

PENICILINOTERAPIA INTRAVENOSA EM ALTAS DOSES NA NEUROSSÍFILIS

III. AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTITREPONÊMICOS DA CLASSE IgM NO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO E NO SORO

*RICARDO NITRINI **

*MIRTHES UEDA ***

*ADELAIDE JOSÉ VAZ ***

*A. SPINA-FRANÇA **

Os métodos de avaliação dos resultados do tratamento da neurosífilis (NS) exigem que sejam repetidos periodicamente exames clínicos e do líquido cefalorraqueano (LCR). A pesquisa de imunoglobulinas específicas no soro e no LCR poderia permitir a avaliação mais precisa dos resultados do tratamento. Entretanto, teores persistentemente elevados de IgG poderiam refletir apenas que, após estimulação antigênica intensa, os clones produtores de IgG não cessam sua atividade senão longo tempo depois do tratamento¹⁵. De fato, a reação de imunofluorescência para sífilis (FTA-Abs) tende a manter-se positiva indefinidamente no soro e no LCR, embora possa negatar-se no LCR, muitos anos depois de tratamento^{3,10}. Para avaliar os resultados do tratamento, seria mais conveniente estudar as variações das imunoglobulinas M (IgM). Anticorpos antitreponêmicos da classe IgM são detectáveis precocemente no soro, em casos de sífilis recente^{5,19}, e desaparecem rapidamente, após tratamento eficaz^{11,14,17,19}. A pesquisa destes anticorpos no soro e no LCR poderia indicar a atividade da NS^{2,7,15,17}. Oxelius e col.¹⁵ observaram que logo depois de tratamento com penicilina, as concentrações de IgM reduziram-se rapidamente no LCR. Há dois obstáculos principais ao emprego da determinação das IgM no controle da atividade da doença. Em primeiro lugar, o desaparecimento das IgM constatado na sífilis recente não é tão rápido nas formas tardias; há casos de persistência de IgM no soro, por mais de dois anos depois de tratamento^{4,9,14,19,20}. Outro obstáculo reside na dificuldade de padronização de método simples e eficiente de detecção de IgM no soro e no LCR. A reação de imunofluorescência (IgM-FTA-Abs) fornece número elevado de resultados falso-positivos e falso-negativos^{5,17}. A reação de imunofluorescência precedida de procedimento que permita separar os anticorpos da classe IgM dos anticorpos da classe IgG (19S-IgM-FTA-Abs), que tem elevadas especificidade e sensibilidade, necessita de laboratório especializado para sua realização^{5,17}. Outras técnicas como a de hemadsorção em fase sólida¹⁸ e métodos imuno-

* Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; ** Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

enzimáticos^{12,16} têm sido desenvolvidos. Luger & col.⁷ utilizaram a técnica de hemadsorção em fase sólida e detectaram anticorpos antitreponêmicos da classe IgM no LCR de 10 dentre 11 doentes com NS não tratada.

Não há estudos que tenham avaliado a evolução das IgM do LCR na NS após tratamento. É objeto desta pesquisa contribuir para o tema.

MATERIAL E MÉTODOS

Nove dentre os 62 pacientes com NS submetidos a penicilioterapia intravenosa em altas doses (13) foram avaliados quanto à evolução de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM (casos 54 a 62). Em todos a reação de imunofluorescência para sífilis para anticorpos classe IgG (FTA-Abs) foi reagente no LCR e no soro. Parte das amostras de LCR e de soro de cada caso foram conservadas a -20°C até que todas as coletas tivessem sido feitas. Essas amostras foram submetidas no Instituto Adolfo Lutz aos seguintes procedimentos:

Teste de hemadsorção em fase sólida para detecção de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM — Realizado de acordo com a metodologia descrita por Schmidt (18) com algumas modificações: globulina de coelho com atividade anti-IgM (Dakopatts a/s, Copenhagen, Dinamarca) foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6); as incubações para sensibilização do soro e LCR foram de duas horas a 37°C e, posteriormente a 4°C durante 15 a 18 horas; as placas foram lavadas com solução fosfatada-tampoadada (PBS) (pH 7,4) contendo Tween 20 a 0,05; as hemácias sensibilizadas foram diluídas a 1/10 em PBS (pH 7,4) contendo albumina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Foram considerados significativos os resultados positivos em diluições superiores a 1/4.

