

## PESQUISA DE ANTICORPOS, POR IMUNOFLORESCÊNCIA, EM SOROS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO LESÕES CUTÂNEAS RECENTES

Cléa de Andrade CHIARI<sup>(1)</sup>, Paulo Araújo MAGALHÃES<sup>(2)</sup> e Wilson MAYRINK<sup>(3)</sup>

### RESUMO

Realizamos a reação de imunofluorescência indireta em 37 soros de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana, apresentando lesões cutâneas recentes e reação de Montenegro positiva, utilizando antígeno homólogo. O tempo de evolução da lesão inicial, a comprovação parasitológica da infecção e a idade do paciente não exerceram influência, estatisticamente significativa, nos títulos de anticorpos fluorescentes. Os pacientes com lesões cutâneas múltiplas, apresentaram títulos significativamente mais altos do que os obtidos em soros de pacientes com uma única lesão. A maior média de títulos foi assinalada no grupo entre 0 a 9 anos de idade. O maior número de casos de leishmaniose ocorreu entre indivíduos de 10 a 19 anos, apesar da população acima de 20 anos também estar exposta à infecção. Julgamos que somente após estudos mais pormenorizados sobre o mecanismo do desenvolvimento da imunidade na leishmaniose muco-tegumentar, será possível analisar o papel da imunidade em relação ao título de anticorpos circulantes.

### INTRODUÇÃO

Tendo em vista a variação dos níveis de anticorpos nas diversas formas clínicas da leishmaniose tegumentar<sup>3, 4, 9</sup>, realizamos a reação de imunofluorescência (RIF) em soros de pacientes apresentando lesões cutâneas recentes, visando a interpretação dos valores dos títulos obtidos.

Algumas observações sobre a influência da forma clínica da doença, tempo de evolução e atividade da infecção nos níveis de anticorpos circulantes foram anteriormente assinaladas<sup>2, 8, 9, 10</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Antígeno

Usamos como antígeno formas de cultura obtidas de *Leishmania braziliensis* isolada

de um caso humano de leishmaniose muco-cutânea no Ceará, em 1960 por Alencar e mantida em meio NNN.

#### Soros

Os soros foram coletados de pacientes com leishmaniose tegumentar, na área endêmica do Vale do Rio Doce, Minas Gerais (Mapa 1). Estes pacientes apresentavam lesões cutâneas recentes e reação de Montenegro positiva.

