r = 0,7314$. O teste *t* indicou que existe dependência do título de RIFI em relação ao título de RHP, ao nível de 95% de confiança. As Fig 1 e 2 mostraram a especificidade das duas reações estudadas, sendo que o título da maioria dos soros positivos variou de 40 a 5120 e de 20 a 10240, respectivamente para RHP e para RIFI. A média geométrica do título foi de 413 para RHP e 420 para RIFI.

Os índices de especificidade, sensibilidade e de concordância ou eficiência diagnóstica foram calculados para diversos níveis de limiar de reatividade e estão expressos nas Fig. 3 e 4. Com o aumento progressivo do limiar de reatividade a especificidade aumenta, chegando ao máximo de 100%, enquanto que a sensibilidade decresce. Por outro lado, a eficiência atinge um valor máximo e depois decresce.

Os soros analisados permitiram es-

* Gentilmente cedido pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

tipular o limiar de 20 para RIFI e 40 para RHP. Assim, os índices avaliadores dessas reações puderam ser determinados com base nos resultados das Tab. 2 e 3. Nestas circunstâncias, foram obtidos os seguintes índices para RIFI: sensibilidade 0,952, especificidade 1,000, concordância ou eficiência diagnóstica 0,983, valor preditivo positivo 1,000 e valor preditivo negativo 0,968. Para a RHP os índices foram: sensibilidade 0,857, especificidade 1,000, concordância ou eficiência diagnóstica 0,941, valor preditivo positivo 1,000 e valor preditivo negativo 0,909.

Para análise de reações cruzadas, 6 soros provenientes de cães com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e 1 soro de cão infectado por *Trypanosoma evansi* foram submetidos às duas reações em estudo. Os resultados contidos na Tab. 4 mostraram que todos os soros testados apresentaram resultados positivos com o antígeno Co42. Os resultados positivos dos cães com LTA na RHP já eram esperados, uma vez que se utilizou reagente preparado com amostra de *Leishmania homóloga*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As médias geométricas dos títulos das reações estudadas foram semelhantes, sendo de 420 e de 413 respectivamente para RIFI e RHP. Se selecionarmos apenas os cães com exame parasitológico positivo por aposição de órgãos (33 casos), a média geométrica passa a ser um pouco mais elevada, de 850 para RIFI e de 1010 para RHP. Em 1979 LANOTTE et alii, 13, estudando cães com leishmaniose visceral patente, encontraram igualmente altos títulos de anticorpos para RIFI, obtendo a média geométrica de 1237. Estes títulos de cães com calazar não diferem muito dos resultados encontrados na RIFI, por LANOTTE et alii, 14, em soros humanos com leishmaniose visceral, os quais foram 321 e de 1218 respectivamente para crianças (1 a 10 anos) e adultos (30 a 40 anos).

A escolha do limiar de reatividade ou "cut off" de 20 e 40 respectivamente para RIFI e RHP baseou-se no fato de que, neste ponto, a eficiência diagnóstica do teste adquire o valor máximo (Fig. 3 e Fig. 4). Embora títulos de 40 e 100 tenham sido empregados por diferentes autores (10, 18), como limite de

positividade na RIFI, a utilização do título 20 fornece um teste de alta sensibilidade (95,2%) e com especificidade de 100%; porém, se incluídos os casos de outros tripanossomatídeos, este último índice passa a ser de 90%. Um teste sorológico sensível seria de grande utilidade em inquéritos populacionais, pois somente desta forma poderia detectar casos de leishmaniose assintomática, bem como aqueles com níveis reduzidos de anticorpos. A existência de cães com leishmaniose visceral, porém sem sintomatologia específica, foi relatada por diversos autores (2, 13, 20). Títulos baixos de 20 e 40 na RIFI foram frequentemente observados por LANNOTE et alii, 12, em cães com leishmaniose diagnosticados pelo isolamento do parasita.

