

PESQUISA DE ANTICORPOS CIRCULANTES PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Achiléa L. BITTENCOURT⁽¹⁾, Altina SODRÉ⁽²⁾ e Zilton A. ANDRADE⁽³⁾

RESUMO

Anticorpos circulantes contra leishmânias foram demonstrados nos soros de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa pela técnica da imunofluorescência. Estes anticorpos diminuem ou desaparecem com a cura da doença ao contrário da reação de Montenegro que tende a ficar indefinidamente positiva. Desta maneira a identificação dos anticorpos tem utilidade como teste de cura ou como demonstração de atividade das lesões, além de importância diagnóstica. Os anticorpos também foram verificados nos soros de portadores de leishmaniose difusa, uma doença até então, considerada como sendo de tipo anérgico.

Reações falso negativas não foram observadas e as reações cruzadas foram poucas, sendo a mais importante a que aparece em portadores de calazar.

INTRODUÇÃO

Quando as leishmânias não podem ser evidenciadas nas lesões da leishmaniose cutâneo-mucosa, seja pelo exame direto ou nas secções histológicas, o diagnóstico específico fica na dependência da reação de Montenegro. E apesar da grande sensibilidade desta reação existem casos em que a mesma é negativa e, além disto, pode dar resultados positivos em indivíduos normais, habitantes de zonas endêmicas e pode permanecer positiva após a cura^{1, 7, 8}.

A maior parte dos doentes vêm de zonas rurais, já submetidos a tratamento inadequado e com longa evolução de doença. Por isto mesmo, não apresentam mais leishmânias ao exame direto e, apenas, raramente nos cortes histológicos. Quando acresce o fato da reação de Montenegro ser negativa

ou duvidosa torna-se difícil o diagnóstico, restando apenas fazer a prova terapêutica.

Por tais razões sente-se a necessidade de investigar novos métodos que por si só contribuam com elementos mais precisos para o diagnóstico.

Resolvemos, por este motivo, estudar no presente trabalho o valor diagnóstico da pesquisa de anticorpos circulantes no soro de portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa, pela técnica da imunofluorescência e, ao lado disto, procuramos verificar o comportamento desses anticorpos após o tratamento específico da doença. Apesar desta técnica ter sido empregada para o diagnóstico de outras parasitoses incluindo mesmo alguns poucos casos de leishmaniose, o valor desta reação ainda não está bem estabelecido^{3, 6, 9, 10, 11}.

Trabalho realizado na Clínica Dermatológica da Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia (Prof. Newton A. Guimarães) e no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Prof. Edgard Santos, com o auxílio da Fundação para o Desenvolvimento da Ciência na Bahia

- (1) Anátomo-patologista da Clínica Dermatológica da Faculdade de Medicina Federal da Bahia. Anátomo-patologista da Maternidade Tsyla Balbino, do Estado da Bahia, Brasil
- (2) Imunologista da Fundação Gonçalo Muniz
- (3) Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Prof. Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brasil

Estendemos também a nossa investigação à pesquisa de anticorpos circulantes em soros de pacientes portadores de leishmaniose difusa, parasitose cuja etiopatogenia não está esclarecida e para a qual levantam-se as hipóteses de que seja uma forma anérgica de leishmaniose tegumentar cutâneo-mucosa ou de que seja produzida por uma outra variedade de leishmânia, a *L. braziliensis pifanoi*^{4, 5}.

São poucos os trabalhos referentes ao emprego da técnica da imunofluorescência para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Em 1963, ODDO & CASCIO (*in* 3) trabalhando com soros de leishmaniose cutânea e visceral no Mediterrâneo obtiveram resultados positivos usando como antígeno leptômonas de *L. donovani* e observaram que o nível de anticorpos é muito inferior na leishmaniose cutânea quando comparado com a leishmaniose visceral.