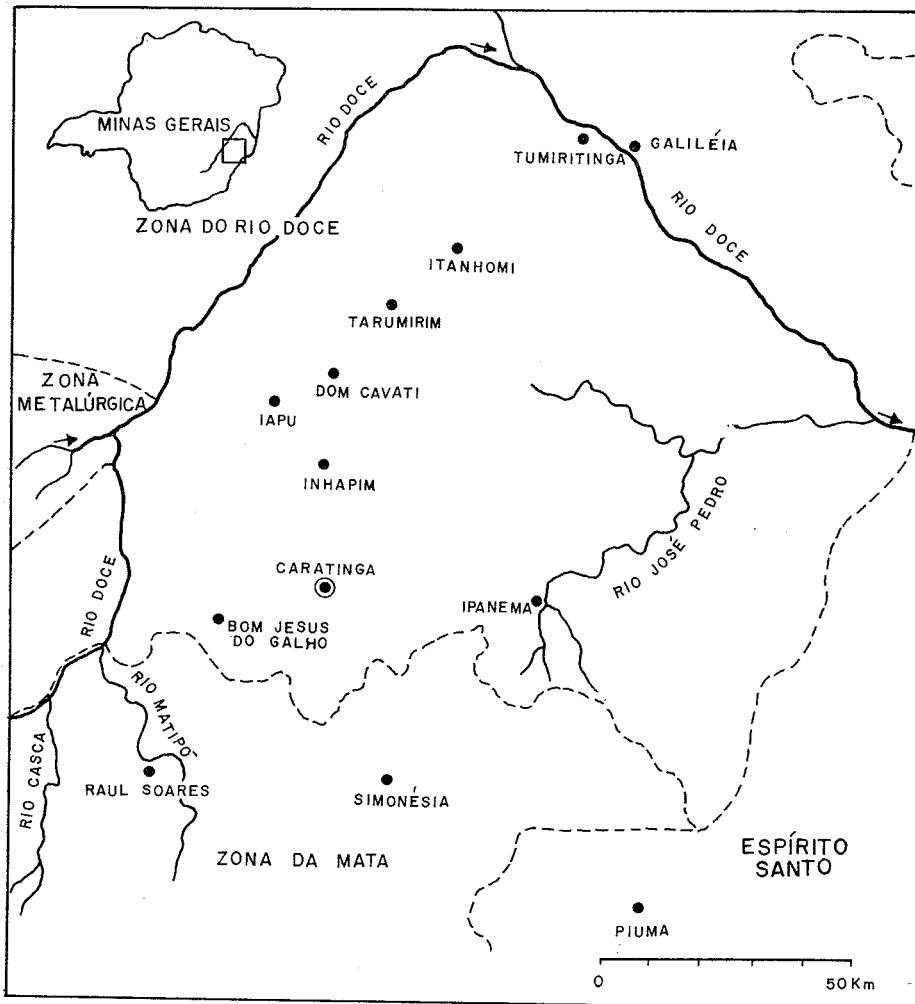
#### Esquema geral das reações

Distribuímos aproximadamente 0,05 ml de cada diluição dos soros, em solução salina tamponada pH 7.2, nas lâminas com anti-

Trabalho do Departamento de Zoologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com a Superintendência de Campanhas (SUCAM) do Ministério da Saúde. Realizado com ajuda financeira da Companhia Vale do Rio Doce.

(1) (3) Professores de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Caixa Postal 2486, Belo Horizonte, Brasil

(2) Médico Sanitarista do Ministério da Saúde



Mapa 1 — Mapa da região indicando as localidades de procedência dos casos de leishmaniose tegumentar

geno. A preparação foi incubada a 37°C durante 40 minutos, em câmara úmida. As lâminas, após lavadas duas vezes em solução tampão, foram secas à temperatura ambiente e em seguida incubadas por 40 minutos com conjugado. Utilizamos antigamaglobulina humana marcada e diluída em solução de Tween 80 a 2%. A antigamaglobulina empregada foi marcada com isotiocianato de fluoresceína segundo a técnica de CHERRY & col.<sup>7</sup>. A relação fluoresceína-proteína foi 16 (microgramas de fluoresceína/miligramas de proteína) e o conjugado quando titulado mostrou-se efetivo em uma diluição de 1/80. Removemos o conjugado das lâminas por lavagem em salina tamponada e água destilada,

e adicionamos solução (1/1000) de azul de Evans. Após 5 minutos removemos o corante por lavagem, e as lâminas foram preparadas com glicerina neutra.

#### *Leitura dos resultados*

Utilizamos microscópio ZEISS GF25 equipado com lâmpada ultra violeta OSRAM HBO 200. Usamos como filtros de barreira os n.ºs 53 e 44 ZEISS e como filtros de excitação os BG 12 e UG 5.

