

## AValiação DO TESTE DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA FILARIOSE BANCROFTIANA USANDO A MICROFILÁRIA DE *W. bancrofti* COMO ANTÍGENO, EM RECIFE-PE, BRASIL.

Gerusa DREYER (1), Luiz ANDRADE (1), Marlene ESPÍRITO SANTO(2), Zulma MEDEIROS (1), Isolda MOURA (2), Jocelene TENÓRIO (2), Abraham ROCHA (1), Maria Ilceir CASIMIRO (2), Eliane GALDINO (2), Elisabeth DREYER (1), Fátima BÉLIZ (1), Antonio RANGEL (3) & Amaury COUTINHO (1).

### RESUMO

Analisou-se o teste de imunofluorescência indireta com microfilárias de *W. bancrofti* tratadas pela papaína, como antígeno, amplamente utilizado em Recife para o imunodiagnóstico da filariose linfática. Foram testados soros de 50 pacientes portadores das diversas formas clínicas da doença, incluindo microfilaremia assintomática, eosinofilia pulmonar tropical, elefantíase de membros inferiores, linfagite aguda e quilúria. Para o grupo controle, foram selecionados 50 indivíduos vivendo pelo menos há 5 anos em área endêmica, sem nenhuma evidência clínica e/ou laboratorial da doença, constituindo os chamados endêmicos normais. A sensibilidade e especificidade do teste, segundo diferentes pontos de corte, mostraram a impossibilidade de diferenciação entre o grupo controle e o grupo sabidamente infectado. Também não foi possível estabelecer correlação entre os títulos encontrados e as diferentes formas clínicas. Foi considerada a existência de reações cruzadas relacionadas a helmintíases intestinais, porém nenhuma relação direta foi encontrada.

**UNITERMOS:** *W. bancrofti*: imunodiagnóstico, imunofluorescência indireta: resposta humoral, filariose linfática.

### INTRODUÇÃO

O imunodiagnóstico em filariose bancroftiana tem limitações gerais, como para qualquer outra doença parasitária, requerendo a padronização de um teste diagnóstico auxiliar, que atenda as normas básicas do sorodiagnóstico. Além disso, esta padronização vai depender também da resposta humoral dos indivíduos infectados assintomáticos, sintomáticos, assim como, dos indivíduos expostos à infecção, porém não infectados, potencialmente imunes. Esses últimos estão sendo constantemente desafiados pela larva infectante dos mosquitos infectados. A técnica de imunofluorescência indireta (IMF), com microfilária (mf) de *W. bancrofti* tratada pela papaína, foi descrita por SANTOS et al. (1976)<sup>12</sup>, estabelecendo-se o título de 1/100 ou superior, como diagnóstico da doença. Desde então, esta técnica tem sido amplamente difundida e usada na nossa região, sendo considerada indicativa de filariose doença, e determinante do tratamento do

indivíduo, independente do mesmo apresentar ou não sintomatologia característica da doença.

A análise individual dos casos clínicos referidos no Ambulatório Especializado de Filariose do CPqAM/FIOCRUZ, com o teste positivo e com resultados de difícil interpretação, levou à realização do presente estudo clínico-laboratorial, na tentativa de melhor compreender e interpretar os resultados obtidos na rotina diagnóstica em área endêmica de filariose.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Seleção dos pacientes:

Soros de 100 indivíduos vivendo em área

Trabalho financiado pelo CNPq (Processo 401718/86 - BM e 500762/90-2)

(1) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Cx. Postal 7472, Recife, PE, Brasil 50739.

