

Análise do Desempenho da Pesquisa de Anticorpos IgG Anti-formas Promastigotas Vivas de *Leishmania (V.) braziliensis* (AAPV-IgG), por Citometria de Fluxo no Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

Roberta D. R. Rocha,¹ Célia M. F. Gontijo,¹ Silvana M. E. Santos,^{1,2} Andréa T. Carvalho,^{1,3} Teresa C. Ferrari,² Rodrigo C. Oliveira,¹ Marcos J. Marques,⁴ Wilson Mayrink,⁵ Olindo A. Martins-Filho.¹

INTRODUÇÃO

Os testes sorológicos convencionais, tais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), são, de um modo geral, considerados de valor limitado na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), devido aos baixos títulos de anticorpos detectáveis (Brito et al., 2000), a ausência de relação desses níveis com a presença de infecção ativa (Souza et al., 1992; Gontijo et al., 2002) e aos altos níveis de reatividade cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae (Vexenat et al., 1996). Vários autores têm procurado superar essas limitações através da busca de preparações antigênicas ideais para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e o diagnóstico sorológico seguro da LTA (Jensen et al., 1996; Gonçalves et al., 2002). Recentemente, desenvolvemos em nosso laboratório uma metodologia para detecção de anticorpos IgG anti-promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis* (AAPV-IgG) (Rocha et al., 2002) que avalia no contexto *ex vivo* a reatividade de anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana do parasito, evitando, dessa forma, a reatividade dos soros com estruturas intracitoplasmáticas, alvos da reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos. Nesta presente investigação avaliamos de forma comparativa o desempenho da RIFI e da AAPV-IgG. Para tal, foram empregados diferentes índices, incluindo sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, probabilidade de doença pós-teste negativo e taxa de falso-positivo. A acurácia foi também avaliada através da construção da *receiver operating characteristic curve*- curva ROC (Greiner et al., 2000), do Índice J de Youden (Youden, 1950) e da Razão de Verossimilhança - RV (Jaescheke et al., 1994). Nossos resultados demonstraram a aplicabilidade da AAPV-IgG como um novo instrumento para ensaios clínicos de diagnóstico sorológico da LTA. Além disso, foi possível identificar que a AAPV-IgG seguida pela análise combinada de AAPV-IgG1 e a AAPV-IgG2, elevou a especificidade do método, favorecendo o esclarecimento diagnóstico de casos positivos pela AAPV-IgG.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - População avaliada. Os indivíduos incluídos nesse estudo foram selecionados a partir de um inquérito clínico-imunoparasitológico, nos municípios de Araçuaí e Caratinga, MG, no período de 1996 a 2000. A População I consistiu de 145 indivíduos classificados em dois grupos, quanto à ausência de lesão (L- = 78) ou presença de lesão com exame parasitológico e/ou Intradermorreação de Montenegro positivos (L+ = 67). Misturas de soros de pacientes portadores de hanseníase (n=8), paracoccidiomicose (n=8), tuberculose (n=8), toxoplasmose (n=10), leishmaniose visceral - IV (n=18) e doença de Chagas - DC (n=18), foram utilizadas nos estudos de especificidade. A População IA foi estabelecida para simular um ensaio clínico em uma área onde coexistam LTA, DC e IV, sendo constituída por 103 indivíduos L-, incluindo 67 indivíduos saudáveis da População I, 18 pacientes portadores de DC e 18 portadores de IV. A Sub-cohort "IA" foi composta por 28 amostras de soros de pacientes L-, incluindo 15 pacientes portadores de DC e 13 portadores de IV e 16 pacientes L+. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz.

2 - Reação de imunofluorescência pela RIFI e pela AAPV-IgG. A RIFI para pesquisa de IgG foi realizada segundo descrição do kit para diagnóstico de leishmaniose humana (Biomanguinhos/FIOCRUZ/MS). Os títulos iguais ou superiores a 1/40 foram considerados como reação positiva. Os ensaios da AAPV-IgG, foram realizados segundo protocolo descrito Rocha et al. (2002).

