ACURÁCIA E CONFIABILIDADE DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PRODUZIDO POR BIO-MANGUINHOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Sonia Regina Lambert Passos[1], Lílian Dias Nascimento[1], Maria de Fátima Madeira[2], Eliame Mouta Confort[2], Tânia Maria Pacheco Schubach[3], Fabiano Borges Figueiredo[3], Andressa Guimarães de Souza Pinto[2], Fernanda Santos de Oliveira[5], Raquel Pacheco[5], Yara Hahr Marques Hökerberg[1], Sandro Javier Bedoya Pacheco[1], Adelaide Maria Salles Bessa[4], Maria do Carmo Araújo Gomes[4].

1 - Laboratório de Epidemiologia Clínica - IPEC - Fiocruz
2 - Laboratório de Vigilância em Leishmanioses - IPEC – Fiocruz
3 – Laboratório de Dermatozoonoses – IPEC - Fiocruz
4 - Centro de Controle de Zoonoses - Belo Horizonte
5 - Laboratório de Sistemática Bioquímica - IOC - Fiocruz

sonialambert@fiocruz.br

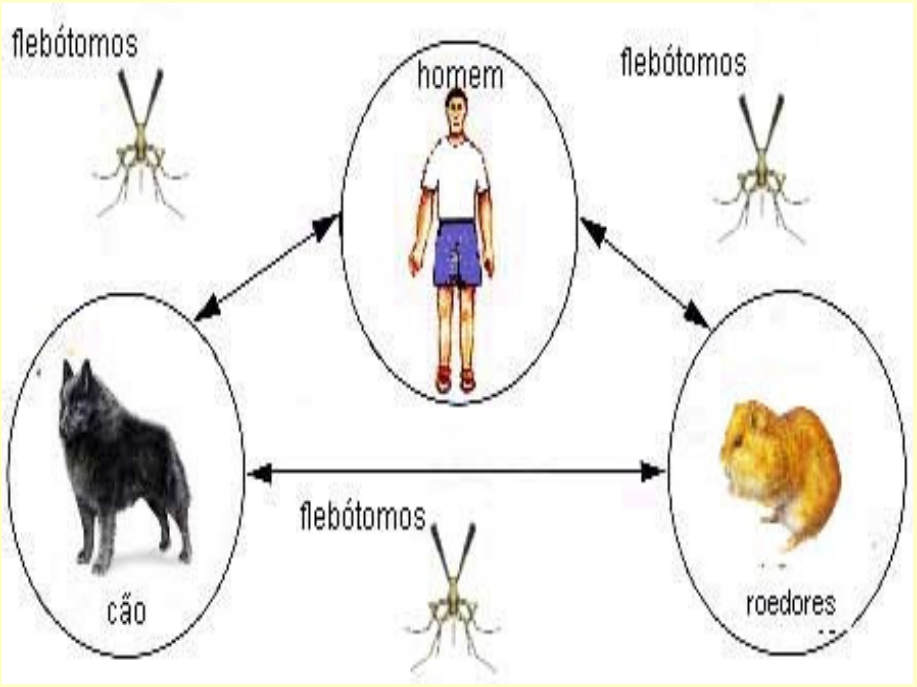
Introdução

– A Leishmaniose Visceral Humana é endêmica em mais de 47 países nas Américas central e do sul, norte da África e região sub-saariana, Europa mediterrânea e Sudeste da Ásia.

– Está em crescimento de número de casos no Nordeste, principalmente nas periferias das grandes cidades.

- O controle da doença canina é importante pois o cão funciona como reservatório do parasita (50% cães assintomáticos)

- Flebotomíneos: *Lutzomyia sp.*



Projeto

- Introdução:
  - Limitações de investigações anteriores:
    - Ausência de um teste de referência consensual – IFI, parasitológicos nos cães doentes e cães de áreas não endêmicas, PCR .
    - Dificuldade de classificação correta de cães sem manifestações clinicas de LVC
    - Forma de seleção dos cães: não probabilística ou seqüencial
    - **Superestimação da acurácia dos testes?**

Objetivos

GERAL:

Avaliar a acurácia, confiabilidade do ensaio imunoenzimático na detecção de anticorpos IgG específicos para o diagnóstico da LVC causada por *Leishmania* .

Específicos

- Estimar a confiabilidade e reprodutibilidade do kit de ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina (EIE-LVC) produzido por Bio-Manguinhos;
- Estimar medidas de validade de diagnóstico (acurácia: sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança, área sob a curva ROC) e os valores preditivos do kit EIE-LVC de Bio-Manguinhos;
- Efetuar uma análise comparativa dos parâmetros obtidos no EIE-LVC frente à Imunofluorescência Indireta (IFI);
- Avaliar a acurácia e comparar a densidade óptica do ensaio imunoenzimático segundo o espectro clínico da LVC;
- Correlacionar os resultados do teste EIE com dados epidemiológicos.

Método

- Delineamento do estudo e população alvo
  - Trata-se de uma investigação de validação diagnóstica do ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina, no município do Rio de Janeiro e Belo Horizonte, com amostras coletadas no período de 1 de março de 2006 a 1 de julho de 2007

Variáveis de interesse

- Caracterização clínica dos cães - lesões cutâneas e mucosas, especificando o número, localização e características.
  - Em todos os animais foram coletadas duas amostras de pele íntegra: do pavilhão auricular direito e escápula.
  - Se houvesse lesão, essa foi biopsiada junto com o pavilhão auricular direito.
- Localização/endereço (exposição a doença)
- Resultados laboratoriais

Tamanhos amostrais

– Mínimo: 402 cães doentes e 402 cães não doentes

Considerando uma sensibilidade de 95% (para o teste referência - IFI), uma sensibilidade esperada de 94% (para o método em avaliação - EIE); uma diferença limite de equivalência entre os dois métodos de 3%, um nível de significância de 5% e um poder de 80% utilizando-se a fórmula de cálculo amostral para equivalência de duas proporções.

estimativas de sensibilidade e especificidade para o teste de referência IFI (Mancianti & Meciani, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 1998; Scalone *et al.*, 2002) e foram consideradas com cautela as limitações particulares de cada uma delas.

