

CONTROLO DE QUALIDADE DA TÉCNICA DE MICRO-ELISA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA*

ISABEL MAURÍCIO, LENEA CAMPINO, PEDRO ABRANCHES

Disciplina de Protozoologia. Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais
Universidade Nova de Lisboa. Lisboa

RESUMO

A leishmaniose visceral ou kala-azar é, em Portugal, uma zoonose cujo reservatório é o cão. Neste trabalho realizou-se o controlo de qualidade da técnica de micro-ELISA, tendo como referência a técnica de IFI a mais utilizada no diagnóstico desta protozoose. O estudo foi efectuado simultaneamente em soros humanos e caninos. Para o cálculo do limiar de significância aplicaram-se três métodos diferentes: $X+2dp$ (média de soros negativos mais dois desvios padrão), P/N e índice J. Usaram-se como parâmetros de qualidade a sensibilidade, a especificidade, a eficácia e o valor preditivo positivo. Fixou-se o limiar para soros humanos em 0.100 A, com 100% de sensibilidade, 90.5% de especificidade, 95.3% de eficácia e 91.4% de valor preditivo positivo, e para soros caninos em 0.200 A, com 80.0% de sensibilidade, 94.3% de especificidade, 87.7% de eficácia e 96.6% de valor preditivo positivo. Observou-se que a reprodutibilidade não é plenamente satisfatória e propõem-se duas formas de a melhorar: P/N e um factor de correcção. Verificou-se haver correlação estatisticamente significativa entre os valores de absorvância em micro-ELISA e os títulos em IFI para soros humanos, não tendo sido possível fazer o mesmo para soros caninos.

SUMMARY

Quality control of the technique of micro-ELISA in the diagnosis of human and canine Visceral Leishmaniasis

Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar is, in Portugal, a zoonosis with the dog as reservoir. A quality control of the technique of micro-ELISA was carried out, using as reference the technique of IFI, the most commonly used for the diagnosis of this protozooisis, both for human and canine sera. Three different methods were used to estimate the cut-off point: $X+2sd$ (average for negative sera plus two standard deviation), P/N and J index. As quality parameters were used sensitivity, specificity, efficacy and positive predictive value. The cut-off point for human sera was established at 0.100 A, with 100% sensitivity, 90.5% specificity, 95.3% efficacy and 91.4% positive predictive value, and for canine sera in 0.200 A, with 80.0% sensitivity, 94.3% specificity, 87.7% efficacy and 96.6% positive predictive value. Reproducibility was not fully satisfactory and two different ways of improving it are proposed: P/N and a correction factor. A statistically significant correlation was observed between micro-ELISA's absorbances and IFI titres regarding human sera, though it was not possible to do the same for dog sera.

* Este trabalho foi financiado pelo programa Science and Technology for Development STD3, projecto n° TS3-CT93-0253 da Comissão das Comunidades Europeias - DG XII - Science, Research and Development.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar é uma zoonose causada, em Portugal, por um protozoário parasita, da espécie *Leishmania infantum*, Nicolle 1908 (Kineto-plastida: Trypanosomatidae). O kala-azar atinge a população humana, principalmente crianças, esporadicamente em todo o país (0.51 casos/100 000 habitantes/ano), havendo três regiões endêmicas: Alto Douro (8.30 casos/100 000 hab./ano), Região Metropolitana de Lisboa (0.20 casos/100 000 hab./ano) e Algarve (1.20 casos/100 000 hab./ano). O reservatório é principalmente canino¹.

É importante que se faça um diagnóstico precoce uma vez que o tratamento, quando instituído cedo, é quase sempre eficaz. Os métodos de diagnóstico serológico, se bem que menos específicos que as técnicas parasitológicas, são mais sensíveis e menos invasivos. Além disso permitem seguir com rigor a evolução da doença e o efeito do tratamento, pela observação da descida dos títulos de anticorpos quando a doença evolui para a cura, ou a sua subida em caso de agravamento ou de recaída.

É aconselhável usarem-se duas reacções, tanto quanto possível diferentes nos seus fundamentos. No nosso laboratório utilizamos a reacção de Imunofluorescência Indirecta (IFI) e a Contraímuno-electroforese (CIE), sendo, no entanto, recomendável possuir uma terceira técnica que deve ser aplicada em casos de difícil interpretação. Escolheu-se, para esse efeito, uma *Micro-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Micro-ELISA), cuja execução é algo trabalhosa e um pouco mais demorada que a IFI ou a CIE mas com a capacidade de testar, numa única sessão, um número considerável de soros o que a torna vantajosa também em estudos epidemiológicos. Existe ainda a possibilidade de uso de proteínas purificadas como antígenos, o que pode aumentar tanto a sua sensibilidade como a sua especificidade.

