

Nueva evidencia sobre el valor diagnóstico de la prueba de inmunofluorescencia indirecta y la reacción intradérmica de hipersensibilidad retardada en la infección humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* en la Amazonia brasileña

Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil

New evidences on the diagnostic value of indirect immunofluorescence test and delayed hypersensitivity skin test in human infection by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in the Amazon, Brazil

Raimundo Nonato Pires Barbosa
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

José Aprígio Nunes Lima
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Zuila de Jesus Coelho Corrêa
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Iorlando da Rocha Barata
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Roseli Conceição dos Santos de Jesus
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Maria Sueli Barros Pinheiro
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Domingas Ribeiro Everdosa
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Edna de Freitas Leão
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

João Alves Brandão
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Fábio Márcio Medeiros da Silva
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Raimundo Negrão Coelho
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Maria das Graças Soares da Silva
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Antonio Júlio de Oliveira Monteiro
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Marliane Batista Campos
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Raimundo Sérgio Machado
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Adelson Alcimar Almeida de Souza
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

João Batista Palheta da Luz
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Ralph Lainson
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Antonio Francisco Pires Martins
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Fernando Tobias Silveira
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brasil

Roberto Carlos Feitosa Brandão
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Correspondencia / Correspondência / Correspondence :

Fernando Tobias Silveira
Instituto Evandro Chagas, Seção de Parasitologia
Rodovia BR 316, km 07, s/nº, Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
E-mail: fernandotobias@iec.pa.gov.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Rocio Tamara (resumen) y Lota Moncada (artículo)

RESUMEN

Estudio prospectivo realizado a partir de mayo de 2006 hasta septiembre de 2008 con una muestra de 1.099 individuos de ambos sexos, con edades de 1 a 84 años (media 24,4 años), residentes en un área endémica de leishmaniasis visceral americana (LVA) en el Municipio de Cametá (Estado de Pará, Brasil). Su objetivo es examinar la prevalencia y la incidencia de la infección humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, así como la dinámica de la evolución de los perfiles clínicos e inmunológicos definidos previamente: 1. Infección asintomática (IA); 2. Infección sintomática (IS = LVA); 3. Infección subclínica oligosintomática (ISO); 4. Infección subclínica resistente (ISR); y 5. Infección inicial indeterminada (III). El diagnóstico de la infección, se basa en la utilización simultánea de la reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI) y reacción intradérmica de hipersensibilidad retardada. Se diagnosticaron un total de 304 casos de la infección durante el periodo de estudio (187 en la prevalencia y 117 en la incidencia), dando una prevalencia acumulada de 27,6%, cuya distribución, dentro de los perfiles clínicos e inmunológicos, fue del siguiente orden: IA 51,6%, III 22,4%, ISR 20,1%, ISO 4,3% e IS (= AVL) 1,6%. Con base en la dinámica de la infección, el principal hallazgo recae en el perfil III, que tuvo un papel decisivo en la evolución de la infección, dirigiéndola ora hacia el polo inmunológico de resistencia, perfiles ISR (21 casos, 30,8%) e IA (30 casos, 44,1%), ora hacia el polo inmunológico de susceptibilidad, perfil IS (1 caso, 1,5%); además, de estos casos, 16 mantuvieron el perfil III hasta el final del estudio. Se concluyó que este método de diagnóstico puede contribuir al monitoreo de la infección en las zonas endémicas, con el objetivo principal de prevenir la morbilidad de la LVA, así como reducir el tiempo y los gastos con el tratamiento.

Palabras clave: *Leishmania (L.) infantum chagasi*; Infección; Pruebas Inmunológicas; Hipersensibilidad Retardada; Técnica del Anticuerpo Fluorescente Indirecta.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, uno de los aspectos de mayor interés relativo a la interacción entre la *Leishmania (L.) infantum chagasi* Shaw 2002 (= *Leishmania chagasi* Cunha y Chagas 1937), el agente etiológico de la leishmaniasis visceral americana (LVA), y la respuesta inmune del hombre dice respecto al aspecto clínico e inmunológico que puede resultar de esa interacción. De ese modo, parece claro que un buen entendimiento con relación a ese espectro clínico, principalmente en lo que se refiere al repertorio de respuestas del sistema inmune del hombre contra la infección por ese agente, puede ser de crucial importancia en la conducción de casos clínicos de la infección. En este sentido, ha sido considerado, hasta recientemente, que el espectro clínico puede variar desde una forma asintomática de la infección, registrada en individuos inmune resistentes con fuerte respuesta inmune celular (respuestas de hipersensibilidad tardía, de proliferación de linfocitos, y con producción de "gamma interferón"), hasta una forma sintomática encontrada en individuos inmune susceptibles, en los cuales una supresión de estos parámetros de la respuesta inmune celular puede llevar a la forma clásica de la LVA^{13,33}. Entre estas dos formas polares, sin embargo, existen ciertos individuos que pueden presentar una forma intermedia ("borderline") conocida como infección subclínica oligosintomática, cuyos aspectos clínicos e inmunológicos aun no están totalmente aclarados^{27,10}.

En Brasil, han sido realizados algunos estudios con el objetivo de caracterizar el espectro clínico e inmunológico de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*, sin embargo, estos estudios han sido basados, principalmente, i) o en la respuesta de anticuerpos IgG (respuesta humoral = susceptibilidad), ii) o en la respuesta intradérmica de hipersensibilidad tardía (respuesta inmune celular = resistencia) de los individuos infectados, lo que ha promovido cierta dificultad en la comprensión más amplia de la respuesta inmune del hombre contra la infección^{7,14,19}. En otras palabras, estos estudios han usado, generalmente, o un método serológico, tal como el ensayo inmunoenzimático "ELISA", o un método de naturaleza

inmune celular, como el análisis intradérmico de hipersensibilidad tardía ("delayed-type hypersensitivity"), con el objetivo de determinar el diagnóstico de la infección activa por *L. (L.) i. chagasi*. Es notorio, sin embargo que estos tipos de abordaje diagnóstico subestiman la posibilidad de que ciertos individuos que residen en el área endémica pueden expresar, simultáneamente, los dos tipos de respuestas inmunes, la humoral y la celular, contra la infección por la *L. (L.) i. chagasi* y que, en virtud de eso, esos tipos de abordaje no reflejan la situación real de la infección en el área endémica.

Más recientemente, sin embargo, fue demostrado a través del uso simultáneo de reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI) y de la reacción intradérmica de hipersensibilidad tardía (= reacción intradérmica de Montenegro - RIM) la habilidad de esos métodos en el inmunodiagnóstico de la infección humana, sintomática y asintomática, por *L. (L.) i. chagasi* en área endémica. La alta especificidad de este abordaje diagnóstica, basada en el uso de formas amastigotas (para RIFI) y promastigotas (para RIM) del antígeno especie-específico de *L. (L.) i. chagasi*, permitió la identificación del más amplio espectro clínico e inmunológico de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi* en la Amazonía, Brasil, constituido por los siguientes perfiles clínico-inmunológicos de la infección; Infección Asintomática (IA), Infección Sintomática (IS) (=LVA), Infección Subclínica Oligosintomática (ISO), Infección Subclínica Resistente (ISR) e Infección Inicial Indeterminada (III)^{11,29}. Por lo tanto, conforme lo referido anteriormente, los tres primeros perfiles (IA, IS e ISO) ya son conocidos de la literatura especializada, sin embargo, los dos últimos (ISR y III) representan nuevos perfiles del espectro clínico inmunológico de la infección.

