

Visseral Leishmaniasis Olgularında İmmunglobulin İzotip ve IgG Subtiplerinin Dağılımı

Sinem AKÇALI¹, İ. Cüneyt BALCIOĞLU², Tamer ŞANLIDAĞ¹,
Emin LİMONCU², Seray ÖZENSOY TÖZ³, Yusuf ÖZBEL³

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
²Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, ³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET: Visseral leishmaniasis erken tanısının zor olması, sağaltımda sıklıkla ilaç direnci ve relapslarla karşılaşılması nedeniyle, günümüzde halen sorun olmaya devam eden fatal, tropikal bir hastalıktır. Bu çalışmada visseral leishmaniasis tanısı almış 29 hastada ve klinik bulguları uygun ancak farklı bir tanı alan 30 kontrol hastasında immunglobulin izotip düzeyleri (IgG, IgM, IgA ve IgE) ve IgG subtiplerinin (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) dağılımları araştırılmıştır. Visseral leishmaniasisli grupta IgG düzeyleri ve subtiplerde de IgG1 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre, visseral leishmaniasis hastalarında, spesifik immunglobulin izotip ve subtip düzeylerinin takip edilmesinin, enfeksiyonun progresyonu ya da rezolusyonu açısından klinisyene yol gösterebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Visseral leishmaniasis, immunglobulinler, IgG subtipleri.

Distribution of Immunoglobulin Isotypes and IgG Subclasses in Visceral Leishmaniasis Cases

SUMMARY: Visceral leishmaniasis, a fatal tropical disease, remains problematic as early diagnosis is difficult and treatment often results in drug resistance and relapse. In this study, relative levels of immunoglobulin G (IgG), IgM, IgA, IgE, and IgG subclasses were analyzed in 29 visceral leishmaniasis patients. Compared to 30 controls, visceral leishmaniasis patients showed a significantly higher IgG response. Among IgG subclasses, IgG1 response was significantly higher in visceral leishmaniasis patients than in the controls. Therefore, monitoring of immunoglobulin isotypes and IgG subclasses in visceral leishmaniasis patients may be a good serologic alternative in monitoring the disease status.

Key words: Visceral leishmaniasis, immunoglobulins, IgG subclasses

GİRİŞ

Leishmaniasis Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropik hastalıktan birisi olarak kabul edilen ve dünyada 20 milyon insanın enfekte olduğu, her yıl eklenen olgu sayısı 400 bin olan ve yaklaşık 350 milyon insanı tehdit eden paraziter bir enfeksiyondur (15, 25). Morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Leishmania* türleri klinik olarak visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere 3 farklı klinik tablo oluşturur. *L. donovani*'nin VL etkeni olduğu alanlarda tedavi sonrası deride ortaya çıkan ve "post kala azar dermal leishmaniasis" (PKDL) olarak adlandırılan klinik tablo da son yıllarda dördüncü klinik şekil olarak kabul edilmiştir (17).

Ülkemizde *L. infantum*'un sebep olduğu VL, parazit hastalıkları içerisinde gerek sağaltımının gerekse korunmanın zor olması, çocuklarda uzun süren klinik tablo ile seyretmesi ve sağaltılmadığı takdirde gastrointestinal sistem kanamalarına

bağlı ölüme yol açabilmesi nedeniyle önemli parazit hastalıklarından biridir.

İmmunglobulinler, antijenlerle uyarılan B lenfositlerinin başkalaşımı ile ortaya çıkan plazma hücreleri (plazmosit) tarafından oluşturulmaktadır. İmmunglobulin molekülleri taşıdıkları ağır zincir tipine göre immunglobulin G (IgG), immunglobulin M (IgM), immunglobulin A (IgA), immunglobulin D (IgD) ve immunglobulin E (IgE) olmak üzere 5 izotipe ayrılmışlardır. Bu izotiplerin ağır zincirleri üzerindeki birtakım değişiklikler antikor moleküllerinde farklılaşmaya neden olur. Bu farklılıklar sayesinde IgG sınıfında 4 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA sınıfında ise 2 (IgA1, IgA2) subtip tesbit edilmiştir. Çeşitli enfeksiyon etkenleri, farklı izotip ve subtiplerde artışa neden olmaktadır.

Bu parazitin hedef hücresi makrofajlardır. Makrofajlar *Leishmania* parazitini fagosite ederek vakuol içinde hapsederler. Makrofajlarda çok sayıda amastigot bulunması ve aşırı retikulo-endotelial sistem uyarımı, poliklonal B lenfosit yanıtı ile sonuçlanır. Üretilen çok miktarda kalitesiz, koruyuculuğu olmayan IgG yapısındaki antikorlar nedeniyle hipergammaglobülinemi, karaciğer disfonksiyonuna bağlı hipoalbuminemi gelişir.