Neste trabalho fez-se o controlo de qualidade desta reacção, calculando o seu limiar de significância e determinando os seguintes parâmetros de qualidade: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e reprodutibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno

Usou-se antígeno total solúvel, preparado a partir de duas estirpes de *L. infantum* zimodeme MON-1 (IMT 163 e 176) isoladas de dois casos humanos de LV. A cultura de massa dos promastigotas foi feita em frascos de Roux de 1 l com 20 ml de soro fisiológico e 100 ml de meio sólido de Brain Heart Infusion (BHI), Difco 0418-01-5, suplementado com 10 ml de sangue de coelho desfibrinado mecanicamente e 62500 U de Penicilina sódica. O antígeno foi preparado de acordo com a técnica descrita por Mansueto *et al*² para a reacção de CIE. O teor em proteínas antigénicas foi calculado através da fórmula $1.55 \times A_{280\text{nm}} - 0.77 \times A_{260\text{nm}} = \text{mg/ml}$ ³, em que A significa Absorvância. O antígeno foi conservado a -70° C até ao momento de uso.

Micro-ELISA

Usou-se uma metodologia adaptada da técnica inicialmente descrita por Voller *et al*⁴. Todos os reagentes foram usados na quantidade de 100 µl/poço. As diluições de cada reagente e a concentração do antígeno foram previamente determinadas através de *checker-board titration*⁴. O antígeno foi diluído em tampão carbonato e usado na concentração de 25 µg/ml. Após cada incubação e antes de nova adição de reagentes fizeram-se 3 lavagens da placa com PBS + Tween 20. Sensibilizou-se a placa (Nunc, de fundo plano) com antígeno, e bloqueou-se com PBS + Tween 20. Os soros, diluídos a 1/100 em PBS + Tween 20, foram testados em duplicado. O conjugado (Proteín A-Horseradish Peroxidase, da Biomakor^(R)), foi diluído a 1/500 em PBS + Tween 20. Depois de adicionado o substrato (5-AS com 0.1% de H₂O₂) deixou-se 30 min. à temperatura ambiente. A leitura foi feita a 450 nm, em leitor de ELISA Titertek Multiskan Plus MKII e os resultados foram lidos em Absorvância (A) em relação a um branco.

Soros

A reacção de Imunofluorescência Indirecta (IFI) foi usada como técnica de referência, considerando-se como títulos significativos diluições superiores ou iguais a 1/128¹.

Foram estudados 103 soros humanos. Destes, 29 eram pertencentes a indivíduos clinicamente sãos, cedidos gentilmente pelo Serviço de Imunohemoterapia do Hospital de Egas Moniz, 42 tinham reacções serológicas positivas para outras doenças (gentilmente cedidos pelos Laboratórios de Malária, Helminologia, Toxoplasmose e Leptospirose do IHMT), e 32, provenientes de diversos Hospitais da Grande Lisboa, exibiam resultados positivos em IFI (realizada no nosso laboratório) significativos de LV em evolução.

Foram também estudados 91 soros caninos, dos quais 35 com títulos significativos em IFI, outros 35 provenientes de animais com suspeita clínica de leishmaniose ou já confirmada laboratorialmente mas em fase de remissão após tratamento, com IFI negativa ou positiva nas diluições até 1/64 inclusivé, e, finalmente, 21 soros provenientes de uma amostra de cães de uma zona considerada não endémica (Ilha de S. Tomé, República de S. Tomé e Príncipe) e sem anticorpos contra *L. infantum* em IFI.

Todos os soros foram conservados a -70° C e descongelados à temperatura ambiente no momento de uso.

Controlo de qualidade

Estudaram-se 3 formas de determinar o limiar de significância:

1^a - intervalo de 95% da distribuição Normal (X+2DP, em que X corresponde à média aritmética e DP ao desvio padrão) de uma amostra de soros negativos, que inclui igual número de soros de indivíduos sãos e com outras doenças, em humanos, e com outras doenças indeterminadas ou em fase de cura de leishmaniose, em cães.