Con base en los comentarios anteriores, consideramos de interés presentar aquí nuevas evidencias sobre el valor diagnóstico del uso combinado de la RIFI y la RIM en la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*, las que resultaron de un estudio prospectivo realizado en área endémica de LVA en el municipio de Cametá, Estado de Pará, Brasil; el presente estudio viene a reforzar los hallazgos previos sobre este abordaje diagnóstico en la infección humana

por *L. (L.) i. chagasi*, principalmente el diagnóstico precoz de la infección, el que consistió en el reconocimiento de los individuos recién infectados, con potencial para desarrollar la forma activa de la infección, la LVA. La relevancia del diagnóstico de los casos recién infectados en el área endémica – los representados por el grupo clínico inmunológico III – en el sentido de prevenir la morbilidad de la LVA grave, bien como de disminuir el tiempo y los costos del tratamiento, se discute en el presente trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en cuatro pequeños pueblos (Ajó, Vacaria, Vacajó y Enseada) localizadas en el municipio de Cametá (01° 56' S: 54° 45' W), el que está situado en los márgenes del río Tocantins, en la región Nordeste del Estado de Pará, Brasil. El clima es típicamente ecuatorial, con temperatura media de 28°C y alta humedad. La estación de lluvias en esa región es de cerca de 2.500 mm. o más en el período de enero a junio. El bosque primario de la región ya fue casi totalmente destruida, restando apenas plantaciones en medio al bosque secundario. Aproximadamente el 70% de los habitantes residen en casas de madera construidas en área de tierra firme, mientras que el resto vive en casas en terrenos cenagosos, cubierto principalmente, por vegetación baja, e inundada dos veces al día por el agua del río Tocantins. De ese modo, el clima y las condiciones ambientales de esta área son muy semejantes al área de otro estudio, realizado en el Municipio de Barcarena, Estado de Pará, distante aproximadamente a 150 Km. de esta área del Municipio de Cametá, donde fue estudiada, previamente, la dinámica de transmisión de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*²⁸.

POBLACIÓN Y TIPO DEL ESTUDIO

La población que tomó parte en el estudio se constituyó de una cohorte de 1.099 individuos (92,2% del total), siendo 596 del sexo masculino y 503 del sexo femenino, con edades de 1 a 84 años (en promedio 24,4 años), caracterizando una población relativamente joven. Cuando se inició el estudio el número de habitantes del área era de 1.192¹⁶.

Además, considerando que el presente estudio planeaba analizar la prevalencia y la incidencia de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*, bien como la dinámica de la evolución de sus perfiles clínico inmunológicos (IA, IS= LVA, ISO, ISR y III), fue necesario planificar un estudio prospectivo con el propósito de acompañar a la cohorte (1.099 individuos) durante el período de dos años (mayo/2006-setiembre/2008). De ese modo, la RIFI y la RIM se usaron cronológicamente al mismo tiempo para determinar la prevalencia y la incidencia; o sea, para todos los individuos previamente seleccionados para la prevalencia y, para las dos incidencias, determinadas a los 12 y 24 meses de edad; después estas pruebas se realizaron solamente en los individuos que fueron negativos en la prevalencia y en la primera incidencia (a los 12 meses). En este sentido, en los

casos con reactividad solamente a la RIM, la que representa una característica genética de resistencia inmunológica contra la infección¹⁸, estos individuos fueron removidos de las evaluaciones subsecuentes con la RIM, de manera semejante a un estudio longitudinal hecho en Sudán³⁴. Además, en los casos que revelaron reactividad a ambas pruebas, los individuos fueron analizados nuevamente apenas por la RIFI, ya que para ésta no es necesario inyectar nueva carga antigénica en los individuos analizados, como en el caso de la RIM. Finalmente, en los casos de reactividad solamente por la RIFI, lo que, al contrario de la RIM, representa un estado inmunológico de susceptibilidad a la infección, los individuos permanecieron bajo investigación con los dos test, con el objetivo de analizar la evolución de las dos respuestas inmunes; la humoral y la celular. Sin embargo, por varios motivos, tales como vacaciones o viajes, por ejemplo, hubo una pérdida de casi 5% (54 individuos) del muestreo original durante el período de acompañamiento de la cohorte.

Por último, la población fue estratificada en tres grupos etarios, 1-10 (303), 11-20 (252) y 21 años (544 individuos), respectivamente, objetivando analizar la distribución de la infección según la edad.

El diseño del presente estudio se realizó de modo similar a otros dos estudios previos; uno ya publicado²⁸, y otro aceptado para publicación²⁹.

EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS INDIVIDUOS INFECTADOS

Todos los individuos que presentaron algún tipo de respuesta inmunológica, por RIFI y/o por RIM, fueron clínicamente examinados (examen físico, principalmente) con la finalidad de que fuera identificada alguna señal o síntoma reconocido del cuadro clínico clásico de la LVA o de la infección subclínica oligosintomática. Es importante destacar, sin embargo, que solamente los casos típicos de LVA recibieron terapia convencional con antimonio pentavalente, conforme la recomendación del Programa Nacional de Control de la LVA²⁴. Los casos con diagnóstico de infección subclínica oligosintomática fueron acompañados por período de hasta tres meses, a fin de ser confirmada su resolución clínica espontánea, según observación hecha en otro estudio en el Estado de Maranhão, Brasil¹⁴.

CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN HUMANA

Considerando que la RIFI evidencia respuesta humoral (susceptibilidad) y la RIM respuesta inmune celular (resistencia)³, la definición de caso humano de la infección por *L. (L.) i. chagasi* se asumió como la presencia de reactividad para una o ambas pruebas inmunológicas. No obstante, considerando que la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) puede interferir con este abordaje diagnóstico, debe ser destacado que, al momento de inicio del estudio, ningún caso humano de coinfección con el virus del SIDA había sido registrado por la Secretaría de Salud del municipio de Cametá al interior de la comunidad.

Considerando, además, la importancia de que se estableciera la especificidad de los dos test inmunológicos, de la RIFI y de la RIM, se utilizó una escala semicuantitativa de resultados con puntaje (en cruces) variando de + a +++++, de la siguiente manera: para RIFI, títulos serológicos (IgG) de 80-160 y de 320-640 recibieron + y ++, y aquellos de 1.280-2.560 y de 5.120-10.240 recibieron +++ y +++++, respectivamente. Para RIM, reacciones intradérmicas débiles (5-8 mm.) recibieron +, reacciones moderadas (9-12 mm.) ++, reacciones fuertes (13-15 mm.) +++ y reacciones exacerbadas (16 mm.) +++++, respectivamente. De ese modo, se asumió que, reacciones serológicas a partir de título 80 (IgG) y reacciones intradérmicas formando induraciones con 5 mm de diámetro fueron consideradas punto de corte positivas (*cut-off*) para RIFI y para RIM, respectivamente^{23,31,28}. Así, combinando el estado clínico de los individuos infectados con la escala semicuantitativa de resultados para la RIFI y la RIM, fue posible identificar los siguientes perfiles inmunológicos de los grupos clínicos de la infección: IA (RIM+/++++ y RIFI-), IS (=LVA) e ISO con o mismo perfil imune (RIM- y RIFI+++/++++), ISR (RIM+/++++ RIFI+/++) y, III (RIM- y RIFI+/++)^{11,29}.

PROCEDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

La realización de la RIM siguió los mismos pasos técnicos descritos en otros trabajos con objetivo de diagnóstico de leishmaniasis tegumentar americana (LTA)^{31,28}. Sin embargo, considerando que el área del presente estudio presenta características epidemiológicas que sugieren la posibilidad de transmisión también de LTA, se utilizó un antígeno de alta especificidad para la LVA, constituido de formas promastigotas de fase estacionaria de cultivo (medio RPMI 1640) de una cepa regional de la *L. (L.) i. chagasi* (MCAO/BR/2003/M22697/Barcarena, Estado do Pará), aislada de un perro con leishmaniasis visceral del Municipio de Barcarena. Las formas promastigotas del parásito se fijaron con solución de mertiolate (1/10.000), en concentración final de, aproximadamente, 10×10^6 parásitos/mL. Como control del antígeno, fue usada una dosis igual de 0,1 mL de una suspensión de solución de mertiolate (1/10.000) para ser inyectada, intradérmicamente, en el antebrazo opuesto de cada individuo. Es de notar que, siendo el Instituto Evandro Chagas un laboratorio vinculado a la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud (MS, Brasil), todos los reactivos destinados a la investigación humana son previamente evaluados por un programa de control de calidad antes del uso en humanos.

La realización de la RIFI se basó en otra experiencia previa²³, la que demostró que el antígeno de formas amastigotas de *L. (L.) i. chagasi* presentó más sensibilidad y especificidad que antígenos de formas promastigotas del mismo parásito y de *Leishmania (L.) major*-like (Bio-Manguinhos, Brasil), así como, de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. En resumen, los antígenos de formas amastigotas eran impregnados en la superficie de las láminas da RIFI a través de la impresión de pequeños fragmentos de hígado, bazo (*L. i. chagasi*) y piel (*L. amazonensis*) de hámster (*Mesocricetus auratus*) infectado con esos parásitos. En el caso de diagnóstico en laboratorio

de la leishmaniasis visceral canina, este procedimiento también se mostró más específico que los kits comerciales para RIFI y ELISA de Bio-Manguinhos, Brasil²⁰.

Estos procedimientos para realización de las dos pruebas inmunológicas, RIM y RIFI, también ya fueron previamente publicados^{11,28}.

ANÁLISIS ESTADÍSTICA

Los resultados se analizaron a través del programa Bio-Estat 4.0⁴ y el χ^2 y la prueba binomial fueron usados para determinar el nivel de significancia de las diferencias entre los perfiles clínico inmunológicos de la infección, con intervalo de confianza de 95%.

APROBACIÓN POR COMITÉ DE ÉTICA

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana del (IEC), bajo el número de resguardo: CEP/IEC 16/2003.

RESULTADOS

DISTRIBUCIÓN DE LOS PERFILES CLÍNICO INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN HUMANA POR *L. (L.) I. CHAGASI* EN EL ÁMBITO DE LA PREVALENCIA

La prevalencia real de la infección fue de 17% (187 casos/1.099 individuos); en otras palabras, esto significó 90 casos diagnosticados solamente por la RIM (perfil clínico inmunológico IA), 54 solamente por la RIFI (cuatro casos del perfil IS=LVA, nueve del perfil ISO e 41 del perfil III), y 43 por ambas pruebas (perfil ISR). De ese modo, la distribución de esos perfiles reveló una mayor frecuencia ($P < 0,05$) del perfil IA (48,1%) sobre los otros; ISR (23%), III (22%), ISO (4,8%) e, IS=LVA (2,1%) (Tabla 1), así como reveló también que las frecuencias de los perfiles ISR y III fueron mayores ($P < 0,05$) que las de los perfiles ISO e IS, aunque no hayan sido observadas diferencias ($P > 0,05$) entre los perfiles ISR versus III, e ISO versus IS. Además, estos resultados demostraron, también que la gran mayoría de los individuos infectados (93%/174) era asintomática (perfiles IA, ISR y III).

DISTRIBUCIÓN DE LOS PERFILE CLÍNICO INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN HUMANA POR *L. (L.) I. CHAGASI* EN EL ÁMBITO DE LA INCIDENCIA

La primera incidencia de la infección, estimada 12 meses luego del inicio del estudio, fue de 7,2% (64 casos nuevos/892 individuos no infectados provenientes de la prevalencia); lo que significó 28 casos nuevos diagnosticados tan sólo por la RIM (perfil IA), 21 solamente por la RIFI (cuatro casos del perfil ISO y 17 del perfil III), y 15 por ambas las pruebas (perfil ISR). La distribución de los perfiles clínico inmunológicos mostró que el perfil IA tuvo nuevamente una frecuencia (43,7%) mayor ($P < 0,05$) que las de los otros perfiles; III (26,6%), ISR (23,4%) e, ISO (6,3%) (Tabla 1). Se notó, por lo tanto, que no hubo ningún caso de LVA (= perfil SI) entre los casos nuevos de la infección (primer año del estudio). Estos resultados demostraron también que las frecuencias de los perfiles III e ISR fueron mayores ($P < 0,05$) que la del perfil ISO, aunque no haya sido observada diferencia ($P > 0,05$) entre las frecuencias de los perfiles III versus ISR.

Tabla 1 – Tasas de frecuencia de los perfiles clínico inmunológicos de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi* en el ámbito de la prevalencia, incidencia, prevalencia acumulada y de la evolución final en el municipio de Cametá, Estado de Pará, Brasil

| Avaliações | Perfis clínico-imunológicos n° (%) | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------|-----------|-----------|
| | IA | IS | ISO | ISR | III |
| Prevalencia (n = 187 casos) | 90 (48,1) | 4 (2,1) | 9 (4,8) | 43 (23,0) | 41 (22,0) |
| Incidencia (12 meses) (n = 64 casos) | 28 (43,7) | – | 4 (6,3) | 15 (23,4) | 17 (26,6) |
| Incidencia (24 meses) (n = 53 casos) | 39 (73,6) | 1 (1,8) | 1 (1,8) | 3 (5,7) | 10 (18,9) |
| Incidencia final (n = 117 casos) | 67 (57,3) | 1 (0,8) | 1 (0,8) | 18 (15,4) | 27 (23,1) |
| Prevalencia acumulada (n = 304 casos) | 157 (51,6) | 5 (1,6) | 5 (1,6) | 61 (20,1) | 68 (22,4) |
| Evolución final (n = 304 casos) | 238 (78,3) | 1 (0,3) | 1 (0,3) | 46 (15,1) | 16 (5,3) |

IA – Infección asintomática; IS (=LVA) – Infección sintomática; ISO – Infección subclínica oligosintomática; ISR – Infección subclínica resistente y, III – Infección inicial indeterminada.

Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

La segunda incidencia de la infección, calculada 24 meses después del inicio del estudio, fue de 6,6% (53 casos nuevos/802 individuos no infectados procedentes de la primera incidencia); estos resultados significaron 39 casos nuevos de la infección diagnosticados apenas por la RIM (perfil IA); 11 solamente por la RIFI (perfil SI =LVA 1 caso y perfil III diez casos); y tres casos por ambas pruebas (perfil ISR). La distribución de los perfiles clínico inmunológicos demostró, una vez más, que el perfil IA (73,6%) fue más frecuente ($P < 0,05$) que los otros; III (18,9%), ISR (5,7%) y SI (1,8%) (tabla 1). Esta vez, el perfil ISO no estuvo presente entre los casos nuevos de la infección (segundo año del estudio). Estos resultados mostraron, además, que la frecuencia del perfil III (18,9%) fue mayor ($P < 0,05$) que las de los perfiles ISR (5,7%) y SI (1,8%) y, finalmente, que la frecuencia del perfil ISR fue mayor ($P < 0,05$) que la del SI.

A título de aclaración sobre el número de individuos esperados para tomar parte en esas incidencias: es importante subrayar que, a la primera incidencia se esperaba examinar a 912 individuos no infectados, provenientes de la prevalencia; pero solamente fueron examinados 892 (97,8%), lo que generó una pérdida de 20 (2,2%) individuos; en la segunda incidencia, se esperaba examinar a 828 individuos no infectados, procedentes de la primera incidencia; pero, fueron examinados 802 (96,8%), lo que generó también una pérdida de 26 (3,2%) individuos. De esa manera, durante el acompañamiento de la cohorte (1.099 individuos) en los dos años del estudio, hubo una pérdida total de 46 (5,4%) individuos, lo que representa una pérdida pequeña, no significativa.