Geliş tarihi/Submission date: 16 Ocak/16 January 2004

Kabul tarihi/Accepted date: 07 Nisan/07 April 2004

Yazışma /Corresponding Author: Sinem Akçalı

Tel: (+90) (236) 233 38 28 / 1310 Fax: (+90) (236) 237 02 13

E-mail:

Bu çalışmada VL tanısı almış olgularda immünglobulin izotip düzeyleri (IgG, IgM, IgA ve IgE) ve IgG subtiplerinin (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) dağılımlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖTEM

Serum örnekleri: Hepatosplenomegali, pansitopeni, ateş ve kilo kaybı semptomlarından en az biri bulunan 8 ay ile 15 yaşları arasında, serolojik (ELISA, IFAT) ve parazitolojik (kemik iliği aspirasyon biyopsi materyalinde amastigotların saptanması) olarak VL tanısı almış 29 olgu hasta grubu olarak alınmıştır. Ayrıca klinik tanı kriterlerine uyan ve aynı yaş grubunda 30 olgudan kontrol grubu oluşturulmuştur. Çalışma ve kontrol grubundaki olgulardan serum örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayırılmış ve çalışma gününe kadar -80°C ’de saklanmıştır.

Serum immünglobulin düzeylerinin ölçülmesi ve değerlendirilmesi: Nefelometrik yöntemle Dade Behring firmasına ait “N Antiserum to Human Immünglobulins (IgG, IgA and IgM)” ve “N AS IgG 1-4” kitleri kullanılarak serum örneklerinde IgM, IgA, IgE, total IgG ve IgG subtiplerinin düzeyleri araştırılmıştır. Kitteki manüale uygun olarak çalışılmış ve burada her bir izotip ve subtip için belirtilen normal değerler kabul edilmiştir.

Çalışmada üretici firmanın önerileri doğrultusunda IgG 8-17 gr/Lt, IgG1 4.9-11.4 gr/Lt, IgG2 1.5-6.4 gr/Lt, IgG3 0.2-1.1 gr/Lt, IgG4 0.08-1.4 gr/Lt, Ig A 1-4.9 gr/Lt, IgM 0.5-3.2 gr/Lt değerleri arası ve Ig E < 100 IU/ml olması normal değerler olarak alınmıştır.

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Windows 98® bilgisayar işletim ortamında çalışan SPSS for Windows 6.1® (SPSS Inc., 1994) programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz Fisher’ in kesin testi, student t testi ve Pearson korelasyon analiziyle yapılmıştır ($p < 0.0001$).

BULGULAR

29 hastanın 21’ inde (%72) IgG, 7’ sinde (%24) IgE, 3’ ünde (%10) IgM düzeyleri yüksek bulunurken, IgA düzeyleri normal sınırlarda bulunmuştur. Yine 23 hastanın (%79) IgG1 düzeyleri yüksek saptanırken, IgG2, IgG3 ve IgG4 düzeyleri normal sınırlarda saptanmıştır. Yaş ile immünglobulinler arasında saptanan korelasyon katsayısı -0.051 (IgE) ile 0.243 (IgG4) arasında olup, anlamsız bulunmuştur. Hasta grubunda saptanan IgG ve IgG1 yüksekliği ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Tablo 1).

TARTIŞMA

Gelişmiş ülkelerin de dahil olduğu 88 ülkede 12 milyon insanı etkileyen ve yaklaşık 350 milyon insanı tehdit eden bir parazit enfeksiyonu olan leishmaniasis, insan-vektör-insan geçişi ile yayılmakta ve dünyada oldukça geniş bir alanda görülmektedir. Birçok ülkede kentleşme, tarımsal gelişmeye paralel göç hareketlerinin artması ve her geçen yıl HIV/AIDS’in yaygınlaşması nedeniyle leishmaniasisin hem bulaş yolları artmış, hem de yayılımı hız kazanmıştır (27).

Leishmania’nın oluşturduğu intrasellüler enfeksiyon, çeşitli hücrel immun reaksiyonlar ve dolaşımdaki antikörlerle uyarılan kompleks bir immun yanıtla karakterizedir. Kemik iliği ve dalakta bol miktarda parazit varlığına bağlı olarak B lenfositlerin poliklonal aktivasyonları sonucunda, şiddetli VL olgularının büyük çoğunluğunda *Leishmania* antijenlerine karşı yüksek antikör titreleri saptanmıştır (9). Bu antikörlerin büyük çoğunluğunu IgG tipi antikörlerin oluşturduğu, yapılan değişik çalışmalarda gösterilmektedir (10, 12). Ancak, bunların hastalığın seyrinin önceden tahmin edilmesi ile ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceği halen açıklanmayı beklemektedir.

