

## TESTES SOROLÓGICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS NA INTERPRETAÇÃO

JOARA TYCZKIEWICZ DA COSTA<sup>1</sup>; VITÓRIA FERNANDES DA SILVA<sup>2</sup>; MARIA EDUARDA RODRIGUES<sup>3</sup>; ANA CLARA DORNELLES REICHOW<sup>4</sup>; TÁBATA PEREIRA DIAS<sup>5</sup>; MARLETE BRUM CLEFF<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – joaracosta26@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – mv.vitoriafernandes@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - eduarda.rodrigueset@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – reichowmedvet@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - tabata\_pd@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de caráter zoonótico, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (BR) (BRASIL, 2014), sendo o diagnóstico obtido através de exames sorológicos, parasitológicos ou técnicas moleculares (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). O protocolo diagnóstico pela vigilância epidemiológica no país é realizado em duas etapas, iniciando pelo teste rápido (TR) de duplo percurso para triagem DPP® (*Dual Path Platform DPP®*) e posterior confirmação por ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo a norma técnica vigente (BRASIL, 2011). O DPP® (Bio-Manguinhos) apresenta especificidade entre 87,5 a 91,7% e sensibilidade entre 92 a 100% sendo esses parâmetros menores em amostras de animais assintomáticos (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Existem também testes rápidos sorológicos comerciais, que podem ser usados por médicos veterinários autônomos para triagem, como o teste imunocromatográfico de fluxo lateral *Leishmania Ab ECOVet®*, que tem sensibilidade de 93,2% e especificidade de 91,3%. Segundo Grimaldi *et al.* (2012), apesar dos testes imunocromatográficos serem de fácil execução, podem apresentar resultados variados de acordo com a presença ou não da sintomatologia nos animais testados, uma vez que os sinais clínicos geralmente são proporcionais a titulação de anticorpos.

Diante de diversas particularidades referentes à enfermidade e as manifestações nos animais, os imunoenaios podem resultar em resultados falsos positivos e falsos negativos, impactando na conduta médica e consequentemente no prognóstico dos pacientes (ANDRIOLO *et al.*, 2018). Entre outros motivos, componentes naturais nas amostras como proteínas, carboidratos e lipídeos estão entre os fatores que podem interferir na leitura do teste (ANDRIOLO *et al.*, 2018). Assim, a interpretação dos testes diagnósticos para LVC deve ser criteriosa porque pode condenar o paciente a eutanásia, pois esta é a estratégia de controle da enfermidade ainda recomendada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de um segundo teste rápido para detectar cães fracamente positivos considerados indeterminados pelo DPP®, a fim de ampliar as opções de diagnóstico da LVC nos pacientes assintomáticos, assim como analisar as possíveis interferências da amostra na interpretação dos testes.

## 2. METODOLOGIA

As amostras de soro de cães foram identificadas e testadas com TR DPP® conforme instruções do fabricante, sendo consideradas positivas (formação de duas linhas, controle e teste), negativas (formação de apenas uma linha no controle) e quando houve revelação de cor pouco intensa na linha teste foram consideradas como “indeterminado”. No trabalho foram testados para LVC e analisados 742 soros de cães, provenientes de soroteca de animais atendidos no Hospital de Clínica Veterinária (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As amostras que tiveram seus resultados como indeterminados no TR DPP®, foram testadas no Ab ECOVet®. Os soros foram ainda analisados quanto aos parâmetros considerados relevantes para o estudo de possíveis interferências como: presença de icterícia, lipemia e hemólise. Os integrantes do projeto analisaram as amostras separadamente, classificando-as visualmente quanto a presença ou ausência das alterações. Posteriormente, o grupo composto por quatro observadores realizou a média dos resultados obtidos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 742 soros utilizados, 11 (1,5%) apresentaram resultado indeterminado no teste DPP®, sendo o restante, 98,5%, negativos. Devido a disponibilidade de amostra, nove dos soros inconclusivos no DPP® foram testados no Ab ECO®, sendo que todos apresentaram resultados negativos neste teste. Assim obteve-se nove amostras discordantes entre os testes rápidos, diante dos resultados, aparentemente o teste Ab ECO® foi capaz de identificar animais negativos, que apresentaram-se inconclusivos no DPP®. Embora o pequeno número de amostras discrepantes, isso pode ter ocorrido devido a diferença entre os testes, o DPP® utiliza o antígeno recombinante rK28 (uma quimera que combina os antígenos K9, K26 e K39) de *L. infantum* e detecta imunoglobulinas específicas anti-*L. infantum*. O teste Leishmania Ab ECO® Vet-TRV.0004 também detecta as mesmas imunoglobulinas, porém utiliza o antígeno rKDDR, composto por 19 aminoácidos.

Vistas as limitações associadas ao exame parasitológico, os métodos sorológicos continuam sendo ferramentas úteis para o diagnóstico acurado da LVC, sendo técnicas pouco invasivas, acessíveis para grande parte dos clínicos veterinários e de maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Entretanto alguns trabalhos têm evidenciado possíveis interferentes da amostra nos resultados dos testes rápidos, como por exemplo presença de hemólise (ANDRIOLO *et al.*, 2018).