(2) Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

(3) Secretaria de Saúde de Olinda, Olinda, PE, Brasil.

endêmica de filariose linfática, virgens de tratamento específico com dietilcambazina (DEC), provenientes de Recife, Olinda e Jaboatão, foram selecionados dentre 1008 pacientes atendidos no ambulatório de filariose. Após serem submetidos ao protocolo do Serviço, foram divididos em dois grupos: grupo de estudo, chamado A, e grupo de controle, chamado B. O grupo A foi formado de 50 pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 13 a 73 anos e foi dividido em subgrupos de acordo com a apresentação clínica da doença. O grupo B foi formado por 50 indivíduos do sexo masculino, com idade variando de 18 a 55 anos, sem nenhuma evidência clínico-laboratorial da doença, e com residência em área endêmica de pelo menos cinco anos.

O grupo A foi dividido nos seguintes sub-grupos:

A.1. 20 indivíduos assintomáticos, portadores de microfilárias circulantes.

A.2. 9 pacientes portadores de eosinofilia pulmonar tropical (EPT)

A.3. 10 pacientes amicrofilarêmicos portadores de elefantíase de membros inferiores.

A.4. 5 pacientes com sintomatologia inflamatória aguda (linfangite e funiculoepididimite), amicrofilarêmicos.

A.5. 6 pacientes portadores de quilúria, amicrofilarêmicos. Os indivíduos do grupo B e subgrupos A2 e A4 foram submetidos ao teste terapêutico com a DEC, após a coleta do soro para estudo. Para formar o grupo B, foram selecionados os indivíduos que não apresentaram nenhuma reação adversa geral, e principalmente localizada na região urogenital, durante e após o teste terapêutico, e sem evidências da infecção e/ou doença filarial, durante a reavaliação clínico-laboratorial feita trimestralmente por dois anos. Os indivíduos do grupo B foram selecionados dentre 158 indivíduos supostamente normais, que iniciaram o estudo. Por outro lado, a rápida e eficaz resposta ao tratamento específico dos indivíduos portadores de EPT e filariose aguda, foi o critério final para incluí-los nos sub-grupos A2 e A4, respectivamente.

#### Coleta e armazenamento do soro:

Os soros foram obtidos até 3 horas após a co-

leta do sangue, separados com alíquotas de 300 ul, trabalhando-se em banho de gelo, e conservados a -20° C até o momento da realização do exame, variando até 3 meses após a coleta.

#### Obtenção de microfilárias:

Após o consentimento dos assintomáticos microfilarêmicos, foram coletados 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo em tampão fosfato pH 7.4, em forma de *pool*.

#### Teste de imunofluorescência (IMF):

Foi executado de acordo com técnica descrita por SANTOS et al. (1976)<sup>12</sup>.

Em resumo, as microfilárias foram isoladas a partir do sangue total por hemólise com saponina a 2%, em agitação contínua, e centrifugação posterior com lavagens sucessivas em tampão fosfato pH 7.4. Tratou-se posteriormente as microfilárias com papaína (Papaína hidrossolúvel 30000-U/mg/Merck nº 7144.0025), procedendo-se a técnica de rotina de imunofluorescência e titulando-se o conjugado anti IgG total (Biolab/Bio Méricux/Fluoline H) com soros controles positivos existentes no Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFPE. O estudo foi conduzido de forma duplo-cego com a decodificação das amostras após a realização dos ensaios nos soros testes. Utilizou-se as amostras controle positivas e negativas usadas na rotina do Serviço do Hospital das Clínicas/UFPE.

#### Dosagem de IgG total específica

Este ensaio foi realizado nos soros dos pacientes do sub-grupo A2 no Laboratório de Doenças Parasitárias e Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde (NIH/Washington - USA), pelo Dr. Eric Ottesen, pela técnica de ELISA, utilizando-se como antígeno o verme adulto de *Brugia malayi* (OTTESEN et al. 1985)<sup>9</sup>. O resultado foi expresso em U/ml, considerando normais os valores menores do que 150U/ml.

## RESULTADOS

Os resultados da IMF indireta, do ELISA e do exame parasitológico de fezes, encontram-se nos quadros I, II e III, respectivamente. As sensibilidades e especificidades levando-se em conta os vários pontos de corte, estão relacionados no Quadro IV.

