

Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA

Comparative study about the specific antileishmania of immunoglobulin G and E as markers of infection and illness among dwellers of a visceral leishmaniasis endemic area in São Luis, MA

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento^{1,2}, Geusa Felipa de Barros Bezerra^{1,2}, Abderval Pinto Bandeira Neto¹, Leopoldo Muniz da Silva¹, José de Macêdo Bezerra¹ e Graça Maria de Castro Viana¹

RESUMO

Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em área endêmica de leishmaniose visceral na ilha de São Luis, MA no período de maio de 1999 a maio de 2000. A casuística foi composta de 1.016 menores de 16 anos. Destes, foram randomizados 85 para dosagem de IgE antileishmania pelo ELISA. A prevalência de soropositividade por IgG foi de 17,1% (174 menores) e 0,4% da população evoluiu para leishmaniose visceral doença. A positividade para IgE antileishmania, foi de 43,5% dos 85 indivíduos estudados. Dos 7 casos de calazar no passado analisados, observou-se que todos apresentavam positividade para IgG e 4 (57,14%) permaneceram positivos para IgE, mesmo 7 anos após a cura. Os 3 menores com leishmaniose visceral doença, apresentaram positividade para IgG e IgE antileishmania. A detecção de IgE antileishmania demonstrou ser marcador de infecção para Leishmania chagasi em área endêmica, não sendo entretanto, marcador de doença.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral. Imunoglobulinas. Marcadores de infecção.

ABSTRACT

Comparative study regarding IgG and IgE anti-leishmania as markers of infection and illness among residents of a visceral leishmaniasis visceral leishmaniasis endemic area, São Luis, MA in the period from May 1999 to May 2000. All the 1,016 individuals younger than 16 years old were tested for the presence of IgG by ELISA. A total of 174 (17,1%) children revealed a positive IgG test and 4 children showed symptoms of classical visceral leishmaniasis during the time of the survey: 85 IgE anti-leishmania ELISA tests with positivity of 43,5% were realized. In this sample, all 7 children with past-visceral leishmaniasis in the sample were IgG positive and 4 (57,1%) were IgE positive, even after a 7 year post treatment period. Three children with current visceral leishmaniasis were evaluated, and all of them were positive for both tests. The detection of antileishman IgE antibodies presented as a good marker for infection by Leishmania chagasi in endemic areas but not as a disease marker.

Key-words: Visceral leishmaniasis. Immunoglobulins. Infection markers.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de grande importância mundial, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo, tanto por sua prevalência quanto por sua letalidade quando não tratada, apresentando um comportamento endêmico no Brasil^{3 9 14 18 21 22}.

No Maranhão, desde o ano de 1982, a LV representa uma epidemia, com surtos epidêmicos nos anos de 1984-1985, 1993-1994 e 1998-2001, sendo que nos anos de 1999 e 2000 o Estado foi o maior notificador de casos à Fundação Nacional de Saúde. A Ilha de São Luis responde por uma importante

1. Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA. 2. Centro de Ensino Universitário do Maranhão, São Luis, MA.

Endereço para correspondência: Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento. Rua Duque Bacelar, Quadra 33, casa 41, Calhau, 65067-510 São Luis, MA, Brasil.

e-mail: cnsd_ma@uol.com.br, leopoldomuniz@pop.com.br

Recebido para publicação em 3/8/2004

Aceito em 29/8/2005

parcela destes casos, com destaque para São Luis e Paço do Lumiar¹⁹.

Altas taxas de anticorpos são encontradas no curso da infecção por *L. chagasi* e a detecção destes é um dado diagnóstico importante para identificar casos de LV em indivíduos com infecção por este parasita. Estes anticorpos não têm um papel protetor evidente na leishmaniose. No entanto, acredita-se que podem estar envolvidos na patogênese desta protozoose^{19,20}.

Embora a IgE seja principalmente associada com reações alérgicas classificadas como reações de hipersensibilidade tipo I, sua relação com doenças infecciosas como as helmintíases e, mais recentemente, com protozooses e infecções virais tem sido demonstrada^{4,15}. Títulos séricos de IgE total e frações específicas de IgE antileishmania e anticorpos IgG foram demonstrados por Atta cols², em indivíduos com diferentes formas clínicas da infecção, associando seus níveis à gravidade da doença e resposta à terapêutica^{5,8,16,17,23,24}.

