

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO ACOMPANHAMENTO DA TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

WILSON JACINTO SILVA DE SOUZA
SERGIO GOMES COUTINHO
MAURO CELIO DE ALMEIDA MARZOCHI
LUCIANO MEDEIROS DE TOLEDO
MARINA VENTURA GOTTLIEB

*Foram estudados 17 indivíduos cujas idades variaram de 2 a 78 anos, procedentes da área endêmica de Jacarepaguá (RJ), com diagnóstico clínico, epidemiológico, imunológico e parasitológico de leishmaniose tegumentar americana. Todos foram tratados pelo antimonialto de N-metilglucamina na dose de 60 mg/kg/dia em três séries de 10 dias de duração, com 10 dias de intervalo entre cada série e submetidos à coleta de sangue venoso para a reação de imunofluorescência indireta (IF-IgG) antes, durante e após o medicamento. Estes 17 indivíduos foram reatores a intradermorreação de Montenegro (≥ 5 mm) e soro-reagentes ($\geq 1:45$) na IF-IgG, sendo que em 6 deles (31,7%) foi demonstrado ou isolado *Leishmania braziliensis*.*

A positividade da IF-IgG antes do tratamento foi de 76,4% (13 casos com título $\geq 1:90$). As médias geométricas das recíprocas dos títulos antes da primeira série do antimonial (89,9), durante o tratamento (63,6 a 29,3) e 10, 30 e 120 dias após medicação, mostraram uma graduação nitidamente decrescente (14,9; 2,1 e 1,2), respectivamente. Todos tiveram suas lesões cicatrizadas ao final do tratamento sendo maior o número de cicatrizações após a 2ª série.

Somente 120 dias após a terapêutica, foram observados títulos abaixo de 1:45 na quase totalidade dos pacientes (16 casos - 94,1%) sugerindo que, na utilização da IF-IgG como controle de cura, faz-se necessário um acompanhamento sorológico de no mínimo 3 a 4 meses.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta-se com surtos ocasionais de importância relativa no Rio de Janeiro (Salazar & Salgueiro, 1979) sem que se tenha logrado equacionar muitos dos seus aspectos epidemiológicos (Coutinho et al, 1981). Per-

Trabalho subvencionado, em parte, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº 22228-8-118/80.

Instituto Oswaldo Cruz - Caixa Postal 926 - 20000 Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido para publicação em 15 de janeiro e aceito em 1º de março de 1982.

siste ainda em áreas de Jacarepaguá como Pau da Fome, Camorim, Vargem Grande, Vargem Pequena, Guaratiba, etc. entre outras áreas desta região. Por outro lado, têm sido muitas as dificuldades de avaliação do sucesso da terapêutica específica para a LTA (WHO, 1979), assim como o estabelecimento de um prognóstico efetivo, tendo em vista a possibilidade de recrudescência dessa parasitose mesmo após prolongada administração de antimoniais (Walton, 1980).

A reação de imunofluorescência indireta (IF), desde sua proposição por Oddo & Cascio (1963), tem-se mostrado útil no diagnóstico da LTA (Cuba Cuba et al, 1980) devido sua elevada sensibilidade (Marzochi et al, 1980), embora apresentando reações cruzadas com outros tripanosomatídeos agentes de outras leishmanioses e tripanosomíases (Guimarães et al, 1969; Camargo & Rebonato, 1969; Furtado, 1980; Salfelder & Mannweiler, 1981).

Diversos autores têm referido que os anticorpos circulantes na LTA decrescem ou desaparecem após a terapêutica específica, possibilitando a utilização da IF no controle de cura (Bittencourt, Sodré & Andrade, 1968; Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973; Walton, 1980). No entanto, o mesmo parece também ocorrer na vigência de cura espontânea ou infecção assintomática (Marzochi et al, 1980).

A manutenção de sorologia positiva após o tratamento ou mesmo após cura espontânea (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973; Walton, 1980), deve ser atribuída à persistência do parasitismo que poderia levar posteriormente ao comprometimento de mucosas, ou recrudescência das lesões.