3 - Análise estatística. O desempenho dos testes foi avaliado segundo diferentes índices, incluindo: sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo -VPP; valor preditivo negativo -VPN; probabilidade de doença pós-teste negativo; taxa de falso positivo e o índice J de Youden (Youden, 1950). A *receiver operating characteristic curve* (curva ROC) foi utilizada para selecionar o melhor ponto de corte para segregar os resultados em positivo ou negativo, bem como calcular a acurácia global dos testes como a área sob a curva ROC-ASC (Swets, 1988;

1. CPqRR-FIOCRUZ; 2. FM/UFMG; 3. EF/UFOP; 4. UFRJ; 5. ICB/UFMG.

Greiner et al., 2000). O desempenho dos testes foi ainda avaliado a partir da determinação das Razões de Verossimilhança (RV) (Jaeschke et al., 1994). A probabilidade pós-teste de doença (PPT) foi calculada a partir das RV.

RESULTADOS

Estudo das curvas ROC da RIFI e da AAPV-IgG na População I - De acordo com Swets, 1988, nossos dados mostraram que a RIFI apresentou uma baixa acurácia ($0,5 < ASC < 0,7$) enquanto a AAPV-IgG mostrou uma acurácia elevada ($0,9 < ASC < 1,0$). A curva ROC da AAPV-IgG demonstrou que o valor de 60% de PFP seria um melhor ponto de corte para a segregação dos grupos L- e L+ (Figura 2). O estabelecimento desse ponto de corte revelou uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 87% para a AAPV-IgG. Dessa forma, nesse estudo, os valores de PFP $\leq 60\%$ referem-se a resultados de baixa reatividade ou resultados negativos e valores de PFP $> 60\%$ definem uma faixa de alta reatividade ou resultados positivos.

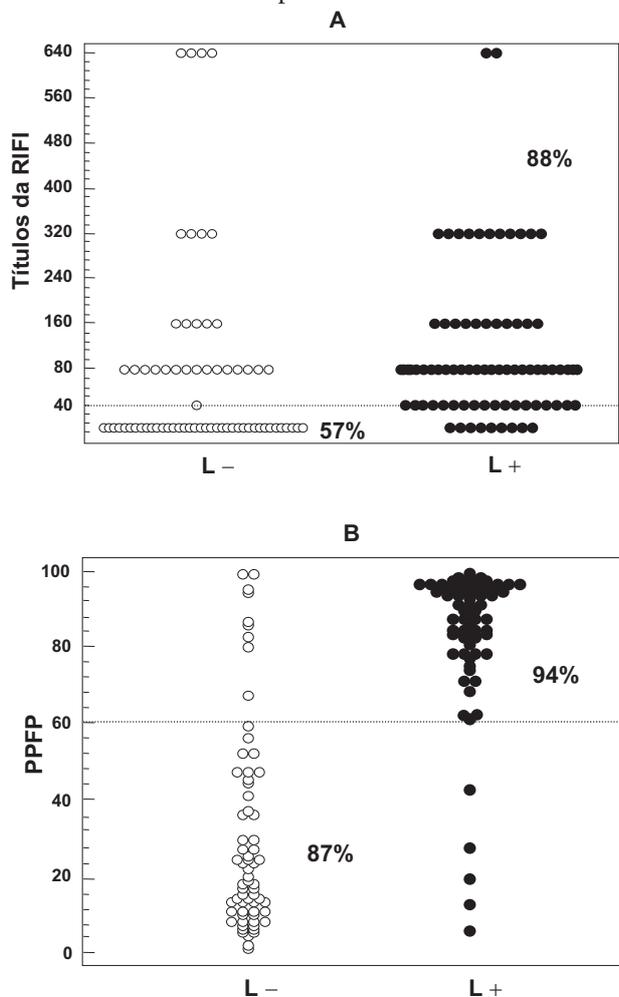


Figura 1 - Reatividade de IgG em amostras de soros da População I, classificadas com L- (○=67) ou L+ (●=78), utilizando RIFI (A) e AAPV-IgG (B). Os resultados da AAPV-IgG correspondem aos valores de PFP na diluição do soro 1:1.1024. A linha pontilhada representa o ponto de corte entre valores positivos e negativos para RIFI e AAPV-IgG.