Fracionamento cromatográfico do soro e do LCR por filtração em gel — Realizado segundo a técnica descrita por Frisch-Niggemeyer (1) com as seguintes modificações: foi utilizada resina Sephacryl S-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) e preparação de Sudam III a 0,3% em propanol-1. A fração cromatográfica contendo IgM foi utilizada para a reação de imunofluorescência e para a reação imunoenzimática (ELISA).

Reação de imunofluorescência para sífilis para detecção de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM (IgM FTA-Abs) — A fração cromatográfica de sangue ou de LCR contendo IgM foi utilizada para a reação IgM FTA-Abs segundo a técnica utilizada no Instituto Adolfo Lutz, empregando-se soro de coelho anti-IgM humana, específico para cadeia $_{\mu}$, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Dakopatts a/s, Copenhagen, Dinamarca).

Reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM — A suspensão liofilizada de *Treponema pallidum*, cepa Nichols (Biobab-Mérieux, São Paulo, Brasil), utilizada rotineiramente no teste de imunofluorescência (FTA-Abs), foi reconstituída com 1ml de água destilada e então diluída a 1/20 em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Esta suspensão foi submetida ao processo de rotura de células por ultrassom (Thorton-Inpec Eletrônica S/A, São Paulo, Brasil) a 40 KHz, 80 mA durante três minutos; este processo foi repetido por três vezes. A suspensão assim obtida foi centrifugada a 6000g durante 30 minutos e o sobrenadante, que correspondia ao antígeno, encontrava-se na concentração proteica de $300\mu\text{g/ml}$. As placas de microtitulação de poliestireno com fundo em U (Interlab, São Paulo, Brasil) foram sensibilizadas com o antígeno diluído a 1/200 em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) sendo $100\mu\text{l}$ distribuídos a cada cavidade. Após incubação a 4°C durante 15 a 18 horas, a placa sensibilizada foi lavada por três vezes com solução fosfatada (PBS) (pH 7,4) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A seguir, cada cavidade da placa foi tratada com $100\mu\text{l}$ de solução PBS (pH 7,4) contendo albumina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 1%, durante 90 minutos a 27°C . Após

lavagem, 100 μ l da fração contendo IgM, obtida mediante fracionamento cromatográfico do soro ou do LCR através de método descrito, foram adicionados a cada cavidade da placa, depois de terem sido submetidos a diluição em tampão absorvedor utilizado no teste de hemaglutinação (TPHA) (Fujizoki Pharmaceutical Co., Tokyo, Japão). Após incubação a 37°C durante duas horas, a placa foi lavada com PBS-T e a seguir

Caso	LCR						Soro					
	Pré	Pós	3-6 m	10-12 m	13-18 m	19-24 m	Pré	Pós	3-6 m	10-12 m	13-18 m	19-24 m
<i>Reação de imunofluorescência (IgM-FTA-Abs)</i>												
54	R
55	NR	R
56	NR	R	NR
57	NR	NR	R	R	R	R	NR
58	NR	NR	NR	NR	R	R
59	NR	R	NR	R	NR	NR	R	NR
60	NR	NR	NR	R	R	NR
61	R	NR	R	R
62	NR	R	NR	R	NR	R	R	NR	NR
<i>Reação de hemadsorção em fase sólida (anticorpos classe IgM)*</i>												
54	4
55	64	64
56	4	256	256
57	4	NR	256	512	128	16	4
58	8	4	NR	512	64	16
59	256	64	NR	4	512	256	256	64
60	8	8	8	256	256	512
61	256	64	128	128
62	256	4	NR	4	4	64	64	32	256	256
<i>Reação imunoenzimática, ELISA (anticorpos classe IgM)*</i>												
54	400
55	100	200
56	100	400	100
57	100	NR	100	100	100	400
58	100	50	100	100	50	50
59	100	100	NR	100	200	100	100	200
60	100	100	50	200	100	50
61	100	100	50	50
62	200	200	100	100	50	100	200	100	100	100

Tabela 1 — Pesquisa de anticorpos classe IgM por imunofluorescência (FTA-Abs), hemadsorção e ELISA em 9 casos de neurosífilis em relação ao tratamento: antes (Pré), em seguida (Pós) e, após, em diversas épocas reunidas em meses (m). R, reagente; NR, não reagente; * títulos expressos pelo inverso da diluição; (...), não pesquisada.