Nos estudos de Atta cols² foi observada a elevação dos níveis de IgE total em pacientes com leishmaniose visceral-doença, na infecção subclínica de *L. chagasi*, em indivíduos moradores em área endêmica e naqueles com infecções helmínticas. Porém, anticorpos IgE específicos antileishmania foram observados somente em pacientes com leishmaniose visceral doença. Esta descoberta indica que a produção de anticorpos IgE específicos antileishmania não é meramente uma consequência da ativação policlonal das células B, mas também resposta direcionada ao antígeno.

Entretanto, ainda é controverso o comportamento dos anticorpos da classe IgE nas diversas formas clínicas de LV em áreas endêmicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar se os anticorpos da classe IgE são um marcador de doença na infecção por *L. chagasi* em uma área endêmica no Estado do Maranhão.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo transversal de prevalência, etariamente estratificado.

Neste trabalho, estudou-se a população das localidades Parque Thiago Aroso/Vila São José II, município de Paço do Lumiar, na Ilha de São Luis, Maranhão – Brasil, no período de maio de 1999 a maio de 2000. Tais localidades foram escolhidas por ser área endêmica de LV, apresentando uma prevalência de 2,5 casos/1.000 habitantes, nos anos de 1994 e 1995¹⁹.

A totalidade dos domicílios foi visitada, perfazendo 527 domicílios no Parque Tiago Aroso e 306 na Vila São José II, com um total de 1.016 menores distribuídos em 445 domicílios.

Todos os 1.016 menores tiveram seus soros submetidos ao teste ELISA para detecção de anticorpos IgG antileishmania, e um total de 85 amostras foram analisadas para pesquisa de IgE antileishmania: 61 testes colhidos entre os indivíduos soropositivos para IgG e 24 testes entre os soronegativos para IgG. Todos os testes sorológicos foram efetuados no Laboratório de Imunologia do Hospital Edgar Santos, da Universidade Federal da Bahia.

Considerou-se LV no passado quando a doença foi registrada a partir de pelo menos 6 meses atrás. O antígeno utilizado foi preparado no Laboratório de Imunologia do Hospital Edgar Santos/UFBA, a partir da cepa *L. chagasi* “ELEONE”, seguindo técnica descrita por Atta cols².

A análise estatística dos dados se baseou em testes não paramétricos, como o qui-quadrado (χ^2) de independência com a correção de Yates, para avaliar a associação dos dados de IgG e IgE e o teste de Mann-Whitney (Teste U) para verificação da relação do tempo de calazar e a positividade ou não da IgE.

Os dados coletados foram tabulados em um banco de dados no Programa Epi-Info 6.04.

RESULTADOS

Dos 833 domicílios visitados, em 445 foi referida a presença de indivíduos menores de 16 anos, num total de 1.016 menores, com média aproximada de 2,3 menores por domicílio. Dos menores estudados, 495 (48,7%) eram do sexo masculino e 521 (51,3%) do sexo feminino.

De acordo com a faixa etária, 257 (25,3%) menores encontravam-se entre 0 e 4 anos, 387 (38,1%) na faixa de 5 a 9 anos e 372 (36,6%) de 10 a 15 anos.

A detecção dos anticorpos IgG antileishmania foi considerada positiva quando a densidade óptica foi igual ou superior ao *cut off* de 0,095. Deste modo, detectaram-se 174 (17,1%) menores soropositivos e 842 (82,9%) soronegativos.

A soropositividade do teste de ELISA com IgG antileishmania foi predominante (46,6%) na faixa etária de 10 a 15 anos.

Dos 1.016 menores estudados, 4 crianças apresentaram sintomas da leishmaniose visceral, sendo os casos confirmados através da imunofluorescência indireta (IF) e pelo teste de ELISA.

Dentre os 1.016 menores estudados, 34 (3,3%), apresentavam história de LV doença comprovada no passado há no mínimo 6 meses. Dentre estes, 20 (58,8%) ainda apresentavam soropositividade para IgG. O período de ocorrência de LV doença nestes indivíduos variou de um a sete anos antes desta pesquisa.

A Figura 1 mostra os casos de LV no passado, segundo o período em que foi diagnosticada a doença e demonstra que a soropositividade por IgG antileishmania em moradores de área endêmica permanece, através desta detecção, mesmo em indivíduos que tiveram LV doença há mais de 7 anos.

