

Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro¹
 Alexandre Casimiro de Macedo²
 Aparecida Taemi Nagao-Dias³
 Guilherme Alves de Lima Henn⁴
 Cássio Marinho Campelo⁵
 Luiz Carlos Albuquerque Pinto⁶
 Lília Maria Carneiro Câmara⁷

ESTUDO SOROLÓGICO DA CO-INFECÇÃO DE LEISHMANIA INFANTUM E MYCOBACTERIUM LEPRAE EM ÁREA DE ALTA ENDEMICIDADE

SOROLOGICAL STUDY OF COINFECTION LEISHMANIA INFANTUM E MYCOBACTERIUM LEPRAE IN AREA OF ENDEMICITY HIGH

RESUMO

Introdução: A região Nordeste é responsável por 55% dos casos de hanseníase e por quase 50% dos casos de Leishmaniose visceral no Brasil. O Ceará, em especial a capital Fortaleza, é responsável por um grande número de casos novos dessas doenças. Este fato é reforçado pela correlação na distribuição de casos dessas patologias por municípios do estado do Ceará, onde de acordo com os dados da Secretaria de Saúde do Estado (2013), observa-se forte correlação epidemiológica entre os casos de hanseníase e do Leishmaniose visceral nos 184 municípios principalmente em Fortaleza. **Objetivos:** Nosso objetivo foi analisar a produção de anticorpos IgM anti-PGL1 em pacientes com Calazar sem tratamento. **Material e métodos:** 28 pacientes com confirmação clínico-laboratorial para Leishmaniose visceral acompanhados no Hospital São José de Doenças Infecciosas. **Resultados:** Quanto ao gênero, 21 foram do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com mediana de idade de 20,5 anos (var. 3 a 76 anos), dos quais 15 pacientes não necessitaram internamento e 13 foram internados por um período médio de 28 dias (var. 5 a 28 dias). A média e desvio-padrão do índice de IgM anti-PGL1 foi de 1,91 + 0,69,

Carneiro IPDM, Macedo AC, Nagao-Dias AT, Henn GAL, Campelo CM, Pinto LCA, Câmara LMC. Estudo Sorológico da Co-infecção de Leishmania Infantum e Mycobacterium Leprae em Área de Alta Endemicidade. Hansen Int. 2015; 40 (2): p. 59-64.

sendo 78,6% considerados soropositivos. **Conclusão:** Não foi observada qualquer diferença entre gênero, idade, necessidade ou não de internamento, ou tempo de tratamento. A alta frequência de IgM anti-PGL1 positiva pode ser secundária à ativação policlonal que ocorre na Leishmaniose visceral, dificultando a possibilidade de detecção da infecção pelo *M. leprae* por avaliação sorológica em região de alta endemicidade para Leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral, Hanseníase, IgM anti-PGL1

Agência de Fomento: CNPQ

Submetido em 12/04/2016

Aprovado em 22/07/2016

- 1 Bióloga - Mestre - Faculdade de Medicina/FAMED - Universidade Federal do Ceará/UFC
- 2 Farmacêutico - Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem/FFOE - Universidade Federal do Ceará/UFC
- 3 Biomédica - Doutora - Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem/FFOE - Universidade Federal do Ceará/UFC
- 4 Médico Infectologista - Mestre - Hospital São José de Doenças Infecciosas/HSJ e Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina/FAMED - Universidade Federal do Ceará/UFC
- 5 Biólogo - Especialista - Faculdade de Medicina/FAMED - Universidade Federal Ceará/UFC
- 6 Biomédico - Mestre - Faculdade de Medicina/FAMED - Universidade Federal Ceará/UFC
- 7 Médica - Doutora - Faculdade de Medicina/FAMED - Universidade Federal Ceará/UFC