2^a - através de P/N⁵, que representa uma proporção Positivo/Negativo. N é a média de 6 soros negativos, sendo 3 de indivíduos sãos e 3 com outras doenças ou

com leishmaniose já em fase de cura, como no método acima descrito. Divide-se a Absorvância de cada um desses seis soros pelo valor N. À média desses 6 quocientes adiciona-se 2 ou 3 DP obtendo-se o limiar P/N. A sua utilização será descrita e discutida a seguir.

3ª – índice J de Youden (Sensibilidade + Especificidade - 100) cujo valor máximo corresponde ao limiar que otimiza aqueles dois parâmetros ⁶.

Calculou-se a sensibilidade (Vp/Vp+Fn), a especificidade (Vn/Vn+Fp), a eficácia (Vp+Vn/P+N) e o valor preditivo positivo (Vp/Vp+Fp), associados aos diversos limiares de significância referentes aos métodos acima referidos^{7,8}. Estudou-se também a reprodutibilidade usando como medida o coeficiente de variação (quociente entre o desvio padrão e a média) de soros controlo de resultado positivo ao longo de vários ensaios.

RESULTADOS

Os parâmetros de distribuição dos grupos de soros humanos e caninos estão representados no *Quadro 1*. Nos humanos não houve sobreposição entre o grupo de soros de indivíduos sãos e o de indivíduos doentes. O intervalo correspondente aos soros do grupo de indivíduos com outras doenças sobrepõe-se aos intervalos dos outros dois grupos, estando, em 90% dos casos, abaixo de 0.10 A.

Os três agrupamentos de soros, tanto humanos como caninos, são estatisticamente diferentes entre si, dois a dois, a um nível de significância de 5%, através do Teste t de Student por análise univariada *unpaired* (*Quadro 2*).

O teste de normalidade mostrou que os grupos formados têm uma distribuição normal a um nível de significância de 5% (*Quadro 1*). Todos os testes estatísticos foram realizados em StatWorks-Macintosh.

O limiar de significância calculado para os soros caninos (*Quadro 3*) através de X+2DP (0.20 A) coincide com um dos indicados pelo índice J (J=74.3). O limiar para soros humanos (*Quadro 3*) difere conforme se usa X+2DP (0.12 A) e o índice J (0.10 A; J=90.5).

O limiar para soros humanos em 0.10 A corresponde a uma sensibilidade de 100% e a uma especificidade de 90.5%, com uma eficácia de 95.3% e um valor preditivo positivo de 91.4%; com o limiar em 0.12 A obtém-se uma sensibilidade de 87.5% e uma especificidade de 92.9%, com uma eficácia de 92.2% e um valor preditivo positivo de 93.5%. O limiar canino em 0.20 A resulta numa sensibilidade de 80.0% com uma especificidade de 94.3%, a eficácia é de 87.7% e o valor preditivo positivo 96.6%.

O limiar segundo P/N foi calculado separadamente em placas diferentes usando amostras de 6 soros escolhidos aleatoriamente de um grupo com títulos entre 0 e 1/64 em IFI, como é explicado em Material e Métodos. Os limiares resultantes foram muito baixos, de tal modo que se verificou que foram considerados positivos soros com Absorvância abaixo de 50% de qualquer dos limiares calculados pelos outros dois métodos.

O coeficiente de variação (CV) em dois soros humanos positivos (controlos positivos) foi de 6 e 27% (*Quadro 4*). Os dois soros caninos, também controlos positivos, apresentam maior variabilidade: para um o

Quadro 1 – Parâmetros estatísticos dos grupos de soros estudados em micro-ELISA

Grupos de soros	Amplitude do intervalo (mín - máx)		Média	Teste de Normalidade estatística significância	
	HUMANOS				
Sãos	0,01	(0,00-0,01)	0,005	0,126	0,248
Outras Doenças	0,26	(0,00-0,26)	0,052	0,179	0,123
Doentes	1,17	(0,10-1,27)	0,448	0,241	0,086
CÃES					
Sãos	0,05	(0,01-0,06)	0,027	0,228	0,148
Outras Doenças	0,49	(0,01-0,50)	0,104	0,259	0,063
Doentes	1,03	(0,05-1,08)	0,455	0,112	0,254

Quadro 2 – Teste t entre os resultados de micro-ELISA dos grupos de soros estudados