Dessa maneira, um teste sorológico como a IF se torna útil no controle de cura e na avaliação da eficácia de drogas e de esquemas terapêuticos ensaiados. Já havia sido demonstrado que soros de indivíduos tratados pelo antimônio pentavalente (N-metilglucamina) tornaram-se não reagentes ou reagentes apenas até a diluição de 1:45 cerca de 25 dias após o tratamento (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973) e cicatrização completa da lesão. Walton (1980) refere entretanto que em apenas 10% dos casos tratados e clinicamente curados os títulos de anticorpos caem a níveis não detectáveis abaixo de 1:8.

No presente trabalho, procurou-se avaliar o comportamento sorológico de casos de LTA, através da IF, realizada antes, durante e até 120 dias depois de completada a terapêutica pelo antimônio de N-metilglucamina.

MATERIAL E MÉTODOS

De 40 indivíduos infectados pela *L. b. braziliensis* diagnosticados e tratados no Rio de Janeiro (Marzochi et al, em publicação), foram selecionados 17 indivíduos procedentes da área endêmica de Jacarepaguá (RJ) que puderam ser acompanhados sorologicamente até um período mínimo de 120 dias, após o término do tratamento.

Desses indivíduos, 10 eram masculinos e 7 femininos sendo que as idades variaram de 2 a 12 anos (5 casos); 13-20 anos (4 casos) e mais de 20 anos (8 casos). Todos apresentavam lesões cutâneas sugestivas de LTA, não complicadas, com tempo de duração variável de 1 a 6 meses.

O tratamento foi realizado através da administração intramuscular do antimônio de N-metilglucamina na dose de 60 mg/kg/dia em três séries de 10 injeções, fazendo-se intervalo de 10 dias entre elas.

As coletas de sangue venoso para reação de IF foram realizadas antes de cada uma das três séries, 10 dias, 30 dias e 120 dias após o final da 3ª série.

Para as reações de IF (Guimarães, Giovannini & Camargo, 1974) nas classes IgG de imunoglobulinas (IF-IgG) foram utilizados conjugados de isotiocinato de fluoresceína Hyland (Travenol Co, E.U.A.) sendo os soros diluídos ao dobro a partir de 1:45, utilizando-se como antígeno formas promastigotas de *L. braziliensis* amostra JOF (Marzochi et al, 1980).

Os resultados obtidos nos seis diferentes períodos de exame sorológico foram comparados através das médias geométricas (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973) das recíprocas dos títulos (MGRT).

RESULTADOS

Os 17 indivíduos foram reatores (≥ 5 mm) à reação intradérmica de Montenegro, utilizando-se como antígeno 40 microgramas de N-proteico/ml. Posteriormente foram submetidos a biópsia, sendo que em 6 casos (31,7%) foi evidenciado ou isolado *Leishmania b. braziliensis* conforme metodologia usada por Herrer, Thatcher & Johnson (1966) e Marzochi et al (em publicação), sendo que as amostras isoladas em meio de McNeal, Novy & Nicolle foram caracterizadas por "isoelectrofocusing" e eletroforese de enzimas em gel de poliacrilamida (Momen, Grimaldi & Soares, 1980).

Dos 17 pacientes com LTA submetidos a IF-IgG antes do tratamento, 13 deles apresentavam títulos $\geq 1:90$, 4 com títulos de 1:45 e nenhum deles soro não reagente até a diluição de 1:45. A sensibilidade da IF-IgG portanto, neste grupo, foi de 76,4%, considerando-se que 13 indivíduos foram reagentes a títulos iguais ou superiores a 1:90.

Todos os 17 pacientes foram considerados clinicamente curados, apresentando cicatrização completa da lesão, antes do final da 3ª série do antimonial. Outros pacientes que ainda não apresentavam lesão cicatrizada até o final da 3ª série não foram incluídos na presente casuística.