Na Tab. 4 foram observadas reações cruzadas entre o antígeno de *L. donovani* (Co42) e os soros de cães com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e com *Trypanosoma evansi*, analogamente à reatividade cruzada existente entre as leishmanioses e a doença de Chagas em soros humanos (4,5). Esta reatividade ocorreu em títulos relativamente baixos, ou seja, de até 80 na RIFI e também na RHP, no caso do soro de cão infectado por *T. evansi*.

Ressalta-se que, no presente trabalho, os autores tiveram a preocupação de usar uma amostra de *Leishmania homóloga* para se obter melhor resultado na RIFI. Assim, utilizou-se a cepa de *L. donovani* Co42, isolada de um cão de Corumbá, município onde foram coletados os soros positivos. Já com a RHP, que exige grande quantidade de antígeno parasitário no preparo do reagente, os autores não tiveram o mesmo sucesso, em vista do pouco crescimento dessa cepa homóloga no meio de NNN/BHI. Assim, foi empregada amostra heteróloga de *L. brasiliensis* que tem a vantagem de fornecer reatividade cruzada com os soros de calazar. A sensibilidade relativamente mais baixa por nós verificada na RHP talvez seja explicada parcialmente pela utilização dessa cepa heteróloga.

Embora alguns autores (10) utilizem o critério de que somente títulos ≥ 160 , ou ainda, a soroconversão teriam valor diagnóstico, devido às reações de grupo existentes entre os tripanossomatídeos, foram estabelecidos, no trabalho, os limiares de reatividade mais baixos, com o objetivo de detectar com eficiência as infecções causadas por *Leishmania*, principalmente em inquéritos populacionais. Desta forma, não se teve a intenção de discriminar a leishmaniose visceral da

leishmaniose tegumentar, pois esta distinção poderá ser realizada através de dados clínicos e epidemiológicos.

Deve-se lembrar, ainda, que na região de Corumbá há ocorrência de *Trypanosoma evansi* em cães (NUNES, 1986*) e que na interpretação dos resultados sorológicos o aspecto clínico dos animais deve ser considerado.

Os nossos achados parecem se assemelhar aos de sorologia humana reportados por apenas alguns autores (5) pois a literatura não é muito consistente a respeito dos parâmetros aqui estudados. Contudo, pode-se concluir que tanto a RIFI quanto a RHP são eficientes em estabelecer o diagnóstico sorológico da infecção de cães por *L. donovani*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara por ter fornecido soros de cães saudáveis e à Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu pela colaboração na interpretação de resultados.

YAMAMOTO, Y.I.; NUNES, V.L.; REGO JUNIOR, F.A.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.M.C. Efficiency of the fluorescent antibody and indirect hemagglutination (IHA) tests for the diagnosis of the canine visceral leishmaniasis. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 25(1): 143-152, 1988.

SUMMARY: Dogs are the main reservoir of *Leishmania donovani*, however, better standardization of serological tests for the diagnosis of canine Calazar still has to be done. Thus, in this paper the fluorescent antibody (FA) and indirect hemagglutination (IHA) tests for this diagnostic purpose were standardized and evaluated in 42 sera from animals with clinical and parasitological diagnosis of Calazar and 60 sera from healthy dogs. The stipulated cut-offs for FA and IHA tests were, respectively, 20 and 40. The indices of sensibility, specificity, efficiency, positive and negative predictive values for FA tests were as follow: 0.952, 1.000, 0.983, 1.000 and 0.968 and, for the IHA test: 0.857, 1.000, 0.941, 1.000 and 0.909. It was concluded that both FA and IHA tests are efficient for the diagnosis of canine leishmaniasis.

