



Avaliação Comparativa do Desempenho da Subclasse IgG3 por Citometria de Fluxo no Diagnóstico e Cura da Leishmaniose Visceral Americana em Relação a Outros Testes Imunológicos e Moleculares

Toni Ramos Alves de Souza, Leandro de Freitas Teles, Maria Fernanda Guimarães de Carvalho, Elenice Moreira Lemos, Talita Antunes Guimarães, Agostinho Gonçalves Viana, Silvio Fernando Guimarães Carvalho

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença, muitas vezes negligenciada, causada por um protozoário, parasita intracelular obrigatório, transmitido por vetores. A LV tem uma distribuição mundial com cerca de 400.000 casos de LV ocorrendo a cada ano. O diagnóstico da LV é geralmente complexo, porque suas manifestações clínicas mimetizam muitas doenças microbianas. A doença é caracterizada clinicamente por febre, perda de peso gradual e esplenomegalia, sendo frequentemente fatal sem tratamento específico [1].

A confirmação do diagnóstico depende de demonstração do parasita em amostras de tecidos diretamente ou após cultura. Embora o exame microscópico de aspiração do baço e/ou esfregaço de medula óssea têm maior eficácia diagnóstica, porém são procedimentos invasivos, e mais restritos [1].

Há uma série de testes serológicos que têm sido desenvolvidos e avaliados para o diagnóstico de LV. Os testes com base na detecção de anticorpos no soro, tais como o anticorpo de imunofluorescência, ensaio ligado a enzima-imunossorvente (ELISA) e o antígeno recombinante de 39 aminoácidos (rK39) à base de um teste ELISA [2,3].

Apesar de altos níveis de anticorpos específicos anti-leishmania terem sido usados com sucesso para determinar diagnóstico de LV, a reatividade sorológica residual observada em pacientes curados de LV representa o principal fator determinante da baixa eficiência da maioria das abordagens sorológicas para avaliar a cura pós-terapêutica em LV.

Devido às limitações destas técnicas para abordagens imunológicas, alternativas têm sido empregadas. Logo, tem sido relatada a aplicabilidade do método de imunofluorescência baseado em citometria de fluxo para a detecção de anticorpos IgG *anti-live and fixed* contra *L. chagasi*, e avaliado o seu desempenho para a detecção de cura após tratamento específico em LV humana [4].

Métodos moleculares, tais como PCR para DNA de *Leishmania* no sangue periférico, são sensíveis e específicos para o diagnóstico e seguimento de pacientes com leishmaniose visceral [5].

Apesar dos avanços no diagnóstico laboratorial, até o momento a definição de cura se baseia principalmente em melhora clínica indicada por desaparecimento da febre, redução do baço e do tamanho do fígado. Assim, um dos principais desafios atualmente tem sido a criação de ferramentas de laboratório para avaliar a eficácia do tratamento. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os testes imunológicos e moleculares aplicados em pacientes antes e após a cura clínica e a aplicabilidade da citometria de fluxo no acompanhamento pós-terapêutico destes pacientes.

Material e métodos

A. Pacientes e Amostras

Este estudo foi realizado no Hospital Universitário Clemente de Farias, entre abril de 2011 e maio de 2014 em Montes Claros, MG, Brasil. Vinte e um pacientes considerados portadores de LV por apresentarem quadro clínico característico, como febre, hepatoesplenomegalia e palidez tiveram diagnóstico confirmado por qualquer um dos seguintes métodos: pesquisa direta de amastigotas em esfregaço de medula óssea, promastigotas em cultura de aspirado de medula óssea e teste rápido anti-rK39. As amostras de soro e sangue total de pacientes com LV foi coletada antes do tratamento (AT) e seis meses após o tratamento (6 mDT).

B. Testes Laboratoriais

Microscopia Direta, identificação da *Leishmania* a partir do aspirado de medula óssea. *Kala-azar Detect®* (tira de rK39), detecção qualitativa de anticorpos contra o antígeno rK39 da *Leishmania* (*L.*) *chagasi* no soro durante a infecção ativa. *Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)*, todas as amostras que mostram resultados positivos a uma diluição de 1:40 foram consideradas reativas. *ELISA (Ensaio de Enzima Ligada a Imunossorvente)*.