Nos diferentes períodos, a MGRT variou de 89,9 antes da medicação a 2,1 e 1,2, respectivamente, 30 dias e 120 dias após o término do tratamento, com nítida tendência a

TABELA I

Acompanhamento pela IF-IgG, de 17 indivíduos da área de Jacarepaguá (RJ), portadores de LTA, antes, durante e após tratamento efetuado pelo antimoniato de N-metilglucamina*

(Dia) Período de exame	Recíproca dos títulos de anticorpos na IF-IgG					MGRT
	NR	45	90	180	360	
(0) Antes da 1ª série	—	4	9	4	—	89,9
(20) Antes da 2ª série	1	6	7	2	1	63,6
(40) Antes da 3ª série	3	9	4	1	—	29,3
(60) 10 dias após a 3ª série	6	5	6	—	—	14,9
(90) 30 dias após a 3ª série	14	1	2	—	—	2,1
(170) 120 dias após a 3ª série	16	1	—	—	—	1,2

*Dose de 60 mg/kg/dia durante 10 dias, com intervalo de 10 dias entre cada série.

NR — Soro não reagente até a diluição 1:45.

MGRT — Média geométrica da recíproca dos títulos de anticorpos.

tornarem-se soro não reagentes (16 casos – 94,1%) ou reagentes apenas na diluição 1:45 (1 caso – 5,9%), 120 dias após o medicamento (Tabela I).

O comportamento dos títulos dos soros, durante o tratamento, apresentou algumas variações, tais como: ascensão inicial dos títulos logo no início do antimonial com posterior queda abaixo de 1:45; queda progressiva até abaixo de 1:45 ou queda brusca com manutenção de título 1:45 (Fig. 1).