Grupos de soros	SÃOS vs OUTRAS DOENÇAS	SÃOS vs DOENTES	OUTRAS DOENÇAS vs DOENTES
	HUMANOS		
t	-5,440	-7,010	-7,456
graus de liberdade	69	59	72
significância	0,000	0,000	0,000
CÃES			
t	-3,701	-7,340	-7,346
graus de liberdade	54	54	68
significância	0,001	0,000	0,000

Quadro 3 – Parâmetros de controlo de qualidade de micro-ELISA

LIMIAR		SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	INDICE J	EFICÁCIA	VALOR PREDITIVO POSITIVO
HUMANO	0,090	100,0	85,7	85,7	92,2	86,5
	0,100	100,0	90,5	90,5	95,3	91,4
	0,110	90,0	92,9	82,9	92,2	93,5
	0,120*	87,5	92,9	80,4	92,2	93,5
	0,130	85,0	97,6	82,0	92,2	96,6
CANINO	0,175	82,9	91,4	74,3	87,1	93,5
	0,200*	80,0	94,3	74,3	87,1	96,6
	0,250	68,4	94,3	62,9	82,8	96,0

* limiar calculado por $x + 2 DP$

coeficiente de variação é de 24%, mas para o outro é de 40% (Quadro 4). De notar que todos os valores, ao longo dos vários ensaios, se encontram dentro do intervalo determinado por $X \pm 2dp$, não se registando portanto *outliers*, excepto duas medições na testemunha que apresentou menor variabilidade. Não se registaram aumentos ou diminuições dos valores de absorvância durante mais do que 3 medições seguidas, pelo que se pode considerar aleatória a variação registada.

Quadro 4 – Reprodutibilidade da micro-ELISA

	Soros Testemunhas			
	Humanos		Caninos	
	A	B	A	B
Média	0,795	1,025	0,756	0,774
CV	27,00%	6,30%	40,28%	23,80%

Obeve-se uma correlação de 0.85 entre a técnica de referência (IFI) e a micro-ELISA para os 32 soros humanos IFI positivos, que é estatisticamente significativa a um nível de significância de 5%. Não foi possível determinar a correlação para os soros caninos uma vez que em muitos casos não foi determinado o título exacto dos soros positivos em IFI.

DISCUSSÃO

O valor de Absorvância de 0.20 tomado como limiar nos soros caninos, resultante tanto do cálculo de $X+2DP$ como do índice J, está associado a uma especificidade, eficácia e valor preditivo positivo altos. No entanto a sensibilidade é relativamente baixa (80%), devido à sobreposição dos intervalos de distribuição das Absorvâncias dos soros de doentes e de não doentes. Já o limiar encontrado para os soros humanos varia com o uso dos dois métodos. O limiar calculado por $X+2DP$ (0.12 A) permite obter uma especificidade, eficácia e valor preditivo positivo altos, superiores a 90%, mas a sensibilidade é menor que 90%. Com o limiar calculado pelo índice J, de 0.10 A, alcança-se uma sensibilidade máxima (100%) e uma especificidade, eficácia e valor preditivo positivo também altos, na mesma ordem de grandeza que para 0.12 A.

Ambos os métodos são simples e fáceis, contudo o método que utiliza a fórmula $X+2DP$ obriga a cálculos estatísticos, ainda que fáceis de fazer em qualquer computador ou máquina de calcular adequados. Este método, para cálculo do limiar de significância será arbitrário⁶, sobretudo quando as amostras não são normais ou quando há uma grande sobreposição de intervalos, o que aconteceu neste estudo nas amostras de soros caninos. O índice J permite uma optimização entre a sensibilidade e a especificidade. Só por si pode não ser adequado visto poder esconder um valor baixo de um parâmetro graças a um valor alto de outro, pelo que convém ser acompanhado da observação do comportamento de ambos, sensibilidade e especificidade. Contudo, observa-se que os limiares achados por $X+2DP$ não são muito diferentes (iguais nos cães) aos escolhidos através do índice J.

Os valores mais elevados de eficácia correspondiam às Absorvâncias indicadas pelos valores máximos do índice J. O valor preditivo positivo revelou-se útil como factor de decisão. Deu mais peso à escolha do limiar para soros caninos, contudo para soros humanos indicou que poderá ser necessário aumentar o limiar para 0.12 A em estudos de carácter epidemiológico em que a sensibilidade não é tão importante.