Dentre as 11 amostras, nenhuma apresentou icterícia ou hemólise, no entanto, a lipemia foi identificada em oito (72,72%). Apesar da hemólise ser a alteração pré-analítica mais presente em amostras de soro e a mais propícia a causar interferências em testes laboratoriais (ALMEIDA, 2011), nesse trabalho ela não foi observada entre os soros que resultaram inconclusivos no DPP® e negativos no Ab ECO®, provavelmente não sendo uma possível causa de interferência nos resultados.

Segundo a literatura, amostras com altas concentrações de triglicérides e colesterol podem causar falsos negativos em testes bioquímicos, uma vez que existe a possibilidade do excesso de lipídios bloquear o acesso ao anticorpo da amostra lipêmica, dificultando assim a sua detecção pelo imunoensaio (ANDRIOLO *et al.*, 2018). Entretanto, outros trabalhos, os quais tinham como objetivo a validação de testes imunocromatográficos para a detecção do vírus da imunodeficiência humana

(HIV), as amostras lipêmicas não interferiram nos resultados dos testes de triagem, mesmo aquelas as quais passaram várias vezes pelo processo de congelamento e descongelamento (NICOLLETE, 2019), contudo, isso não é uma regra e outros testes podem ser sensíveis a esse processo. Nossos achados referentes ao teste DPP® vão ao encontro do relatado por ANDRIOLO *et al.* (2018), uma vez que oito (72,72%) dos 11 soros considerados inconclusivos eram lipêmicos. Isso pode ter ocorrido por ligação dos triglicerídeos das amostras a alguma substância, o que pode ter bloqueado o acesso do anticorpo no teste. Porém, essa explicação não se aplica ao Ab ECO®, visto que todos os soros foram negativos nesse teste. Desta forma, questiona-se se a presença de lipemia nas amostras foi realmente responsável pela resposta inconclusiva gerada no DPP®, a qual não foi detectada no ECO®, ou se outros fatores estiveram envolvidos.

Atualmente, os TR são muito utilizados devido às suas vantagens, como baixo custo, rapidez e fácil utilização. Porém, alguns estudos mostram que devido à baixa sensibilidade e especificidade durante a janela imunológica da infecção, podem ocorrer com maior frequência resultados falsos negativos, uma vez que o animal infectado ainda não soroconverteu e não produziu os anticorpos que seriam detectados nesses testes. Além disso, a baixa titulação de anticorpos também pode ser um fator limitante para o diagnóstico sorológico de animais assintomáticos (DOMINGOS, 2012).

A qualidade dos testes sorológicos para o diagnóstico de doenças infecciosas vai depender tanto de fatores intrínsecos ao paciente, como a fase da infecção, quanto das características do teste, incluindo sensibilidade, especificidade, possibilidade de reações cruzadas com outros agentes bem como a prevalência da enfermidade onde o animal vive (BRASIL, 2014). Reações cruzadas nos testes sorológicos com patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babésia* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* não podem ser descartadas como possíveis causas da linha teste com coloração branda, considerada inconclusiva no DPP® e observada em nosso estudo, mas para excluir ou adicionar essas causas seria necessário avaliar estas amostras para essas enfermidades.

O diagnóstico de uma doença como a LVC é de suma importância para o controle da mesma, sendo necessárias ferramentas de diagnóstico que identifiquem com precisão os animais infectados. Falhas que levem a um diagnóstico equivocado, com falsos positivos, podem acarretar a exposição dos animais a tratamentos desnecessários, encaminhamento para a eutanásia ou abandono pelos tutores. Por outro lado, animais com falso negativo se tornarão portadores e disseminadores da doença (SILVA, 2016), sendo de relevância sua identificação, caracterizando assim a importância de avaliações com maior número de amostras possíveis comparando testes na busca de resultados mais fidedignos.

#### 4. CONCLUSÕES

Em nove amostras, o teste Ab ECO® foi capaz de identificar animais negativos, que apresentaram-se inconclusivos no DPP®. Frente aos resultados observados foi possível concluir que alterações pré-analíticas como a lipemia podem interferir na interpretação dos resultados do teste sorológico DPP® porém, devido ao número baixo de amostras inconclusivas não pode-se afirmar esta hipótese. No entanto, sendo o DPP® o teste de triagem recomendado pelo Ministério da Saúde para o controle da LVC, esta é uma lacuna que deve ser preenchida a partir da realização de trabalhos com número maior de amostras voltados na discussão dessa questão.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, B. F. M. Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 5, n. 1, p. 12-17, 2011.
- ANDRIOLO, A. *et al.* **Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML) : fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais.** Manole, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** v. 1, Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Acessado em 05 ago. 2023. Online. Disponível em: [https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)
- DOMINGOS, I. H. Teste rápido TR-DPP® No Contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. **Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, 2012.
- FIGUEIREDO, F. B. *et al.* Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e180260, 2018.
- FRIOCRUZ. **DPP® Leishmaniose Canina.** Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 2020. Acesso em 20 de ago 2023. Online Disponível: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/en-us/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>
- GRIMALDI, G. *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, n.1, p.54–59, 2012.
- JUNIOR, L.; DE SANTANA, M. V. Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica Conjunta nº01/2011- Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) – CGDT-CGLAB/DEVIT. Brasília: **Diário Oficial da União.** 2011
- NICOLLETE, D. R. P. Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico do HIV. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, 2019.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- SANTOS, W. M. *et al.* A concentração de hemoglobina bovina é viável em sangue armazenado por até 14 dias. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 1, p. 76-79, 2017.
- SILVA, R. *et al.* Aspectos epidemiológicos da LVC na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 625-629, 2016.