DREYER, G.; ANDRADE, L.; ESPÍRITO SANTO, M.; MEDEIROS, Z.; MOURA, I.; TENÓRIO, J.; CASIMIRO, A.; ROCHA, M. I.; GALDINO, E.; DREYER, E.; BÉLIZ, F.; RANGEL, A. & COUTINHO, A. - Avaliação do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico da filariose bancroftiana usando a microfilária de *W. bancrofti* como antígeno, em Recife-PE, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 33 (5): 397-402, 1991.

#### QUADRO I

Resultados da IMF indireta nos sub-grupos A1, A2, A3, A4 e A5 e Grupo B.

Sub-grupo/	Títulos					
		Neg.	1/100	1/200	1/400	1/800
Grupo	nº pac.					
A1	20	03	12	03	02	00
A2	09	01	03	03	02	00
A3	10	00	08	01	01	00
A4	05	01	03	01	00	00
A5	06	01	03	01	01	00
Sub-total	50	06	29	09	06	00
B	50	01	30	10	07	02

#### QUADRO III

Distribuição dos helmintos intestinais presentes nos sub-grupos A e Grupo B.

Grupos	Nº	Pos. (%)	Nº de pacientes positivos				
			A1	Tt	Anc	Ss	Neg
A1	20	100	17	09	05	02	00
A2	09	44	03	03	00	00	04
A3	10	100	09	02	01	01	00
A4	05	100	03	03	00	00	00
A5	06	100	04	03	01	00	00
B	50	70	25	16	04	06	15

A1: *Ascaris lumbricoides*; Tt: *Trichuris trichuria*; Anc: *Ancilostomídeos*; Ss: *Strongyloides stercoralis*.

#### DISCUSSÃO

A reavaliação da técnica de IMF indireta, amplamente difundida e usada no Grande Recife como teste diagnóstico para filariose bancroftiana, foi analisada no presente trabalho. Os resultados encontrados com uma titulação igual ou maior do que 1/100, considerada pelo clínicos e laboratórios, em geral, como ponto de corte na nossa região, resultou em uma especificidade de 2%. Com esse valor é extremamente difícil se utilizar o teste para diagnóstico diferencial. Quando fizemos a análise a nível de título maior ou igual a 1/200, embora aumentando-se em muito a especificidade em relação ao ponto de corte anterior (62%), a sensibilidade obtida caiu para níveis inaceitáveis (28%). À

#### QUADRO II

Resultados de IgG total específica e títulos da IMF obtidos no Grupo A2 (EPT).

Reg.	Anti-BMA* (U/ml)	Título da IMF
21	7250	1/100
22	11500	1/400
23	25000	1/200
24	22000	1/200
25	15000	1/100
26	23000	1/400
27	24000	Neg.
28	25000	1/100
29	12500	1/100

\* Anti-BMA: Anticorpo IgG anti-verme adulto de *Brugia malayi*

#### QUADRO IV

Sensibilidade e especificidade do teste IMF obtidas, considerando-se os títulos maiores ou iguais a 1/100, 1/200 e 1/400.

	Títulos		
	1/100	1/200	1/400
Sensibilidade	84%	28%	12%
Especificidade	02%	62%	82%

medida que elevamos o ponto de corte, ganhamos em especificidade e perdemos sensibilidade, sendo obtido com 1/400, 82 e 12% respectivamente, valores estes também inadequados para um teste diagnóstico. Pelo pequeno número de soros com titulação acima de 1/400, estes ocorrendo principalmente nos indivíduos do grupo B, não foi pertinente continuar a análise com pontos de cortes mais elevados.

Por outro lado, a reprodutibilidade inter-teste não ocorreu na maioria das amostras, havendo discordâncias, com diferentes alíquotas testadas em duplicata e triplicata, tornando imprevisíveis os resultados para uma mesma amostra do paciente em diferentes ocasiões (dados não apresentados neste trabalho). A falta de reprodutibilidade se deve, entre outros fatores, a não padronização do antígeno, pois até o momento, a única fonte de mf de *W. bancrofti* é o homem, cujo sangue é coletado em forma de *pool*. Isso se deve à falta de um animal de experimentação, e principalmente pela

lacuna da não existência de cultivo *in vitro* satisfatório.