Bu enfeksiyonun tanısında ilk aşamayı klinik tanı oluşturmakta ve önemli bir yer tutmakla birlikte, VL tanısında altın standart olarak kabul edilen kemik iliği aspirasyon biyopsi materyalinde amastigotların görülmesi ve NNN besiyerinde üretilmesi kesin tanı konulması açısından önem taşımaktadır (20).

Son zamanlarda etkensel tanıya alternatif olması için birçok serolojik yöntem geliştirilmiştir. Çoğunlukla IgG antikörlerini saptamaya yönelik olan bu testler, VL’ nin tedavisinden sonra da uzun süre pozitif kalmakta ve sıtma, tüberküloz, lepra gibi VL ile birlikte görülebilen diğer enfeksiyonlarla çapraz reaksiyon gösterebilmektedir (8, 11, 19, 22).

VL tanısı almış olgularda immünglobulin izotip düzeyleri ve IgG subtiplerinin dağılımları araştırılan bu çalışmada, 29 hastanın 21’ inde (%72) IgG, 7’ sinde (%24) IgE, 3’ ünde (%10) IgM düzeyleri yüksek bulunurken, IgA düzeyleri normal sınırlarda bulunmuştur. Yine 23 hastanın (%79) IgG1 düzeyleri yüksek saptanırken, IgG2, IgG3 ve IgG4 düzeyleri normal sınırlarda saptanmıştır.

Leishmania enfeksiyonlarının sıçan modellerinde, Th2 - IL4 - IgG1 cevabının progresyonla, Th1 - IFN- γ - IgG2a cevabının ise direnç ve koruyucu bağışıklık ile ilişkili olduğu gösterilmesine rağmen, insanlarda böyle bir ilişki henüz tam olarak kanıtlanamamıştır (1, 2, 6). Antikör izotipleri ve sitokin profilleriyle patogenezi arasındaki bağlantı lepra, AIDS, lenfatik filariasis, onkoserkosis ve sıtma gibi bazı hastalıklarda gösterilmiştir (13, 16, 18, 21, 23). VL’ li olgularda yapılan sitokin incelemelerinde hastalığın aktif döneminde Th-2 yanıtının, Th-1 yanıtından daha kuvvetli olduğu görülmüştür (14).

Sudan’lı olgularda IgG subtiplerinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm IgG subtiplerinin düzeyinde yükselme bildirilirken, IgG3 ve IgG4’ de IgG1’e oranla daha fazla bir stimülasyon gözlenmiştir (7). Buna karşılık, Venezuela (26) ve Hindistan’da (3) yapılan çalışmalarda en fazla IgG1’de yükselme saptanırken, Venezuela bunu IgG4’ün , Hindistan’da ise IgG3, IgG4 ve IgG2 düzeylerinde anlamlı bir artışın izlediği bildirilmiştir. Somali’de VL olgularında IgG1 düzeylerinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir yükseklik saptanmıştır (24). Sonuçlardaki bu çeşitliliğin etnik farklılıklar, parazitik genotiplerdeki farklılıklar ve antijen çalışmalarında kullanılan antikörlerin özgüllüğündeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

IgG1 ve IgG3 tipi antikorların kompleman bağlama ve opsonizasyon aktivitesinin yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *Leishmania*-spesifik IgG1 ve IgG3 düzeylerindeki yükselmeler, düşük C3 düzeyleri, doku hasarı ve diğer inflamatuvar reaksiyonlara cevap olarak ortaya çıkabilmektedir. Diğer taraftan IgG2 antikorları kompleman bağlama ve opsonizasyon aktivitesi zayıf antikorlardır ve bu yüzden bazı patolojilerdeki rolleri azdır (5).

VL'li olgularda spesifik immunglobulin izotiplerinin şiddetli stimülasyonunun temel immunolojik mekanizmaları açıklanamadığından, ilaç tedavisiyle immunglobulin düzeylerinde gözlenen değişiklikler de henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiştir. Anam ve arkadaşları VL olgularını sodyum stiboglukonat (SbV) ile tedaviye almışlar ve bu süreçte spesifik immunglobulin izotip ve subtiplerini izlemişlerdir. Hastalığın akut fazında en fazla yükselmeyi IgG ve IgG1' de saptamışlardır. SbV'a direnç gösteren hastalarda IgG, IgM, IgE ve IgG4 düzeyleri yüksek kalırken, IgG2 ve IgG3 düzeylerinde düşme gözlemiştir. Buna karşılık IgG1 düzeylerinde anlamlı bir yükselme bildirmişlerdir. İyileşme döneminde ise IgG, IgM, IgE ve tüm IgG subtiplerinin düzeylerinin düştüğünü saptamışlardır (4).