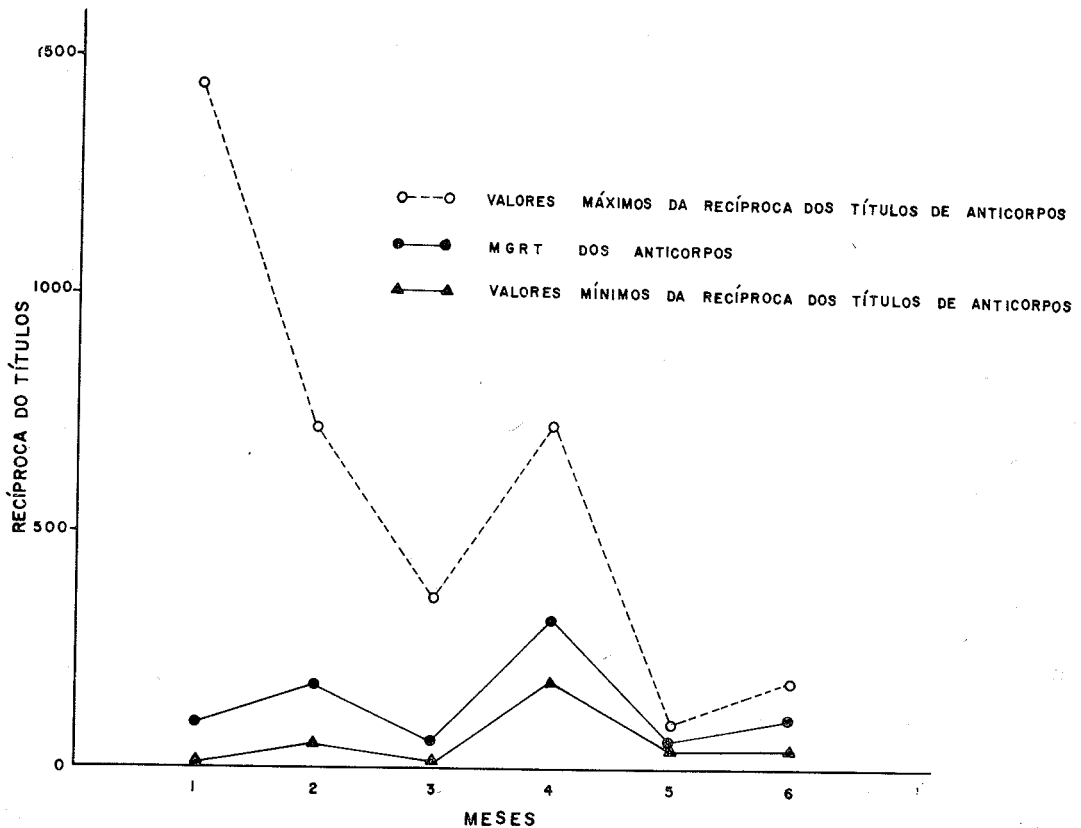
Consideramos positivas todas as preparações que apresentaram fluorescência amarelo esverdeada característica e semelhante à observada com os soros testemunhas, compro-

CHIARI, C. de A.; MAGALHÃES, P. A. & MAYRINK, W. — Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:304-309, 1973.

TABELA I

Freqüência da distribuição dos títulos de anticorpos fluorescentes em 37 soros positivos para *Leishmania braziliensis*, relacionada ao tempo de aparecimento da lesão inicial, de acordo com informações do paciente, utilizando antígeno homólogo.

Tempo aproximado de aparecimento da lesão inicial, em meses	Recíproca dos títulos							N.º de soros	MGRT
	1	45	90	180	360	720	1440		
1	1	2	2	1	1	—	1	8	78
2	—	1	2	—	2	1	—	6	180
3	1	2	4	1	1	—	—	9	58
4	—	—	—	2	2	1	—	5	314
5	—	3	1	—	—	—	—	4	53
6	—	1	2	2	—	—	—	5	103



vadamente positivos. Critério semelhante foi adotado nos casos negativos, sendo a coloração vermelho-alaranjada comparada com a coloração obtida com os soros padrões negativos. Além disto, foi realizado sempre um controle de conjugado, a fim de eliminar a possibilidade de fluorescência inespecífica.

#### Cálculos estatísticos

A fim de comparar os resultados obtidos nos diferentes grupos utilizamos a média geométrica da recíproca dos títulos (MGRT)<sup>1</sup>.

Nos casos em que foi necessária uma análise comparativa de dados usamos a distribuição de *t* de Student, com *n* - 2 graus de liberdade e  $\alpha = 1\%$  ou  $\alpha = 5\%$ .