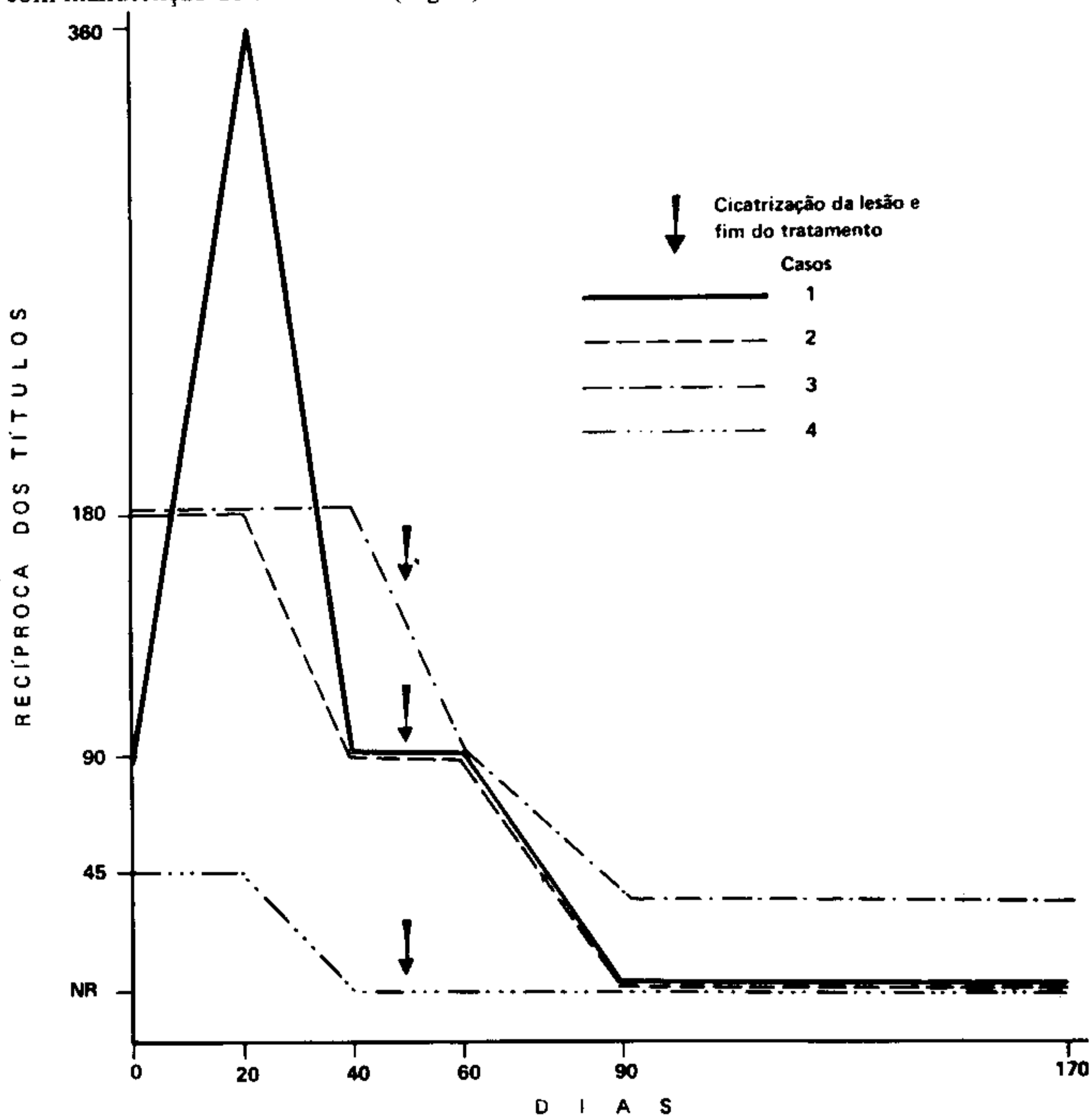


Fig. 1 – Comportamento da IF-IgG em soros de quatro casos de LTA, antes, durante e após três séries do antimoniato de N-metilglucamina.

Níveis de anticorpos inferiores a 1:45 só foram evidenciados a partir do trigésimo dia após o fim da terceira série do antimonial, uma vez que ainda neste período 2 dos 17 soros apresentavam títulos iguais a 1:90.

DISCUSSÃO

Tem sido referido que na leishmaniose tegumentar americana, sem comprometimento de mucosa, com lesão única, com tempo de duração da doença variável de 1 a 12

meses e sob a forma papulosa, é freqüente o encontro de indivíduos não reagentes à imunofluorescência indireta (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973).

Entretanto, os 17 casos presentemente acompanhados, com menos de 6 meses de duração da lesão cutânea, apesar de apresentarem títulos baixos, todos foram soro reagentes, sendo 13 deles (76,4%) reagentes à diluição $\geq 1:90$, antes do tratamento.

Durante o tratamento, no entanto, os níveis de anticorpos tenderam a baixar com a cura clínica das lesões sendo que 16 casos (94,1%) mostraram-se soro não reagentes até a diluição 1:45 e somente 1 caso (5,9%) foi soro-reagente a esta diluição, quatro meses após o término do tratamento. Bittencourt, Sodré & Andrade, 1968; Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973 já haviam relatado, anteriormente, esta tendência à queda dos títulos de anticorpos após a cura das lesões. Walton (1980), entretanto, verificou queda a níveis inferiores a 1:8 em apenas 10% dos casos, e com maior freqüência entre os indivíduos que apresentaram níveis intermediários de anticorpos antes do tratamento.

Contudo, num período imediatamente após o tratamento apenas 6 casos (35,2%) eram soro não reagentes até a diluição 1:45 e 30 dias após o medicamento 14 casos (82,3%) passaram a esse título. Esta observação sugere que uma avaliação sorológica de controle de cura somente terá valor se realizada 3 a 4 meses após o fim da terapêutica (Tabela I). Por outro lado, indivíduos que tendessem à manutenção de títulos elevados além desse período, estariam sujeitos ao desenvolvimento da forma mucosa ou recrudescente mais tardiamente (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973; WHO, 1979) justificada pela persistência de parasitos residuais no organismo (Walton, 1980).