ABSTRACT

Introduction: The Northeast region accounts for 55% of leprosy cases and nearly 50% of cases of visceral leishmaniasis in Brazil. Ceará, in particular the Fortaleza capital is responsible for a large number of new cases of these diseases. This fact is reinforced by the correlation in the distribution of cases of these diseases in the state of Ceará counties where according to the data of the State Health Department (2013), we observed strong epidemiological correlation between cases of leprosy and visceral leishmaniasis in 184 counties mostly in Fortaleza. **Objectives:** Our objective was to analyze the production of anti-PGL1 IgM antibodies in patients with visceral leishmaniasis untreated. **Materials and Methods:** 28 patients with clinical and laboratory confirmation for visceral leishmaniasis followed at São José Hospital for Infectious Diseases. **Results:** As to gender, 21 were males and 7 females, with a median age of 20,5 years (var 3-76 years.), Of which 15 patients did not require hospitalization and 13 were hospitalized for an average 28 days (var. 5 to 28 days). The mean and standard deviation of the anti-IgM PGL1 index was 1.91 ± 0.69 , and 78.6% considered seropositive. **Conclusion:** It was not observed any difference between gender, age, necessity or not hospitalization, or time treatment. The high frequency of positive IgM anti-PGL1, can be secondary to polyclonal activation occurring in kala-azar, hindering the possibility of detection of *M. leprae* infection by serologic evaluation in high endemicity area for visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis, leprosy, anti-IgM PGL 1

Development Agency: CNPQ

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o mundo vem assistindo o aumento global das doenças infecciosas emergentes. Com o avanço das viagens turísticas e dos processos migratórios que sofre o mundo, é imperativo que o sistema de saúde esteja ciente da associação de organismos nas doenças infecciosas e como isso pode representar um desafio e impacto no tratamento e diagnóstico^{1,2}.

Estudos sobre doenças infecciosas em seres humanos revelam que a coinfeção pode desempenhar um papel crítico no binômio saúde-doença, através dos efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro e sobre a associação da patogenicidade entre organismos, modificando os padrões epidemiológicos das doenças humanas^{3,4,5,2}.

A coinfeção de um hospedeiro por várias espécies de parasitas é uma condição comumente observada,

onde susceptibilidade individual e a patogenicidade são afetadas em vários níveis. Ao nível imunológico, as mudanças ocorrem pela alteração nos padrões de citocinas, que podem agir sinergicamente ou antagonicamente com aquelas provocadas por outra espécie, aumentando ou dificultando simultaneamente o controle das infecções, sendo de importância para a compressão da dinâmica da coinfeção^{6,7,8}.

Leishmaniose visceral e hanseníase são doenças infecciosas crônicas que acometem principalmente indivíduos de países de clima tropical e em desenvolvimento. Causadas pelos microrganismos intracelulares *Leishmania infantum* e *Mycobacterium leprae*, possuem a capacidade de resisitir à fagocitose por macrófagos. Os mecanismos imunológicos desencadeados pela infecção possuem pontos em comum, gerando um espectro da doença que vai de formas assintomáticas ou oligossintomáticas até formas mais agressivas com comprometimento sistêmico. A ocorrência da coinfeção pode gerar mudanças no padrão de resposta imune acarretando uma maior susceptibilidade às formas mais graves destas doenças⁹⁻¹³.

Leishmanioses são primariamente zoonoses que afetam outros animais, além do homem. São endêmicas em 88 países no mundo, presente em todos os continentes, exceto Austrália e Antártica. Constituem-se na segunda categoria de doença mais importantes entre as negligenciadas e está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo e a segunda entre as causadas por protozoários após a malária. É uma enfermidade que está associada ao desequilíbrio social relacionado com a pobreza, a desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de moradia e a falta de recursos sociais¹⁴⁻²⁰.

A região Nordeste é responsável por 50% dos casos de Leishmaniose visceral e por que 55% dos casos de Hanseníase no Brasil. O Ceará, em especial a capital Fortaleza, é responsável por um grande número de casos novos dessas doenças. Este fato é reforçado pela correlação na distribuição de casos dessas patologias por municípios do Estado do Ceará, onde de acordo com os dados da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (2008, 2009 e 2013) observou-se uma forte correlação epidemiológica entre os casos de hanseníase e de calazar nos 184 municípios, principalmente em Fortaleza (Pearson variando de 0,96 a 0,98; $p < 0,0001$). Este trabalho teve como objetivo analisar a produção de anticorpos IgM anti-PGL1 em pacientes com Calazar sem tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do

Ceará (PROSPESQ) em 31 de março de 2014 (CAAE 20297113.5.0000.5054); e do Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital São José de Doenças Infecciosas da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA), em 25 de abril de 2014 (CAAE 20297113.5.3001-5044).

