

## DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS E REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEO-MUCOSA

Lucyr Jones ANTUNES, Ataulpa Pereira dos REIS, Carlos Alberto Pereira TAVARES e J. PELLEGRINO

### RESUMO

Determinou-se o nível de imunoglobulinas pela técnica de imunodifusão reversa em 34 pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa obtendo-se os seguintes resultados: IgG  $1.512 \pm 295$  mg/100 ml, IgA  $321 \pm 58$  mg/100 ml e IgM  $81 \pm 14$  mg/100 ml. Estes dados mostram um aumento de IgA em relação aos achados obtidos em indivíduos normais. Foi feita, também, a reação de hemaglutinação passiva com antígeno polissacarídico, extraído de *Leishmania braziliensis*, em pacientes com leishmaniose tegumentar, esquistossomose mansônica e doença de Chagas. A reação foi positiva em 91% dos pacientes com leishmaniose havendo, entretanto, reações cruzadas em soros de pacientes com doença de Chagas e esquistossomose até diluições de 1:80 e 1:40, respectivamente. O achado de títulos hemaglutinantes iguais ou inferiores a 1:80, em indivíduos residentes em áreas onde existem outras parasitoses, não credencia o emprêgo da reação de hemaglutinação como prova sorológica de diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

Embora o diagnóstico imunológico da leishmaniose tegumentar, por meio do teste intradérmico, tenha sido introduzido por MONTE-NEGRO<sup>7</sup> desde 1926, pouco se conhece sobre os processos imunológicos relacionados com esta parasitose. Sabe-se que a resposta cutânea representa uma manifestação imunológica do tipo celular, que pode aparecer precocemente no decurso da infecção e que persiste, em geral, por toda a vida do paciente<sup>8</sup>. A presença de anticorpos circulantes foi demonstrada por WALTON<sup>8</sup>, utilizando o teste de imunofluorescência indireta.

No presente trabalho foram determinados os níveis de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) no soro de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, bem como foi feita a reação de hemaglutinação passiva nos mesmos indivíduos e em pacientes com infecção pelo *Schistosoma mansoni* e pelo *Trypanosoma cruzi*.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Soros** — Foram utilizados soros de indivíduos agrupados da seguinte maneira:

**Grupo A:** Leishmaniose cutâneo-mucosa (dosagem de imunoglobulinas e hemaglutinação passiva). Foram usados soros de 34 pacientes. Todos apresentavam parasitas ao exame microscópico das lesões.

**Grupo B:** Doença de Chagas (hemaglutinação passiva). A reação foi feita no soro de 10 pacientes com diagnóstico clínico e reação de fixação do complemento (RFC) positiva para doença de Chagas. Estes pacientes procediam de áreas onde a leishmaniose não é endêmica.

**Grupo C:** Esquistossomose mansônica (hemaglutinação passiva). Foram utilizados soros de 10 pacientes com exame de fezes positivo para *S. mansoni* e RFC negativa para doença de Chagas.

**Grupo D:** Contrôles normal (hemaglutinação passiva). Foram incluídos soros de 20 indivíduos adultos procedentes de áreas não endêmicas para leishmaniose e com RFC negativa para esquistossomose e doença de Chagas.

Os dados referentes à dosagem de imunoglobulinas foram retirados de trabalho anteriormente publicado<sup>1</sup>.

**Dosagem de imunoglobulinas nos soros** — Foi feita a determinação quantitativa de IgG, IgM e IgA nos pacientes do Grupo A adotando-se, para isso, a técnica de imunodifusão reversa descrita por ANTUNES & col.<sup>1</sup>.

**Antígeno** — Foi usado antígeno de *Leishmania braziliensis* preparado segundo a técnica descrita por FURTADO & PELLEGRINO<sup>5</sup>, baseada no método de FULLER<sup>4</sup> para a extração de polissacarídes pela formamida. Para a sensibilização das hemácias, o antígeno foi usado na concentração de 142 µg/ml, dosado pelo reagente de antrona<sup>6</sup>.

**Hemaglutinação passiva** — Foram usadas hemácias humanas O Rh negativas, lavadas três vezes com NaCl 0,15M. Após a última centrifugação, 0,2 ml da "papa" de hemácias foram misturados com 0,3 ml do antígeno e a mistura deixada em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as hemácias foram lavadas três vezes com solução salina tamponada (0,1M, pH 7,1) e ressuspensas de modo a se ter uma concentração final de 2,5%. Os soros a serem examinados foram inativados a 56°C durante 30 minutos e depois diluídos em salina 0,15M a 1:10, 1:20, 1:40 até 1:5120 em um voiu-

me de 0,5 ml. À cada diluição foi adicionada uma gota (0,05 ml) da suspensão de hemácias. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso à temperatura ambiente, durante 2 horas. A leitura da hemaglutinação foi feita após centrifugação (1.500 rpm durante 2 minutos), anotando-se o tubo cuja maior diluição apresentava grumos de hemácias visíveis a olho nú (título hemaglutinante), após ligeira agitação.