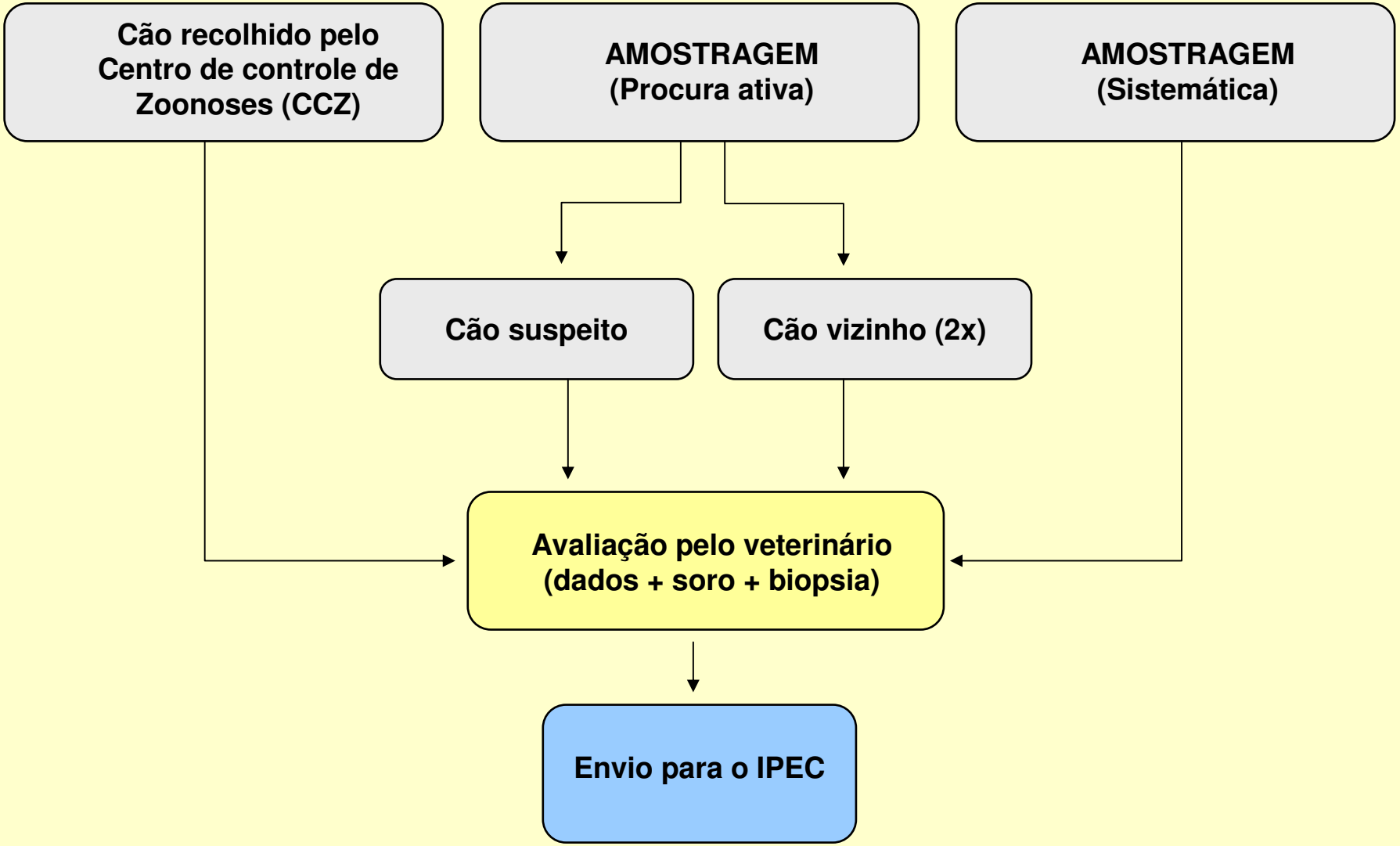
– O tamanho amostral para verificação de reprodutibilidade foi estimado em no mínimo 208 soros devendo ser testados por dois observadores independentes, para um Coeficiente de Correlação Intraclasse de 0,95, um nível de 95% de confiança e um erro absoluto de 0,02. Estas amostras serão selecionadas randomicamente por meio de lista de números aleatórios dentre as analisadas em duplicata.

Critérios de Elegibilidade

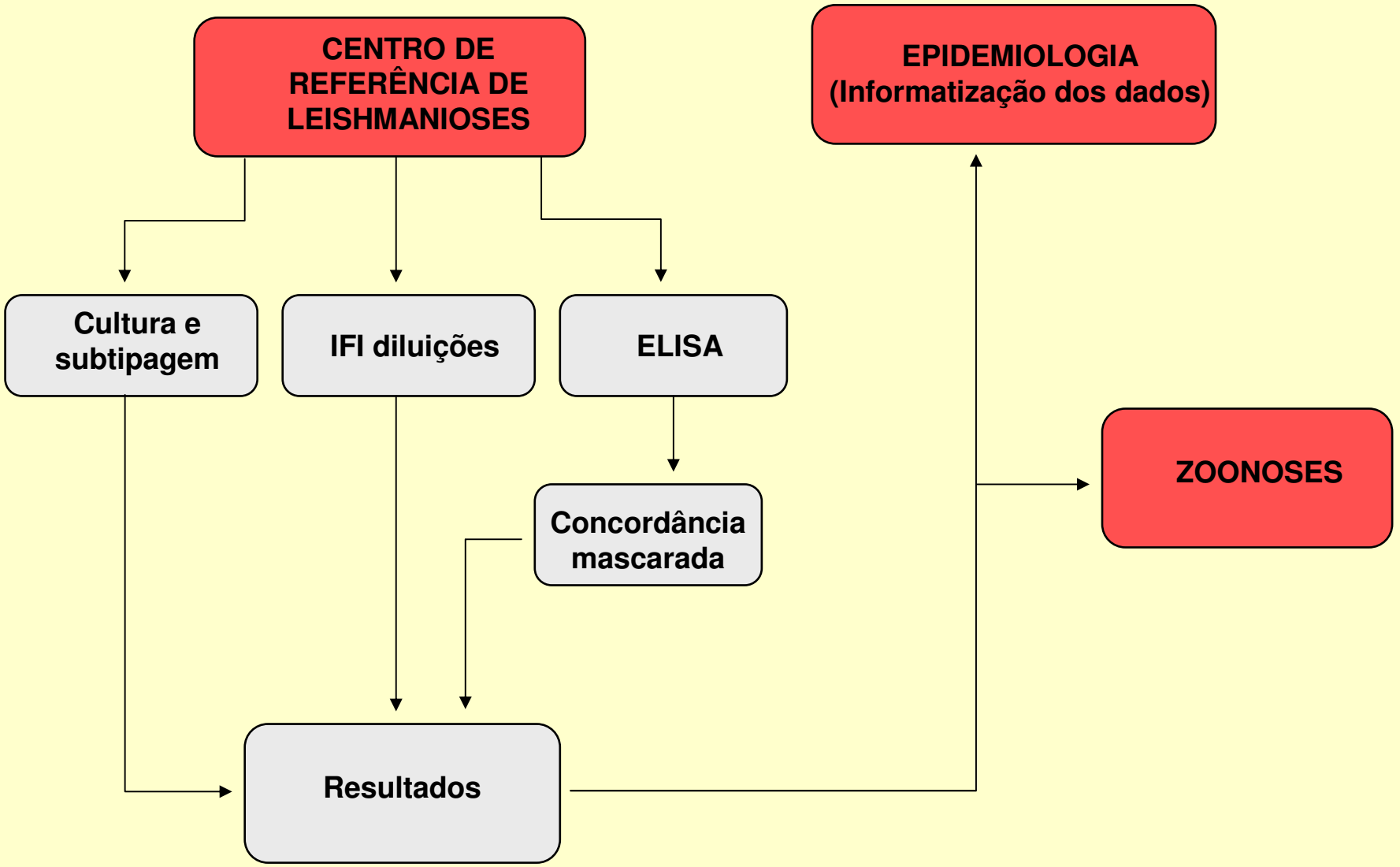
- Critérios de inclusão:
  - Cães suspeitos de LVC na busca ativa
  - 2 cães vizinhos do suspeito na busca ativa
  - Cães assintomáticos da área endêmica (sistemático).