En resumen, las dos incidencias de la infección registraron un total de 117 casos nuevos en dos años de estudio; el perfil IA presentó la más alta frecuencia (57,3%), siguiendo de los perfiles III (23,1%), ISR (15,4%), ISO (3,4%) e IS =LVA (0,8%) (tabla 1). Por lo tanto, se percibe que la gran mayoría de los casos nuevos de la infección (95,7%) era, también, asintomática (perfiles IA, III e ISR).

DISTRIBUCIÓN DE LOS PERFILES CLÍNICO INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN HUMANA POR *L. (L.) i. CHAGASI* EN EL ÁMBITO DE LA PREVALENCIA ACUMULADA

Luego de las tres evaluaciones (prevalencia y dos incidencias), un total de 304 casos de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi* se registraron, con prevalencia acumulada de 27,6%; el perfil IA fue el más prevalente (51,6%), seguido del III (22,4%), ISR (20,1%), ISO (4,3%) y, finalmente, el IS =LVA (1,6%) (Tabla 1).

DISTRIBUCIÓN, POR EDAD, DE LOS PERFILES CLÍNICO INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN HUMANA POR *L. (L.) i. CHAGASI* EN EL ÁMBITO DE LA PREVALENCIA E INCIDENCIA.

Considerando la distribución, por edad, de los perfiles clínico inmunológicos de la infección en la prevalencia (187 casos), se observó que, en la franja de 1-10 años (23% - 43 casos), no hubo diferencia ($P > 0,05$) entre las frecuencias de los perfiles IA (30,2% - 13), ISR (30,2% - 13) y III (25,6% - 11), las que fueron superiores ($P < 0,05$) a las de los perfiles SI (9,3% - 4) e ISO (4,7% - 2); en la franja de 11 - 20 años (23,5% - 44 casos), no hubo diferencia ($P > 0,05$) entre las frecuencias de los perfiles IA (47,7% - 21) y III (34,1% - 15), las que fueron mayores ($P < 0,05$) que las de los perfiles ISR (13,6% - 6) e ISO (4,6% - 2); por último, en la franja de =21 años (53,5%-100 casos), se notó una frecuencia más elevada ($P < 0,05$) del perfil IA (56% - 56) sobre las de los otros perfiles: ISR (24% - 24), III (15% - 15), e ISO (5% - 5). Por otro lado, comparando la distribución, por edad, de los casos de la infección en un mismo perfil, tres puntos merecieron destaque en la prevalencia: i) se notó un aumento creciente en la frecuencia de los casos del perfil IA con la edad, o sea, en la franja de 1 - 10 años ocurrieron 13 casos (14,5%), de 11 - 20 años 21 casos (23,3%) y, a partir de 21 años 56 casos (62,2%), sugiriendo un efecto acumulativo del perfil IA con la edad; ii) los cuatro casos del perfil IS (=LVA) fueron diagnosticados en los individuos de la franja etaria menor, de 1 - 10 años; y, iii) entre los casos del perfil III (44 casos), no hubo diferencia ($P > 0,05$) de la frecuencia entre las franjas etarias, o sea, de 1 - 10 años, ocurrieron 11 casos (26,8%), de 11 - 20 años, 15 casos (36,6%) y, =21 años, más 15 casos (36,6%) (Tabla 2).

Tabla 2 –Distribución, por edad, de los perfiles clínicos inmunológicos de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi* en el ámbito de la prevalencia y de la incidencia Municipio de Cametá, Estado de Pará, Brasil

| Evaluaciones n (%) | | Perfiles clínicos inmunológicos | | | | |
|----------------------------------|------------|---------------------------------|---------|---------|-----------|-----------|
| | | IA | IS | ISO | ISR | III |
| Prevalencia (n = 187 casos) | | | | | | |
| 1 - 10* | 43 (23,0) | 90 (48,1) | 4 (2,1) | 9 (4,8) | 43 (23,0) | 41 (22,0) |
| 11 - 20 | 44 (23,5) | 28 (43,7) | – | 4 (6,3) | 15 (23,4) | 17 (26,6) |
| 21 | 100 (53,5) | 39 (73,6) | 1 (1,8) | 1 (1,8) | 3 (5,7) | 10 (18,9) |
| Incidencia final (n = 117 casos) | | | | | | |
| 1 - 10 | 51 (43,6) | 67 (57,3) | 1 (0,8) | 1 (0,8) | 18 (15,4) | 27 (23,1) |
| 11 - 20 | 44 (37,6) | 157 (51,6) | 5 (1,6) | 5 (1,6) | 61 (20,1) | 68 (22,4) |
| 21 | 22 (18,8) | 238 (78,3) | 1 (0,3) | 1 (0,3) | 46 (15,1) | 16 (5,3) |

IA: Infección asintomática; IS: (=LVA) Infección sintomática; ISO: Infección subclínica oligosintomática; ISR: Infección subclínica resistente; y III: Infección inicial indeterminada;

* Grupos etarios (años);

Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

En lo tocante a las dos incidencias (117 casos), llamó la atención que la mayor frecuencia de los casos ocurrió en las dos franjas menores de edad: i) en la franja de 1 - 10 años (43,6% - 51 casos), el perfil IA presentó frecuencia (58,8% - 30 casos) superior ($P < 0,05$) a la del III (27,5% - 14 casos), del ISR (5,9% - 3 casos), del ISO (5,9% - 3 casos) y, finalmente, del IS (1,9% - 1 caso); ii) en la franja de 11 - 20 años (37,6% - 44 casos), el perfil IA presentó frecuencia (68,2% - 30 casos) superior ($P < 0,05$) a la del ISR (18,2% - 8 casos) y del III (13,6% - 6 casos). En la franja con =21 años (18,8% - 22 casos), ocurrió no apenas la menor frecuencia de infección, como también, tasas iguales ($P > 0,05$) de frecuencia para los perfiles IA (31,8% - 7 casos), ISR (31,8% - 7 casos) y III (31,8% - 7 casos); y la menor frecuencia para el perfil ISO (4,6% - 1 caso). Por otra parte, cuando la frecuencia de la infección se comparó en los mismos perfiles, dos hechos llamaron la atención: i) tanto en el perfil IA como en el III, las mayores frecuencias de casos, 89,5% - 60 casos y 74% - 20 casos, respectivamente, ocurrieron en las dos franjas menores de edad (1 - 10 e 11 - 20 años), indicando una frecuencia más alta de los casos nuevos de la infección debajo de los 21 años; y, ii) el único caso de la enfermedad (perfil IS =LVA) ocurrió, una vez más, en la franja menor de edad, de 1 - 10 años (Tabla 2).