Foram realizados um total de 85 testes de ELISA para pesquisa de IgE antileishmania, sendo 61 (71,7%) testes randomizados entre as amostras positivas para IgG antileishmania e 24 (28,2%) testes randomizados entre as negativas para IgG antileishmania.

A Tabela 1 demonstra a relação observada entre a soropositividade por IgG e IgE antileishmania. Dentre os 85 exames realizados, para pesquisa de IgE antileishmania,

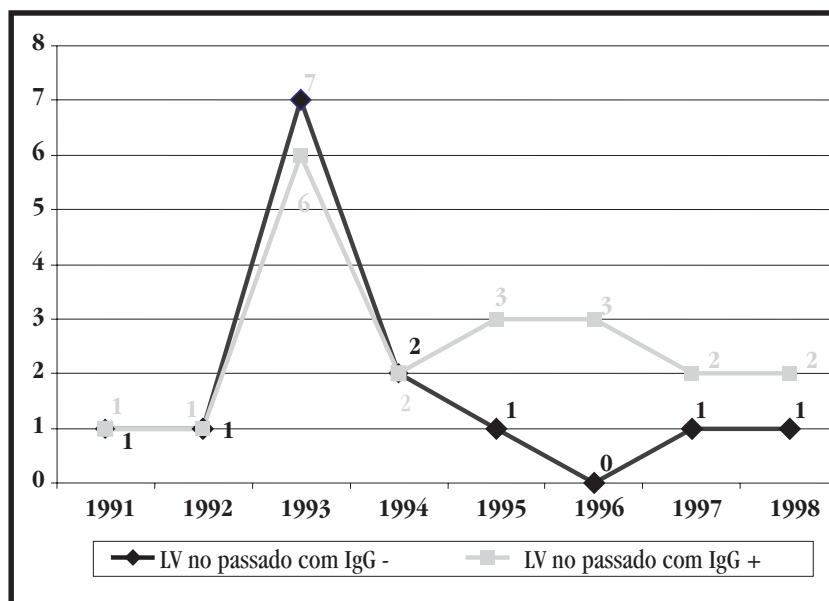


Figura 1 - Distribuição dos 34 casos de LV no passado, segundo o ano de aparecimento da doença e a soropositividade atual por IgG. Paço do Lumiar, Maranhão, 2000.

Tabela 1 - Distribuição da sororreatividade pelo ELISA por IgG e IgE antileishmania. Paço do Lumiar, Maranhão, 2000.

Imunoglobulina E	Imunoglobulina G		Total
Cut off IgE = 0,197	IgG (+)	IgG (-)	
IgE (+)	37	0	37
IgE (-)	24	24	48
Total	61	24	85

Teste do qui-quadrado (χ^2) com a correção de Yates (p= 0,0000013)

37 (43,5%) apresentaram-se positivos e todos estes também eram concomitantemente positivos para a pesquisa de IgG antileishmania. Não houve casos de positividade de IgE em indivíduos sem positividade IgG antileishmania. Treze menores apresentaram positividade isolada para IgG.

A partir destes achados, observa-se que os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo para pesquisa de anticorpos IgE específicos antileishmania em indivíduos infectados por *L. chagasi* apresentam-se como se segue: a) sensibilidade = 60,6%; b) especificidade = 100%; c) valor preditivo positivo = 100%; d) valor preditivo negativo = 50%.

O risco relativo (RR) calculado para a associação entre a positividade por IgE e IgG antileishmania foi de 2 (RR = 2,0; IC - 95%, 1,51-2,65). O valor do qui-quadrado (χ^2) com a correção de Yates foi de 23,37, valor de p = 0,0000013.

Dos 7 casos de menores com história de LV no passado analisados, observou-se que todos apresentavam-se positivos para IgG e apenas 4 (57,1%) permaneciam positivos para IgE. O teste de Mann-Whitney (teste "U") foi utilizado para avaliar a relação entre o tempo após a cura da leishmaniose visceral e a sororreatividade por IgE antileishmania. O valor de U encontrado foi igual a 5, com Z = -0,35. O valor de p foi igual a 0,72.

Quanto à avaliação do teste de IgE antileishmania como marcador de doença ativa na leishmaniose visceral, observou-se

que todos os 3 menores com LV aguda, incluindo o menor que evoluiu para o óbito apresentaram forte positividade para IgE. No entanto, diversas amostras positivas para estes anticorpos foram obtidas a partir de menores sem sinais ou sintomas de leishmaniose visceral clássica. A correção de Yates para o χ^2 desta relação forneceu o valor de 2,0, com um p não-significativo de 0,157 (Tabela 2).