– Critérios de exclusão:
  - Donos não permitem que cão participe.
  - Cães com material/dados insuficiente para análise

FLUXO OPERACIONAL NO CAMPO
(áreas endêmicas do Rio de Janeiro)

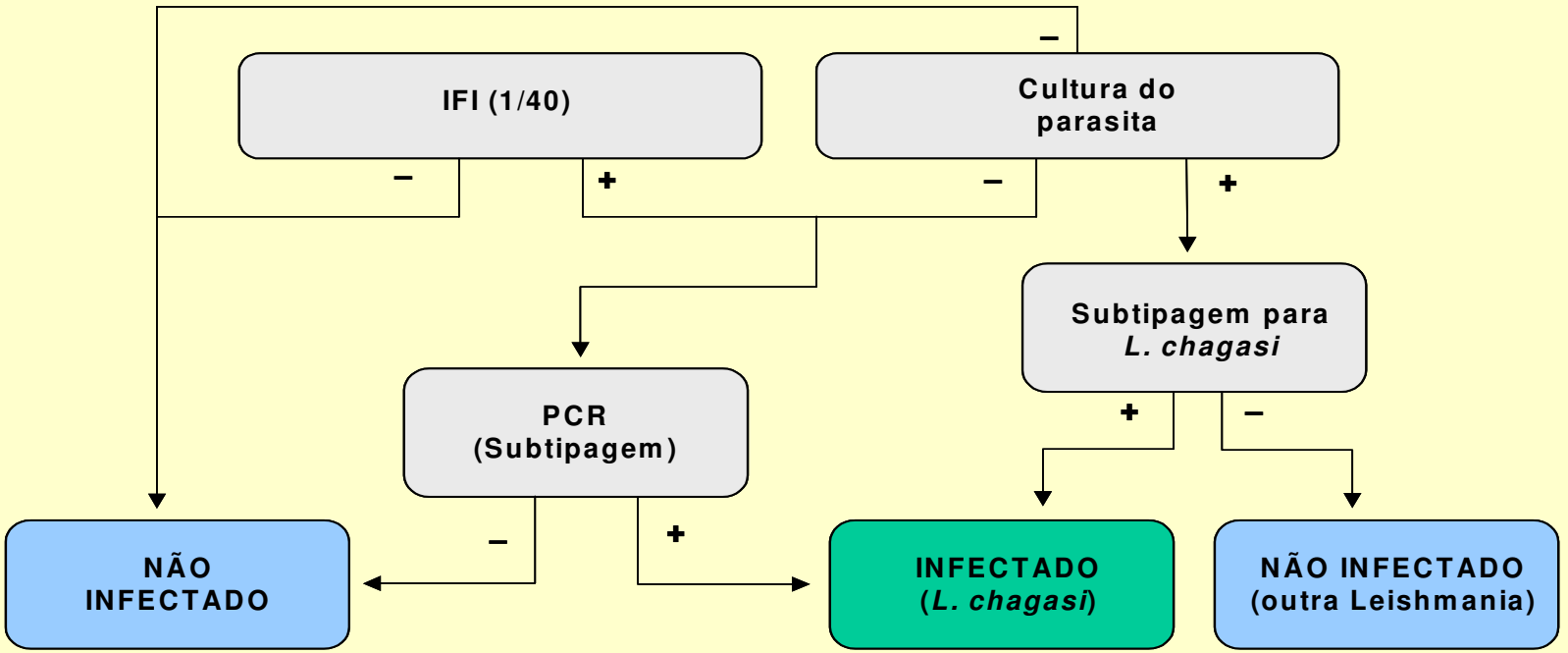


FLUXO OPERACIONAL NO IPEC



OPERACIONALIZAÇÃO DO "PADRÃO OURO"

Figura 1. **Operacionalização do "Padrão Ouro"**

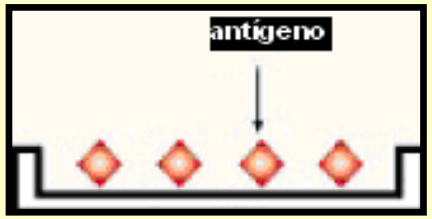


Grupo de cães considerados infectados *L. chagasi*.

Grupo de cães considerados controles: sem infecção com *L. chagasi* ou com infecções por outras leismanias.

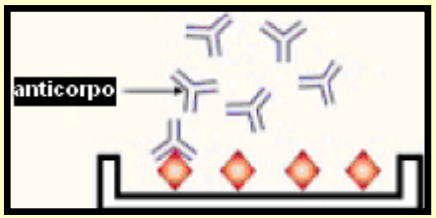
Metodologia

Protocolo Técnico ELISA



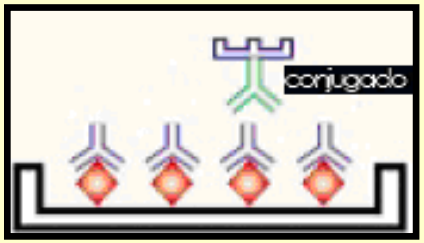
Incubação: *Overnight* - 8ºC

Lavagem



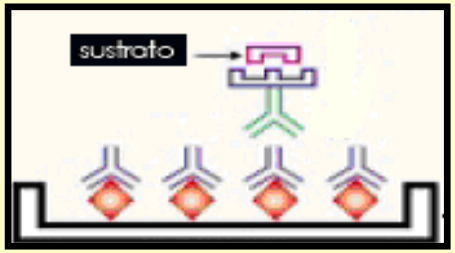
Soro= 1:40
Incubação: 1h - 37ºC

Lavagem



Anti-IgG + peroxidade
Incubação: 1h - 37.º C

Lavagem



Incubações: 20 min
(OPD + H_2O_2)
Solução Stop (H_2SO_4)

Leitura

OPD: 492 nm

Considerações éticas

- O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ) sob o número P-0286/06, sendo assinado pelos donos dos animais incluídos neste projeto

Fotos de Campo

Fotos de Campo

Fotos de Campo

Plano de Análise

– Confiabilidade / Repetibilidade:

- **Foram realizadas duas leituras ópticas, em momentos distintos e pelo mesmo técnico treinado de uma mesma amostra. Nas duas leituras foi garantido o mascaramento do status diagnóstico.**

  - Numéricos: Correlação Intraclasse Coeficiente de Variação.
  - Gráficos: Altman-Bland.