DINÁMICA DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA E INMUNOLÓGICA DE LA INFECCIÓN HUMANA POR *L. (L.) I. CHAGASI*

Los resultados relativos a la dinámica de la evolución clínica e inmunológica de la infección pueden ser vistos en la tabla 1 y figura 1 (evolución final de la infección). Pero, para tomar este proceso más claro, se decidió hacerlo a partir de los resultados encontrados en la prevalencia acumulada (total de los casos diagnosticados en la prevalencia e incidencia) para, en seguida, llegar a la evolución final de los casos de la infección. De ese modo, iniciando por los casos recientes de la infección, perfil III (RIFI+ / + + y RIM-), se observó que de los

68 (22,4%) casos diagnosticados (41 en la prevalencia y 27 en la incidencia), 21 (30,9%) evolucionaron para el perfil ISR (convirtieron positivamente la RIM+ / + + + +), 30 (44,1%) para el perfil IA (convirtieron positivamente la RIM+ / + + + + y, negativamente la RIFI-), 1 (1,5%) para el perfil IS (=LVA) (amplió la RIFI+ / + + + +) y, 16 (23,5%) conservaron el mismo perfil hasta el final del estudio. En seguida, de los 61 (20,1%) casos (43 en la prevalencia y 18 en la incidencia) del perfil ISR (RIFI+ / + + + y RIM+ / + + + +), 47 (77%) evolucionaron para el perfil IA (convirtieron negativamente la RIFI-) y, 14 (23%) mantuvieron el mismo perfil; no obstante, como 21 casos del perfil III evolucionaron para el perfil ISR, así como otros ocho del perfil ISO y tres del perfil IS también evolucionaron para el perfil ISR, el resultado fue que la evolución final del perfil ISR terminó en 15,1% (46 casos). Con relación al perfil ISO (RIFI+ / + + + + y RIM-), de los 13 (4,3%) casos diagnosticados (nueve en la prevalencia y cuatro en la incidencia), ocho (61,5%) evolucionaron para el perfil ISR (convirtieron positivamente la RIM+ / + + + + y redujeron la RIFI+ / + + +), dos (15,4%) evolucionaron para el perfil IA (convirtieron positivamente la RIM+ / + + + + y, negativamente la RIFI-) y, finalmente, tres (23,1%) mantuvieron el perfil. Continuando, de los cinco (1,6%) casos de LVA (RIFI+ / + + + + y RIM-), cuatro diagnosticados en la prevalencia y uno en la incidencia, el resultado del tratamiento clínico con antimonial pentavalente llevó tres (60%) casos para el perfil ISR (convirtieron positivamente la RIM+ / + + + + y redujeron la RIFI+ / + + +), uno (20%) para el perfil IA (convirtió positivamente la RIM+ / + + + + y, negativamente la RIFI-) y, uno (20%) mantuvo la respuesta inmune inicial hasta el fin del estudio, aunque, de manera asintomática (clínicamente curado). Finalmente, con relación a los 157 casos (51,6%) del perfil IA (RIM+ / + + + + y RIFI-), 90 diagnosticados en la prevalencia y 67 en la incidencia, como estos no evolucionan, ya que representan el polo genético de resistencia a la infección, se sumaron a ellos 30 provenientes del perfil III, 47 del ISR, dos del ISO y, 1 del SI (=LVA), lo que generó una evolución final de 78,3% (238 casos).

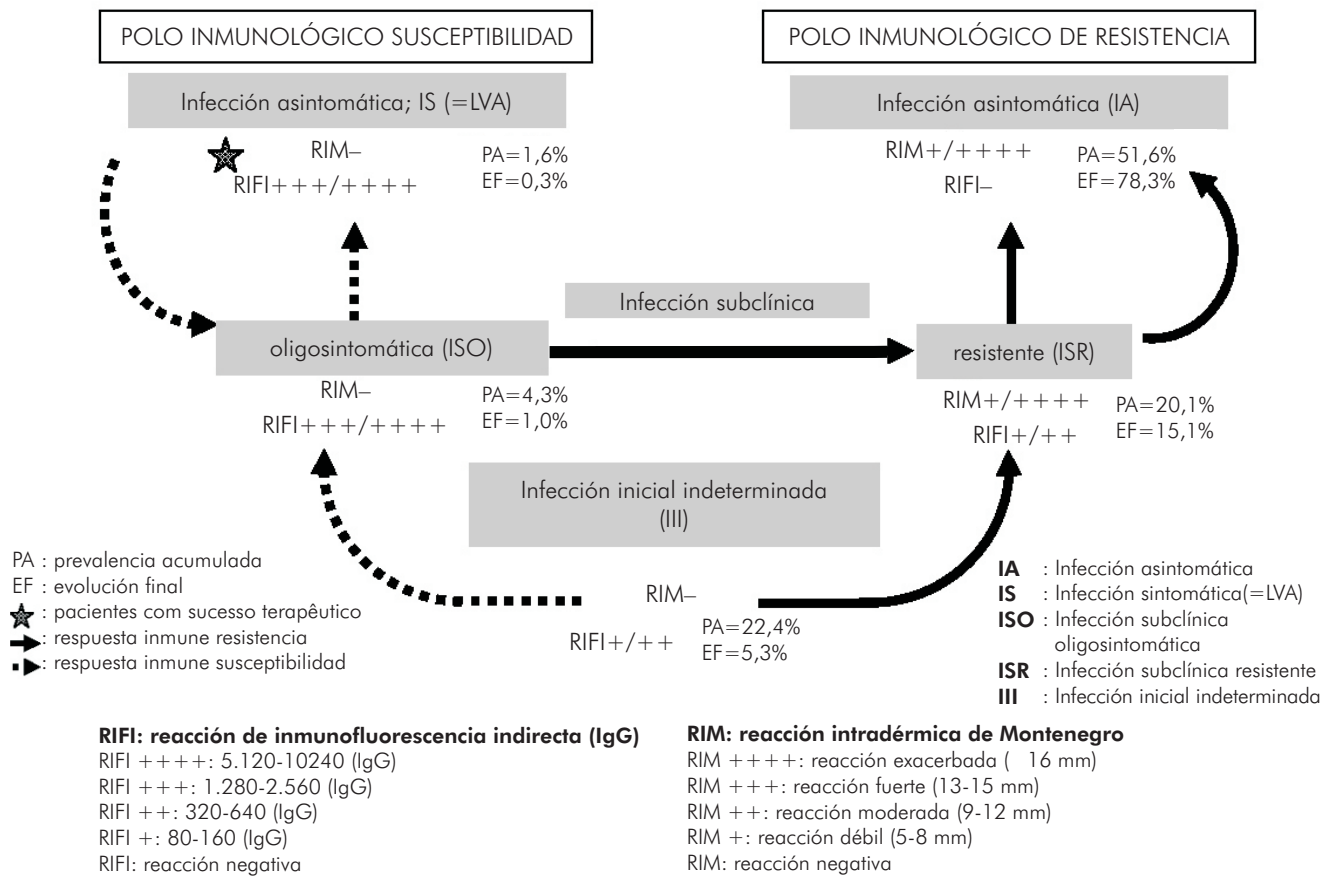


Figura 1 – Dinámica de evolución clínica e inmunológica de la infección humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* en la Amazonía, Brasil

En resumen, el único perfil que sumó con la dinámica de la evolución clínica e inmunológica de la infección fue el perfil IA (51,6%-78,3%), mientras que los otros perfiles perdieron: IS (1,6%-0,3%), ISO (4,3%-1%), ISR (20,1%-15,1%) y, principalmente, el III que registró la pérdida mayor (22,4%-5,3%).

Por último, es importante señalar que, durante todo el período del estudio no se detectó ningún caso de leishmaniasis cutánea entre los individuos reactivos tanto por la RIM como por la RIFI, lo que vino a reforzar la especificidad de las reacciones inmunológicas, RIM y RIFI, en el diagnóstico de los casos humanos de la infección por *L. (L.) i. chagasi*. De la misma forma, ningún caso de coinfección con el virus del SIDA se señaló entre los individuos que tomaron parte en el estudio.