Sonuç olarak VL hastalarında, spesifik immunglobulin izotip ve subtip düzeylerinin takibinin, infeksiyonun progresyonu yada rezolusyonu açısından klinisyene yol gösterebileceği ve bu konuda daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Afrin F, Ali N, 1997. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun*, 65: 2371-2377.
2. Afrin F, Ali N, 1998. Isotype profiles of *Leishmania donovani* infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome associated promastigote antigens. *J Parasitol*, 84: 743-748.
3. Anam K, Afrin f, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Gupta PN, Saha SK, Ali N, 1999. Immunglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6 (2): 231-235.
4. Anam K, Afrin f, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Ali N, 1999. Differential decline in *Leishmania* membrane specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect Immunol*, 67 (12): 6663-6669.
5. Asish KG, Dasgupta S, Ghose AC, 1995. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2: 291-296.
6. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H, 1992. Establishment of stable, cell mediated immunity that make "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257: 539-542.
7. Elasad AM, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalib HW, 1994. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol*, 95 (2): 294-299.
8. Fargeas C, Hommel M, Mandon R, Dourado C, Monsigny M, Mayer R, 1996. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 34: 241-248.
9. Galvao-Castro B, Sa Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH, 1984. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 56: 58-66.
10. Ghose AC, Haldar JP, Pal SC, Mishra BP, Mishra KK, 1980. Serological investigation on Indian Kala-azar. *Clin Exp Immunol*, 40: 318-326.
11. Hailu A, 1990. Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84: 673-675.
12. Haldar JP, Saha KC, Ghose AC, 1981. Serological profiles in Indian post kala-azar dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75: 514-517.
13. Hussain R, Kifayet A, Chiang TJ, 1995. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. *Infect Immun*, 63: 410-415.
14. Karp CL, Ei Safi SH, Wynn TA, Satti MMH, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL, 1993. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin 10 and interferon gamma. *J Clin Invest*, 91: 1644-1648.
15. Kuman HA, Altıntaş N, 1996. *Protozoon Hastalıkları*, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi: 79-100.
16. Kurniawan A, Yazdanbakhsh M, Van Ree R, Aalberse R, Selkirk ME, Partono F, Maizels RM, 1993. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. *J Immunol*, 150: 3941-3950.
17. Osman OF, 1998. VL: *The PCR and DAT for diagnosis and management*. Royal Tropical Institute, Amsterdam, Ph.D. Thesis: p.49-56.
18. Ouaaz F, Ruscetti FW, Dugas B, Mikovits J, Agut H, Debre P, Mossalayi MD, 1996. Role of IgE immunocomplexes in the regulation of HIV-1 replication and increased cell death of injected U1 monocytes: involvement of CD23/FcεRII-mediated nitric oxide and cyclic AMP pathways. *Mol Med*, 2: 38-49.
19. Pal A, Mukerji K, Basu D, Naskar K, Mullick KK, Ghosh DK, 1991. Evaluation of direct agglutination test (DAT) and ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India. *J Clin Lab Anal*, 5: 303-306.
20. Pearson RD, De Queiroz Sousa A, 1996. Leishmaniasis. Bennet JC, Plum F (Eds). "Cecil Textbook of Medicine". 20th ed, WB Saunders Comp: 1903-1907.

21. **Perlmann P, Perlmann H, Flyg BW, Hagstedt M, Elghazali G, Worku S, Fernandez V, Rutta ASM, Troye-Blomberg M,** 1997. Immunoglobulin E, a pathogenetic factor in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*, 65: 116-121.
22. **Rolland-Burger L, Rolland X, Grieve CW, Monjour L,** 1991. Immunoblot analysis of the humoral immun response to *Leishmania donovani* infantum polypeptides in human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 29: 1429-1435.
23. **Salinas G, Sinha K, Cooper JP, Whitworth JAG, Taylor DW,** 1996. Human isotype antibody responses to an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase. *Parasite Immunol*, 18: 377-386.
24. **Shiddo SA, Huldt G, Nilsson LA, Ouchterlony O, Thorstensson R,** 1996. Visceral leishmaniasis in Somalia. Significance of IgG subclasses and of IgE response. *Immunol Lett*, 50 (1-2): 87-93.
25. **TDR News.** 1990. WHO/TDR-CTD/HH.90.1, 14-15.
26. **Ulrich M, Rodriguez V, Centeno M, Convit J,** 1995. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol*, 100: 54-58.
27. **WHO.** *Information Circular*, WHO Mediterranean Zoonose Control Centre, 1996, 40: 11-13.