#### RESULTADOS

Os resultados da RIF em casos recentes de leishmaniose tegumentar, são apresentados de acordo com o tempo de aparecimento da lesão inicial (Tabela I e Gráfico 1), número

de lesões (Tabela II), exames parasitológicos positivos (Tabela III) e idade do paciente (Tabela IV).

#### DISCUSSÃO

Os resultados das reações realizadas em 37 soros mostraram que há uma variação nos títulos de anticorpos de acordo com o tempo de evolução da lesão inicial (Tabela I). Essa variação, no entanto, não é homogênea nem constante, indicando que, em casos com um a seis meses de evolução, outros fatores podem influir nos níveis de anticorpos. O encontro de um título médio (MGRT) significativamente mais alto nos casos apresentando lesões múltiplas (Tabela II) pode ser atribuído à presença de maior número de parasitas e conseqüente aumento do estímulo antigênico. Entre os soros de pacientes com exames parasitológicos positivos, o número de reações negativas foi maior do que o do grupo com exames parasitológicos negativos (Tabela III). No entanto, a diferença

TABELA II  
Frequência dos títulos de anticorpos fluorescentes em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar +, agrupada de acordo com o número de lesões, usando antígeno homólogo

Número de lesão	Recíproca dos títulos							N.º de soros	MGRT
	1	45	90	180	360	720	1440		
Única	2	9	8	5	4	—	—	28	24
Múltipla	—	1	3	1	1	2	1	9	429

+ Diagnosticada clinicamente e com reação de Montenegro positiva

TABELA III  
Frequência dos títulos de anticorpos fluorescentes em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar +, lesões recentes, com exames parasitológicos positivos e negativos, utilizando antígeno homólogo

Exames parasitológicos	Recíproca dos títulos							N.º de soros	MGRT
	1	45	90	180	360	720	1440		
Positivos	2	2	5	5	3	1	—	18	85
Negativos	—	7	6	2	2	1	1	19	103

+ Diagnosticada clinicamente e com reação de Montenegro positiva

TABELA IV  
 Frequência dos títulos de anticorpos fluorescentes, segundo o grupo etário, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar+, com lesões recentes, utilizando antígeno homólogo

Idade	Recíproca dos títulos							N.º de soros	MGRT	%
	1	45	90	180	360	720	1440			
0 —  10	1	3	4	2	2	—	—	12	70	20,7
10 —  20	6	6	2	2	2	1	1	20	27	34,4
20 —  30	2	—	3	1	1	1	1	8	46	13,9
30 —  40	3	3	2	1	3	—	—	12	34	20,6
40 —  50	3	1	—	1	1	—	—	6	10	10,4
Total	15	13	11	7	9	2	2	59	...	100,0

+ Diagnosticada clinicamente e com reação de Montenegro positiva

entre as MGRT, não foi significativa. Os títulos de anticorpos são relativamente baixos, em ambos os grupos, o que pode ser atribuído à presença de lesões recentes.

Os títulos de anticorpos agrupados segundo a idade (considerando-se que trabalhamos com uma amostra selecionada), revelaram que a maior prevalência de leishmaniose ocorreu em indivíduos entre 10 a 19 anos, apesar do grupo entre 20 e 39 anos estar igualmente exposto à infecção. A menor ocorrência foi assinalada nos indivíduos acima de 40 anos. A maior média de títulos ocorreu no grupo de 0 a 9 anos, provavelmente devido ao menor grau de imunidade. Fato semelhante foi observado no Município de Vila Queiroz, São Paulo, onde a incidência de leishmaniose apresentava variações entre os componentes das famílias residentes em locais próximos a matas, onde havia grande número de insetos vectores. Segundo PESSÔA<sup>11</sup>, esta variação estaria provavelmente ligada a imunidade natural e adquirida. A imunidade natural poderia ocorrer através de um mecanismo semelhante ao assinalado para a malária. Quanto à imunidade adquirida poderia se admitir como resultante de formas abortivas, de caráter benigno, que evoluiriam mais ou menos rapidamente, sem deixar nenhuma cicatriz, porém trazendo imunidade duradoura. Esses indivíduos frequentemente apresentariam reação de Montenegro negativa.