Para análise dos resultados aqui apresentados, foram considerados os dados obtidos com a primeira alíquota examinada. Adicionalmente, a comparação dos resultados obtidos pela técnica de ELISA, dosando IgG total específica, e IMF, referentes ao sub-grupo A2, mostraram valores não comparáveis (Quadro II).

A eficácia do tratamento da microfilária com os diversos tipos de papaína (não padronizadas pelos serviços de uma maneira geral) para retirar a bainha do parasita e expor os determinantes antigênicos, pode variar muito, inclusive no mesmo lote de antígeno, podendo-se conjecturar haver variáveis não controláveis da sensibilidade do parasita à digestão enzimática, uma vez que em uma mesma preparação, pode-se visualizar microfilárias com e sem bainha, assim como parasitas parcial ou totalmente digeridos. Esse fato, pode ter repercussões diretas na reação de IMF uma vez que, frente a uma mesma amostra de soro, a superfície das microfilárias exibiu padrões não homogêneos de fluorescência em ambos os grupos (A e B). Observou-se diferentes padrões de fluorescência, com parasitas apresentando-se total ou parcialmente fluorescentes, reagindo ora com a metade superior, ora com a inferior, assim como, fluorescência granular, reagindo com estruturas específicas tais como células subcuticulares, poros excretor e anal. Até o momento não conseguimos estabelecer o significado dos diversos padrões de fluorescência, correlacionando-os com a presença de infecção ou diferentes apresentações clínicas da doença. Diferentes padrões de fluorescência foram também originalmente descritos por SANTOS et al. (1976)<sup>12</sup>, porém sem sugestões do possível significado para o fato.

Não foi possível correlacionar os títulos encontrados na IMF e a presença dos diversos helmintos intestinais, assim como também não ocorreu qualquer correlação entre os títulos da IMF e as diferentes formas clínicas da doença. A grande maioria dos soros testados reagiu com a mf (93/100), evidenciando que o tratamento enzimático do parasita expõe determinantes antigênicos ou epitopos, porém não ficando claro o seu significado.

Em áreas endêmicas de filariose, os indivíduos

que estão repetidamente expostos a picadas de mosquitos infectados com larva de terceiro estágio de *W. bancrofti*, podem evoluir sem ou com infecção, essa última definida pela presença de verme adulto, e assim desenvolverem anticorpos que podem ser detectados por vários ensaios imunológicos (PIESSENS & MACKENZIE, 1982)<sup>10</sup>. Adicionalmente, reações cruzadas entre os antígenos filariais e os antígenos de outros parasitas existentes na região contribuem para dificultar a padronização de um teste diagnóstico. De fato, isso constitui um dos problemas mais persistentes no imunodiagnóstico da infecção filarial (LAU & OTTESEN, 1988)<sup>5</sup>. A falta aparente de especificidade dos extratos antigênicos destes parasitas tem tornado o imunodiagnóstico muito difícil, e assim, incentivado o estudo para reconhecimento dos epitopos não comuns entre os helmintos. Embora a maioria desses epitopos permaneçam ainda não caracterizados, um determinante comum tem sido identificado como sendo a fosfocolina ou fosforilcolina (PC). Essa molécula, por sua vez evoca resposta imune vigorosa em diferentes formas de infecção: bacterianas, fúngicas, protozoárias e helmínticas, tanto em humanos quanto em animais de experimentação (AMBROISE THOMAS, 1974)<sup>2</sup>, dificultando grandemente a especificidade das reações.

