

REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA NO CONTROLE DE TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Cleá de A. CHIARI⁽¹⁾, Wilson MAYRINK⁽²⁾ e Paulo A. MAGALHÃES⁽³⁾

RESUMO

Realizamos a reação de imunofluorescência indireta (RIF) em soros de 38 pacientes com leishmaniose tegumentar submetidos a tratamento pelo antimoniato de N metilglucamina. As curvas de títulos obtidas mostraram que antes do tratamento os títulos variaram de negativo a 1:1440. Em 51,8% dos pacientes as RIF foram negativas antes da cicatrização da lesão inicial e 100% dos casos apresentaram sorologia negativa 25 dias após a cicatrização das lesões. Em 25,8% dos pacientes observamos um aumento dos títulos de anticorpos precedendo à cicatrização da lesão inicial. Estes resultados indicam que a RIF pode ser utilizada com um critério de controle de cura na leishmaniose tegumentar americana.

INTRODUÇÃO

O decréscimo dos níveis de anticorpos circulantes em casos de leishmaniose cutânea submetidos a tratamento já havia sido assinalado^{2, 6}, sem que fosse avaliado o tempo necessário para a negatificação total da sorologia e se esta diminuição de títulos era gradativa e constante. Posteriormente, a reação de imunofluorescência foi utilizada como um possível método para avaliar a eficácia dos quimioterápicos na leishmaniose tegumentar americana⁷. Os títulos mais elevados foram obtidos com antígenos de formas amastigotas de *L. braziliensis* que se mostraram mais sensíveis que as formas promastigotas^{4, 7}.

Como em nosso laboratório usamos formas promastigotas como antígeno, julgamos oportuno acompanhar sorologicamente um grupo de pacientes submetidos a tratamento pelo antimoniato de N metilglucamina, droga considerada eficaz na terapêutica das leishmanioses. A possibilidade do emprego de uma reação sorológica como controle de cura con-

tribuiria para diminuir o número de recidivas em pacientes tratados. Adotando como critério de cura unicamente a cicatrização das lesões, tivemos a oportunidade de verificar que cerca de 38% dos pacientes, submetidos a tratamento em clínicas especializadas e considerados clinicamente curados, apresentavam sorologia positiva. Este dado pareceu-nos importante, considerando-se que cerca de 40% dos casos, submetidos a um esquema terapêutico curto mas suficiente para promover a cicatrização das lesões, apresentam posteriormente lesões mucosas.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros

a) — Soros provenientes de amostras de sangue de 38 pacientes com leishmaniose tegumentar americana, apresentando lesões cutâneas recentes e Reação de Montenegro

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) (2) Professores de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486, Belo Horizonte - Brasil
(3) Médico Sanitarista do Ministério da Saúde

positivas. Estas amostras de sangue foram colhidas antes, durante e após o tratamento, com intervalos aproximados de doze dias.

b) — Soros de 40 pacientes, clinicamente curados, com Reação de Montenegro positiva, colhidos quatro a quarenta e oito meses após o tratamento.

Esquema de tratamento

O antimoniato de N metilglucamina, foi administrado pela via intramuscular, na dose de 60 mg de sal por quilo de peso do paciente, em séries de 10 injeções. O critério de cura adotado foi o de cicatrização das lesões e RIF negativa.

Técnica da reação

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada de acordo com a técnica de CERISOLA³, utilizando antigamaglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína (relação ponderal F/P = 16 e título 1:80).

Consideramos positivos todas as preparações que apresentaram fluorescência amarelo esverdeada característica observada com os soros testemunhas comprovadamente positivos. Critério semelhante foi adotado nos casos negativos, sendo a coloração vermelho-alaranjada comparada com a dos soros padrões negativos. A fim de eliminar a possibilidade de fluorescência inespecífica realizamos sempre um controle do conjugado. Para os soros de indivíduos em tratamento, quando diluídos, adotamos o critério utilizado por AMBROISE-THOMAS¹. Consideramos como positiva somente a primeira diluição em que foi observada uma fluorescência pouco definida e menos intensa que a do soro positivo padrão. As diluições subseqüentes, mesmo apresentando certo grau de fluorescência, foram consideradas negativas.