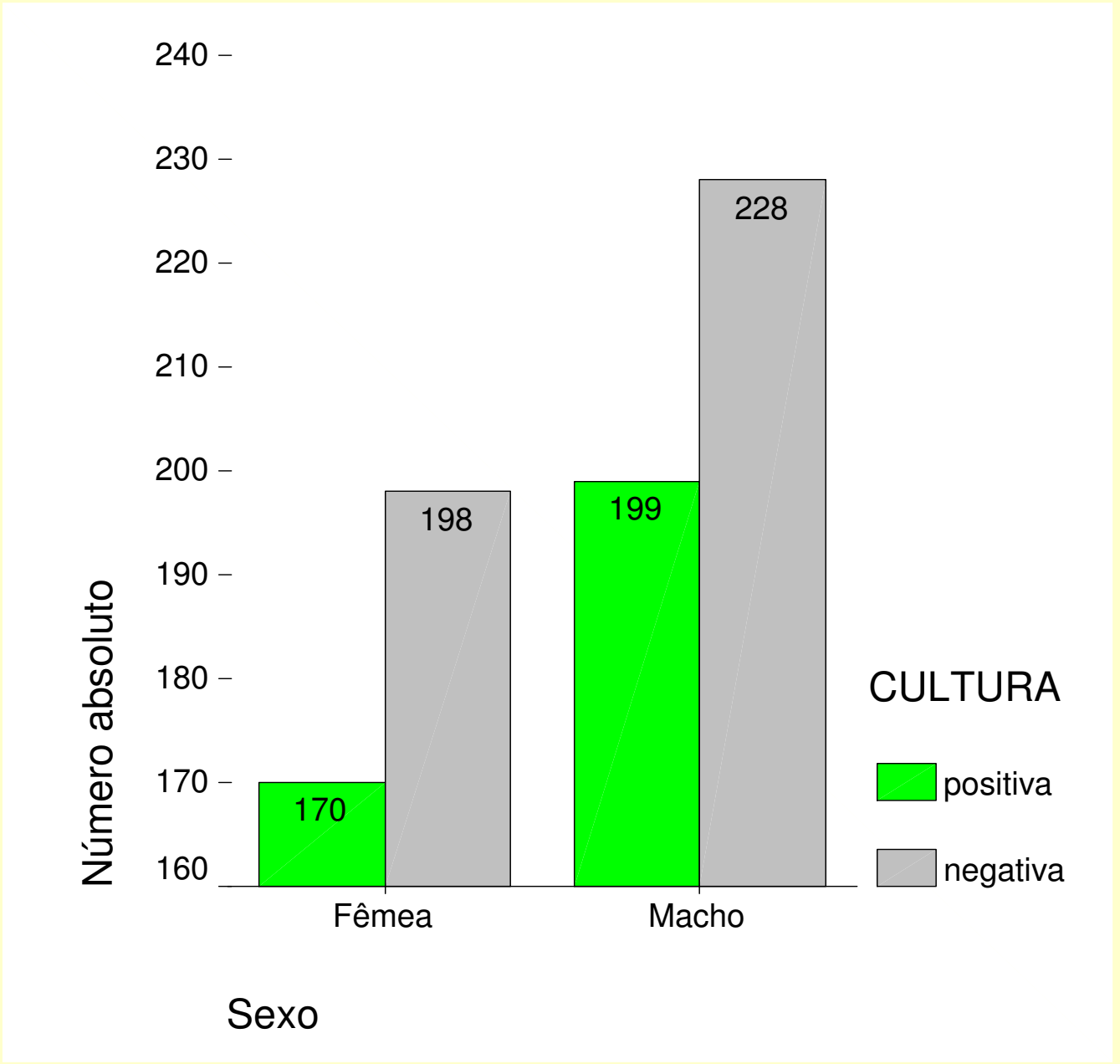
Plano de Análise

– Resultados intermediários (zona cinza):
  - Estudados através da curva ROC.

– Plano de análise:
  - Exploração sumária
  - Estimativas de confiabilidade
  - Estimativas de validade
  - Estimativas de ponto de cortes e valores indeterminados

Características clínicas

	Cultura Positiva	Cultura Negativa
Peso	3,0 Kg (IIQ 2,0 – 14,0)	11,0 Kg (IIQ 5,0 - 18,0)
Temperatura	39,0 ^{0}C (38,5 - 39,4)	39,0 ^{0}C (38,5 – 39,6)
Apatia	88 /121 (72,7%)	245 / 633 (38,7%)
Estado geral Bom Regular Ruim	401 (93,7%) 21 (4,9%) 6 (1,4%)	350 (93,3%) 9 (2,4%) 11 (2,9%)
Úlceras crostosas	38 (19,2%)	72 (8,9%)
Emagrecimento	68 (18,1%)	33 (7,7%)


240
230
220
210
200
190
180
170
160
Número absoluto
170
198
199
228
Fêmea
Macho
Sexo
CULTURA
positiva
negativa

Repetibilidade

- A confiabilidade do EIE-LVC foi excelente analisando-se pelas densidades óticas

  CCI 0,98 (0,98; 0,98)

- Ou por faixas de resultado do exame incluindo a categoria "inconclusivo"

  Kappa ponderado (KW) = 0,95 (SE 0,03).

- A confiabilidade do IFI foi menor

  KW 0,84 (SE 0,03).

Repetibilidade das duas aferições mascaradas do EIE LVC Bio Manguinhos (n = 802)

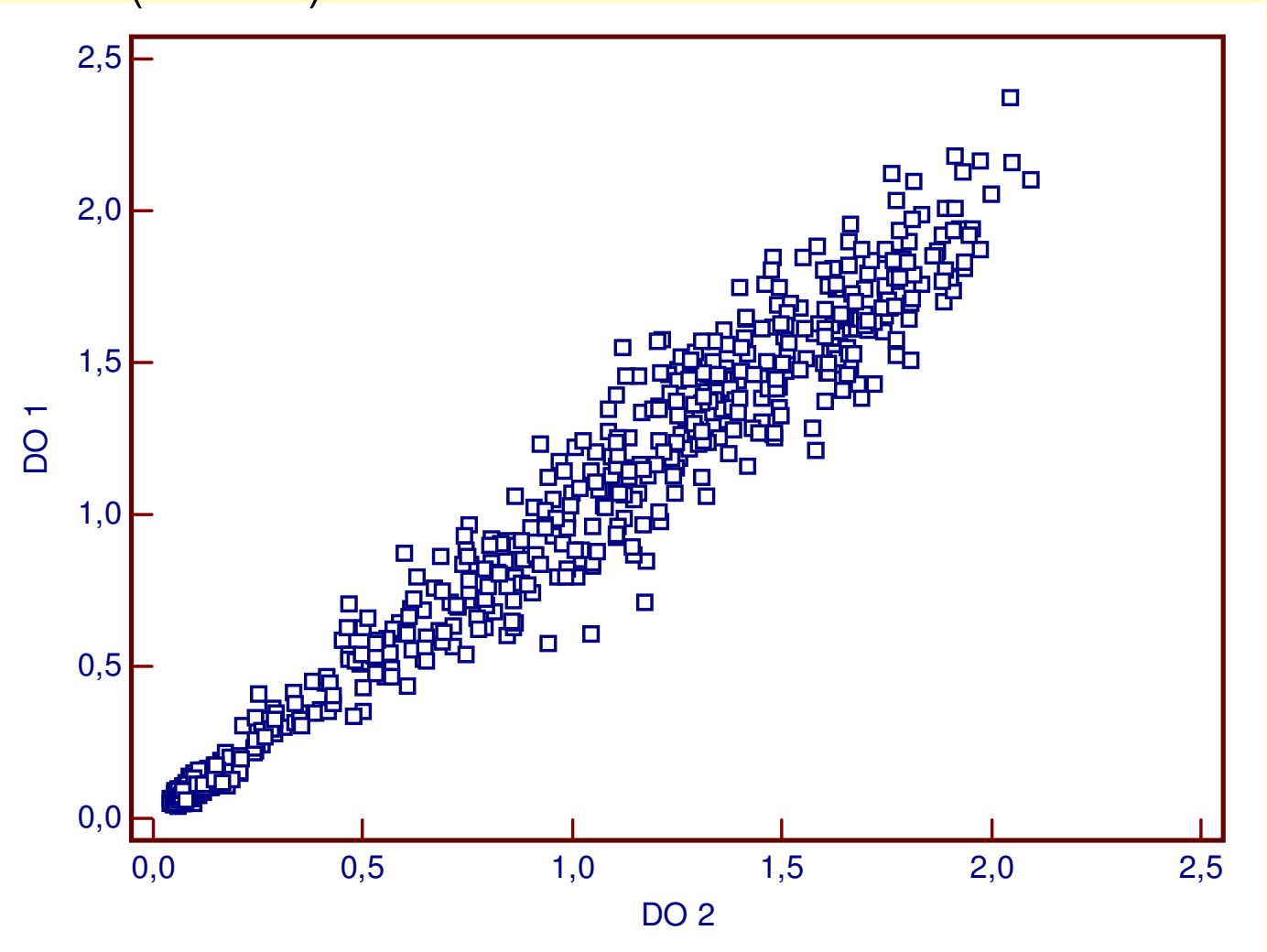
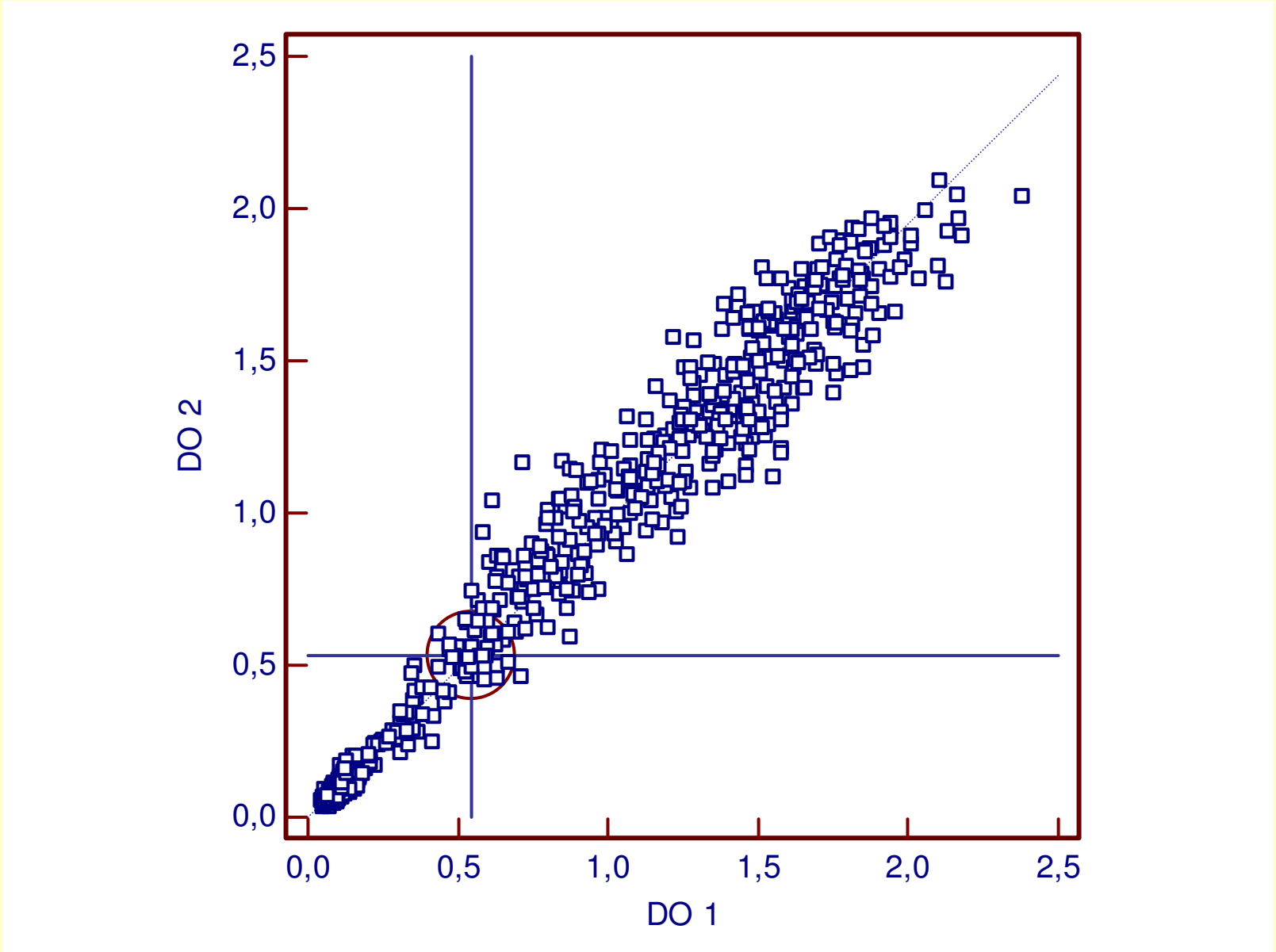