C. Citometria de Fluxo e PCR em tempo real (qPCR)



A detecção de anticorpos na L. chagasi anti-fixo contra promastigotas por citometria de fluxo (FC-AFPA) foi realizada como descrito por Lemos *et al.*[4]. Foram analisadas as subclasses IgG1 e IgG3.

As reações no qPCR foram realizadas como descrito anteriormente Ferreira *et al.*[6]

D. Análise Estatística

Os níveis de desempenho dos testes foram avaliados através da determinação de um intervalo de índices expressos em porcentagem, com base nas seguintes fórmulas: (i) sensibilidade; (ii) a especificidade; (iii) o valor preditivo positivo (VPP); (iv) o valor preditivo negativo (VPN); (v) acurácia e razão de verossimilhança (RV), tendo RV para os resultados positivos (RV+), e RV para os resultados negativos (RV-). As análises foram realizadas por Graphpad Prism 6.

Resultados e Discussão

A. Desempenho dos testes e visão geral

Todos os pacientes seis meses após o tratamento (06 mDT) foram curados e foram considerados verdadeiros negativos para a determinação da especificidade na avaliação de métodos de controle de cura.

A percentagem de resultados positivos e negativos e os diferentes métodos avaliados em AT e 06 mDT são apresentados na Fig. 1(A e B). Os níveis de desempenho dos testes a utilizada para o diagnóstico da LV estão totalmente listadas na Tabela 01. Excetuando a microscopia direta e o RIFI, todos os outros métodos demonstraram elevada sensibilidade: a tira de rK39, ELISA, FC-AFPA IgG3, FC-AFPA-IgG1 (sensibilidade, 95%), qPCR. Em relação à especificidade, FC-AFPA IgG3 mostrou uma maior especificidade em relação ao RIFI, à tira de rK39, à ELISA, à qPCR e à FC-AFPA IgG1. Além disso, os VPP e de acurácia foram observados melhores para FC-AFPA IgG3 em relação ao RIFI, tira de rK39, ELISA, qPCR e FC-AFPA IgG1. Os mais alto valor preditivo negativo também foram encontrados para FC-AFPA IgG3.

B. Subclasses FC-AFPA IgG como ferramentas laboratoriais para avaliação de cura em LV.

Os resultados apontam que 1: 128.000 para FC-AFPA IgG1 e 1: 640 para IgG3 foram as diluições de soros mais promissoras para segregar os valores médios de percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) entre o AT e 06 mDT.

A utilidade de FC-AFPA IgG1 para avaliação de cura da LV em 06 mDT foi demonstrada pela sua capacidade de identificar 19/20 amostras de AT confinados a uma região de PPFP > 50% (sensibilidade = 95%) e 15/20 de amostras de 06mDT confinado em uma região de PPFP ≤ 50% (especificidade de 70%). O FC-AFPA IgG3 também apresentou bons índices de desempenho, sendo capaz de identificar 19/21 das amostras de AT dentro de uma região de PPFP > 40% (sensibilidade = 90,5%) e 19/21 de amostras 06 mDT restrito a PPFP ≤ 40% (especificidade = 90,5%). RV confirmou que FC-AFPA IgG3 tem um excelente desempenho como critério de cura após a intervenção terapêutica na LV (Tabela 01).

Logo, As técnicas sorológicas (rK39 e ELISA) e a molecular qPCR se mostraram sensíveis no diagnóstico da LV, mas pouco eficazes na avaliação de cura. Além disso, a FC- AAPF IgG, baseada na citometria de fluxo, se mostrou uma técnica eficaz para ser utilizada no diagnóstico da LV com os índices de desempenho expressos em percentual demonstrando melhor performance da FC-AAPF IgG3 em relação aos outros métodos avaliados no monitoramento precoce de cura pós-terapêutica da LV (06 mDT). Demostramos ainda que a FC-AAPF IgG1 se mostrou eficaz no diagnóstico da LV, no entanto, apresentou baixa performance no monitoramento de cura precoce em comparação com AAPF IgG3.

Conclusão

Nossos dados demonstram o verdadeiro potencial de citometria de fluxo (FC-AFPA subclasse IgG1 e IgG3) no diagnóstico e a subclasse IgG3 como ferramenta para a avaliação não invasiva do sucesso do tratamento da leishmaniose visceral.

