

La diagnosi sierologica di Leishmaniosi canina: ELISA commerciale o IFAT allestita in laboratorio?

Pasquale Santoro e Andrea Vellusi

Traduzione (non letterale) del lavoro pubblicato su: *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 5, February 2015 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/ojvm>

Abstract

I livelli anticorpali anti-*Leishmania infantum* rivestono un ruolo rilevante nella diagnosi ed il follow-up dei cani infetti. Entrambi i metodi: ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e IFAT (Indirect immunofluorescent antibody test) sono correntemente impiegati per dosare i livelli di anticorpi nel cane, ma allo stato attuale, la correlazione tra assorbanza ELISA e titolo IFAT non è stata studiata. In questo articolo, abbiamo confrontato le densità ottiche ottenute con un test ELISA commerciale, Leiscan® (Laboratorios Dr. Esteve SA), con i titoli ottenuti dall'IFAT. Abbiamo misurato l'assorbanza ELISA di: 44 campioni negativi IFAT provenienti da un'area endemica; 10 campioni negativi provenienti da una zona non endemica; 29 campioni con un titolo IFAT tra 1/40 e 1/80; 10 campioni con un titolo IFAT di 1/160; 9 campioni con un titolo IFAT di 1/320; 10 campioni con un titolo IFAT di 1/640; 10 campioni con un titolo \geq IFAT di 1/1280.

I risultati mostrano che:

- a) esiste una scarsa correlazione tra titolo IFAT e assorbanza ELISA;
- b) Leiscan® non è in grado di distinguere tra i campioni IFAT-negativi e con titoli fino a 1:160;
- c) campioni negativi all'IFAT provenienti da un'area endemica e non endemica mostrano una diversa assorbanza se dosati con l'ELISA;
- d) le prestazioni del kit commerciale possono essere migliorate con l'uso di un cut-off più appropriato.

Introduzione

L'identificazione dei cani infetti è fondamentale per il controllo della leishmaniosi umana, in quanto essi sono il principale serbatoio della malattia. La leishmaniosi canina può essere diagnosticata con metodi diretti, dimostrando la presenza del parassita nei puntati linfonodali, nel midollo osseo, con esami colturali, o mediante tecniche indirette sierologiche. Mentre le tecniche dirette difettano in sensibilità, le tecniche sierologiche spesso offrono risultati non chiari in quanto sono più sensibili, ma meno specifiche. La ricerca del parassita mediante PCR, per quanto sia in grado di individuare tutti i soggetti infetti, appare invece essere troppo sensibile per gli screening di massa ed ha un basso valore predittivo nell'identificare i soggetti effettivamente malati. La combinazione di più metodi analitici, a seconda del caso clinico in oggetto, può fornire dati sufficienti per formulare una diagnosi di Leishmaniosi canina.

L'IFAT è uno dei metodi sierologici più frequentemente utilizzati ed è considerata da diversi autori come il "gold standard" nella diagnosi di leishmaniosi. Poiché la tecnica IFAT è comunque lunga nella sua esecuzione e richiede un personale altamente qualificato nella lettura del risultato, sono stati proposti diversi "kit" commerciali ELISA per la ricerca degli anticorpi anti *Leishmania*. Numerosi kit ELISA sono stati posti in commercio: kit che utilizzano estratti antigenici solubili in tampone o solubili in detergenti, che utilizzano antigeni ricombinanti. Ognuno ha caratteristiche ben definite e diverse dagli altri. Il clinico che si rivolge ad un laboratorio che utilizza un metodo ELISA dovrebbe quindi essere bene informato circa le caratteristiche del kit utilizzato e dei relativi vantaggi/svantaggi.

Poiché l'IFAT è stata impiegata per decenni nella diagnosi di leishmaniosi canina, spesso le case produttrici di kit ELISA includono nelle loro istruzioni delle tabelle di corrispondenza tra risultati ELISA ed IFAT.