Em resultado deste estudo, decidiu-se usar como limiar de significância, em ELISA, para soros caninos, uma Absorvância de 0.20, visto que todos os parâmetros estudados incidiam naquele valor. Para soros humanos o limiar foi estabelecido em 0.10 A, valorizando o índice J, em conjunto com a eficácia, em relação ao cálculo por $X+2DP$. Um valor de limiar semelhante a este foi achado por Moshe *et al*⁹ num estudo epidemiológico em Israel em populações assintomáticas, com concentrações de antígeno e diluições de soro semelhantes, mas com antígeno de *L. donovani*.

Pelas razões indicadas, considera-se que o índice J deverá ser o método escolhido em futuros estudos epidemiológicos em que esta técnica de micro-ELISA seja usada.

Um dos grandes problemas dos métodos enzimáticos para estudo dos anticorpos circulantes é o da sua reprodutibilidade¹⁰ o que se verificou especialmente com uma das testemunhas (CV de 40%). O uso de um limiar obtido por P/N em cada ensaio teria a vantagem de melhorar a reprodutibilidade, porque o valor, relativo a um grupo

de testemunhas, é calculado em cada ensaio. Contudo, a amostra usada terá de ser forçosamente pequena, e por isso, como no caso presente em todos os grupos usados, pode não ter uma média e variabilidade adequadas. Uma alternativa seria o uso de um factor de correcção. Este é calculado, em cada ensaio, dividindo o valor de Absorvância da(s) testemunha(s) positiva(s) pela média dessa(s) testemunha(s) ao longo dos ensaios anteriores. O factor de correcção é multiplicado por cada valor de Absorvância dos soros problema, melhorando, assim, a reprodutibilidade.

Este estudo revelou haver correlação entre IFI e ELISA o que não apoia os resultados de Rachamim *et al*¹¹, em que as duas técnicas não eram correlacionáveis. Contudo naquele trabalho as estirpes usadas para os respectivos antigénios eram diferentes e o estudo incluía também um grupo de soros IFI negativos. Voller *et al*⁴ tinham chamado já a atenção para a possibilidade de as duas técnicas correlacionarem melhor usando soros de doentes comprovados em que os anticorpos são detectados mais consistentemente, como foi o caso deste trabalho. No entanto, para confirmação será necessário realizar um estudo mais aprofundado, dentro de uma só população, com as duas técnicas realizadas na mesma altura.

AGRADECIMENTOS

Ao colega Pedro Aguiar da Disciplina de Saúde Pública do IHMT pela revisão estatística.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRANCHES P, PIRES CA, CONCEIÇÃO-SILVA FM, SILVA PEREIRA MCD, SANTOS-GOMES GM: O Kala-Azar em Portugal-VI. Inquérito epidemiológico realizado na Região Metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. Bol Soc Ciênc Méd Lisboa 1987; 87 (7): 1-12
2. MANSUETO S, PICONE DM, DI ROSA S, LA CASCIA C: La Controimmunoelettroforesi nella diagnostica della leishmaniosi viscerale. Bollettino Dell'Istituto Seroterapico Milanese 1978; 57(5): 623-630
3. HUDSON L, HAY FC: Practical Immunology, 3ª ed. Blackwell Scientific Publication 1989
5. LOCARNINI SA, COULEPIS AG, STRATTON AM, KALDOR J, GUST I: Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of Hepatitis A-Specific Immunoglobulin M. J Clin Microb 1979; 9 (4): 459-465
4. VOLLER A, BARTLLET A, BIDWELL DE: Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1976; 70 (2): 98-106
6. ASHFORD D, BADARO R, EULALIO C, FREIRE M, MIRANDA C, ZALIS MG, DAVID JR: Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon Assay Screening Test-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Fast-ELISA™) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1993; 48(1): 1-8
7. GUERRERO R, GONZALEZ CL, MEDINA E: Epidemiologia. Fondo Educativo Interamericano, S.A. (Bogotá) 1981; 218pp
8. ABRANCHES P, FERNANDES JP: Métodos para controlo de qualidade em testes seroimunológicos nas doenças infecciosas. Acta Médica Portuguesa II Série 1991; 4(1): 19-22
9. MOSHE E, PAZ A, JAFFE C: Assymptomatic visceral leishmaniasis in Israel. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 651-652
10. VENKATESAN P, WAKELIN D: ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitology Today 1993; 9 (6): 228-232
11. RACHAMIM N, JAFFE CL, ABRANCHES P, SILVA-PEREIRA MCD, SCHNUR LF, JACOBSON RL: Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. Ann Trop Med Parasit 1991; 85: 503-508