As coletas de dados e do material clínico foram realizadas através de busca ativa pelos pacientes nos setores de emergência, laboratório de coleta de sangue e enfermarias do HSJ. Antes da coleta do material clínico o paciente (e/ou seu responsável) foram esclarecidos a respeito do estudo, procedimentos, riscos e finalidade através do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), autorizando a continuidade do processo ao assiná-lo. Os pacientes eram provenientes do município de Fortaleza, capital do Estado do Ceará.

Após a confirmação clínico-laboratorial da leishmaniose visceral, e tendo o consentimento do paciente ou de seu representante legal, foram colhidos 3,0 mL de sangue periférico, em tubo com gel separador, dos pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas no momento do diagnóstico. O soro foi mantido a -80°C até a dosagem de anticorpos IgM anti-PGL1 por ELISA, que considerou como positivo valores de índice iguais ou acima de 1,2 (índice = média D.O. da amostra-branco/média D.O. do soro-padrão negativo-branco), segundo Nagao-Dias *et al*²¹.

Para o teste de ELISA foram utilizados microplacas (Costar, Cambridge, USA), IgM anti-PGL1 (Sigma, EUA), solução de ortofenilenodiamina 0,4mg/ml, H_2O_2

a 0,01% e tampão de 0,1 M de citrato-fosfato²¹.

Análise Estatística

As diferenças dos níveis de anti-PGL1 em pacientes com Calazar segundo idade, gênero e condições clínicas para internamento ou não foram comparados usando os testes t-Student e o teste de Perseon. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Foi utilizado para análise dos dados o software Graph Pad Prism versão 6.0.

RESULTADOS

No período de abril de 2014 a julho de 2015, foram colhidas amostras de 28 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de Leishmaniose visceral. Quanto ao gênero, 21 foram do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com mediana de idade de 20,5 anos (var. 3 a 76 anos), dos quais 15 pacientes não necessitaram internamento e 13 foram internados por um período médio de 28 dias (var. 5 a 28 dias).

Não foram observadas diferenças entre os valores médios das dosagens de IgM anti-PGL1 quando o grupo de 11 crianças (3 a 15 anos) foi comparado ao de 17 adultos (18 a 72 anos), com $p = 0,4020$ (Teste t não-pareado). Também não houve diferença nos valores médios das dosagens de IgM anti-PGL1 entre os pacientes internados ($N = 13$) e os que não necessitaram internamento ($N = 15$), com $p = 0,2528$ (Teste t não-pareado).

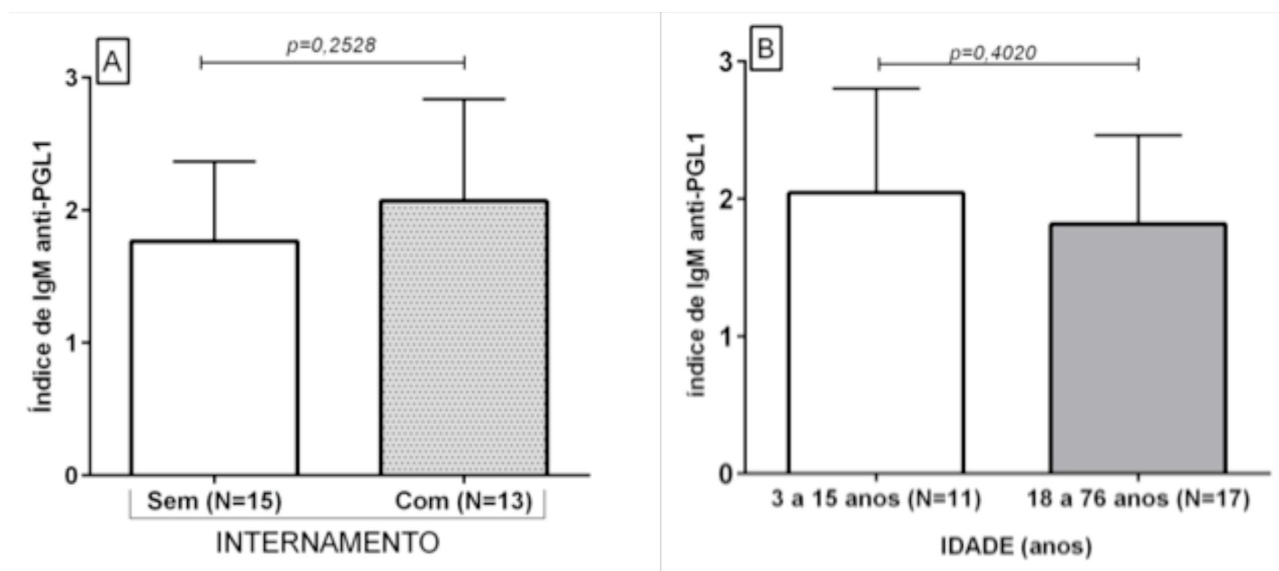


Figura 1 – Comparação entre as dosagens de IgM anti-PGL1 em pacientes com Calazar, sem tratamento quanto à idade (A) e à necessidade de internamento (B). Teste “t” não-pareado, com significância $p < 0,05$.