SHAW & VOLLER¹⁰ um ano depois não conseguiram corar formas leishmânia de *L. braziliensis* (raça panamenha) com o soro de paciente portador de leishmaniose tegumentar da mesma variedade. No mesmo ano, DUXBURY & SADUN⁶ estudando anticorpos circulantes no calazar encontraram reações cruzadas com soros de pacientes portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa. De trinta e um soros, sete deram resultados fortemente positivos e cinco fracamente positivos. Em 1965 CONVIT & KERDEL-VEGAS⁵ pesquisaram anticorpos circulantes em soros de portadores de leishmaniose difusa e cutâneo-mucosa usando como antígeno formas leishmânia de *L. braziliensis pifanoi*, de *L. tropica* e de *L. donovani*. Encontraram resultados positivos apenas com os soros de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, os quais apresentavam reação de Montenegro positiva.

BRAY & LAWSON³ neste mesmo ano fizeram estudo comparativo da capacidade antigênica de formas de cultura de diversos tipos de leishmânias, corando-as com soros humanos de várias formas de leishmaniose, inclusive com sete soros de leishmaniose cutâneo-mucosa e dois soros de leishmaniose difusa, os quais deram resultados positivos. Considerando os resultados obtidos por CONVIT & KERDEL-VEGAS⁵, BRAY & LAWSON³ tentaram explicar a positividade dos casos de

leishmaniose difusa de duas maneiras: 1) seus pacientes poderiam ser portadores de uma tripanosomíase; 2) as leishmânias mortas pelo tratamento específico feito aos seus pacientes poderiam ter incitado uma resposta imunitária, a qual não ocorreria se as leishmânias estivessem vivas.

Os trabalhos sobre o emprego da técnica de imunofluorescência na leishmaniose cutâneo-mucosa são ainda escassos e de resultados discordantes, mas pela sua importância prática merecem ser ampliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos soros de 29 pacientes com leishmaniose tegumentar cutâneo-mucosa, soros de três pacientes com leishmaniose difusa e, como controle, quarenta e dois soros provenientes de indivíduos normais e de portadores de outras doenças. Os portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa foram submetidos a reação de Montenegro, biopsia e a tratamento específico cujos resultados forneceram elementos para o diagnóstico.

Incluimos ainda seis soros de portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa, já tratados.

Os casos de leishmaniose difusa apresentavam evolução de vinte a vinte e cinco anos. Tinham reação de Montenegro negativa e numerosíssimas lesões distribuídas por todo o tegumento, riquíssimas em leishmânias. Estudamos diversas amostras de soro destes pacientes, obtidas em épocas diferentes, antes e depois do uso de tratamento específico para leishmaniose tegumentar. Estes pacientes não obtiveram cura com o tratamento, observando-se apenas desaparecimento temporário das lesões.

Antes de escolhermos o antígeno que deveríamos usar neste trabalho resolvemos fazer uma avaliação da capacidade antigênica das formas leptômonas da *L. braziliensis*, da *L. braziliensis pifanoi* e das formas leishmânias da *L. donovani*. Como tôdas estas formas coraram-se bem e com igual intensidade, tanto com soro de leishmaniose difusa como de leishmaniose cutâneo-mucosa, resolvemos usar apenas as formas leptômonas da *L. braziliensis pifanoi*, as quais nos eram de mais fácil obtenção.

TABELA I
Dados gerais sobre casos de Leishmaniose cutâneo-mucosa nos quais foram feitas pesquisas de anticorpos circulantes