Calculando a média geométrica da recíproca dos títulos de anticorpos (M G R T), segundo WAUGH⁸ e AMBROISE-THOMAS¹, obtivemos a curva de títulos médios no decorrer do experimento.

TABELA I

Frequência dos títulos de anticorpos fluorescentes anti-*Leishmania braziliensis* e suas médias geométricas (MGRT) em casos de leishmaniose tegumentar +, submetidos ao tratamento

Dias exames	Recíproca dos títulos								Total soros examinados	MGRT
	1	45	90	180	360	720	1440			
0 Antes	—	10	6	6	4	—	1	27	126	
12	Durante tratamento	7	6	5	4	3	1	1	27	34
24		14	2	4	3	1	2	—	26	11
36		10	4	3	4	1	—	—	22	7
48		8	2	3	1	1	—	—	15	8
60		2	1	2	1	—	—	—	6	20
72		—	—	1	—	—	—	—	1	...
84		—	1	—	—	—	—	—	1	...
1	Após tratamento	25	1	1	—	—	—	—	27	1
12		25	1	1	—	—	—	—	27	0
24		25	2	—	—	—	—	—	27	0
36		27	—	—	—	—	—	—	27	0
48		27	—	—	—	—	—	—	27	0
56		27	—	—	—	—	—	—	27	0

+ Diagnosticada clinicamente e com reação de Montenegro positiva



TABELA II

Resultados obtidos com 27 soros de pacientes com leishmaniose tegumentar + que apresentaram reação inicial positiva. Antígeno homólogo

	Reações negativas			Reação positiva logo após cicatrização	Aumento do título precedendo à cicatrização da lesão
	antes da cicatrização	na época da cicatrização	25 dias após a cicatrização		
N.º de reações	14	25	27	2	6
%	51,8	96,3	100	3,7	25,8