DISCUSIÓN

Inicialmente, parece no haber duda con relación a la importancia del perfil IA en el contexto del espectro clínico inmunológico de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*; los resultados del presente trabajo demuestran, una vez más, que el perfil IA fue el más frecuente de todos los perfiles diagnosticados en todas las evaluaciones y, en especial, en el análisis de la prevalencia acumulada (casos antiguos y nuevos de la infección), en el que, representó 51,6% de todos los casos diagnosticados, seguido de los perfiles III (22,4%), ISR (20,1%), ISO (4,3%) y, finalmente, el IS =LVA (1,6%) (Tabla 1). De ese modo, es posible interpretar que la elevada frecuencia del perfil IA puede estar reflejando un breve período de tiempo que se

desarrolla entre el estadio inicial de la infección (perfil III) y su estadio final (perfil IA), indicando que la mayoría de los casos del perfil III presenta un breve período de respuesta humoral (RIFI+), seguido de rápida conversión de la respuesta de hipersensibilidad tardía (perfil ISR) y, por último, la conversión negativa de la RIFI-.

En un trabajo previo²⁹, situación semejante ya había sido diagnosticada en área endémica de LVA en el Municipio de Barcarena, Estado do Pará, distante cerca de 150 Km. del local del presente estudio, en el cual el perfil IA correspondió a 73,2% de los casos de la infección en el ámbito de la prevalencia acumulada. Por lo tanto, considerando que la hipersensibilidad tardía representa fuerte expresión genética¹⁸ de resistencia inmune celular^{33,10} contra la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*, estos resultados vienen a confirmar que la gran mayoría (evolución final del perfil IA 78,3%) de los individuos infectados en el área endémica es genéticamente resistente contra la infección. Además, considerando que el perfil ISR (evolución final 15,1%) representa un estadio evolutivo de la infección en el sentido del polo de resistencia (perfil IA), esa tasa puede llegar próximo al 90% de la infección en el área endémica.

En ese sentido, si la hipersensibilidad tardía puede ser considerada una característica genética definitiva de resistencia inmune celular contra la infección, es probable que algunos relatos sobre la pérdida de esa condición (hipersensibilidad tardía) podrían resultar de inmunosupresión² o de baja especificidad de los antígenos de *Leishmania* usados para estimular la

hipersensibilidad tardía¹³. En la Amazonía brasileña, sin embargo, se observó una especificidad significativamente mayor para las reacciones de hipersensibilidad tardía (16 x 12 mm.) usando el antígeno especie-específico de *L. (L.) i. chagasi* de este trabajo, que las reacciones (11 x 6 mm.) producidas por antígeno de *L. (L.) amazonensis*, un agente causal de la (LTA), en dos individuos adultos (30 años de edad) naturales del área endémica (Municipio de Igarapé-Miri) de LVA en el Estado de Pará, Brasil, sugiriendo no apenas que la inmunidad celular tiene larga duración (memoria inmunológica), como también, que resulta de respuesta inmune especie-específica³⁰.

Con relación al perfil ISR, el que representa un nuevo estadio de la infección en el contexto de este abordaje diagnóstico, su desempeño no se mostró muy distinto al observado antes²⁹; su frecuencia en el ámbito de la prevalencia (23%) fue relativamente superior a la encontrada en la incidencia final (15,4%), sugiriendo ser un estadio evolutivo más presente entre los casos antiguos de la infección y, consecuentemente, con mayor probabilidad de continuar su evolución en el sentido del polo de resistencia de la infección (perfil IA). Este hecho se confirma en el presente estudio en 47 (77%) de los 61 casos diagnosticados de este perfil a través de la conversión negativa de la respuesta humoral y la manutención de la hipersensibilidad tardía (RIFI- y RIM+/++++). En este sentido, como la expresión de la hipersensibilidad tardía es controlada genéticamente, a partir del momento en que el individuo recién infectado (perfil III) convierte la hipersensibilidad tardía (perfil ISR) evolucionará, naturalmente, para el perfil de resistencia (perfil IA).

Con respecto al perfil III, el que constituye no apenas otro nuevo estadio de la infección, sino también el más reciente estadio de la infección en este contexto diagnóstico, fue interesante notar que, diferentemente al estudio anterior en el Municipio de Barcarena (Estado de Pará, Brasil), donde la prevalencia de la infección fue de 12,6%, los casos recientes de la infección se presentaron extremadamente regulares en todas las fases del presente estudio, tales como; prevalencia 22%; incidencia a los 12 meses 26,6%; incidencia a los 24 meses 18,9%; incidencia final 23,1%; y prevalencia acumulada 22,4%, lo que denota expresiva regularidad de la transmisión de la infección a nivel más elevado en el área del estudio actual en el Municipio de Cametá (mismo Estado y País), en donde la prevalencia de la infección fue, coincidentemente, más alta (17%). Además de eso, considerando que la incidencia final del perfil III fue de 23,1%, se espera que, por lo menos, 20-23% de los casos nuevos de la infección en esta área deban requerir monitoreo clínico, una vez que aproximadamente 5-6% de esos casos presentan potencial para desarrollar las formas clínicas susceptibles de infección, la ISO y la IS (=LVA). Así siendo, estos hallazgos deberían ser llevados en consideración cuando la elaboración de nuevos programas de control de la LVA.

Los perfiles ISO e IS (=LVA) fueron los de menor frecuencia en todas las fases del presente estudio, aunque el primero haya presentado una prevalencia acumulada

(4,3%) casi tres veces más grande que el segundo (1,6%). De cualquier modo, así como en el primer estudio²⁹, los dos perfiles juntos (prevalencia acumulada de 5,9%) no superaron la franja del 6% del total de casos de la infección en el área endémica de la Amazonía brasileña, lo que parece un dato bien diferente de la Región Nordeste de Brasil; en el Estado de Bahia, la forma subclínica oligosintomática (ISO) fue detectada en 60% de 86 niños infectados por debajo de los 15 años de edad⁶ y, en el Estado de Maranhão, esta forma fue diagnosticada en 17,4% de 189 niños infectados en la misma franja etaria¹⁴. Se debe destacar que, en las dos ocasiones el diagnóstico final de la enfermedad (ISO) se basó en el parámetro clínico, apoyado solamente por el análisis serológico (ELISA). Por lo tanto, es posible que las diferencias observadas en esos dos estudios en la Región Nordeste de Brasil se deban a la restricción de la franja etaria (hasta 15 años) de los individuos participantes (los niños presentaron mayor susceptibilidad a la infección sintomática), aunque en el presente estudio hay sido observado que siete (53,8%) de los 13 casos del perfil ISO estaban en las dos franjas menores de edad (1-10 y 11-20 años). Por otro lado, en el caso del perfil IS (=LVA) su incidencia fue casi insignificante (0,2/1.000 habitantes) comparada a las tasas mucho más elevadas registradas en la Región Nordeste de Brasil^{6,9,25}, lo que hace suponer una transmisión más intensa de la infección y/o una susceptibilidad mayor de los individuos infectados para desarrollar la enfermedad activa.

Cuando la distribución de los perfiles clínico inmunológicos se consideró en razón de la edad, quedó demostrado, nuevamente, que el perfil IA fue más frecuente que los otros perfiles en casi todos los grupos analizados (1-10, 11-20 y 21 años), tanto en la prevalencia como en la incidencia (Cuadro 2), con excepción de la franja de 1-10 años en la prevalencia, cuya frecuencia (30,2%) fue igual a la del perfil ISR y, en la franja de 21 años en la incidencia, cuya frecuencia (31,8%) también fue igual a las de los perfiles ISR y III – de ese modo le confiere al perfil IA la condición de perfil más frecuente en las diferentes franjas de edad y situaciones temporales (prevalencia e incidencia).