Tabela 2 - Detecção de IgE antileishmania em crianças infectadas por *L. chagasi* com a forma assintomática da infecção e com leishmaniose visceral. Paço do Lumiar, Maranhão, 2000.

Imunoglobulina E	Formas clínicas		
	LV doença	assintomáticos	total
Cut off IgE = 0,197			
IgE (+)	3	34	37
IgE (-)	0	48	48
Total	3	82	85

Teste do qui-quadrado (χ^2) com a correção de Yates (p=0,15)

Os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do teste de ELISA por IgE para leishmaniose visceral doença foram: a) sensibilidade = 100%; b) especificidade = 58,5%; c) valor preditivo positivo = 8,1%; d) valor preditivo negativo = 100%.

DISCUSSÃO

Nos últimos vinte anos, a leishmaniose visceral tem apresentado um aumento significativo no número de casos notificados, tanto no Brasil como em diversos países da Ásia, África, Américas e Europa²².

Estudos prévios identificaram formas clínicas variadas de infecção por *L. chagasi* (assintomático, oligosintomático e LV clássica) e evolução da infecção para LV doença em um percentual considerável de indivíduos. Entretanto, no presente estudo, as quase totalidades das crianças soropositivas

apresentaram-se assintomáticas, sendo o percentual de evolução para LV muito baixo em comparação aos encontrados na literatura^{3 14 20}. Como a diminuição do número de casos de infectados que apresentam a forma oligossintomática ou evolução para LV não pode ser explicada por uma maior sensibilidade do teste diagnóstico empregado, é possível que aspectos nutricionais expliquem em parte este fenômeno.

Dye e Willians¹² baseados em dados de áreas endêmicas do Brasil concluíram que crianças são mais susceptíveis à LV quando elas são mais jovens e mais desnutridas, porém permanece desconhecida se a imunidade à LV adquirida com a idade é sempre adquirida com resultado de infecção. Neste contexto, é possível que o número de indivíduos desnutridos ou a gravidade da desnutrição, importantes fatores de risco para evolução da infecção assintomática para doença, tenham diminuído nesta área endêmica da Ilha de São Luis, MA.

O teste de ELISA por IgG antileishmania utilizado no presente trabalho demonstrou sensibilidade em todos os 4 menores que desenvolveram LV clássica. Além disso, o teste de ELISA por IgE foi igualmente sensível para os 3 menores com LV clássica analisados. Tais achados concordam com Shiddo e cols²⁰ que, em estudos na Somália, determinaram os níveis das subclasses de IgG e IgE no soro de pacientes com leishmaniose visceral-doença e verificaram que a concentração de IgG é um marcador da leishmaniose visceral.

Segundo demonstrou Chatterjee e cols⁷ em estudos com calazar indiano, a quantificação de IgG antileishmania é uma boa alternativa sorológica para monitoramento de LV.

A validação do teste de ELISA já foi comprovada em estudos com indivíduos clinicamente suspeitos recrutados em área endêmica. El Assad e cols¹³, no Sudão, demonstraram altos níveis de IgG, com 93,4% de sensibilidade e 93,7% de especificidade antes da quimioterapia.

O teste de ELISA por IgG antileishmania utilizado no presente trabalho demonstrou sensibilidade em todos os 4 menores que desenvolveram LV clássica. Dados estes que concordam com Anam e cols¹, que em teste semelhante detectaram 100% de sensibilidade, com alta significância de valores de absorvância de IgG, como também com Nascimento¹⁹, que numa casuística de 9 pacientes em 1.000 habitantes, conseguiu inferir a sensibilidade para o diagnóstico em 100% e a especificidade em 75%.

A sensibilidade e especificidade das diferentes classes de imunoglobulina estudadas por Anam e cols¹ demonstraram que a IgG apresentou 100% de sensibilidade e 85% de especificidade, enquanto que a IgE apresentou 98% de especificidade e 44% de sensibilidade. Estes dados concordam com os obtidos neste estudo, onde a sensibilidade do teste foi evidenciada em todos os casos que evoluíram para LV doença.