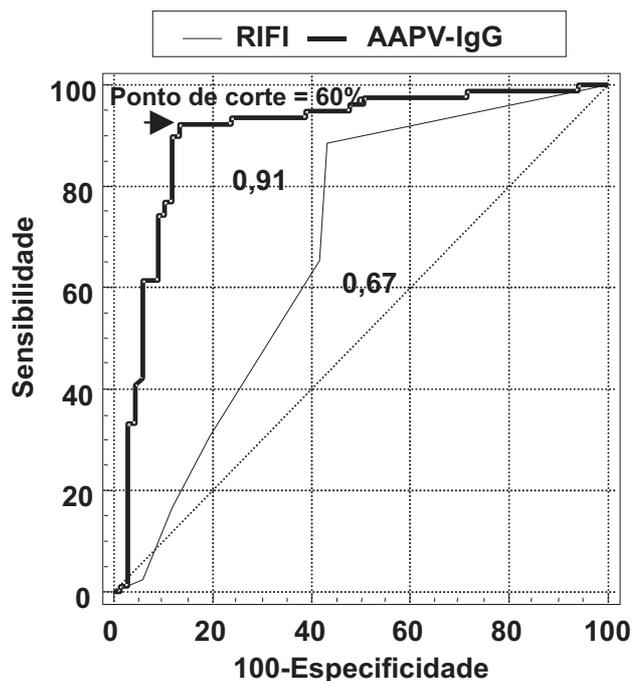


Figura 2 - Curvas ROC da RIFI e da AAPV-IgG construídas a partir dos resultados obtidos na População I. A seta representa a localização do melhor ponto de corte para a AAPV-IgG.

RIFI e AAPV-IgG na População I - Os resultados da RIFI demonstraram que 57% (38/67) dos indivíduos L- apresentaram títulos negativos, enquanto 88% (69/78) dos pacientes L+ apresentaram títulos positivos (Figura 1A). A análise dos resultados da AAPV-IgG permitiu identificar 87% (58/67) dos indivíduos L- com valores de PFP restritos a uma região de baixa reatividade e 94% (73/78) dos pacientes L+ com valores confinados numa região de alta reatividade (Figura 1B).

Identificação de situações clínicas que podem interferir no desempenho da AAPV-IgG - A análise dos resultados permitiu identificar que entre as situações clínicas avaliadas, apenas LV e DC apresentaram valores de PFP $> 60\%$ (Figura 3). Assim, o desempenho da RIFI e da AAPV-IgG foram avaliados, através da curva ROC, numa população

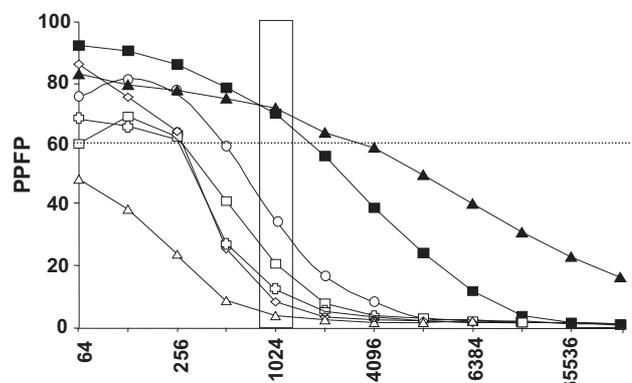


Figura 3 - Reatividade de AAPV-IgG em amostras de soros de indivíduos com diferentes situações clínicas, incluindo hanseníase (◇=6), paracoccidiodomicose (□=8), tuberculose (⊕=8), toxoplasmose (△=10), malária (○=10), leishmaniose visceral (▲=18) e doença de Chagas (=18). O retângulo representa a diluição 1:1024 avaliada. A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados positivos e negativos.

Tabela 1 - Índices de desempenho da RIFI^{3/1/40}, da AAPV-IgG>60% e da análise combinada AAPV-IgG1>60%/IgG2>50% em duas amostras populacionais.*

Índices	População I §		Sub-cohort "IA" †	
	RIFI	AAPV-IgG (Ganho)	RIFI	AAPV-IgG1/IgG2 (Ganho)
Sensibilidade	88	94 (06%)	87	100 (13%)
Especificidade	57	87 (30%)	14	93 (79%)
Valor Preditivo Positivo	70	89 (19%)	36	89 (53%)
Valor Preditivo Negativo	81	92 (11%)	67	100 (33%)
Pr (D+/T-)	19	08 (11%)	33	00 (33%)
Taxa de falso-positivo	43	13 (30%)	86	07 (81%)
Índice J de Youden	51	81 (30%)	03	89 (86%)

* Resultados expressos em porcentagem. § Valores preditivos estimados para a prevalência de 54%. † Valores preditivos estimados para a prevalência de 36%. Pr (D+/T-) = Probabilidade de doença pós-teste negativo.