UNITERMS: Leishmaniasis of dogs; *Leishmania donovani*; Fluorescent antibody technique; Haemagglutination

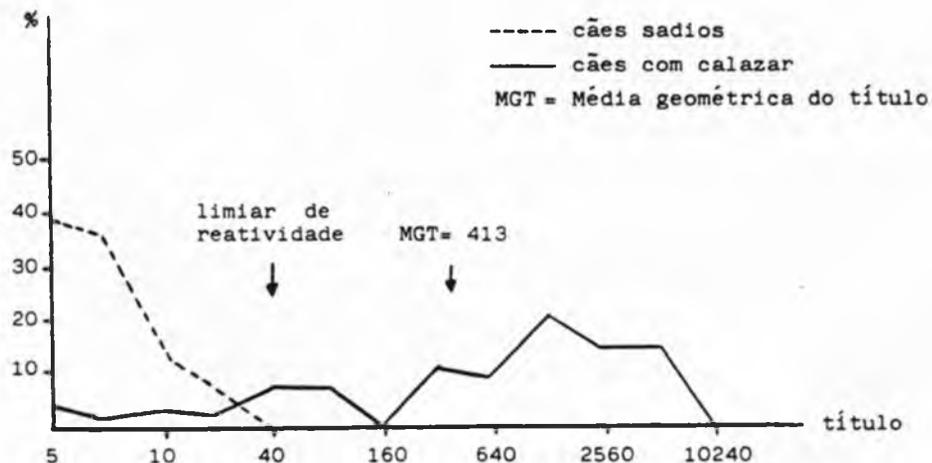


FIGURA 1 — Distribuição da frequência em percentagem de títulos da reação de hemaglutinação passiva (RHP) em soros de cães saudáveis e com calazar, Corumbá (MS), 1984

* Comunicação pessoal

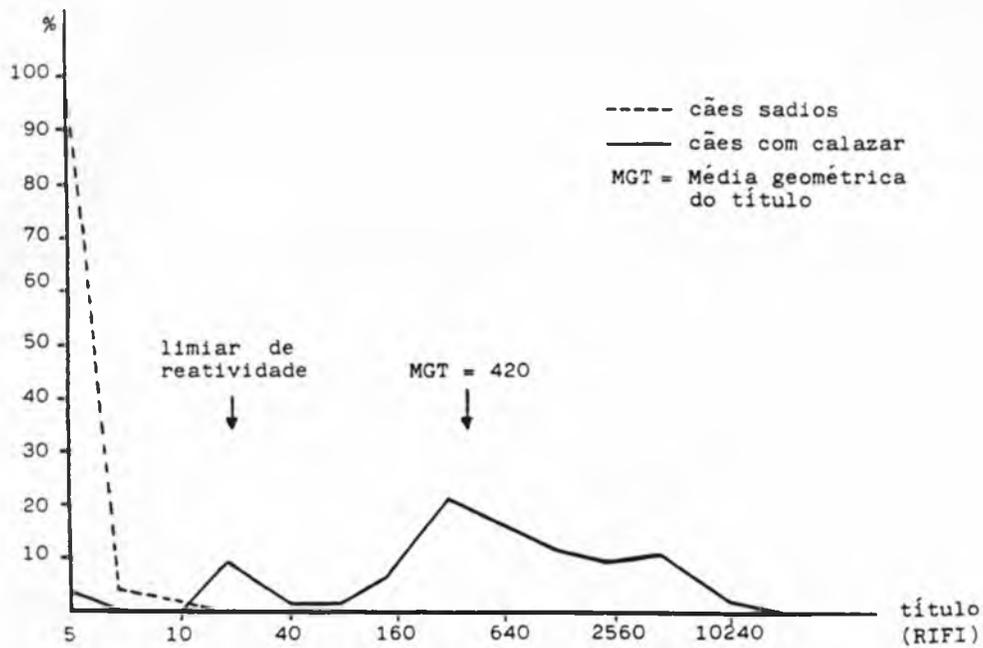


FIGURA 2 – Distribuição de frequência de títulos da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em soros de cães sadios e com calazar, Corumbá (MS), 1984