Diagrama de dispersão das duas aferições ELISA LVC Bio Manguinhos



Teste de Youden duas aferições EIE LVC Bio-Manguinhos

Coeficiente de correlação de concordância

Variable Y	DO 1ª aferição EIE LVC
Variable X	DO 2ª aferição EIE LVC

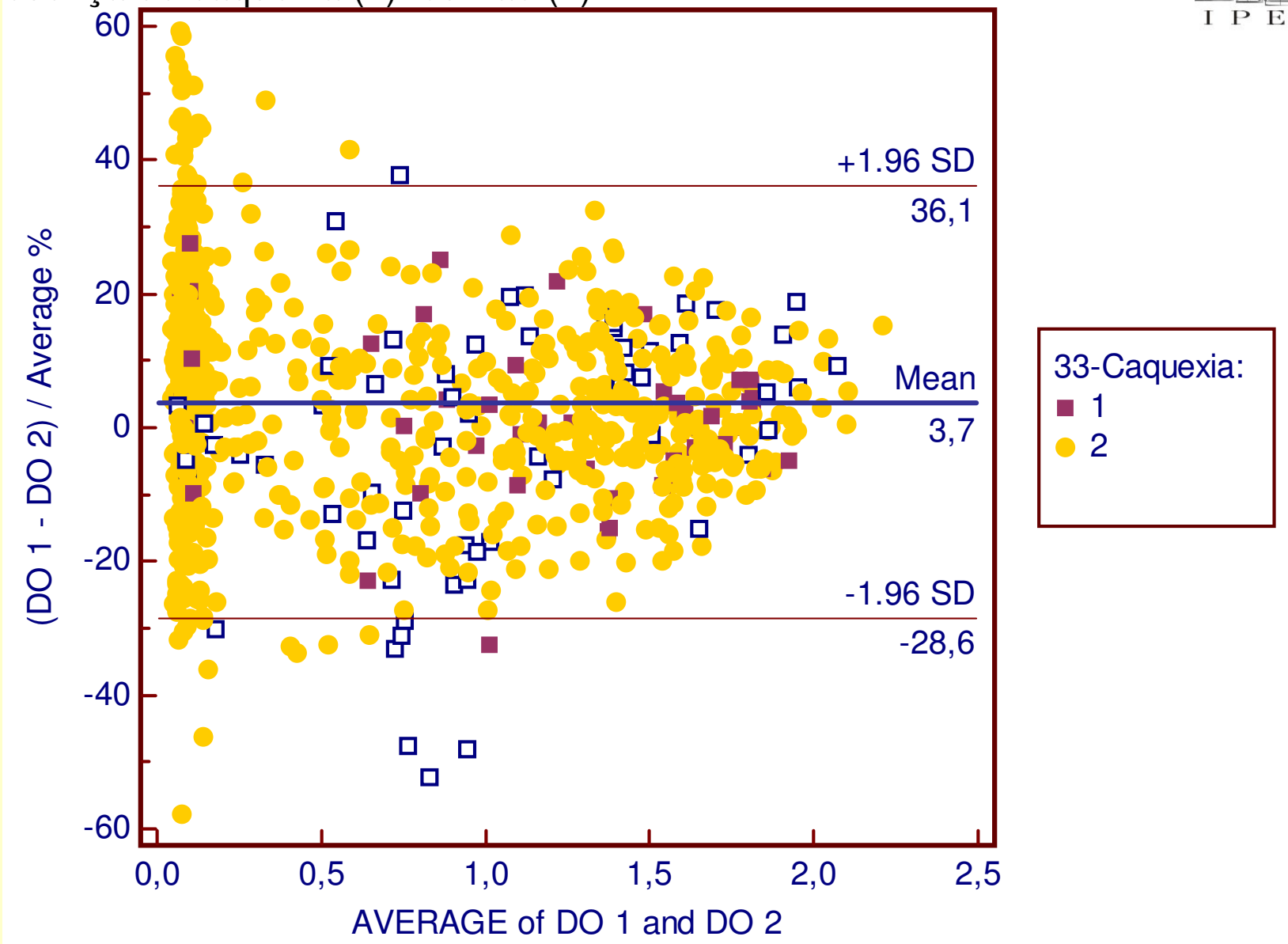
Tamanho Amostral	802
Coeficiente de corrrelação de concordância (IC 95%)	0,99 (0,98 - 0,99)
Pearson ρ (precisão)	0,99
Fator de correção para Viés C_b (acurácia)	0,99

Kappa ponderado para EIE LVC categorizado pelo Cut-off em 1 positivo, 2 negativo e 3 indeterminado

	EIE – 1ª. Aferição			
EIE – 2a. aferição	1	2	3	
1	367	1	0	368 (98,1%)
2	0	5	0	5 (1,3%)
3	0	2	0	2 (0,5%)
	367 (97,9%)	8 (2,1%)	0 (0,0%)	375

Kappa ponderado	0,95
Erro padrão (Kw'=0)	0,33
Erro padrão (Kw'#0)	0,05

Bland_Altman – repetibilidade EIE LVC Bio-Manguinhos segundo presença de caquexia (1) ou não (2).