Chiari, Mayrink & Magalhães (1973) observaram que 25,8% dos seus pacientes tiveram um aumento de títulos de anticorpos precedendo à cicatrização da lesão inicial enquanto que agora foi observado o mesmo fenômeno em 17% dos casos (caso 1, Fig. 1). Na maioria dos casos os níveis de anticorpos tenderam a não reagentes (caso 2, Fig. 1). Em um caso somente, houve queda acentuada dos títulos com manutenção ao nível de 1:45 (caso 3, Fig. 1). No entanto, pacientes com níveis iniciais de 1:45 tornaram-se não reagentes precocemente, durante o tratamento (caso 4, Fig. 1).

A IF-IgG, além da sua importância no diagnóstico da LTA (Bittencourt, Sodré & Andrade, 1968; Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973; Marzochi et al, em publicação) e em inquéritos epidemiológicos (Camargo & Rebonato, 1969; Marzochi et al, 1980) pode perfeitamente ser utilizada no controle de cura de indivíduos tratados por novas drogas (Chiari, Mayrink & Magalhães, 1973; WHO, 1979), porém o risco de recrudescência seria de 53,8% nos pacientes sem modificações dos títulos após tratamento da LTA (Walton, 1980).

Cuba Cuba et al (1980) empregando simultaneamente a IF e a aglutinação direta verificaram uma melhoria no imunodiagnóstico da LTA (86,9%). Por outro lado, estes mesmos Autores observaram uma associação significativa entre os títulos de anticorpos detectados pela IF de amastigotas com o número de lesões presentes e formas clínicas da doença. Apesar da ocorrência de reações cruzadas com *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* ou outros tripanosomatídeos (Camargo & Rebonato, 1969; Furtado, 1980; Salfelder & Mannweiler, 1981), a IF tem sido recomendada para a avaliação da terapêutica de casos humanos de LTA.

Yamamoto et al (1981) compararam a IF com a reação de hemaglutinação tendo verificado índices de co-positividade (0,85), co-negatividade (0,98) e concordância (0,78) em soros de leishmanióticos. É possível que anticorpos monoclonais possam ser úteis no diagnóstico direto de leishmaniose, assim como para identificação taxonômica (Pratt & David, 1981) de diferentes espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.

SUMMARY

Seventeen persons, from 2 to 78 years of age, with clinical, epidemiological, immunological and parasitological diagnosis of american tegumentary leishmaniasis, were studied. All came from the endemic area of Jacarepaguá, a suburb of the city of Rio de Janeiro. The patients were treated with n-methylglucanine antimonate, using a dosage of 60 mg/kg/day, in three series of ten days duration each series, with intervals of ten days between each series, venous blood samples having been taken for the indirect immunofluorescent tests (IF-IgG) before, during and after medication. The seventeen individuals were reactive to the intradermal reaction of Montenegro (≥ 5 mm) and serum-reactive ($\geq 1:45$) to the IF-IgG test; *Leishmania b. braziliensis* ssp was demonstrated or isolated in six cases (31.7%).

Before treatment, the IF-IgG test showed positive in 76.4% of the cases (13 cases with titers $\geq 1:90$). The geometric averages of the reciprocal titer were as follows: before the first antimonial series (89.9); during treatment (63.6 to 29.3) and 10, 30 and 120 days after medication which revealed a clearly decreasing scale (14.9; 2.1 and 1.2), respectively. All lesions were healed upon termination of treatment, the scarring being most evident after the second series.