Quando analisamos os 28 pacientes quanto à positividade para IgM anti-PGL1 (índice maior ou igual a 1,2) observamos que 78,6% foram considerados soropositivos, com média de $2,06 \pm 0,61$ (var. 1,3 a 3,6) (Figura 2).

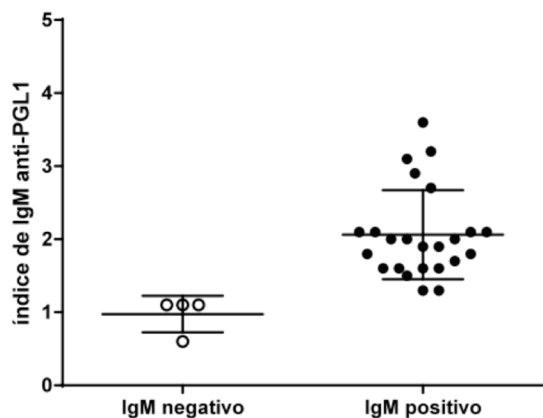


Figura 2 – Comparação entre os pacientes com Calazar sem tratamento quanto ao resultado da dosagem de IgM anti-PGL1.

Ao compararmos os índices de IgM anti-PGL1, cujas dosagens foram realizadas em trabalho anterior do mesmo grupo, de amostras de 140 indivíduos controles (mediana 26,5 anos, sendo 59 do sexo masculino, 81 do sexo feminino) e de 49 pacientes com hanseníase sem tratamento (mediana de 44 anos, 25 do sexo masculino, 24 do sexo feminino, sendo 24 multibacilares, 24 paucibacilares e 1 indeterminado) provenientes também do município de Fortaleza-CE, com os dados dos pacientes com calazar sem tratamento, observamos que houve diferença significativa dos valores do índice de IgM anti-PGL1 dos controles ($1,53 \pm 0,10$, var.0,1 a 6,4) em relação aos pacientes com calazar ($1,91 \pm 0,13$, var.0,6 a 3,6), que por sua vez apresentaram resultado semelhante aos pacientes com hanseníase ($4,14 \pm 0,56$, var.0,4 a 14,6) (Figura 3)

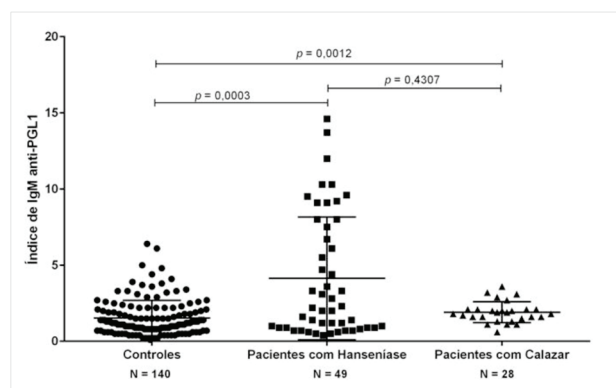


Figura 3 – Distribuição do índice de IgM anti-PGL1 de 140 indivíduos controles, 49 pacientes com hanseníase sem tratamento e 28 pacientes com calazar sem tratamento. Teste de Mann-Whitney, significância $p < 0,05$.