Da Matta e cols¹⁰, demonstraram que anticorpos IgE, IgG e subtipos tiveram seus níveis reduzidos após o tratamento, aventando assim um possível marcador imunológico para seguimento de quimioterapia na LV. Estes achados corroboram com os obtidos nessa pesquisa, já que todos os pacientes com calazar no passado e tendo feito o tratamento, ainda apresentavam-se positivos para IgG. Entretanto, a maioria destes

mesmos indivíduos já haviam negativado o teste para IgE, reafirmando seu valor como marcador pós-tratamento¹¹.

Apesar da IgE antileishmania ter sido positiva em todos os 3 casos analisados de LV doença, indivíduos assintomáticos podem apresentar positividade no teste, não sendo portanto, marcador de doença ativa, o que discorda de Atta e cols², que observou a elevação dos níveis de IgE total somente em pacientes com leishmaniose visceral doença.

Diante do exposto, conclui-se que, na população estudada, houve decréscimo dos títulos e negatificação do teste de IgE antileishmania em pacientes curados de leishmaniose visceral, sendo este um melhor marcador pós-tratamento do que a dosagem de IgG. Entretanto, a dosagem de IgE antileishmania não se mostrou marcador específico de doença, sendo positiva em muitos indivíduos com formas assintomáticas de LV.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus e Dr. Marcelo Nascimento Burattini pela colaboração na execução dos testes laboratoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anam K, Afrim F, Gura SK. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 231-235, 1999.
2. Atta AM, Correa J, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:426-430, 1998.
3. Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 188:1003-1011, 1986.
4. Bryce PJ, Oettgen HC. Antigen-independent effects of immunoglobulin E. *Current Allergy and Asthma Respiratory* 5:186-190, 2005.
5. Carvalho EM, Bacelar O, Brownell C, Regis I, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 152:5949-5956, 1994.
6. Carvalho EK, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson Jr WD. Absence of gamma-IFN and interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation* 76: 2066-2069, 1985.
7. Chateerjee M, Basu D, Mandal C. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian Kalaazar patients. *Clinical and Experimental Immunology* 114:408-413, 1998.
8. Coffman RL, Carty JA. T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon gamma. *Journal of Immunology* 136: 949-954, 1986.
9. Costa CHN, Pereira H F, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública* 24:361-372, 1990.
10. Da Matta VL, Hoshino-Shimizu S, Dietze R, Corbett CE. Detection as specific antibody and subtypes before and after treatment of american visceral leishmaniasis. *The Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14:5-12, 1990.
11. D'Oliveira Jr A. Leishmaniose: aspectos clínicos-epidemiológicos, imunológicos e terapêuticos, Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia-Faculdade de Medicina, Salvador, BA, 1998.

12. Dye C, Willians BG. Malnutrition age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proceedings Biological Sciences* 254:33-39, 1993.
13. Ellasad AM, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalb HW. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese leishmaniasis patients. *Clinical and Experimental Immunology* 95:294-299, 1994.
14. Evans TG, Texeira MJ, McAuliffe IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42:118-123, 1990.
15. Hagan P. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunology* 15: 1-4, 1993.
16. Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Texeira MJ, Sousa ADE, Sadick MD, Vasconcelos AW, Abrams JS, Pearson RD. Correlates of *Leishmania* - specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *The Journal of Infectious Disease* 167:411-417, 1993.
17. Locksley RM, Scott P. Helper T cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunology Today* 12: 58-61, 1991.
18. Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 67-72, 1994.
19. Nascimento MDSB. Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luís, Maranhão-Brasil: análise da dinâmica de transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, 1996.
20. Shiddo SA, Hultdt G, Nilsson LA, Ouchterlony O, Thorstensson R. Visceral leishmaniasis in Somalia Significance of IgG subclasses and of IgE response. *Immunology Letters* 50: 87-93, 1996.
21. Vieira JB, Lacerda MM, Marsden PD. National reporting of leishmaniasis: the brazilian experience. *Parasitology Today* 6: 339-340, 1990.
22. World health organization. Visceral Leishmaniasis – Disease information. WHO. Available from URL: <http://www.who.int/diseases/leish/diseaseinfo.htm>, 2000.
23. Yanagihura Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Koshio T, Basaki Y, Akiyama K. Functional significance of IL-4 receptor on B cells in IL-4 induced human IgE production. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96:1145-1151, 1995.
24. Zwiongenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Senkamp S, Neiger S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous IL-4 over IFN-gamma production. *Clinical Immunology and Immunopathology* 57: 242-249, 1990.