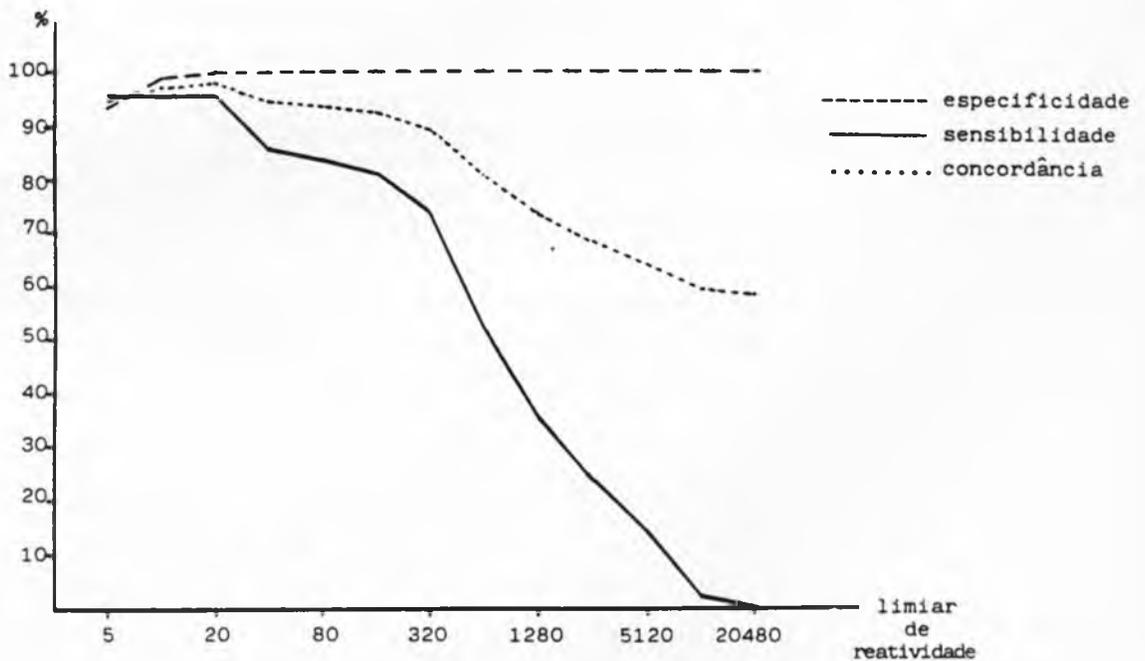


FIGURA 3 – Distribuição da especificidade, sensibilidade e da concordância da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em soros de cães sadios e com calazar de acordo com o limiar de reatividade, Corumbá (MS), 1984