## RESULTADOS

Os valores médios das imunoglobulinas (Quadro I) nos indivíduos com leishmaniose cutâneo-mucosa foram os seguintes: IgG 1.512 ± 295 mg/100 ml, IgM 81 ± 14 mg/100 ml e IgA 321 ± 58 mg/100 ml.

A Fig. 1 mostra os títulos de anticorpos dosados pela hemaglutinação passiva nos pacientes dos diferentes grupos.

Nos pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa a reação de hemaglutinação foi positiva em 91% dos casos sendo que em mais de 50% os títulos hemaglutinantes foram iguais ou superiores a 1:160.

Nos chagásicos crônicos, somente em um caso a reação foi negativa; em 9 foi positiva, sendo que o maior título foi de 1:80 (1 paciente).

A reação de hemaglutinação foi negativa na metade dos indivíduos com esquistossomose mansônica. O maior título neste grupo foi de 1:40 (2 casos).

Em todos os indivíduos controles a reação de hemaglutinação passiva foi negativa.

## QUADRO I

Dosagem de imunoglobulinas (concentração em mg/100 ml e desvio padrão)

Grupos de indivíduos	IgG	IgA	IgM
Leishmaniose cutâneo-mucosa	1.512 ± 295	321 ± 58	81 ± 14
Contrôle normal *	1.437 ± 224	222 ± 93	89 ± 16

\* Dados de ANTUNES & col.<sup>1</sup>

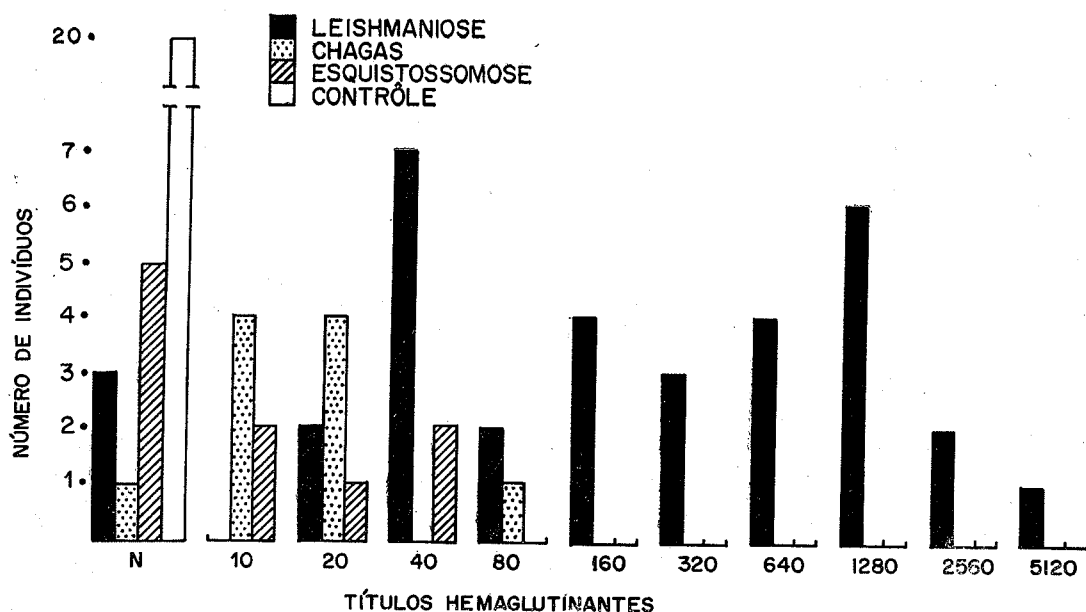


Fig. 1 — Títulos hemaglutinantes (recíproca das diluições) em pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, doença de Chagas, esquistossomose mansônica e em indivíduos normais. Os dados agrupados em "N" representam as reações negativas. Empregou-se como antígeno uma fração polissacarídica extraída de *Leishmania braziliensis*.

#### DISCUSSÃO

A dosagem das classes de imunoglobulinas no sêro de pacientes com endemias tropicais tem importância a fim de se verificar as imunoglobulinas cuja produção possa ser estimulada pelos antígenos dos diferentes parasitas.