In questo lavoro abbiamo comparato le densità ottiche ottenute mediante un kit commerciale (LEISCAN, ESTEVE), recentemente descritto come "il nuovo gold standard" per la diagnosi di leishmaniosi canina, con i titoli IFAT. Questo è il primo lavoro pubblicato che compara densità ottiche e titoli IFAT, dimostrando chiaramente che i risultati ottenuti tramite le due tecniche non sono comparabili. Inoltre vengono dimostrati i limiti intrinseci e comuni ai kit commerciali ELISA, correlati alla difficoltà di includere nella confezione un appropriato valore di cut-off.

2. Materiali e Metodi

2.1. ELISA

L'ELISA è stata eseguita come descritto dal produttore.

Tutte le fasi sono state eseguite tra 20 - 25 °C e in continua agitazione meccanica.

In breve: 100 µl di campioni diluiti (1:20), controlli (negativo, positivo alto e basso), venivano dispensati negli appositi pozzetti e incubati 10 minuti. Le piastre venivano lavate cinque volte con 300 µl di soluzione di lavaggio e 100 µl di coniugato venivano infine aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo 5 minuti, dopo un ulteriore lavaggio, venivano aggiunti 100 µl di substrato. La reazione è stata infine stoppata dopo 10 minuti mediante 100 µl di una apposita soluzione. Le micropiastre sono state lette da uno spettrofotometro (EPOCH, BioTek US Winooski, VT 05405, USA).

I risultati sono stati espressi mediante il rapporto tra la D.O. (Densità Ottica) del campione con la D.O. del cut-off incluso nel kit (un campione definito come positivo 1:80 all'IFAT).

Nessun supporto scientifico è fornito dal produttore per la scelta di siffatto cut-off. In particolare colpisce che il produttore includa nel kit un cut-off correlato direttamente alla metodica che esso stesso descrive meno performante.

2.2. IFAT

L'IFAT è stata eseguita impiegando una preparazione dell'antigene ottenuta in laboratorio da colture di promastigoti di *Leishmania infantum* e provenienti da un cane che aveva acquisito l'infezione in modo naturale e senza trattamento.

La procedura di analisi veniva eseguita tramite un protocollo riconosciuto valido dagli opportuni organi di controllo internazionali. Gli anticorpi anti-*Leishmania* sono stati rilevati utilizzando un anticorpo specie specifico anti-IgG coniugate con un marker fluorescente (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Ciascun dosaggio è stato eseguito in duplicato ed è stato letto da due persone con una esperienza specifica nel campo.

L'osservazione è stata eseguita con un ingrandimento di 400-600x.

I sieri di controllo inclusi nel kit ELISA sono stati anche essi esaminati mediante IFAT.

2.3. Reclutamento dei campioni

I campioni siero-negativi all'IFAT sono stati raccolti da cani clinicamente sani con un normale emocromo e normali livelli sierici di urea, creatinina, AST, ALT, e proteine totali.

Tali soggetti esibivano un normale rapporto albumine/globuline e proteinuria/creatinuria e erano sierologicamente negativi per *Ehrlichia canis* e *Rickettsia rickettsii*.

I sieri denominati "zona endemica" provenivano da Napoli, Campania, mentre quelli denominati "zona non endemica", provengono da Padova (Veneto).

I campioni positivi all'IFAT per la presenza di anticorpi anti-Leishmania infantum sono stati selezionati tra i campioni analizzati di routine nel nostro laboratorio specializzato in analisi veterinarie, e provenienti dalla zona endemica di Napoli.

I risultati sono stati riportati come media (\bar{x}) \pm deviazione standard (D.S.). I dati sono stati analizzati con l'aiuto di un software commerciale (GraphPad Prism; GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA).

L'Analisi della varianza, insieme con il post hoc Tukey test è stato usato per confrontare diversi gruppi di dati.

Una valore di $p < 0.01$ è stato considerato come statisticamente significativo.

3. Risultati e discussione

La **Tabella 1** mostra l'assorbanza ELISA a $\lambda = 450$ nm del cut-off ELISA e dei sieri. Come mostrato, la D.O. del cut-off incluso nel kit è pari a 0.560 ± 0.163 , con un titolo IFAT di 1:320. Questo valore è circa due volte superiore alla densità ottica media di campioni IFAT con un titolo di 1:80.