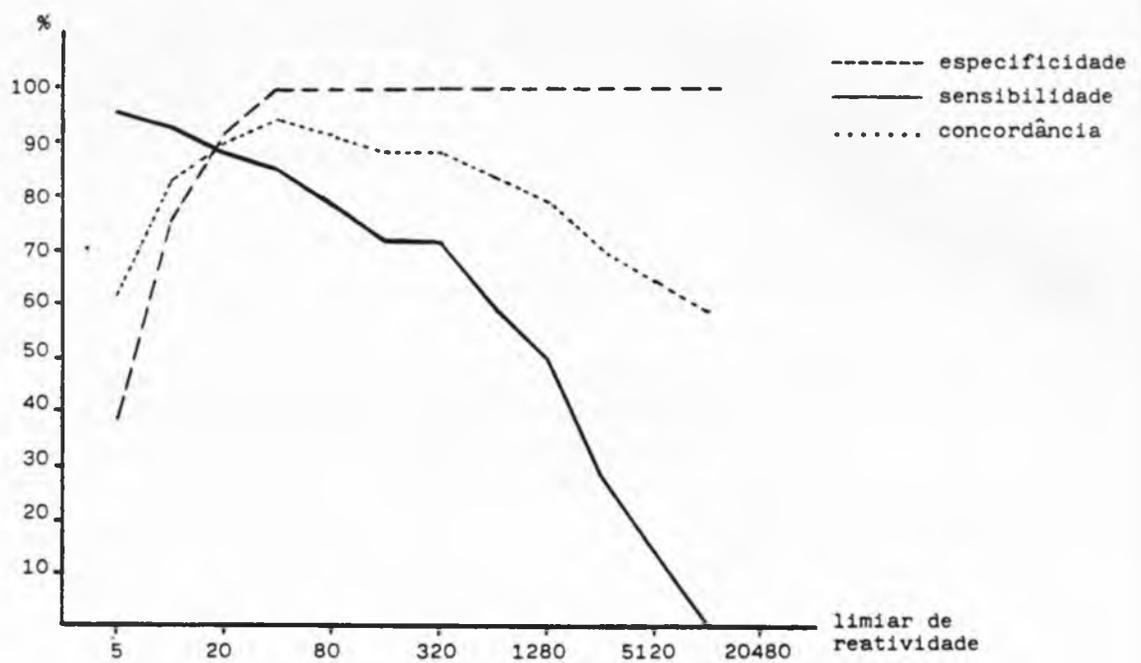


FIGURA 4 – Distribuição da especificidade, sensibilidade e concordância da reação de hemaglutinação passiva (RHP) em soros de cães saudáveis e com calazar de acordo com o limiar de reatividade, Corumbá (MS), 1984

TABELA 1 – Resultados das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e de hemaglutinação passiva (RHP) em 42 soros de cães com calazar, Corumbá (MS), 1984

Título RIFI Título RHP	< 5	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	TOTAL
< 5	1			1										2
5				1										1
10				1				1						2
20							1							1
40	1					1		1						3
80				1			1		1					3
160														0
320					1		1	2		1				5
640									1	1	2			4
1280								3	3	2	1			9
2560								1	2		1	2		6
5120									1	1		3	1	6
TOTAL	2	0	0	4	1	1	3	9	7	5	4	5	1	42

TABELA 2 – Resultados das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) em soros de cães sadios e com calazar (limiar de reatividade 20), Corumbá (MS), 1984

RIFI RESULTADOS	Cães		TOTAL
	COM CALAZAR N.	SADIOS N.	
Reagentes	40	0	40
Não reagentes	2	60	62
Total	42	60	102

TABELA 3 – Resultado da reação de hemaglutinação passiva (RHP) em soros de cães saudáveis e com calazar (limiar de reatividade 40), Corumbá (MS), 1984

RIFI RESULTADOS	Cães		TOTAL
	COM CALAZAR N.	SADIOS N.	
Reagentes	36	0	36
Não reagentes	6	60	66
Total	42	60	102

TABELA 4 – Resultados das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e de hemaglutinação passiva (RHP) em soros de cães com Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e *Trypanosoma evansi*, Corumbá (MS), 1984

Cães	Reação	
	RIFI Título	RHP Título
Com LTA		
1	80	320
2	40	<20
3	20	20
4	40	40
5	80	320
6	80	320
Com T.evansi	80	80

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ALENCAR, J.E.; ALMEIDA, Y.M.; SILVA, Z.F.; PAIVA, A.S.; FONSECA, M.F. Aspectos atuais do calazar no Ceará. Rev. bras. Malariol. Doenc Trop., 26/27:27-53, 1974-1975.
- 2 - ALENCAR, J.E. & CUNHA, R.V. In-
quéritos sobre calazar canino no Ceará - novos resultados. Rev. bras. Malariol. Doenc Trop., 15:391-404, 1963.
- 3 - ALENCAR, J.E.; PESSOA, E.P.; COSTA, O.R. Calazar em Santarém, estado do Pará, 1961. Rev. bras. Malariol. Doenc Trop., 14:371-377, 1962.