+ Diagnosticada clinicamente e com reação de Montenegro positiva

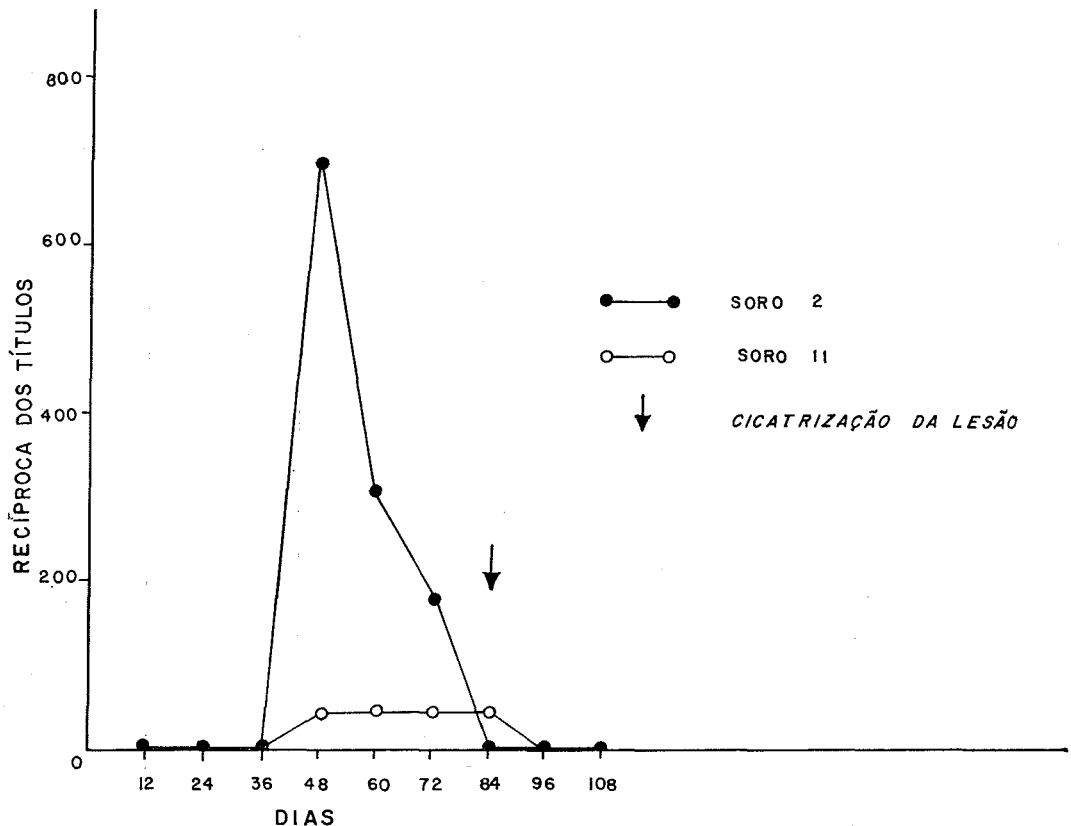


Gráfico 1 — Títulos de anticorpos fluorescentes, durante o tratamento de dois pacientes com leishmaniose tegumentar com reação inicial negativa.

RESULTADOS

Verificamos que em 38 soros de pacientes examinados, 11 soros apresentaram títulos negativos antes do início do tratamento. Estes pacientes foram divididos em dois grupos. No primeiro, constituído de cinco casos, a reação permaneceu negativa durante todo o tratamento e mesmo após a cicatrização das lesões. No segundo, constituído de seis pacientes, houve um aumento dos níveis de

anticorpos (chegando a títulos iguais a 1/720) e tornando-se negativos após a cicatrização da lesão. Considerando estes casos, verificamos que 87% dos pacientes apresentaram reação positiva no decorrer do tratamento.

Nos 27 pacientes que apresentaram reação positiva antes do tratamento os títulos das reações variaram de 1/45 a 1/1440, sendo que a maioria apresentou título igual a 1/45. Em todos os casos foi possível acompanhar a