In letteratura vi è un ampio consenso, nelle zone endemiche, nel considerare titoli IFAT $\geq 1:160$ come "positivi", e titoli $\leq 1:80$ come "sospetti". Quindi, utilizzando lo standard incluso nel kit Leiscan®, numerosi campioni sospetti o positivi all'IFAT saranno considerati come negativi (Tabella 1; cut-off 1). È stato analogamente riportato in numerose pubblicazioni scientifiche che può essere considerato adeguato un valore di cut-off per l'ELISA la D.O. pari alla media di un pool di cani non infetti (IFAT negativo) più due volte il valore della deviazione standard. È stato anche riportato che la scelta di un appropriato cut-off nonché le caratteristiche epidemiologiche della zona in esame possono influenzare la sensibilità e la specificità di un metodo. Analogamente, il nostro lavoro mostra che campioni negativi provenienti da diverse aree geografiche (endemica o non endemica) hanno una diversa D.O..

Questi dati, presi insieme, suggeriscono fortemente che il cut-off dell'ELISA deve essere correlato alla area di provenienza dei campioni.

La scelta del corretto cut-off è un passo fondamentale per i risultati ottenuti mediante l'ELISA; e una scelta errata porterà in un errore di interpretazione dei risultati.

Da questo punto di vista, il cut-off incluso nel kit è completamente inadeguato.

Questo fatto è ben illustrato nella Tabella 1.

Come mostrato, campioni positivi all'IFAT fino a un titolo di 1:160 risulteranno come negativi utilizzando il cut-off incluso nella confezione (**cut-off: 1**).

Tuttavia, l'uso di un cut-off ($\bar{x} + 2$ SD) relativo a un pool di sieri provenienti da cani sani negativi (zona endemica; **cut-off: 2**, o da una zona non endemica, **cut-off: 3**) aumenta notevolmente la significatività del risultato.

Utilizzando questo criterio, titoli IFAT di 1:80 e 1:160 appaiono come "sospetti" o come "positivi" all' ELISA (Tabella 1; **cut-off 2-3**), in accordo alla area geografica in oggetto (endemica o non endemica).

Diversamente dall'ELISA, un vantaggio della titolazione IFAT è che il medico veterinario, e non il laboratorio, può assegnare il giusto significato ai risultati ottenuti, in accordo con il follow-up e l'area geografica di provenienza dei campioni. In altre parole, lo stesso titolo di 1:40 o 1:80 ha un significato diverso se si considerano cani clinicamente sani, malati e a seconda della area di appartenenza. Al contrario, titoli compresi tra 1:40 e 1:160 risulteranno semplicemente negativi utilizzando il kit LEISCAN della ESTEVE.

Gruppo	Titolo IFAT	D.O. ELISA ($\lambda=450$ nm)	ANOVA	Cut-off (1)	Cut-off (2)	Cut-off (3)
1	Negativo (area endemica; n=44)	0.127 \pm 0.07				
2	Negativo (area non-endemica; n=10)	0.092 \pm 0.06				
3	1:40 (n=12)	0.168 \pm 0.105	p>0.05	0.30	0.62	0,79
4	1:80 (n=17)	0.247 \pm 0.175	p>0.05	0.44	0.92	1,16
5	1:160 (n=10)	0.306 \pm 0.177	p>0.05	0.54	1.14	1,44
6	1:320 (n=9)	1.28 \pm 0.52	p<0.01	2.28	4.79	6.03
7	1:640 (n=10)	2.27 \pm 0.72	p<0.01	4.05	8.5	10.7
8	\geq 1280 (n=10)	Out of range	---	---	---	---
Cut-off	1:320 (n=3)	0.560 \pm 0.163				

Tabella 1. Correlazione tra assorbimenti ELISA e titoli IFAT. Il raggruppamento dei campioni è basata sul titolo IFAT. I risultati sono stati riportati come media \pm S.D. Il cut-off (1) è stato ottenuto dividendo la D.O. del campione con la D.O. media del cut-off incluso nel kit ELISA. Il cut-off (2) è stato ottenuto utilizzando il pool di campioni negativi provenienti da un'area endemica ($\bar{x} + 2$ D.S.). Il cut-off (3) è stato ottenuto utilizzando il pool di campioni negativi provenienti da una zona non endemica ($\bar{x} + 2$ D.S.). Come riportato nella procedura di " Leiscan® ", un valore compreso tra 0,9 e 1,1 deve essere considerato come " sospetto" ; e un valore tra 1.1 e 1.5 deve essere considerato come un "basso positivo". La colonna ANOVA riporta il valore " p " del D.O. del gruppo considerato rispetto al gruppo 1 (campioni negativi dalla zona endemica).