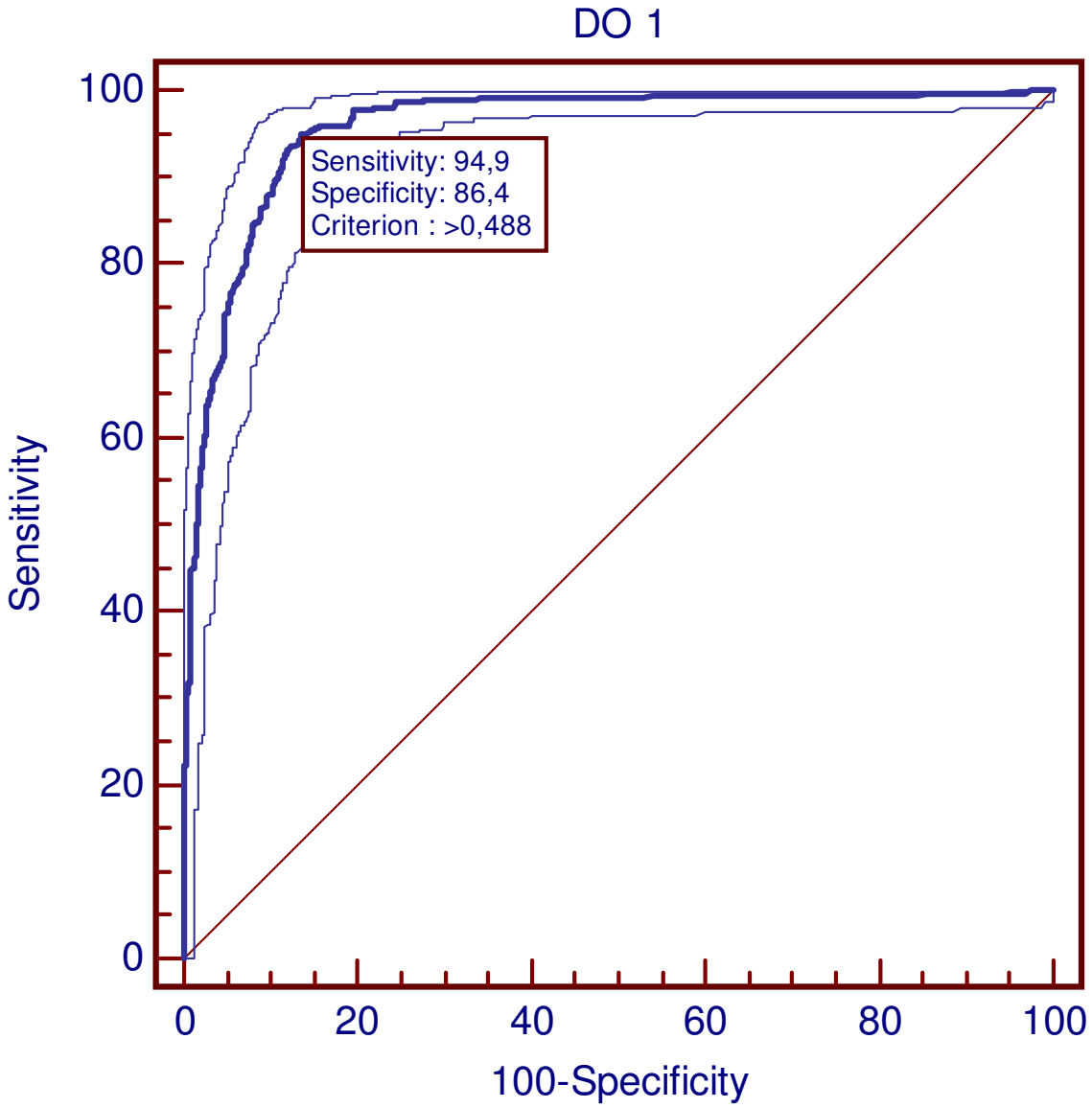
Validade

Variável	do_1 (Densidade ótica do EIE LVC)	
Variável de referência (N)	Cultura (1) Sim = 375	Não (2) = 427

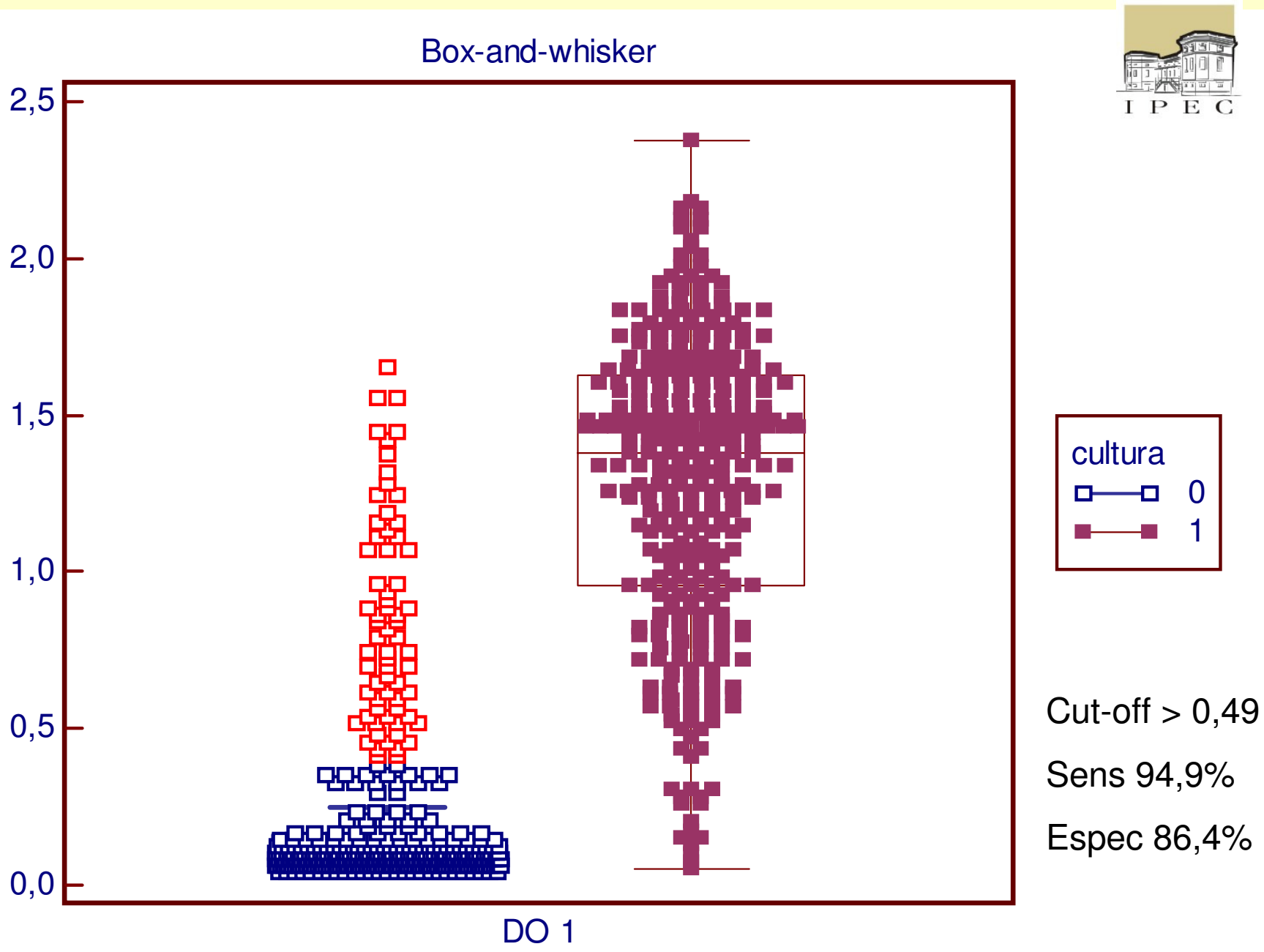
Área sob a Curva ROC (IC 95%)	0,96 (0,94 – 0,97)
Nível de significância de p (AUC = 0,5)	0,0001