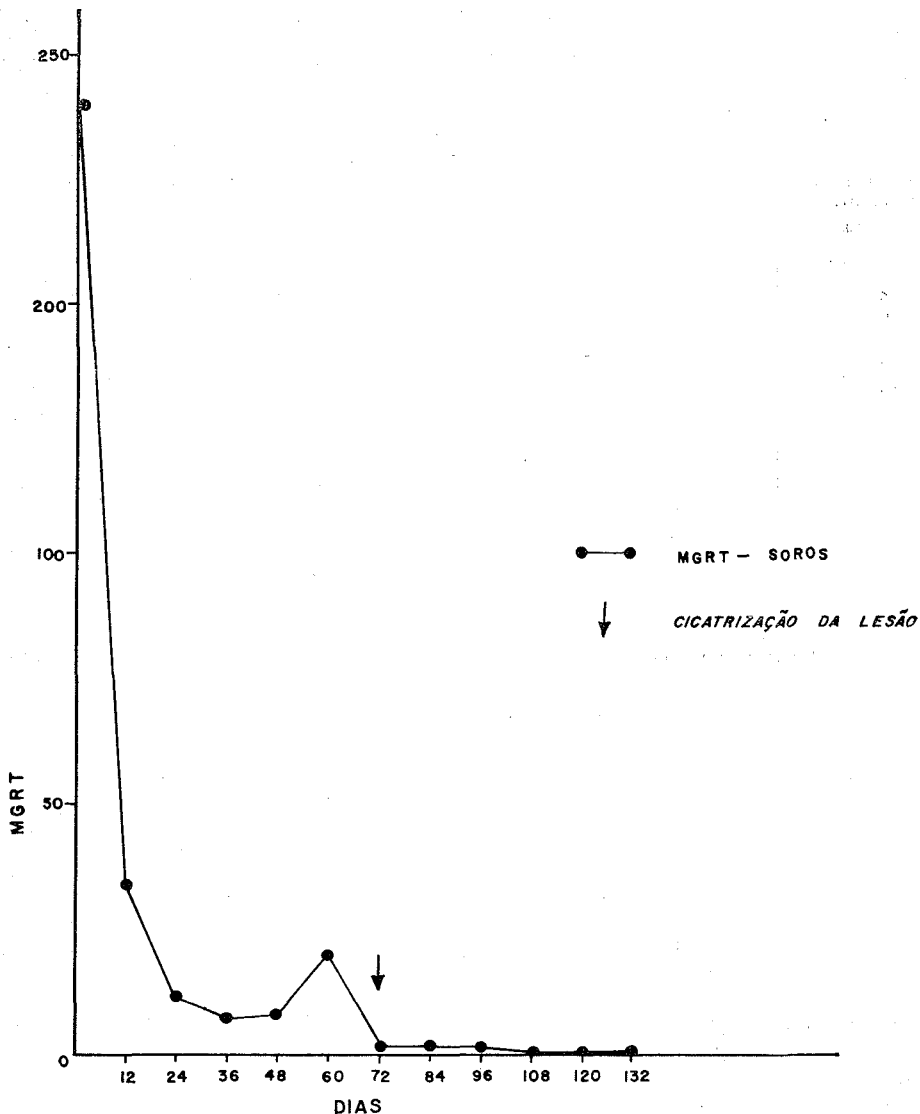


Gráfico 2 — Títulos médios de anticorpos fluorescentes obtidos em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar, durante o tratamento.

evolução dos títulos de anticorpos, durante e após o tratamento. Estes resultados são mostrados nas Tabelas I e II e a curva de títulos médios, nos Gráficos 1 e 2.

Os títulos de anticorpos em soros de pacientes submetidos a tratamento e considerados clinicamente curados, mas que não foram acompanhados sorologicamente, antes, durante e logo após o término do tratamento estão relacionados na Tabela III.

TABELA III

Resultados da reação de imunofluorescência indireta em soros de indivíduos +, com reação de Montenegro positiva, após o tratamento de leishmaniose tegumentar, pelo antimoníato de N metilglucamina

Tempo após o tratamento em meses	Número de soros	Título reação
4	3	—
5	1	—
7	3	—
12	5	—
18	6	—
24	10	—
30	8	—
	1	1/90
48	3	—

+ Estes pacientes não foram acompanhados sorologicamente, através da reação de imunofluorescência antes, durante e logo após o tratamento.

DISCUSSÃO

Nos casos de leishmaniose tegumentar, com infecção recente e sem comprometimento das mucosas, é freqüente o encontro de RIF negativa, utilizando como antígeno formas promastigotas de *L. braziliensis*. Atribuímos esse número de reações negativas ao fato dos soros serem provenientes de indivíduos com lesões iniciais (1 a 12 meses de evolução), únicas e na maioria das vezes ainda sob a forma papulosa. Os títulos das reações são sensivelmente mais altos quando há comprometimento das mucosas⁵. Resultados semelhantes foram encontrados em casos com lesões cutâneas de evolução crônica⁴, ou quando se utilizou como antígeno formas amastigotas de *L. donovani*^{4,7}. Embora tenhamos verificado a freqüência de reações negativas,

não nos foi possível estabelecer qual o tempo provável para o aparecimento de anticorpos circulantes fluorescentes, desde que reações positivas foram assinaladas em casos com apenas um mês de evolução e títulos negativos em indivíduos infestados há aproximadamente 12 meses. No entanto, assinalamos reações positivas no decorrer do tratamento, em alguns pacientes com sorologia negativa, e em outros, verificamos ligeiro aumento de título precedendo à cura clínica. Provavelmente o aparecimento de anticorpos circulantes e a elevação dos títulos possam ser devidos à produção de anticorpos resultantes do estímulo antigênico produzido pela destruição de amastigotas e à liberação de antígenos celulares retidos nas células parasitadas. Em todos os casos houve diminuição gradativa dos títulos de anticorpos, e 25 dias após o tratamento 100% dos pacientes apresentaram RIF negativa. Observamos ainda pequenas variações nas curvas de títulos. Nos indivíduos que apresentavam títulos iniciais mais baixos, foi mais freqüente o encontro de títulos negativos antes da cicatrização total das lesões. Como esses pacientes apresentavam lesões tipo papulosa, julgamos que os títulos de anticorpos estariam relacionados a baixa parasitemia, e a uma rápida resposta terapêutica. Não nos foi possível concluir se o encontro de uma RIF negativa indica que o tratamento possa ser interrompido quando as lesões não estiverem ainda cicatrizadas. Esta observação não foi realizada por nos parecer pouco adequado acompanhar a evolução de leishmaniose tegumentar em indivíduos que se não submetidos a terapêutica eficiente poderiam apresentar, posteriormente, lesões de mucosas. Todos os casos foram acompanhados sorologicamente durante aproximadamente dois meses e a RIF permaneceu negativa. A fim de verificar se os títulos permaneciam negativos durante um período mais longo, realizamos a RIF em 40 soros de pacientes, 4 a 48 meses após o tratamento. Este grupo havia sido submetido à terapêutica pelo antimoníato de N metil glucamine, utilizando o mesmo esquema terapêutico, mas sem controle sorológico (Tabela III). O único caso com reação positiva 30 meses após o tratamento apresentou título 1:90. Este paciente pode ser incluído entre aqueles que não respondem bem ao esquema usual de tratamento e embora tenha ocorrido a cica-