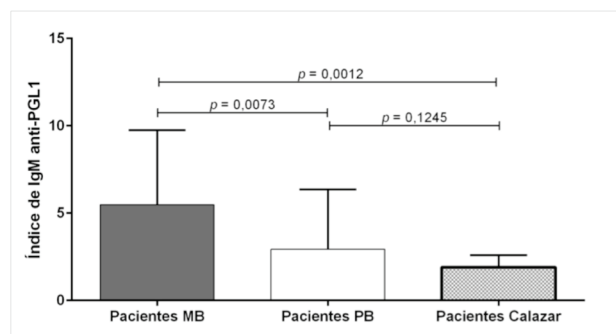


Figura 4 – Distribuição do índice de IgM anti-PGL1 de 24 pacientes com hanseníase multibacilar (MB), de 24 com hanseníase paucibacilar (PB) e de 28 pacientes com calazar sem tratamento. Teste de Mann-Whitney, significância $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Analisamos 28 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral sem tratamento, provenientes de região endêmica tanto para calazar como para hanseníase, quanto à sorologia para IgM anti-PGL1 e correlacionamos com dados de idade e evolução clínica do calazar. Considerando que 75% dos pacientes apresentaram índices de IgM anti-PGL1 considerados positivos, não foram encontradas diferenças quanto aos grupos etários de crianças e adultos, ou quanto à necessidade ou não de internamento do paciente, dado este que diz respeito à gravidade do quadro inicialmente apresentado pelo paciente.

Em estudos anteriores (dados não mostrados) demonstramos soropositividade para calazar (IgG anti- *Leishmania infantum* por ELISA) de 26,5% em 49 pacientes com hanseníase, sem relação com a forma clínica (paucibacilar ou multibacilar) e de 7,1%

em 140 contatos intradomiciliares de indivíduos com hanseníase. Observamos forte correlação entre a dosagem de anticorpos IgG anti-PGL1 e IgG anti-*Leishmania* (Contatos: Pearson $r = 0.4219$, $p < 0,0001$ e Pacientes: Pearson $r = 0.3301$, $p = 0,0205$), indicando que aqueles indivíduos podem estar infectados com *Leishmania infantum*, ou que ensaios sorológicos em região de alta endemicidade para ambas as patologias podem gerar resultados falso-positivos.

Em trabalho anterior, nosso grupo avaliou o índice de IgM anti-PGL1 em uma população controle e em pacientes com hanseníase não tratada. Ao compararmos com os dados dos pacientes com calazar, estes apresentam valores maiores que os dos controles e semelhantes aos pacientes com a forma paucibacilar da hanseníase.

A quantificação dos níveis de anticorpos anti-PGL1 tem sido relatado como promissor na detecção do *M. leprae* na população^{22,23}. Bazan-furini e cols²⁴ relataram que os altos níveis de IgM anti-PGL1 facilitaria na caracterização e o risco no desenvolvimento da hanseníase.

Contudo a alta frequência de reações positivas para IgM anti-PGL1 em indivíduos com leishmaniose visceral pode ser secundária à ativação policlonal que ocorre nesta patologia²⁵ dificultando a possibilidade de detecção da infecção pelo *M. leprae* por aquele marcador sorológico, e levantando a dúvida sobre a correta interpretação de pesquisa de IgM anti-PGL1 em regiões onde são detectados a presença dos dois microrganismos.

CONCLUSÃO

Não foi observada qualquer diferença entre gênero, idade, necessidade ou não de internamento, ou tempo de tratamento. A alta frequência de IgM anti-PGL1 positiva pode ser secundária à ativação policlonal que ocorre no Calazar, dificultando a possibilidade de detecção da infecção pelo *M. leprae* por avaliação sorológica em região de alta endemicidade para leishmaniose visceral.

AGRADECIMENTOS

Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), Universidade Federal do Ceará (UFC), Faculdade de Medicina (FAMED), Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem (FFOE).