Por otro lado, cuando la frecuencia de la infección fue comparada en el ámbito de los mismos perfiles, los puntos siguientes merecieron atención: i) mientras en la prevalencia se notó un efecto acumulativo del perfil IA con la edad, lo que puede ser interpretado como clara evidencia de que la hipersensibilidad tardía (inmunidad celular adquirida) aumenta con la edad^{6,13,26,1}, esto, efectivamente, está solamente reflejando que los individuos con edad más avanzada (21 años) tuvieron un mayor tiempo de exposición a la infección que los más jóvenes (1-10 y 11-20 años); por otro lado, en la incidencia, hubo un efecto diminutivo (contrario) del perfil IA con la edad, con importante reducción de los casos a partir de las franjas menores (1-10 y 11-20 años: 30 - 44,8% - casos, cada) en el sentido de la mayor (21 años: 7 - 10,4% - casos), demostrando que, entre los casos nuevos de la infección, el contingente de individuos más grande del perfil IA está representado por niños y adolescentes; ii) los cuatro casos

de LVA (perfil IS) ocurrieron en la franja etaria menor (1-10 años), confirmando que la LVA es una enfermedad típicamente de niños de baja edad; iii) entre los casos del perfil ISO, se notó una distribución casi equitativa entre las franjas etarias, con 7 (53,8%) casos para las dos franjas menores (1-10 e 11-20 años) y 6 (46,2%) casos para la mayor (> 21 años); iv) en lo referente al perfil ISR, se notó, en la prevalencia, una concentración mayor de casos en la franja de > 21 años (55,8%) en relación a las franjas de 1-10 y 11-20 años (44,2%), sugiriendo una mayor presencia del perfil IA entre los individuos con infección más antigua, en una franja de edad más avanzada; sin embargo, en la incidencia, entre los casos más recientes de la infección, esa tendencia se mostró inversa, con mayor concentración de casos en las franjas de 1-10 y 11-20 años (61,1%) en relación a la franja más avanzada (38,9%); v) por último, con respecto al perfil III, queda evidente, justo en la incidencia (casos nuevos de la infección), una concentración significativamente mayor de casos en las franjas de 1-10 y 11-20 años (74%) sobre la franja de > 21 años (26%), sugiriendo, una vez más, que la transmisión de la infección ocurre, principalmente, intradomiciliariamente o en el área peridomiciliar, en donde los niños y adolescentes son infectados^{21,22,32}.

Con respecto a la dinámica de la evolución de la infección, no se puede omitir la importancia de los hallazgos relativos al perfil III, ya que en el contexto de este abordaje diagnóstico ese perfil clínico inmunológico tiene el papel fundamental de abastecer los otros perfiles de la infección humana. De ese modo, se vio en el presente estudio que, de los 68 casos diagnosticados, 30 (44,1%) evolucionaron para el perfil IA y 21 (30,8%) para el perfil ISR, lo que representa casi 75% (74,9%) de los casos con evolución para el polo inmunológico de resistencia de la infección (perfil IA), cuya evolución final fue de 78,3%. Además de estos, 1 (1,5%) caso evolucionó para el polo de susceptibilidad de la infección (perfil IS = LVA) y, 16 (23,5%) no sufrieron evolución hasta el final del estudio. De ese modo, estos resultados parecen estar de pleno acuerdo con la propuesta de este abordaje diagnóstico⁹, en la que, la evolución de la infección a partir del perfil III puede progresar, dependiendo el perfil genético de la respuesta inmune celular del individuo^{8,17}, o para el polo de resistencia (perfil IA) o para el polo de susceptibilidad de la infección (perfil IS) (Figura 1). Con base en la premisa anterior, consideramos prioritaria la evolución de los perfiles con susceptibilidad a la infección, ISO e IS (=LVA), los que, aunque hayan sido identificados con el mismo perfil inmunológico (RIM- y RIFI+++ / +++++), pudieron ser distinguidos, principalmente, por el hecho del primero (ISO) haber presentado una evolución clínica espontánea para cura en 10 (77%) de los 13 casos diagnosticados (8 evolucionaron para el perfil ISR, 2 para el IA y, 3 se mantuvieron inalterados hasta el final del estudio), mientras que el segundo (LVA) necesitó de terapia antimonial pentavalente para evolucionar favorablemente

hacia la cura también (3 evolucionaron para el perfil ISR, 1 para el IA y 1 conservó el perfil inmunológico inicial, aunque de forma asintomática). A este respecto, es importante mencionar los resultados obtenidos sobre la evolución de la forma ISO en los Estados de Maranhão¹⁴ y Ceará¹⁵, en los cuales, 33 casos de Maranhão y 12 de Ceará tuvieron evolución semejante a la encontrada en este estudio. Además, otro estudio realizado en el Estado de Bahía⁵ documentó que individuos de la forma ISO fueron capaces de producir una mayor cantidad de gamma interferón (IFN- γ) en cultura de células mononucleares de la sangre periférica que individuos con LVA, lo que puede ayudar al mejor entendimiento sobre el desarrollo de esas formas sintomáticas de la infección humana por *L. (L.) i. chagasi*.

Con relación a los perfiles con resistencia a la infección, ISR e IA, la impresión que queda es que el ISR parece representar un estadio de desarrollo hacia el perfil IA, una vez que la mayoría (77%) de los casos convirtió negativamente la RIFI-, asumiendo el estatus inmune del perfil IA; este hecho puede ayudar a explicar el alta frecuencia encontrada del perfil IA en este estudio y, también, en el estudio anterior²⁹. Por otro lado, aunque en algunos pocos casos del perfil IA, provenientes solamente de la prevalencia, haya sido observada la seroconversión transitoria de la RIFI+ en niveles bajos (+ / + +) (seguida, por lo tanto, de reconversión negativa) – hecho interpretado como un posible impulso antigénico de corta duración producido por una reinfección abortada por la respuesta inmune celular de esos individuos -, la gran mayoría de los casos permaneció con el perfil inmune inalterado, sugiriendo que el perfil IA representa el final de la línea de infección (Figura 1).

Finalmente, la dinámica de la infección mostró que tan solo el perfil IA tuvo una evolución positiva con el proceso, cambiando de 51,6% en la prevalencia acumulada para un 78,3% al final de su evolución, mientras que los otros perfiles sufrieron pérdidas importantes con esa evolución, tales como: IS (=LVA) de 1,6% para 0,3%, ISO de 4,3% para 1,0%, ISR de 20,1% para 15,1% y, principalmente, el perfil III de 22,4% para 5,3%. Por lo tanto, considerando el papel de los perfiles ISR y III en el contexto de este abordaje diagnóstico, parece indiscutible la importancia de esos nuevos estadios clínico inmunológicos en la promoción de la evolución de la infección, especialmente el perfil III, que puede ser de gran valor en la prevención de la morbilidad de la LVA, bien como en la reducción del tiempo y los costos del tratamiento.

APOYO FINANCIERO

Este trabajo se realizó con apoyo financiero del Instituto Evandro Chagas (Secretaría de Vigilancia en Salud, Ministerio de Salud, Brasil) y de la Fundación Wellcome Trust (Londres, UK).



Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil

RESUMO

Estudo prospectivo realizado no período de maio/2006-setembro/2008, numa coorte de 1.099 indivíduos, ambos os sexos, com idades de 1 a 84 anos (média 24,4 anos), residente em área endêmica de leishmaniose visceral americana (LVA) no Município de Cametá, Pará, Brasil, objetivando analisar a prevalência e a incidência da infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, assim como a dinâmica da evolução dos seus perfis clínico-imunológicos previamente definidos: 1. Infecção assintomática (IA); 2. Infecção sintomática (IS=LVA); 3. Infecção subclínica oligossintomática (ISO); 4. Infecção subclínica resistente (ISR); e 5. Infecção inicial indeterminada (III). O diagnóstico da infecção baseou-se no uso simultâneo da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia. Um total de 304 casos da infecção foi diagnosticado no período do estudo (187 na prevalência e 117 na incidência), gerando prevalência acumulada de 27,6%, cuja distribuição no âmbito dos perfis clínico-imunológicos foi da seguinte ordem: IA 51,6%, III 22,4%, ISR 20,1%, ISO 4,3% e, IS (=LVA) 1,6%. Com base na dinâmica da infecção, o principal achado recaiu no perfil III, que teve papel fundamental na evolução da infecção, dirigindo-a ora para o pólo imunológico de resistência, perfis ISR (21 casos - 30,8%) e IA (30 casos - 44,1%), ora para o polo imunológico de susceptibilidade, perfil IS (um caso - 1,5%); além destes, 16 casos mantiveram o perfil III até o fim do estudo. Concluiu-se que esta abordagem diagnóstica pode ajudar no monitoramento da infecção na área endêmica, visando, principalmente, prevenir a morbidade da LVA, assim como reduzir o tempo e despesas com o tratamento.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) infantum chagasi*; Infecção; Imunodiagnóstico; Hipersensibilidade Tardia; Técnica Indireta de Fluorescência para Anticorpo.

New evidences on the diagnostic value of indirect immunofluorescence test and delayed hypersensitivity skin test in human infection by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in the Amazon, Brazil

ABSTRACT

This is a prospective study on a cohort of 1099 individuals of both genders, aged 1-84 years (mean 24.4 years), living in an endemic area of American visceral leishmaniasis (AVL) in the Municipality of Cametá, Brazil, from May 2006 to September 2008. It aimed to analyze the prevalence and incidence rates of human infection by *Leishmania (L.) infantum chagasi*, as well as the evolutionary process of its previously defined clinical and immunological profiles: 1. Asymptomatic infection (AI); 2. Symptomatic infection (SI = AVL); 3. Subclinical oligosymptomatic infection (SOI); 4. Subclinical resistant infection (SRI); and 5. Indeterminate initial infection (III). The diagnosis was based on the simultaneous use of indirect immunofluorescence assay (IFA) and delayed hypersensitivity skin test. A total of 304 cases of infection were diagnosed during the period studied (187 for prevalence and 117 for incidence), generating an accumulated prevalence rate of 27.6%. The distribution regarding their clinical and immunological profiles presented the following order: AI 51.6%; III 22.4 %; SRI 20.1%; SOI 4.3%; and SI (= AVL) 1.6%. Based on the dynamics of the infection, the main discovery was about the III profile, which had an instrumental role in its evolution, directing it either to the resistant immunological pole – SRI (21 cases - 30.8%) and AI (30 cases - 44.1 %) profiles – or to the susceptible immunological pole – SI (1 case - 1.5%) profile. In addition, 16 cases remained within the III profile until the end of the study. It was concluded that this diagnostic approach can help monitor the infection in endemic areas, aiming mainly at preventing morbidity caused by AVL, and reducing the treatment time and expenses.

Keywords: *Leishmania (L.) infantum chagasi*; Infection; Immunologic Tests; Hypersensitivity, Delayed; Fluorescent Antibody Technique, Indirect.



REFERENCIAS

- 1 Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. I. Cross-sectional leishmanin skin test in an endemic locality. *Ann Trop Med Parasitol*. 1993 Apr;87(2):157-61.
- 2 Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. II. Annual leishmanin transformation in a population: is positive leishmanin reaction a life-long phenomenon? *Ann Trop Med Parasitol*. 1993 Apr;87(2):163-7.
- 3 Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004 Jun;119(6):238-58.
- 4 Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres D, Santos AS. Bioestat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2004.
- 5 Bacellar O, Barral-Neto M, Badaró R, Carvalho EM. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24(8):791-5.
- 6 Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1986 Dec;154(6):1003-11.
- 7 Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*. 1986 Oct;154(4):639-49.
- 8 Blackwell JM, Mohamed HS, Ibrahim ME. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol*. 2004 Jun;20(6):268-74.
- 9 Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2002 Jan-Feb;96(1):21-8.
- 10 Costa SR, D'Oliveira Júnior A, Bacellar O, Carvalho EM. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant leishmania antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):367-70.
- 11 Crescente JAB, Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2009 Dec;103(12):1250-6.
- 12 Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. *Hospital (Rio J)*. 1937;11:3-9.
- 13 Davies CR, Mazloumi Gavvani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology*. 1999 Sep;119(Pt 3):247-57.
- 14 Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Dec;99(8):889-93.
- 15 Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Texeira MJ, Sousa AQ, et al. Correlates of Leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J Inf Dis*. 1993 Feb;167(2):411-7.
- 16 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem nacional de populações. Rio de Janeiro: Superintendência de Estudos Geográficos e Sócio-Econômicos; 2004.
- 17 Jamieson SE, Miller EM, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun*. 2007 Jan;8(1):84-90.
- 18 Jerônimo SMB, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Bezerra FL, Ettinger NA, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun*. 2007 Oct;8(7):539-51.
- 19 Jerônimo SMB, Teixeira MV, Sousa AQ, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-term follow-up. *Clin Infect Dis*. 2000 Mar;30(3):608-9.
- 20 Jesus RCS, Corrêa ZC, Everdosa DR, Martins AP, Eliseu LS, Campos MC, et al. Comparação das técnicas de RIFI (ag. IEC x ag. Bio-Manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina, estado do Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:323.
- 21 Lainson R, Rangel EF, editores. Flebotomíneos no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. p. 311-36.
- 22 Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Dec;100(8):811-27.
- 23 Lima LVR, Souza AAA, Jennings YL, Corrêa Z, Jesus R, Everdosa D, et al. Comparison of the reactivity between antigens of *Leishmania (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *Leishmania* sp. (Bio-Manguinhos) in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test (IFAT). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45 Suppl 13:147.
- 24 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília; 2003. p. 1-120.

- 25 Nascimento MDSB, Souza EC, Silva LM, Leal PC, Cantanhede KL, Bezerra GFB, et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2005;21: 1801-07.
- 26 Pampiglione S, Manson-Bahr PEC, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. Studies in Mediterranean leishmaniasis: 3. The leishmanin in skin test kala-azar. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1975;69(1):60-8.
- 27 Pearson RD, Souza AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Inf Dis*. 1996;22:1-13.
- 28 Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga RR, Shaw JJ, Quinnell RJ, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol*. 1998 Jan;20(1): 19-26.
- 29 Silveira FT, Lainson R, Souza AAA, Crescente JAB, Campos MB, Gomes CMC, et al. A prospective study on the dynamics of clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. In Press 2009.
- 30 Silveira FT, Lainson R, Souza AAA, Ishikawa EAY, Laurent MD, Corbett CEP. Failure of natural immunity induced by asymptomatic *Leishmania chagasi*-infection in protecting against to *Leishmania braziliensis*-cutaneous disease. Poster Section presented at: Immune Response. 3rd World Congress on Leishmaniasis; 2005; Palermo-Terrasini, Sicily, Italy; 2005. p. 278.
- 31 Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Souza AA, Ishikawa EAI, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991 Nov-Dec;85(6):735-8.
- 32 Silveira FT, Shaw JJ, Bichara CNC, Costa JML. Leishmaniose visceral americana. In: Leão RNQ, coordenador. Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Belém: CEJUP; 1997. p. 631-44.
- 33 Vinhas V, Freire M, Bacellar O, Cunha S, Rocha H, Carvalho EM. Characterization of T cell responses to purified leishmania antigens in subjects infected with *Leishmania chagasi*. *Braz J Med Biol Res*. 1994 May;27(5):1199-205.
- 34 Zijlstra EE, El-Hassan AM, Ismael A, Ghalib HW. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Dec;51(6):826-36.

Recebido em / Received / Recibido en: 22/6/2009
Aceito em / Accepted / Aceito en: 17/10/2009