Only 120 days after therapy were titers lower than 1:45 in all patients (16 cases – 94.1%). This suggests that, when the IF-IgG test is used as a control of cures, serological follow up is necessary during a minimum of three to four months.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Claudia Marques e Celio Prado e ao técnico da SUCAM, Sr. Belmiro de Mello, lotados na Unidade Satélite de Vargem Grande da Secretaria de Saúde do Município do Rio de Janeiro e aos técnicos Gentil Dutra e Edilson de Souza, pelas inestimáveis colaborações e ao Dr. Paulo C. Sabroza da Escola Nacional de Saúde Pública-FIOCRUZ pelo estudo estatístico realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BITTENCOURT, A.C.; SODRÉ, A. & ANDRADE, Z. A., 1968. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 10 :247-252.
- CAMARGO, M.E. & REBONATO, C., 1969. Cross reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to Ensure Specific Results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18 :500-505.
- CHIARI, C.A.; MAYRINK, W. & MAGALHÃES, P.A., 1973. Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 15 :298-303.
- COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; SOUZA, W.J.S.; & AMENDOEIRA, M.R.R., 1981. Leishmaniose tegumentar americana. *J. Bras. Med.* 41 :104-118.
- CUBA CUBA, C.A.; MARSDEN, Ph.D.; BARRETO, A.C.; ROCHA, R.; SAMPAIO, R.R. & PATZLAFF, L., 1980. Diagnóstico parasitológico e imunológico de leishmaniasis tegumentaria americana. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 89 :195-208.
- FURTADO, T., 1980. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An. Bras. Dermatol.*, 55 :81-86.

- GUIMARÃES, F.N.; LAGE, H.A.; VENÂNCIO, I.A. & GRYNBERG, N.F., 1969. 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 de Janeiro), 75 :299-313.
- GUIMARÃES, M.C.S.; GIOVANNINI, V.L. & CAMARGO, M.E., 1974. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 16 :145-148.
- HERRER, A.; THATCHER, V.E. & JOHNSON, C.M., 1966. Natural infections of leishmania and trypanosomas demonstrated by skin culture. *J. Parasitol.*, 52 :954-957.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C. & SOUZA, W.J.S., 1980. Reação de imunofluorescência indireta a intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 22 :97-155.
- MARZICHI, M.C.A.; SOUZA, W.J.S.; COUTINHO, S.G.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI, G.P. & MONEN, H., em publicação. Avaliação de critérios diagnósticos na leishmaniose tegumentar em áreas de ocorrência de *Leishmaniose braziliensis braziliensis* no Rio de Janeiro, Brasil.
- MOMEN, H.; GRIMALDI, G.F. & SOARES, M.J., 1980. Identification of *Leishmania* species by isoelectrofocusing and electrophoresis of enzymes in polyacrylamide gels. Pesquisa Básica em Doença de Chagas, VII Reunião Anual – Caxambu, MG – Brasil. Sessão BI Biologia e Ultraestrutura: B19.
- ODDO, F.G. & CASCIO, G., 1963. Il test di immunofluorescenz nella leishmaniasi viscerale e cutanea. *Rev. Inst. Sieroter. Ital.*, 38 :139-145.
- PRATT, D.M. & DAVID, J.R., 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*, 291 :581-583.
- SALAZAR, H.C. & SALGUEIRO, P.F., 1979. Leishmaniasis. Epidemiological aspects in Brazil and in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med.*, 36 :594-597.
- SALFELDER, A. & MANNWEILER, E., 1981. Immundiagnostische befunde an seren von Leishmaniose, Chagas, Malaria und Amöbiasis Patienten in Endemiegebieten Venezuelas. *Tropenmed. Parasit.* 32 :194-196.
- WALTON, B.C., 1980. Evaluation of Chemotherapy of american leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29 :747-752.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979. Report of the Workshop on the Chemotherapy of mucocutaneous leishmaniasis. TDR/LEISH/MCL/ 79.3.
- YAMAMOTO, Y.I.; CENENIVA, A.C. & MOURA, R.A.A., 1981. Leishmaniose cutâneo-mucosa: reações de hemaglutinação passiva e de contraímunoelctroforese com antígeno de *Leishmania braziliensis*. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 17 :123-132.