FONTE DE FINANCIAMENTO

CNPQ

REFERÊNCIAS

- 1 Hawley DM, Altizer SM. Disease ecology meets ecological immunology understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations. *Funct Ecol.* 2011;25(1):48-60. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01753.x
- 2 Ezenwa OV, Jolles EA. From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integr Comp Biol.* 2011;51(4):540-551. doi: 10.1093/icb/icr058
- 3 Lee NH, Embi CS, Vigeland KM, White CR Jr. Concomitant pulmonary tuberculosis and leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Oct;49(4):755-7. doi:10.1067/S0190-9622(03)00456-0
- 4 Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaiser MMM, et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol.* 2010 Aug;40(10):1171-6. doi:10.1016/j.ijpara.2010.05.003
- 5 Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, Gier B, Sartono E, Maizels RM, et al. Regulatory T cells in human geohelminth infection suppress immune responses to BCG and *Plasmodium falciparum*. *Eur J Immunol.* 2010;40(2):437-42. doi:10.1002/eji.200939699
- 6 Delobel P, Launois P, Djossou F, Sainte-Marie D, Pradinaud R. American cutaneous leishmaniasis, lepromatous leprosy and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. *Clin Infect Dis.* 2003;37(5):628-33. doi: 10.1086/376632
- 7 Molina I, Fisa R, Riera C, Falcó V, Elizalde A, Salvador F, et al. Ultrasensitive Real-Time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Am J Trop Hyg.* 2013;89(1):105-10. doi:10.4269/ajtmh.12-0527
- 8 Bogaart EVD, Talha AB, Straetemans M, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP et al. Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC Immunol.* 2014 May;15(16):1-10. doi: 10.1186/1471-21721516
- 9 Scollard DM, Stryjewska BM, Prestigiacomo JF, Gillis TP, Waguespack-Labiche J. Hansen's disease (leprosy) complicated by secondary mycobacterial infection. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Mar;64(3):593-6. doi: 10.1016/j.jaad.2009.10.004.
- 10 Rijal A, Rijal S, Bhandari S. Leprosy coinfection with kala-zar. *Int J Dermatol.* 2009 Jul;48(7):740-2. doi:

- 10.1111/j.1365-4632.2009.04018.x.
- 11 Azeredo-Coutinho RBG, Matos DCS, Nery JAC, Valete-Rosalino VM, Mendonça SCF. Interleukin-10 dependent down regulation of interferon-gamma response to *Leishmania* by Mycobacterium leprae antigens during the clinical course of a coinfection. *Braz J Med Biol Res* 2012 July;45(7):632-6. doi:10.1590/S0100-879X2012007500073
 - 12 Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:480. doi: 10.3389/fimmu.2014.00480
 - 13 Zofou D, Nyasa RB, Nsagha DS, Ntie-Kang F, Meriki HD, Assob JC, et al. Control of malaria and other vector-borne protozoan diseases in the tropics: enduring challenges despite considerable progress and achievements. *Infect Dis Poverty*. 2014 Jan 8;3(1):1. doi: 10.1186/2049-9957-3-1
 - 14 Clem A. A current perspective on leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010 May;2(2):124-6. doi: 10.4103/0974-777X.62863.
 - 15 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
 - 16 Gross TJ1, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE et al. Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):2326-38. doi: 10.4049/jimmunol.1301758
 - 17 Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012 Dec;14(15):1377-89. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.014
 - 18 Stromme EM, Bærøe K, Norheim OF. Disease control priorities for neglected tropical diseases: lessons from priority ranking based on the quality of evidence, cost effectiveness, severity of disease, catastrophic health expenditures, and loss of productivity. *Dev World Bioeth*. 2014;14(3):132-41. doi:10.1111/dewb.12016
 - 19 Boer MC, Joosten SA, Ottenhoff TH. Regulatory T-cells at the interface between human host and pathogens in infectious diseases and vaccination. *Front Immunol*. 2015 May 11;6:217. doi: 10.3389/fimmu.2015.00217.
 - 20 Roy S, Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Ghosh S, Kumar S, Sarkar K, et al. A defective oxidative burst and impaired antigen presentation are hallmarks of human visceral leishmaniasis. *J Clin Immunol*. 2015 Jan;35(1):56-67. doi: 10.1007/s10875-014-0115-3.
 - 21 Nagao-dias AT, Almeida TLP, Oliveira MF, Santos RC, Lima ALP, Brasil M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *Braz J Infect Dis*. 2007 Apr;11(2):215-9. doi:10.1590/S1413-86702007000200009
 - 22 Foss NT, Callera F, Alberto FL. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. *Braz J Med Biol*. 1993 [cited 2015 Nov 20];26(1):43-51 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8220267>
 - 23 Frota CC, Freitas MV, Foss NT, Lima LN, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Jul;104(7):490-5. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.03.006.
 - 24 Bazan-furini R, Motta ACF, Simão JCL, Tarquinio DC, Marques W Junior, Barbosa MHN *et al*. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL1 antibodies and consanguinity. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 2011;106(5):536-40. doi: 10.1590/S0074-02762011000500003
 - 25 Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, Acosta-Rodríguez EV, Gruppi A. B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res*. 2012;2012:362131. doi: 10.1155/2012/362131.

Autor para correspondência:
Cássio Marinho CAMPELO
Rua Alexandre Baraúna - 949 - Rodolfo Teófilo - Fortaleza - Ceará
e-mail: kciocampello@gmail.com