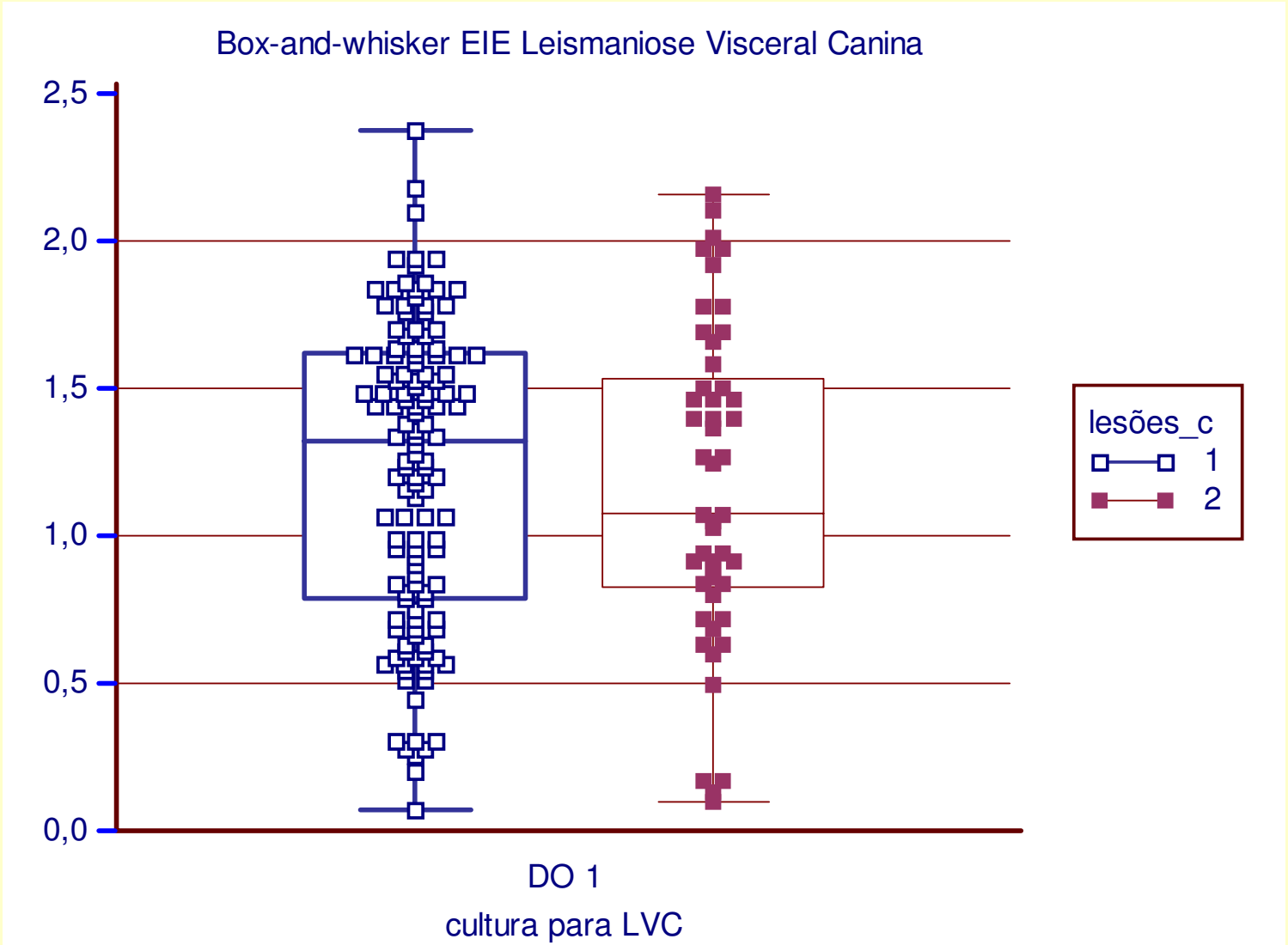
Cut-off	Sens	95% IC	Especif	95% IC	+RV	-RV	VP+	VP-
>0,488	94,93	92,2 - 96,9	86,4	82,8 - 89,5	6,99	0,06	86,0	95,1