Julgamos, no entanto, que todos esses argumentos não representam uma explicação definitiva do fato. Apesar de BRAY & LAINSON<sup>3, 4, 5</sup> e CONVIT & KERDEL VEGAS<sup>8</sup> afirmarem que o parasitismo pela *L. braziliensis*, nos casos de lesões tegumentares ou muco-tegumentares, confere imunidade subsequente à cura, o mecanismo pelo qual o hospedeiro pode oferecer resistência ao desenvolvimento intracelular do parasita ainda não é bem conhecido. BRYCESON & col.<sup>6</sup> sugerem que talvez o mecanismo celular de desenvolvimento de imunidade em cobaias contra *Leishmania enrietti* possa servir como base para a análise do papel das células mediadoras da imunidade específica, na resistência à infecção intracelular na leishmaniose cutânea humana.

Somente após conhecimento mais pormenorizado do assunto seria possível analisar o papel da imunidade, em relação ao título de anticorpos circulantes na infecção por *Leishmania braziliensis*.

#### SUMMARY

#### *Fluorescent antibody test in cases of American leishmaniasis with recent cutaneous lesions*

IFA test has been carried out on 37 sera from individuals with American cutaneous leishmaniasis, showing recent cutaneous lesions and positive Montenegro test. Homologous antigen was used.

Duration of initial lesion, positive parasitological diagnosis and age of patients were of no statistical significance as to fluorescent antibody titers. With sera from patients with multiple cutaneous lesions, titers were significantly higher than from patients with only one lesion. Highest mean titers were found within the age range from 0 to 9 years. Higher incidence of leishmaniasis was found among individuals from 10 to 19 years of age, although population over 20 years were also exposed to the infection. We consider that the role of immunity in relation to circulating antibody titers can only be analyzed after the immunity development mechanism of mucocutaneous leishmaniasis is more thoroughly studied.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P. — Étude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence. Institut de Médecin et d'Hygiène Tropicales. Faculté de Médecin de Lyon, 645 págs., 1969.
2. BITTENCOURT, A. C.; SODRÉ, A. & ANDRADE, Z. A. — Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:247-252, 1968.
3. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I — The fluorescent antibody staining technique. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59:535-544, 1965.
4. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. IV — Results of Ouchterlony double diffusion test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:605-609, 1966.
5. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V — The use of particles as vehicles in passive agglutination test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61:490-505, 1967.
6. BRYCESON, A. D. M.; BRAY, R. S.; WOLSTENCROFT, R. A. & DUMONDE, D. C. — Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clin. Exp. Immunol.* 7:301-341, 1970.
7. CHERRY, W. B.; GODMAN, N. & CARKI, T. R. — *Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Diseases*. Public Health Service Publication n.º 729. Department of Health, Education and Welfare. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U.S.A., 1960.
8. CONVIT, J. & KERDEL VEGAS, F. — Disseminated cutaneous leishmaniasis inoculation to laboratory animals, electron microscopy and fluorescent antibodies studies. *Arch. Derm.* 91:439-447, 1965.
9. CONVIT, J. & PINARD, M. E. — Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Derm. Inter.* January-March: 17-20, 1969.
10. GUIMARÃES, N. F.; LAGE, H. A.; VENANCIO, J. A. & GRZYMBERG, N. F. — Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, leishmanioses tegumentares e calazar com vários antígenos de *Leishmania* e *Trypanosoma*. *Hospital (Rio)* 75:299-313, 1969.
11. PESSÓA, S. B. & BARRETTO, M. P. — *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de São Paulo. Ministério de Educação e Saúde, Serviço de Documentação, 527 páginas, 1944.

Recebido para publicação em 12/12/1972.