Tabela 2 - Razão de Verossimilhança (RV) e Probabilidade Pós-Teste (PPT) da RIFI, da AAPV-IgG na População I e da análise combinada AAPV-IgG1/IgG2 aplicadas na Sub-cohort "IA" em diferentes pontos de corte.

Métodos	Pontos de Corte	RV	PPT (%)
Títulos da RIFI	≥ 40	2,04	70,0
	< 40	0,20	18,6
AAPV-IgG	> 60	6,97	88,9
	≤ 60	0,07	7,40
AAPV-IgG1/IgG2	IgG1>60%/IgG2>50%	14,0	88,8
	IgG1≤60%/IgG2≤50%	0	0

simulada (População IA) onde foram incluídos pacientes portadores de DC e LV. A análise dos resultados mostrou que a despeito de uma queda no desempenho de ambos os métodos em relação ao observado para a População I, na População IA a AAPV-IgG ainda apresenta um melhor desempenho com uma acurácia moderada ($0,7 < ASC < 0,9$) em relação à RIFI, que apresentou uma baixa acurácia na População IA ($0,5 < ASC < 0,7$) (Dados não mostrados).

Análise comparativa do desempenho da RIFI e da AAPV-IgG na População I - A AAPV-IgG demonstrou um ganho real em todos os índices avaliados em relação à RIFI, principalmente em especificidade, taxa de falso positivo e Índice J de Youden (Tabela 1). As RVs e PPTs da RIFI mostraram-se desprovidas de valor diagnóstico, enquanto para a AAPV-IgG mostraram que PPF>60% contribuem para a confirmação do diagnóstico de LTA e que PPF≤60% praticamente excluem o diagnóstico de LTA (Jaeschke et al., 1994).

AAPV-IgG1 e AAPV-IgG2 no esclarecimento de situações AAPV-IgG positivas - O estudo das Curvas ROC da AAPV-IgG1 e da AAPV-IgG2 na População IA mostrou, respectivamente, que os valores de 60% e 50% de PPF nas diluições do soro 1:16384 e 1:64 seriam os melhores pontos de corte para a segregação dos grupos L- e L+. A análise dos dados da AAPV-IgG1 demonstrou que 71% (20/28) dos indivíduos L- apresentaram valores de PPF=60% e 100% dos pacientes L+ permaneceram com valores de PPF confinados a uma região de alta reatividade (Figura 4B). A análise dos resultados da AAPV-IgG2 demonstrou que 75% (21/28) dos indivíduos L- apresentaram valores de PPF restritos a uma região de baixa reatividade e 100% dos pacientes L+ permaneceram com valores de PPF confinados a uma região de alta reatividade (Figura 4C). A análise

combinada da AAPV-IgG1/IgG2 permitiu esclarecer 93% (26/28) de situações de AAPV-IgG positivas que não apresentavam LTA, com resultados restritos a uma região de baixa reatividade e confirmar 100% (16/16) dos casos ativos de LTA com sorologia positiva pela AAPV-IgG, com resultados confinados a uma região alta reatividade (Figura 4D).

Desempenho da RIFI e da análise combinada de AAPV-IgG1 e AAPV-IgG2 no esclarecimento de sorologia falso-positiva pela AAPV-IgG - A Tabela 1 apresenta os valores dos índices de desempenho da RIFI e da análise combinada de AAPV-IgG1/IgG2 obtidos a partir dos resultados apresentados na Sub-cohort "IA". A análise dos dados demonstrou um ganho real em relação da AAPV-IgG1/IgG2 em relação à RIFI aplicada na Sub-