Prevalência da LVC (%)	46,8%

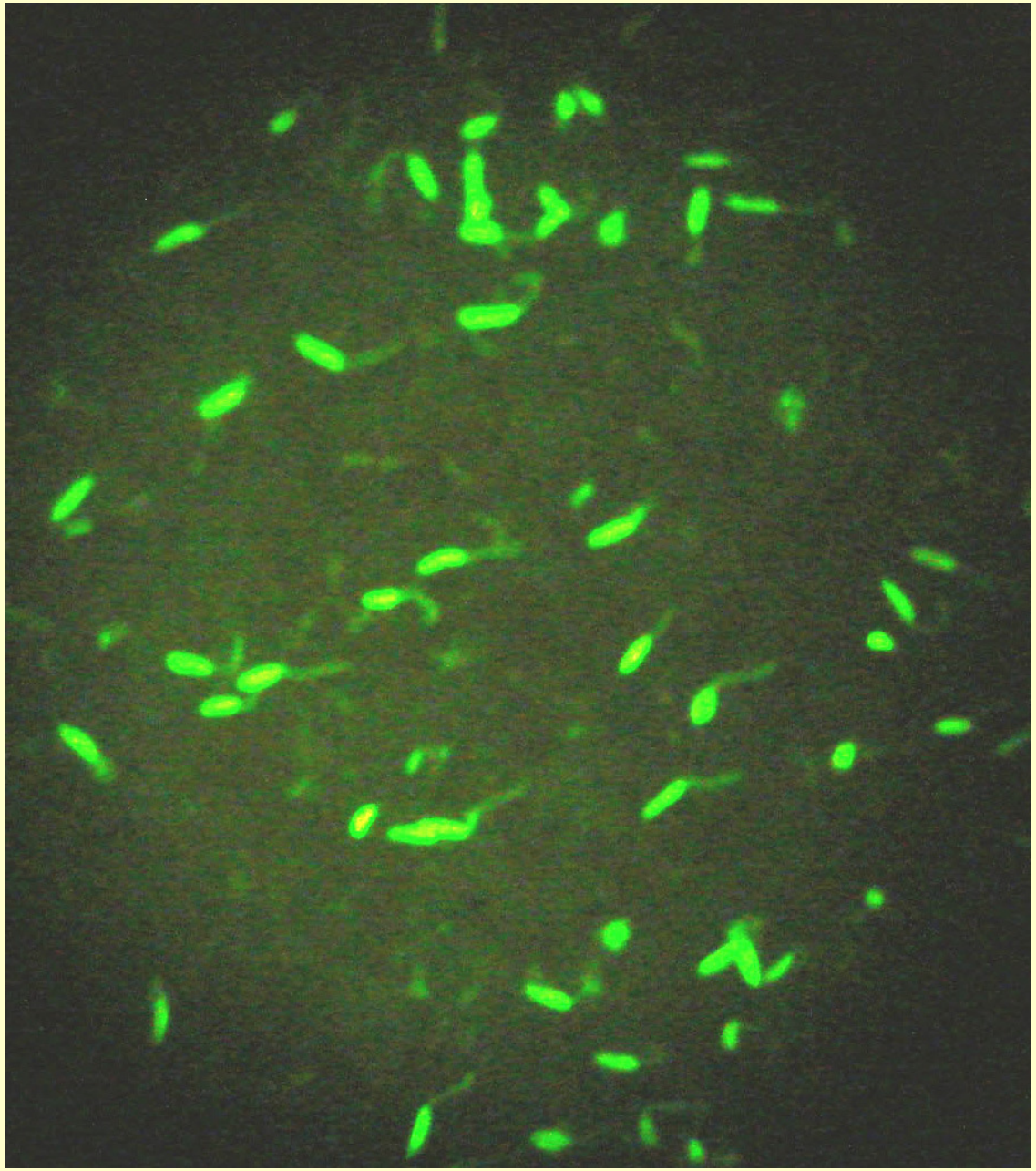


Curva ROC teste EIE Leishmaniose Visceral Canina - BioManguinhos

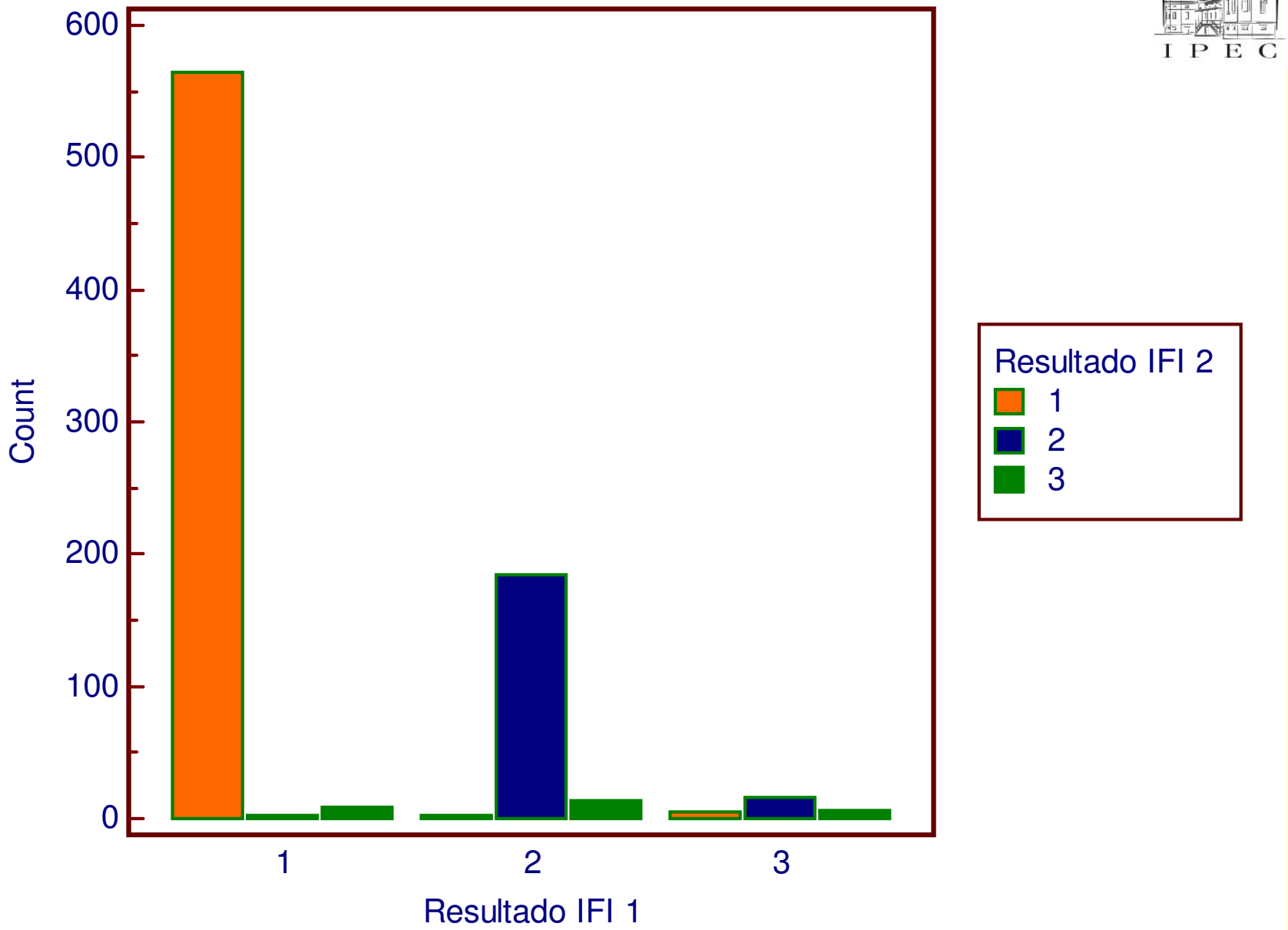

Box-and-whisker
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
DO 1
cultura
0
1
Cut-off > 0,49
Sens 94,9%
Espec 86,4%
I P E C



Densidades óticas de EIE LVC segundo a presença (1) ou não (2) de lesões lesões cutâneas



Lâmina de IFI com promastigotas marcadas


600
500
400
300
200
100
0
Count
1
2
3
Resultado IFI 1
Resultado IFI 2
1
2
3

Concordância entre-avaliações ordinais (kappa)

	IFI_1			
IFI_2	1	2	3	
1	564	3	5	572 (71,3%)
2	2	184	16	202 (25,2%)
3	8	14	6	28 (3,5%)
	574 (71,6%)	201 (25,1%)	27 (3,4%)	802

Kappa Ponderado	0,810
Erro padrão (Kw'=0)	0,035
Erro padrão (Kw'#0)	0,029

Confiabilidade entre ELISA e	eie_1 Resultado EIE 1
IFI	ifi_1 Resultado IFI 1

	Observer A			
Observer B	1	2	3	
1	451	116	7	574 (71,6%)
2	6	194	1	201 (25,1%)
3	1	26	0	27 (3,4%)
	458 (57,1%)	336 (41,9%)	8 (1,0%)	802

Kappa ponderado	0,60
Erro padrão (Kw'=0)	0,03
Erro padrão (Kw'#0)	0,03

Conclusões

- EIE LVC Bio-Manguinhos apresenta parâmetros de acurácia e repetibilidade excelentes a muito boa, e devido a praticidade pode ser implementado como exame de escolha para triagem dos animais suspeitos em vigilância desta zoonose.