Nome	Idade	Forma clínica	Tempo de evolução	Tratamento	Reação de Montenegro	Anticorpos circulantes	Doenças associadas	MACHADO GUERREIRO
1 — E.R.J.	25	C.M.	8 anos	Insuficiente	+	++	—	—
2 — S.J.O.	59	C.M.	—	Insuficiente	+	++	—	—
3 — S.S.	45	M.	2 anos	Nenhum	+	++	—	—
4 — L.B.	45	M.	+10 anos	Nenhum	+	++	—	—
5 — E.B.O.	21	C.	7 meses	Nenhum	+	++	—	—
6 — V.X.R.	25	C.M.	6 meses	Nenhum	+	++	Sifilis, Blastomicrose	Levemente Reagente
7 — A.C.	70	C.	6 meses	Nenhum	+	++	—	Não reagente
8 — M.P.A.	45	C.M.	1 ano	Insuficiente	+	++	—	Não reagente
9 — M.S.A.	14	C.M.	5 anos	Insuficiente	+	++	Tuberculose pulmonar	Não reagente
10 — D.A.D.	63	M.	2 anos	Nenhum	+	++	Tuberculose pulmonar	Não reagente
11 — H.C.S.	20	C.	1 ano	Insuficiente	..	++	Sifilis	Reagente
12 — I.N.C.	15	C.	2 anos	Insuficiente	..	++	Sifilis	Não reagente
13 — M.S.L.	65	C.M.	12 anos	Nenhum	..	++	—	Não reagente
14 — G.S.	28	C.	5 meses	Insuficiente	..	++	—	Reagente
15 — L.R.S.	34	C.M.	10 anos	Insuficiente	..	++	—	Não reagente
16 — R.G.L.	32	C.M.	—	—	..	++	—	Levemente Reagente
17 — M.P.R.	60	M.	14 anos	Nenhum	..	++	—	Não reagente
18 — M.L.S.	17	C.M.	10 anos	Insuficiente	..	++	—	Não reagente
19 — M.J.S.	60	C.	3 anos	Insuficiente	++	++	—	Não reagente
20 — E.P.L.	29	C.	2 meses	Nenhum	+	++	—	Não reagente
21 — J.S.	52	C.M.	3 anos	Nenhum	++	++	Sifilis	Levemente Reagente
22 — D.M.C.	56	C.M.	1 ano	Nenhum	++	++	—	Não reagente
23 — E.D.S.	25	C.	4 meses	Nenhum	++	++	—	Não reagente
24 — J.B.S.	58	C.M.	4 anos	Nenhum	++	++	—	Não reagente
25 — F.S.	41	C.M.	3 anos	Nenhum	++	++	—	Não reagente
26 — J.S.	14	C.	2 meses	Nenhum	..	++	—	Reagente
27 — M.P.S.	47	C.M.	2 anos	Insuficiente	++	++	—	Não reagente
28 — V.J.	6	C.	1 ano	Nenhum	++	++	—	Não reagente
29 — M.J.S.	27	C.	6 meses	Insuficiente	++	++	—	Não reagente

C.M. = Cutâneo-mucosa

M. = Mucosa

Anticorpos-circulantes: 4+ fortemente positiva
3+ moderadamente positiva
2+ fracamente positiva
1+ duvidosa

Usaram-se como antígeno formas leptômonas de *L. braziliensis pifanoi* obtidas em meio de cultura N.N.N. que foram coradas pela técnica indireta de imunofluorescência¹².

Técnica — Foi retirada do meio de cultura uma suspensão de leptômonas a qual foi lavada duas vezes em salina tamponada. Desprezou-se o sobrenadante e fez-se uma suspensão usando 1 ml de salina. No centro de uma lâmina bem limpa marcou-se um quadrado com 1 cm de lado e sobre ele colocaram-se duas gotas da suspensão. Deixou-se secar à temperatura ambiente. Sobre as lâminas bem secas puzeram-se duas gotas do soro a estudar e deixou-se 1 hora em ambiente úmido, para as lâminas não secarem. As lâminas foram depois lavadas três vezes em salina tamponada durando cada lavagem cinco minutos. Posteriormente colocou-se antigamaglobulina humana marcada * previamente adsorvida com pó de fígado de porco e deixou-se durante uma hora tendo cuidado para que as lâminas não secassem. Em seguida voltou-se a lavar por três vezes em salina, cada lavagem de cinco minutos. Montaram-se as lâminas com glicerina tamponada pH 7,2. Foram examinadas em microscópio "Zeiss", com luz ultravioleta fornecida por lâmpada de vapor de mercúrio HBO-200, Osram, utilizando-se dois filtros excitadores BG12 e filtros protetores OG5. Os resultados foram classificados de 1 a 4 cruzes, de acordo com a intensidade da fluorescência esverdeada. Foram consideradas negativas as lâminas que não mostravam fluorescência, as reações positivas foram arbitrariamente consideradas como 4+, 3+ e 2+ de acordo com a sua intensidade e 1+ quando duvidosa, tal como anteriormente feito por WILLIAMS & col.¹³.