trização das lesões poderá apresentar no futuro manifestações clínicas decorrentes da reativação da infecção.

WALTON⁷ já havia observado uma flutuação irregular nos níveis de anticorpos, em pacientes tratados pelo pamoato de cicloguanil, medicamento pouco eficaz nas leishmanioses. Nos pacientes com malária tratados com drogas ativas sobre as formas exoeritrocíticas, observou-se negatificação total da sorologia em períodos que variaram de 15 dias a 5 meses após o tratamento. O mesmo não aconteceu naqueles tratados com 4 aminoquinoleínas. Nestes casos observou-se diminuição dos níveis de anticorpos, mas a reação permaneceu positiva¹.

Tudo indica que em leishmaniose tegumentar o estímulo antigênico produzido pela destruição dos parasitas e mesmo uma possível atividade imunogênica que permaneça depois da cura parasitológica, não resultam na presença de anticorpos fluorescentes por longo período após o tratamento. Estes resultados indicam que a RIF pode ser utilizada não só como controle de cura de indivíduos tratados mas também no ensaio clínico de novas drogas ativas para leishmaniose tegumentar.

SUMMARY

Indirect fluorescent antibody test in the evaluation of treatment of American cutaneous leishmaniasis

IFA serum antibody titers in recent cases of leishmaniasis treated with Antimoniate of N methyl glucamine showed that the test can be used to monitor the efficacy of chemotherapy. The curves of titers obtained from these patients demonstrated a definite decline during treatment. In 100 per cent of cases IFA tests became negative 25 days after healing of the lesions, and in 51.8 per cent before the lesions healed up. These data mean that the reversion to sero-negativity is a sound

criterion to evaluate the successful treatment of American leishmaniasis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P. — Étude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence. Institut de Médecine et d'Hygiène Tropicales. *Faculté de Médecin de Lyon*, 645 páginas, 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. CERISOLA, J. A.; ALVAREZ, M.; LUGONES, H. & REBOSOLAN, J. B. — Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.* 24:2-8, 1969.
4. CONVIT, J. & PINARD, M. E. — Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Derm. Inter.* January-March: 17-20, 1969.
5. GUIMARÃES, N. F.; LAGE, H. A.; VENANCIO, J. A. & GRYMBERG, 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.
6. TRUONG, T.; AMBROISE-THOMAS, P.; QUILICI, M.; DUNAN, S. & RANQUE, J. — Diagnostic serologique des leishmanioses par immunofluorescence sur coupes de foies ou de rates de hamsters infestés avec *Leishmania donovani*. *Bull. Soc. Path. Exot.* 62: 1077-1024, 1969.
7. WALTON, B. C. — The indirect fluorescent antibody test for evaluation of effectiveness of chemotherapy in American leishmaniasis. *Second International Congress of Parasitology. Colloquium in immunodiagnosis* — Washington, D.C., 1970.
8. WAUGH, A. E. — *Elements of Statistical Methods*. 3rd Edition. New York, McGRAW-HILL, 1952.

Recebido para publicação em 12/12/1972.