Por outro lado, níveis séricos de anticorpos específicos IgG4, onde reside a maioria da atividade anticorpo bloqueador, são encontrados com valores relativos maiores em microfilarêmicos, onde imunossupressão específica é encontrada (OTTESEN et al., 1985)<sup>9</sup>. O achado mais consistente nos estudos imunológicos em pacientes com filariose linfática, tem sido a deficiência na resposta imune tipo efetora observada naqueles indivíduos com microfilaremia, assintomáticos (HUSSAIN et al. 1981<sup>4</sup> e PIESSENS et al., 1980<sup>11</sup>). A produção de interferon gama ou anticorpos *in vitro*, são marcadamente mais baixos em microfilarêmicos assintomáticos do que naqueles cuja infecção resultou em patologia linfática (NUTMAN et al., 1987)<sup>6</sup>. Anticorpos específicos como, por exemplo, IgE antifilarial, são identificáveis em todos os indivíduos vivendo em área endêmica, independentemente do fato de apresentarem ou não sintomatologia, e certamente, vale ressaltar os altíssimos níveis de anticorpos específicos IgE encontrados nos pacientes portadores de EPT (HUSSAIN et al., 1981)<sup>4</sup> onde é reconhecido, em sua patogênese, um estado de hipersensibilidade imunológica. É importante frisar também a resposta, até certo ponto

proeminente, anticorpo-específica, nos endêmicos normais, às vezes mais alta do que nos indivíduos com morbidade (OTTESEN, 1984)<sup>7</sup>. Este fato é relevante quando se considera o diagnóstico da doença a nível individual, com técnicas para detecção de anticorpos antifilaria. Considerando-se que:

1. indivíduos que possuem microfilária circulante, prova incontestada de infecção, não produzem níveis de anticorpos suficientes para ficarem acima do ponto de corte, uma vez que o nível de produção de anticorpos é caracteristicamente baixo nesta forma clínica (OTTESEN, 1984)<sup>7</sup>; 2. endêmicos normais reconhecem antígenos de mf e vermes adultos tanto quanto o infectado (PIESSENS & MACKENZIE 1982)<sup>10</sup>; 3. pacientes com patologia crônica não apresentam uniformidade na resposta humoral podendo esta, ser inclusive menor do que nos endêmicos normais (OTTESEN, 1980)<sup>8</sup>; 4. o epitopo imunodominante, a fosforilcolina, é comum a muitos outros organismos existentes na nossa região (LAU & OTTESEN, 1988<sup>5</sup> e SCOTT et al., 1987<sup>13</sup>), nos faz questionar o valor da detecção de anticorpos em testes imunodiagnósticos na filariose, particularmente o teste de IMF indireta.

Os comentários feitos anteriormente, provavelmente, justificam os resultados obtidos no presente estudo, acrescido de que a técnica de IMF para mf apresenta dificuldades significativas na padronização do ensaio.

Para maior precisão diagnóstica dos ensaios sorológicos, devem ser incentivados os estudos da resposta humoral por IgG4 (AALHERSE et al., 1983<sup>1</sup>; LAU & OTTESEN, 1985<sup>5</sup> e OTTESEN et al., 1985<sup>9</sup>), bem como a identificação de frações antigênicas ou epitopos eventualmente importantes.

Os antígenos de secreção-excreção de mf de *W. bancrofti*, referidos como mais específicos e sensíveis do que os antígenos somáticos, homólogos ou heterólogos, tem sido utilizados, inclusive, para avaliação epidemiológica no campo (HARINATH, 1985<sup>3</sup>).

Apesar de investigações preliminares promissoras, as dificuldades no isolamento do parasita e no cultivo *in vitro*, têm sido os principais responsáveis pela falta de estudos mais sistematizados nesta área. Existe, atualmente, uma tendência de se in-

vestir mais na detecção de antígenos circulantes, com o uso de anticorpos monoclonais, assim como de sondas de DNA, no sentido de minimizar um dos maiores desafios do imunoparasitologista: o imunodiagnóstico.

