



AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO POR ELISA PARA LEISHMANIOSE EM CÃES DO PARAGUAI

Stefanía Fraenkel*, Maria Jose Tintel, Oscar Salvioni, Natalia Ramírez Centurión, Paola Arze, Miriam Rolón, Antonieta Rojas de Arias, Maria Celeste Vega

Centro para el Desarrollo de Investigación Científica – CEDIC, Manduvirá 635 entre 15 de Agosto y O'Leary, Paraguay

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada por parasitas flagelados do gênero *Leishmania*. A doença é transmitida por picadas de flebotomos e os cães são os principais reservatórios domésticos de parasitas¹. Em clínicas veterinárias, o método mais comumente utilizado para o diagnóstico sorológico de leishmaniose em cães é o teste de ELISA comercial. Este teste é realizado a espécimes que apresentam sinais, sintomas clínicos e/ou resultados laboratoriais comumente relacionados a essa doença. No entanto, esses parâmetros podem estar relacionados com outras doenças infecciosas ou distúrbios imunomediados^{2,3}. Dada a importância epidemiológica dos cães no controle da leishmaniose e a necessidade de determinar o real impacto da infecção em áreas endêmicas, é essencial o uso de testes diagnósticos eficientes, que não subestimem ou superestimem a incidência ou a prevalência da doença. Além disso é importante que produzam resultados confiáveis que minimizem reações falso-positivas e reações cruzadas com outros microrganismos infecciosos^{4,5}. Com base no exposto acima, foi proposto avaliar a eficácia das técnicas de ELISA para diagnóstico utilizadas em laboratórios veterinários do Departamento Central do país, a traves da comparação com o diagnóstico microscópico e molecular por PCR em tempo real.

METODOLOGIA

Amostras de aspirado de medula foram retiradas de 15 cães que foram diagnosticados com leishmaniose mediante métodos comerciais de ELISA de diferentes laboratórios de diagnóstico veterinário do Departamento Central, sendo este departamento considerado uma área endêmica do país⁶.

As amostras corresponderam a 9 machos e 6 fêmeas que não foram tratados farmacologicamente nem imunizados. Todas as amostras foram coradas com Giemsa 10% e visualizadas com microscópio ótico em objetivo de imersão 100% para a busca de amastigotas.

A extração e purificação de DNA das amostras foi realizada utilizando o kit comercial GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific®), seguindo as instruções do fabricante. A pureza do material genético extraído foi avaliada utilizando um espectrofotômetro.

As amostras foram submetidas por PCR em tempo real utilizando os iniciadores para a amplificação da região espaçadora do transcrito interno 1 do gene do RNA ribossomal (ITS-1) específico para o gênero *Leishmania* publicados por Almeida et al. seguindo o protocolo descrito⁷. Uma vez concluídas todas as análises, os resultados obtidos foram comparados entre as diferentes técnicas avaliadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela N°1: Comparação de métodos diagnósticos de leishmaniose

CODIGO	Diagnóstico imunológico (ELISA)	Diagnóstico Microscópico	Diagnóstico molecular por PCR em tempo real
L14	Positivo	Negativo	Negativo
L15	Positivo	Negativo	Negativo
L16	Positivo	Negativo	Negativo
L22	Positivo	Negativo	Negativo
L25	Positivo	Negativo	Negativo
L29	Positivo	Negativo	Negativo
L55	Positivo	Negativo	Negativo
L59	Positivo	Negativo	Negativo
L66	Positivo	Negativo	Negativo
L67	Positivo	Negativo	Negativo
L90	Positivo	Negativo	Negativo
L95	Positivo	Negativo	Negativo
L96	Positivo	Negativo	Negativo
L99	Positivo	Negativo	Negativo
L106	Positivo	Negativo	Negativo

Amastigotas não foram observadas em nenhuma das amostras analisadas por microscopia ótica. As análises moleculares de todas as amostras também mostraram resultados negativos. Controles positivos e negativos foram utilizados nas reações de PCR.

A técnica de ELISA é o método mais utilizado em laboratórios veterinários para o diagnóstico de leishmaniose em cães do Departamento Central de Paraguai. Um diagnóstico correto da doença não apenas permite o manejo adequado do animal, mas também fornece importantes dados epidemiológicos e permite tomar medidas de controle e prevenção^{5,8}.

Vários autores fizeram comparações entre o diagnóstico de leishmaniose por ELISA e o diagnóstico por diferentes métodos moleculares e relataram em todos os casos uma maior sensibilidade nos últimos⁹⁻¹². Outros autores relataram casos de reações cruzadas devido à presença de outros patógenos em testes diagnósticos sorológicos para leishmaniose^{4,13}.

É importante destacar que em estudos paralelos realizados a estas amostras, a presença de *Ehrlichia canis* foi detectada na amostra L90. Este resultado foi evidenciado com PCR em tempo real utilizando primers específicos para a espécie. Por outro lado, a amostra L29 foi imunologicamente positiva para *Toxoplasma sp.*

Baseado nos resultados expostos acima, a necessidade de métodos eficazes de diagnóstico para esta doença é evidente.

CONCLUSÃO

Esses resultados mostraram uma baixa especificidade das técnicas imunológicas disponíveis localmente, gerando resultados falso-positivos. Uma das possíveis causas de falsos-positivos é a existência de reações cruzadas entre antígenos de outros patógenos, razão pela qual o uso de técnicas moleculares para diagnóstico é altamente recomendado. Nosso grupo de pesquisa tem como objetivo determinar molecularmente o espectro de infecções que causam reações cruzadas com as técnicas de ELISA comerciais usadas para o diagnóstico sorológico da leishmaniose no Paraguai.

AGRADECIMENTOS

Ao Projeto de Pesquisa Educação Investigação e Biotecnologia Aplicada à Saúde. FOCEM / MERCOSUL COF N° 03/11.

A Fabiola Roman pela assistência na tradução ao português.

REFERÊNCIAS

- Murray HW *et al.* Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-1577.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354(0140-6736):1191-1199.
- Andreadou M *et al.* Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. *Exp Parasitol*. 2012;131(4):419-424.
- Zanette MF *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):105-107.
- Srividya G *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012;110(3):1065-1078.
- SENEPA. Evaluación de programas públicos - Informe final. 2012:1-235.
- Almeida ME *et al.* Detection and Differentiation of *Leishmania* spp. in Clinical Specimens by Use of a SYBR Green-Based Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2017;55(1):281-290.
- Mohebbali M *et al.* Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta Trop*. 2007;103(1):33-40.
- Salotra P *et al.* Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: A comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol*. 2003;56(11):840-843.
- Aviles H *et al.* PCR Detection and Identification of *Leishmania* Parasites in Clinical Specimens in Ecuador: A Comparison with Classical Diagnostic Methods. *J Parasitol*. 1999;85(2):181-187.
- Fallah E *et al.* Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. *African J Biotechnol*. 2011;10(4):648-656.
- Shang LM *et al.* The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. *Parasites and Vectors*. 2011;4:1-9.
- Nunes CM *et al.* Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal study Testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em estudo longitudinal. *Braz J Vet Parasitol Jaboticabal*. 2015;24(4):402-409.