Referências

- [1] DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in dermatology*. 1996 Sep-Oct;14(5) v. 14, n. 5, out-sep 1996.
- [2] ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012;7(5):e35671. v. 7, n. 5, jan. 2012.
- [3] SUNDAR, S. Reed SG, et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*. v. 21, n. 351, fev. 1998.

- [4] LEMOS, E.M. *et al.* Detection of anti-leishmania (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. **Clinical and vaccine immunology** : CVI. 2007 May;14(5):569-76. v. 14, n. 5, maio 2007.
- [5] CASCIO, A. *et al.* Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. **Pediatrics**. v. 109, n.2, fev. 2002.
- [6] FERREIRA, S.A. *et al.* Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.7, n. 4, nov. 2013.

Tabela 1. Índices de desempenho de diferentes métodos.

Método Diagnóstico	Sensibilidade (%) (95% CI)	Especificidade (%) (95% CI)	VPP (%) (95% CI)	VPN (%) (95% CI)	Acurácia (%) (95% CI)	LR+
Microscopia Direta	76% (55-89)	*	*	*	*	*
RiFI	81% (6-92)	76% (55-89)	77% (56-89)	80%(58-92)	79% (64-88)	3.4
rK39	100% (85-100)	57% (36-75)	70% (52-83)	100% (85-100)	79% (64-88)	2.3
ELISA	90.5% (71-97)	71.5% (50-86)	76%(57-89)	88% (66-97)	81% (67-90)	3.2
FC-AFPA IgG3	90.5% (71-97)	90.5% (71-97)	90.5% (71-97)	90.5% (71-97)	90.5% (71-97)	9.5
FC-AFPA IgG1	95% (76-99)	70% (48-85)	76% (57-89)	93%(70-99)	83% (68-91)	3.2
qPCR	95% (75-99)	31% (14-56)	62% (44-77)	83% (44-97)	66% (49-79)	1.4

* Não aplicados por questões éticas

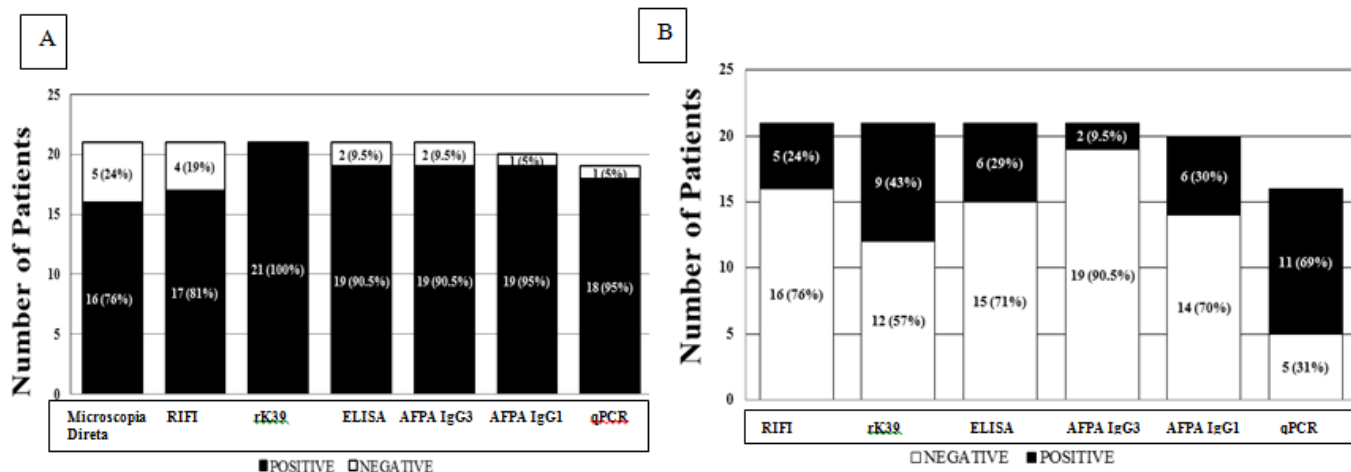


Figura 1. A) Percentagem de resultados positivos e negativos Antes do tratamento (AT) pelas diferentes técnicas avaliadas. B) Percentagem de resultados positivos e negativos após 06 meses de tratamento.