- 4 - AMATO NETO, V.; SILVA, L.J.; CAMARGO, M.E. Resultados de reações para diagnóstico da Doença de Chagas, executadas com soros de pacientes acometidos de leishmaniose visceral. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 19:99-102, 1977.
- 5 - CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 18:500-506, 1969.
- 6 - CUNHA, R.V.; ALENCAR, J.R.; ANDRADE, F.B. Uso da reação de fixação do complemento para diagnóstico de calazar canino em inquéritos de massa. *Rev. bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 15:405-410, 1963.
- 7 - GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York, John Wiley, 1975. 237p.
- 8 - GRINER, P.F.; MAYEWSKI, R.J.; MUSHLIM, A.I.; GREENLAND, P. Selections and interpretation of diagnostic test and procedures. Principles and applications. *Ann. Int. Med.*, 94:557-600, 1981.
- 9 - GUIMARAES, M.C.S.; GIOVANNINI, V.L.; CAMARGO, M.E. Antigenic standartization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. Trop.S.Paulo*, 16:145-148, 1974.
- 10 - IVERSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REICHMANN, M.L.A.B.; ANDRADE, E.A.; TOLEZANO, J.E. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo, Brasil (1979-1982). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 25:310-317, 1983.
- 11 - KABAT, E.A. & WU, T.T. Attempts to locate complementary determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 190:382-393, 1971.
- 12 - LANOTTE, G.; RIOUX, A.; CROSET, H.; VOLLHARDT, Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7. Déspitage de l'enzootie canine par les methodes immunosérologiques. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 49:41-62, 1974.
- 13 - LANOTTE, G.; RIOUX, A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10 Les formes de la leishmaniose viscérale canine. Elaborations d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 54:277-295, 1979.
- 14 - LANOTTE, G.; RIOUX, A.; PRATLONG, F. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 14. Les leishmanioses humaines en Cévennes. Analyse clinique et biologique des formes viscérales et muqueuses. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 55:635-643, 1980.
- 15 - MAGALHAES, P.A.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; BATISTA, S.M.; MICHALIK, M.S.M.; WILLIAMS, P. Calazar na zona do Rio Doce - Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 22:197-202, 1980.
- 16 - MANSUETO, S.; MICELI, M.D.; QUATTARARO, P. Counter-immunoelectrophoresis (CIEP) and ELISA tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 76:229-231, 1982.
- 17 - MILSTEIN, C. & PINK, J.R.L. Structure and evolution of immunoglobulins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 21:209-263, 1970.
- 18 - QUILICI, M.; DUNAN, S.; RANQUE, J. L'immunofluorescence dans les

- leishmanioses. Comparaison avec la reaction de fixation du complement. *Med. trop.*, 28:37-43, 1968.
- 19 - REGO JUNIOR, F.A.; NUNES, V.L.B.; PEREIRA, M.J.S.; CAVALHEIROS, M.E.M.; SILVA, R.P.; BARROS, E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá, MS. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE PARASITOLOGIA, 8., São Paulo, 1983. *Anais.* p.2.
- 20 - SANCHES, R.; VITU, C.; GIAUFRET, A. Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. II. Evolution des testes biologiques dans la maladie experimentale. *Rev. Med. vet. (Toulouse)*, 127:1191-1202, 1976.
- 21 - SHERLOCK, I.A. & ALMEIDA, S.P. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia - II. Leishmaniose canina. *Rev. bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 21:535-539, 1969.
- 22 - SHERLOCK, I.A. & ALMEIDA, S.P. Notas sobre leishmaniose canina no estado da Bahia. *Rev. bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 22:231-242, 1970.
- 23 - YAMAMOTO, Y.I.; CENEVIVA, A.C.; MOURA, R.A.A. Leishmaniose cutâneo-mucosa. Reações de hemaglutinação passiva e de contraimunoeletroforese com antígeno de *Leishmania brasiliensis*. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 17:123-132, 1981.

Recebido para publicação em 24/06/87
Aprovado para publicação em 10/11/87