As dosagens de imunoglobulinas, realizadas no sêro de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, mostraram um aumento acentuado de IgA, a passo que os valores de IgG e IgM não foram diferentes daqueles observados no grupo contrôles. É interessante notar que BULLOCH & col.<sup>2</sup> também encontraram nível elevado de IgA no sêro de pacientes com lepra lepromatosa e lepra tuberculóide.

A presença de níveis elevados de IgA no sêro de pacientes com leishmaniose e lepra poderia ser interpretada como uma indicação de que esta classe de imunoglobulina é produzida nas regiões vizinhas à infecção, com a finalidade de exercer sua atividade biológica nas áreas atingidas.

A purificação de antígenos de parasitas tem por finalidade o preparo de substâncias específicas para serem utilizadas nas diversas reações sorológicas de diagnóstico. Na leishmaniose cutâneo-mucosa, FURTADO & PELLEGRINO<sup>5</sup> utilizaram, com êxito, um antígeno polissacarídico para a reação intradérmica.

A reação de hemaglutinação passiva, feita em soros de 34 pacientes com leishmaniose, mostrou 91% de reações positivas sendo que em mais de 50% estas foram positivas em diluições iguais ou superiores a 1:160.

Foram encontradas, também, reações positivas em pacientes portadores de doença de Chagas e de esquistossomose, porém os títulos dos anticorpos presentes nunca foram superiores a 1:80 e 1:40, respectivamente. Assim, o teste de hemaglutinação passiva mostrou reações cruzadas na doença de Chagas e na esquistossomose, embora em títulos baixos. A 1:160 ou acima a reação foi positiva só nos pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa. É interessante salientar que nos indivíduos normais a reação foi sempre negati-

va. O achado de títulos hemaglutinantes iguais ou inferiores a 1:80, em indivíduos residentes em áreas onde existam outras parasitoses, não credencia o emprêgo da reação de hemaglutinação como prova sorológica de diagnóstico.

#### SUMMARY

#### *Quantitation of immunoglobulins and passive hemagglutination test in patients with cutaneous leishmaniasis*

The reverse immunodiffusion technique was used for the determination of immunoglobulin levels in the sera of patients with cutaneous leishmaniasis. The average numbers obtained from 34 serum samples were as follows: IgG  $1,512 \pm 295$  mg/100 ml, IgA  $321 \pm 58$  mg/100 ml and IgM  $81 \pm 14$  mg/100 ml, which shows an increase of IgA as compared with the figures obtained in normal subjects.

The passive hemagglutination test was performed in sera from patients with cutaneous leishmaniasis, Chagas Disease and schistosomiasis mansoni, using a polysaccharide fraction isolated from *Leishmania braziliensis* as antigen. Sera from normal individuals were used as control. The test was positive in 91% of the patients with leishmaniasis. Cross reactions were observed in cases of Chagas Disease and schistosomiasis mansoni reaching titers of 1:80 and 1:40, respectively.

Unless high titers are obtained (above 1:80), this test has no diagnostic value for cutaneous leishmaniasis in areas where other parasitic diseases are endemic.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; TAVARES, C. A. & KATZ, N. — Immunoglobulins in human schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* 57:539-542, 1971.
2. BULLOCH JR., W. E.; HOM, F. & CHEN, M. L. — Studies of immune mechanism in leprosy. II — Quantitative relationships of IgG, IgA, and IgM immunoglobulins. *J. Lab. Clin. Med.* 75:863-870, 1970.
3. CAHILL, K. M. — Immunodiagnosis of the leishmaniasis by the intradermal skin test. Cf. Colloquium on Immunodiagnosis. Washington, D.C. pp. 1-6. *J. Parasitol.* 56 (Sect. II):407, 1970.
4. FULLER, A. T. — The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. *Brit. J. Exp. Path.* 19:130-139, 1938.
5. FURTADO, T. A. & PELLEGRINO, J. — Intradermal test in American Leishmaniasis with a polysaccharide fraction isolated from *Leishmania braziliensis*. *J. Invest. Dermat.* 27:53-59, 1956.
6. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. — *Experimental Immunochemistry*. Second Ed. Carbohydrate estimation, p. 528, 1961. Springfield, Charles C. Thomas, 1961.
7. MONTENEGRO, J. — Cutaneous reaction in Leishmaniasis. *Arch. Derm. Syph.* 13:187-194, 1926.
8. WALTON, B. C. — The indirect fluorescent antibody test for evaluation of effectiveness of chemotherapy in American leishmaniasis. *J. Parasitol.* 56:480-481, 1970.

Recebido para publicação em 17/9/1971.