L'analisi statistica riportata nella Tabella 1 mostra anche che l'ELISA non è in grado di differenziare tra titoli IFAT 1:40 e 1: 160 (ANOVA ; $p > 0,05$). Ciò è dovuto alla elevata D.S. osservata nei gruppi considerati. Va inoltre osservato che l'IFAT permette di distinguere tra diversi pattern di fluorescenza, che non necessariamente possono generare assorbanza ELISA simili. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che l'ELISA e l'IFAT sono metodi che non necessariamente forniscono risultati comparabili. Infine, la tabella 1 mostra che l'ELISA richiede ulteriori diluizioni per misurare campioni con una quantità elevata di anticorpi anti- Leishmania (titoli IFAT $\geq 1 : 1280$). Da questo punto di vista, la quantizzazione di elevati livelli anticorpali necessita di una ulteriore diluizione sia utilizzando l'ELISA che IFAT, ma i risultati resteranno non comparabili.

4. Conclusioni

In conclusione, questo lavoro mostra i limiti diagnostici del Kit commerciale Leiscan® nel dosaggio di anticorpi anti-Leishmania nel cane. Tale limite è dovuto principalmente alla scelta impropria del cut-off da parte del produttore, e dalla impossibilità di considerare, con un unico cut-off tutte le varianti connesse al soggetto in esame.

La impossibilità di avere un adeguato cut-off rappresenta quindi un limite intrinseco per ogni laboratorio che vuole effettuare la quantificazione di anticorpi anti-Leishmania con un kit "commerciale" ELISA.

Altri autori hanno studiato il modo migliore per determinare il valore di cut-off per i saggi sierologici come i metodi arbitrari, metodi per ottimizzare la sensibilità o la specificità, metodi per ottimizzare l'accuratezza del test, curve ROC, e metodi per ottimizzare il valore predittivo.

La discussione su quale di questi metodi è il migliore per la determinazione di anticorpi anti-Leishmania è lontano dallo scopo del presente lavoro. Tuttavia, i nostri risultati suggeriscono che le prestazioni del kit possono essere migliorate utilizzando un cut-off legato ad un pool di sieri raccolto da cani non infetti.

Inoltre, il cut-off dovrebbe essere correlato alla zona geografica di provenienza dei campioni, cosa agevole da fare mediante l'IFAT e l'espressione dei risultati mediante un titolo, ma impossibile da ottenere mediante l'uso di un kit ELISA commerciale.

Infine, l'utilizzo di LEISCAN, seguendo le istruzioni del produttore, non offre quindi alcun vantaggio nella quantificazione di anticorpi anti-Leishmania, in quanto non è in grado di distinguere titoli compresi tra 1:40 e 1: 160 (Tabella 1, ANOVA, $p > 0,05$).

È nostra opinione che, al momento, non vi sono motivi per sostituire un test IFAT correttamente eseguito con un test "commerciale" ELISA.

Ringraziamenti: Gli autori ringraziano Michela Pasquinucci e Emiliana Cigliano per la loro assistenza tecnica specializzata.

Conflitto di interessi: Nessuno degli autori ha un rapporto finanziario o personale con altre persone o organizzazioni che potrebbero influenzare in modo inappropriato o pregiudizi il contenuto del lavoro.

Finanziamento: Gli autori non ha ricevuto un sostegno finanziario per la ricerca, la paternità, e/o la pubblicazione di questo articolo.

Bibliografia

Per la bibliografia, riferirsi al lavoro originale pubblicato on-line:

<http://www.scirp.org/journal/OJVM/>

<http://www.scirp.org/Journal/PaperInformation.aspx?PaperID=54065>