foram adicionados 100 μ l de soro anti-IgM humana, específicos para cadeia μ , extraído de coelhos, conjugado a peroxidase (Sigma Chemical Co., St., Louis, EUA) diluído a 1/1800 em PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de albumina bovina. A reação foi incubada a 4°C durante 15 a 18 horas, e após lavagem com PBS-T, foram adicionados 100 microlitros do substrato constituído por 40mg de orto-fenilenediamina (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em 100ml de solução tamponada pH = 5,0, contendo 0,04ml de H₂O₂ a 30%. Após 15 minutos, a reação foi paralisada com a adição a cada cavidade de 50 μ l de solução 2N de H₂SO₄. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 492nm (Titertek Multiskan MCC-Flow Laboratories Inc., Rockeville, EUA). Foram considerados significativos os resultados positivos correspondentes a diluições iguais ou superiores a 1/50 no LCR e a 1/100 no soro.

Pesquisa do fator reumatóide — As amostras de soro e da LCR e as frações obtidas após filtração em gel foram testadas pela prova do látex (Biolab-Mérieux, São Paulo, Brasil), segundo a metodologia recomendada pela firma fabricante.

Reação de imunodifusão radial simples proposta por Mancini e col. (9) — As frações de soro e de LCR obtidas através de filtração em gel foram analisadas quanto às concentrações de IgG e de IgM, segundo a padronização técnica empregada no Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

Os resultados das reações imunológicas para detecção de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM são apresentados na tabela 1. A pesquisa do fator reumatóide resultou negativa no soro e no LCR em todos os casos. A reação de imunodifusão radial foi aplicada em frações obtidas após filtração em gel; verificou-se que persistiam quantidades não desprezíveis de IgG em frações que deveriam conter apenas IgM.

COMENTÁRIOS

A reação de imunofluorescência para detecção de IgM (IgM-FTA-Abs) não evidenciou presença de anticorpos da classe IgM no LCR antes do tratamento, em 4 de 5 pacientes em que foi realizada. No soro, foi positiva em 4 dos 6 casos em que foi pesquisada. A baixa sensibilidade desta reação foi constatada por diversos autores^{5,7,17,20}. Número elevado de falso-negativos ocorreria em virtude de competição entre anticorpos das classes IgG e IgM. Para superar este obstáculo, têm sido utilizados métodos que permitem separar imunoglobulinas antes da realização da reação¹⁷. Entretanto, os métodos de separação dependem de recursos técnicos muito elaborados⁶. Neste estudo, foi realizada tentativa de separação de imunoglobulinas utilizando método de mais simples execução¹. Mediante a técnica de imunodifusão radial, verificou-se que não foi possível obter separação, persistindo certa quantidade de IgG em frações que deveriam conter apenas IgM.

A reação imunoenzimática (ELISA) e a hemadsorção em fase sólida para detecção de anticorpos da classe IgM mostraram-se mais sensíveis. A maior sensibilidade da reação de hemadsorção no LCR havia sido referida na literatura⁷. Ambas demonstraram quedas dos títulos depois do tratamento, que foi mais evidente na reação de hemadsorção. Entretanto, na maioria dos casos em que esses exames foram realizados, houve presença de IgM específica no soro e no LCR durante o período compreendido entre o 13° e o 18° mês. A presença de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM no soro, mais de um ano depois do tratamento, tem sido detectada nas formas tardias de sífilis^{14,19,20}.

A pesquisa de fator reumatóide foi realizada para excluir resultados falso-positivos que poderiam depender da presença de anticorpos da classe IgM, com atividade anti-IgG. Ela foi negativa em todas as amostras. Em paciente que apresentou piora clínica e laboratorial da NS (caso 62), o título da reação de hemadsorção encontrava-se mais elevado no soro no 16º mês após tratamento.

O encontro de anticorpos antitreponêmicos da classe IgM, no soro e no LCR além de 12 meses após tratamento, na maioria dos casos em que foram pesquisados, parece frustrar a expectativa de que sua detecção fosse método rápido e eficiente de avaliação dos resultados do tratamento da NS.

RESUMO

Anticorpos antitreponêmicos da classe IgM foram pesquisados no soro e no LCR de 9 casos de neurosífilis sintomática, antes e, em diversos momentos, depois do tratamento. Esses anticorpos foram investigados mediante reações de imunofluorescência (IgM-FTA-Abs), hemadsorção em fase sólida e imunoenzimática (ELISA). Os títulos das reações reduziram-se, mas houve persistência da reatividade no soro e no LCR no segundo ano após tratamento.

SUMMARY

High-dose intravenous penicillin G in the treatment of neurosyphilis. III. Evaluation of antitreponemic antibodies of the IgM class in cerebrospinal fluid and serum.