RESULTADOS

Dos vinte e nove soros de leishmaniose tegumentar, forma cutâneo-mucosa, encontramos 15 resultados fortemente positivos (4+), 13 positivos (3+) e apenas um fracamente positivo (2+). Reações cruzadas fortemente positivas (4+) encontraram-se em dois casos de calazar; positivas (3+) em um caso de lupus eritematoso difuso e em um filho de

paciente chagásica aparentemente normal; fracamente positiva (2+) em um caso de blastomicose sul-americana, um caso de doença de Chagas, um de úlcera tropical, um de tuberculose e um de lupus eritematoso difuso, e reações duvidosas em um de blastomicose sul-americana, dois de tuberculose, um de lupus eritematoso fixo e em um filho de chagásica aparentemente normal. Nos pacientes curados o resultado foi duvidoso ou negativo. Mesmo nos pacientes que anteriormente tinham reação fortemente positiva (4+) esta tornou-se duvidosa ou negativa.

Os doentes de leishmaniose difusa tiveram reação que oscilou entre positiva (3+) e fortemente positiva (4+). Não houve relação entre essa oscilação e o tratamento específico.

DISCUSSÃO

De nossas observações conclui-se que a pesquisa de anticorpos circulantes, pelo método indireto de imunofluorescência, mostra-se de real valor no diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Esta reação diminui, tornando-se mesmo negativa com a cura, podendo assim funcionar como controle terapêutico, o que não acontece com o teste de Montenegro, que, como indicado, pode perdurar indefinidamente positivo.

Encontramos reações cruzadas positivas 3+ e fortemente positivas 4+ apenas com o calazar, lupus eritematoso e com o soro de uma criança aparentemente normal, filha de chagásica.

Reações cruzadas com o calazar já tinham sido observadas⁶ e deverão ocorrer logicamente entre todas as variedades de leishmânias. SADUN & col.⁹ referem que as reações cruzadas entre os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são bem menos intensas que entre as diversas espécies de tripanosoma. Encontramos reações cruzadas 2+ com doença de Chagas. Estranhamos a positividade 3+ do soro de um filho de chagásica de 5 anos de idade, normal clínica e laboratorialmente. Como encontramos reações negativas em outros filhos de chagásicas igualmente normais não sabemos explicar o porquê da positividade

* Obtida comercialmente do Baltimore Biological Laboratory

de neste caso. Como em nosso meio a doença de Chagas é endêmica fizemos, para melhor avaliar a eficiência deste método, reação de Machado Guerreiro na maioria dos soros. A reação de Machado Guerreiro foi reagente em três casos e levemente reagente em outros três casos donde se conclui que a positividade dos nossos casos não foi devida a reações cruzadas com doença de Chagas.

Acreditamos que as duas reações cruzadas observadas com lupus eritematoso difuso se-

jam devidas à existência de auto-anticorpos anti-núcleo nestes soros. DUXBURY & col.⁶ encontraram reações cruzadas apenas em um dos oito casos de lupus que incluem no seu estudo sobre calazar. Estes Autores, no entanto, não referem qual a forma de lupus eritematoso dos seus casos.

Outras reações cruzadas fracamente positivas 2+ foram observadas com um caso de tuberculose, um de úlcera tropical e outro de blastomicose sul-americana. Este último apresentava reação de Machado Guerreiro positiva. Esta positividade pode ter sido devida a reação cruzada com doença de Chagas.

Não nos pareceu haver relação entre o nível de anticorpos circulantes e a forma clínica da doença, o tempo de evolução e a intensidade da reação de Montenegro.

Encontramos leishmânias em apenas um dos vinte casos de leishmaniose cutâneo-mucosa que foram biopsiados.

A presença de anticorpos circulantes na leishmaniose difusa confirma que esta não é uma forma anérgica de leishmaniose. Igualmente os aspectos imunopatológicos desta parasitose evidenciam uma resposta imunocelular, muito embora esta seja mais fraca que a encontrada na leishmaniose cutâneo-muco-

TABELA II

Casos de contróle utilizados para pesquisa de anticorpos circulantes na leishmaniose cutâneo-mucosa, cujos resultados foram negativos

Sífilis	4 casos
Tuberculose	4 casos
Esporotricose	1 caso
Úlcera tropical	7 casos
Piodermite vegetante	1 caso
Psoríase	1 caso
Toxoplasmose	1 caso
Brucelose	1 caso
Tricofitose verrucosa	1 caso
Individuos normais	6 casos