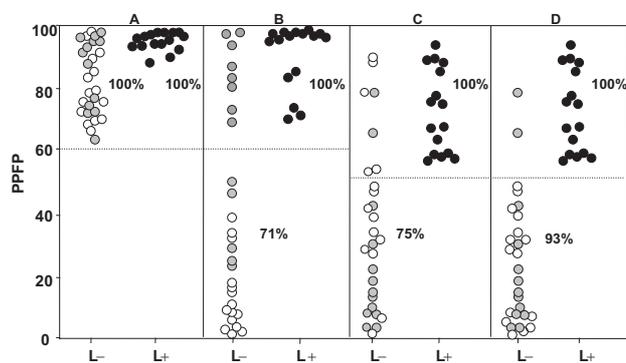


Figura 4 - Reatividade de IgG anti-L. (V.) braziliensis em amostras de soros da sub-cohort "IA", classificadas com L- (● VL=13 and ○ CD=15) ou L+ (● =16) incluindo, AAPV-IgG>60% (A), AAPV-IgG1>60% (B), AAPV-IgG2>50% (C) e a análise combinada AAPV-IgG1>60%/IgG2>50% (D). Os resultados estão expressos em PPF para as amostras individuais, nas diluições 1:1024 (A), 1:16384 (B) e 1:64 (C), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte entre resultados positivos e negativos.

cohort “IA” em todos os índices avaliados (Tabela 1). Os valores de RVs e das PPTs de doença para os pontos de corte propostos para a análise combinada da AAPV-IgG1/IgG2 estão apresentados na Tabela 2. Os resultados destes índices mostraram que um resultado positivo (IgG1>60%PPFP e IgG2>50%PPFP) na análise combinada da AAPV-IgG1/IgG2 praticamente confirma o diagnóstico da LTA, enquanto um resultado negativo (IgG1≤60%PPFP e IgG2≤50%PPFP) praticamente exclui o diagnóstico da infecção ativa.

CONCLUSÃO

Neste estudo, a análise comparativa dos resultados da RIFI e da AAPV-IgG permitiu concluir que o novo método apresenta melhor aplicabilidade na identificação de casos de LTA em atividade clínica. O estudo dos índices de desempenho expressos em percentual e expressos em chances (RVs), demonstrou ainda que a análise combinada AAPV-IgG1/IgG2 aplica-se ao esclarecimento de situações de AAPV-IgG positivas numa amostragem populacional que inclui outras infecções. Esses dados re-enfatizam aplicabilidade da AAPV-IgG no diagnóstico sorológico da LTA e sugerem a utilização combinada da AAPV-IgG1/IgG2 como método sorológico adicional em áreas endêmicas onde a LTA, IV e DC coexistam.

REFERÊNCIAS

1. Brito, M. E. F., M. G. Mendonça, Y. M. Gomes, M. L. Jardim, and F. G. C. Abath. 2000. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7:318-321.
2. Gonçalves, C. C. M., E. M. V. Reiche, B. A. Abreu-filho, T. G. V. Silveira, T. C. Felizardo, K. R. Maia, R. Costacurta, E. J. Padovesi, B. P. Dias-Filho, S. I. Jankevicius, and J. V. Kamkevicius. 2002. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:91-102.
3. Gontijo C. M. E., E. S. Silva, M. B. Fuccio, M. C. A. Sousa, R. S. Pacheco, E. S. Dias, J. D. Andrade Filho, R. P. Brazil, and M. N. Melo. 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Act. Trop.* 81:143-150.
4. Greiner, M., D. Pfeiffer, and R. D. Smith. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45:23-41.
5. Jaescheke R., G. H. Guyatt, and D. L. Sackett. 1994. User's guides to the medical literature. III: How to use an article about a diagnosis test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA.* 271:703-707.
6. Jensen, A. T. R., A. Gaafar, A. Ismail, C. B. V. Christensen, M. Kemp, A. M. El Hassan, A. Kharazmi, and T. G. Theander. 1996. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55:490-495.
7. Rocha R. D. R., C. M. F. Gontijo, S. M. Elói-Santos, A. Teixeira-Carvalho, R. Corrêa-Oliveira, M. J. Marques, O. Genaro, W. Mayrink, and O. A. Martins-Filho. 2002. Anticorpos anti promastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 6:551-562.
8. Souza W. J. S., P. C. Sabrosa, C. S. Souza, M. F. Henrique, and S. G. Coutinho. 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 52:111-119.
9. Swets J. A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* 240:1285-1293.
10. Vander Helm H. J., and E. A. H. Hische. 1979. Application of Bayes's theorem to results of quantitative clinical chemical determinations. *Clin. Chem.* 25:985-988.
11. Vexenat, A. C., J. M. Santana, and A. R. L. Teixeira. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 38: 177-185.
12. Youden W. J. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 3:32-35.