IgM antibodies against *Treponema pallidum* were investigated in the serum and in the CSF of 9 patients with symptomatic neurosyphilis, before the treatment and in several occasions after the treatment. Tests used were the FTA-Abs test, the IgM-solid phase hemadsorption test and an IgM-Elisa test. Titers of reactions decreased after treatment but they were still reactive in the blood and in the CSF during the second year after the treatment.

REFERÊNCIAS

1. FRISCH-NIGGEMEYER, W. — Simple and rapid chromatographic separation of IgM using microcolumns and stained sera. *J. virol. Method.* 5:135, 1982.
2. GIBOWSKI, M. & MACHONKO, T. — Immunoglobulins in the cerebrospinal fluid of patients with late syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 57:20, 1981.
3. GIMENEZ-ROLDAN, S. & MARIN, M. — Tabetic lightning pains: high-dose intravenous penicillin versus carbamazepine therapy. *Eur. Neurol.* 20:424, 1981.
4. LEFÈVRE, J.C.; PRÈRE, M.F.; ABRAL, M. & LARENG, M.B. — Apport du FTA-Abs quantitatif aux différents stades de la syphilis avant et après traitement. *Ann. Dermatol. Venereol.* 110:425, 1983.
5. LUGER, A. — Diagnostic de la syphilis. *Bull. Org. mond. Santé* 60:17, 1982.
6. LUGER, A.; SCHMIDT, B. & SPENDLINGWIMMER, I. — Quantitative evaluation of the FTA-ABS-IgM and VDRL test in treated and untreated syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 53:287, 1977.
7. LUGER, A.; SCHMIDT, B.L.; STEYRER, K. & SHONWALD, E. — Diagnosis of neurosyphilis by examination of the cerebrospinal fluid. *Brit. J. vener. Dis.* 57:232, 1981.

8. MANCINI, G.; CARBONARA, A.O. & HEREMANS, I.F. — Immunochemical quantitations of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235, 1965.
9. MERLIN, S.; ANDRE, J.; ALACOQUE, B. & PARIS-HAMELIN, A. — Importance of specific IgM antibodies in 116 patients with various stages of syphilis. *Genitourin. Med.* 61:82, 1985.
10. MICHEL, D.; BLANC, A.; LAURENT, B.; FOYATIER, N. & PORTFAIX, M. — Étude biologique, psicométrique et tomodensimétrique de la neurosyphilis traitée. *Rev. neurol. (Paris)* 139:737, 1983.
11. MÜLLER, F. & LINDENSCHMIDT, E.G. — Demonstration of specific 19S(IgM) antibodies in untreated syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 58:12, 1982.
12. MÜLLER, F. & MOSKOSPHIDIS, M. — Evaluation of an enzyme immunoassay for IgM antibodies of *Treponema pallidum* in syphilis in man. *Brit. J. vener. Dis.* 60:288, 1984.
13. NITRINI, R. & SPINA-FRANÇA, A. — Penicilinoteria intravenosa em altas doses na neurosífilis: estudo de 62 casos. II. Avaliação do líquido cefalorraqueano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 45:231, 1987.
14. O'NEILL, P. & NICOL, C.S. — IgM antitreponemal antibody in treated syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 48:460, 1972.
15. OXELIUS, V.A.; RORSMAN, H. & LAURELL, A.B. — Immunoglobulins of cerebrospinal fluid in syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 45:121, 1969.
16. PEDERSEN, N.S.; PETERSEN, C.S. & AXELSEN, N.H. — Enzyme-linked immunoglobulin M antibody against the Reiter *treponema flagellum* in syphilis. *J. clin. Microbiol.* 16:608, 1982.
17. SCHMIDT, B. & BOLTZMANN, L. — The IgM-FTA-ABS test in the serum diagnosis of syphilis. World Health Organization, Geneva, 1979.
18. SCHMIDT, B.L. — Solid-phase hemadsorption: a method for rapid detection of *Treponema pallidum* specific IgM. *Sex. Transm. Dis.* 7:53, 1980.
19. SHANNON, R. & BOOTH, S.D. — The pattern of immunological responses at various stages of syphilis. *Brit. J. vener. Dis.* 53:281, 1977.
20. WILKINSON, A.E. & RODIN, P. — IgM-FTA test in syphilis in adults: its relation to clinical findings. *Brit. J. vener. Dis.* 52:219, 1976.