TABELA III

Pesquisa de anticorpos circulantes em pacientes submetidos a tratamento específico

Nome	Forma clínica	Reação de Montenegro	Evolução	Anticorpos circulantes
A.C.	C.	++	Antes com (++++) anticorpos circulantes. Curada há 1 ano.	Negativo
J.S.	C.M.	++	Antes com (++++) anticorpos circulantes. Após 3 meses trat. (720 ml Glucantime)	Duvidoso
G.M.S.	C.M.	++++	Após 6 meses tratamento (1.000 ml Glucantime)	Negativo
J.G.S.	M.	+++	Curado há 10 anos	Duvidoso
O.C.B.	C.M.	+	Curado há 4 anos	Duvidoso
B.R.	C.M.	++	Curado há 10 anos	Duvidoso

C. = Cutânea

C.M. = Cutâneo-mucosa

sa². Observações idênticas às nossas foram feitas por BRAY & LAWSON³. Estes Autores tentaram explicar o aparecimento de anticorpos circulantes nos seus casos de leishmaniose difusa pela destruição das leishmânias com o tratamento ou pela possibilidade de uma associação com uma tripanosomíase. Em nossos casos foi possível afastar estas duas possibilidades, podendo-se concluir que os anticorpos circulantes encontrados foram produzidos como resposta imunitária à presença de *L. braziliensis pijanoi*.

SUMMARY

Detection of circulating antibodies in tegumentary leishmaniasis, by the immunofluorescence technique

Circulating antibodies against leishmania were detected in the sera of patients with muco-cutaneous leishmaniasis by means of the immuno-fluorescence technique. Such antibodies decrease or even disappear after the cure of the disease, unlike the Montenegro's test which tends to remain indefinitely positive. Therefore, its demonstration can be useful both as a diagnostic test and as a criterion for cure. In the sera of patients with the diffuse form of leishmaniasis, a form which has been thought hitherto to be an anergic one, circulating antibodies were also demonstrated.

False negative reactions were absent and cross reactions were occasionally observed, being most intense in the sera of Kala-Azar patients.

AGRADECIMENTOS

As culturas de leishmânia utilizadas neste trabalho foram obtidas pelos Drs. José Lopes e Antuza A. Silva, aos quais agradecemos a valiosa colaboração.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BITTENCOURT, A. L. & ANDRADE, Z. A. — Aspectos imunopatológicos na leishmaniose cutâneo-mucosa. *Hospital* (Rio) 71: 975-984, 1967.

2. BITTENCOURT, A. L. & GUIMARÃES, N. A. — Imunopatologia da leishmaniose tegumentar difusa. (A ser publicado em *Medicina Cutânea*).
3. BRAY, R. S. & LAWSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I — The fluorescent antibody staining technique. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59:534-544, 1965.
4. CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F. & GORDON, B. — Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. *Brit. J. Derm.* 74:132-135, 1962.
5. CONVIT, J. & KERDEL-VEGAS, F. — Disseminated cutaneous leishmaniasis. *Arch. Derm.* 91:439-447, 1965.
6. DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 13:525-529, 1964.
7. PESSÓA, S. B. & BARRETTO, M. P. — *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro, Ministério da Educação e Saúde, 1944, págs. 356 e 352.
8. PESSÓA, S. B. & LOPES, J. A. S. — Sobre a intradermorreação de Montenegro em região endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:170-175, 1963.
9. SADUN, E. H.; DUXBURY, R. E.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. *J. Parasit.* 49:385-388, 1963.
10. SHAW, J. J. & VOLLER, A. — The detection of circulating antibody to Kalazar by means of immunofluorescent techniques. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58:349-352, 1964.
11. VOLLER, A. — Immunofluorescent observations on *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 57:232, 1963.
12. WELLER, T. H. & COONS, A. H. — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and Herpes Zoster propagated *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
13. WILLIAMS, J. S.; DUXBURY, R. E.; ANDERSON, R. I. & SADUN, E. H. — Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodiense* and *T. gambiense* in experimental animals. *J. Parasit.* 49:380-384, 1963.

Recebido para publicação em 22/1/1968.