## SUMMARY

**Evaluation of indirect immunofluorescence test for bancroftian filariasis using *Wuchereria bancrofti* microfilariae as the antigen in Recife, Brazil.**

The authors analysed the indirect immunofluorescence assay, for the diagnosis of bancroftian filariasis using papain treated *W. bancrofti* microfilariae as antigen, widely used in Recife - Brazil. Sera from 50 patients with several clinical forms of the disease including asymptomatic carriers, tropical pulmonary eosinophilia, elephantiasis, filarial fever and chyluria were analysed. For the control group, 50 individuals were selected, living at least 5 years in endemic area, with neither previous DEC treatment nor clinical-laboratory evidences of the disease, called normals endemic. The sensitivity and specificity were analysed taking into account different cut off values. It was not possible to differentiate infected individuals from the control group. It was not even possible to establish any correlation with IMF titers among different clinical presentation of the disease. Crossed reactions with various intestinal helminths were considered, but no relationship was found.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Eric Ottesen e Robert Poindexter pela realização do teste ELISA e aos técnicos Leonardo Dutra, Fernando Gonçalves e Luiz Carlos Figueredo pelo processamento dos exames parasitológicos de fezes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALHERSE, R.C.; van der GAOG, R. & van LEEUWEN - Serologic aspects of IgG4 - restricted response. *J. Immunol.*, 130: 722-726, 1983.
2. AMBROISE-THOMAS, P. - Immunological diagnosis of human filariasis: present possibilities, difficulties and limitations (a review). *Acta trop. (Basel)*, 31: 108-128, 1974.
3. HARINATH, B.C. - Immunodiagnosis of Filariasis. Co-

DREYER, G.; ANDRADE, L.; ESPÍRITO SANTO, M.; MEDEIROS, Z.; MOURA, I.; TENÓRIO, J.; CASIMIRO, A.; ROCHA, M. I.; GALDINO, E.; DREYER, E.; BÉLIZ, F.; RANGEL, A. & COUTINHO, A. - Avaliação do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico da filariose bancroftiana usando a microfilária de *W. bancrofti* como antígeno, em Recife-PE, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 33 (5): 397-402, 1991.

- mum. Dis.*, 17 (Suppl. 1) : 113-116, 1985.
4. HUSSAIN, R.; HAMILTON, R.G.; KUMARASWAMI, V.; ADKINSON, F.A. Jr. & OTTESEN, E.A. - IgE response in human filariasis. I. Quantification of filaria - specific IgE. *J. Immunol.*, 127: 1623-1629, 1981.
  5. LAU, R. B. & OTTESEN, E.A. - Enhanced Diagnostic Specificity in Human Filariasis by IgG4 antibody assesment. *J. infect. Dis.*, 158: 1034-1037, 1988.
  6. NUTMAN, T.B.; KUMARASWAMI, V.; PAO, L.; NARAYANAM, P.R. & OTTESEN, E.A. - An Analysis of "in vitro" B cell Immune responsiveness in human lymphatic filariasis. *J. Immunol.*, 138: 3954-3959, 1987.
  7. OTTESEN, E.A. - Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. *Trans roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78 (Suppl.): 9-18, 1984.
  8. OTTESEN, E.A. - Immunopathology of lymphatic filariasis in man. *Springer Sem. Immunopath.*, 2: 373-385, 1980.
  9. OTTESEN, E.A.; SKVARIL, F.; TRIPATRY, S.P.; POINDEXTER, R. W. & HUSSAIN, R. - Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J. Immunol.*, 134: 2707-2712, 1985.
  10. PIESENS, W.F. & MACKENZIE, C.D. - Immunology of lymphatic filariasis and onchocerciasis. In: COHEN, S. & WARREN, K. S. *Immunology of parasitic infections*. 2nd. ed. Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1982. p. 622-636.
  11. PIESENS, W. F.; Mc CREEVY, P. B.; PIESENS, P. W.; Mc CREEVY, M.; KOIMAN, I.; SAROSO, J. S. & DENNIS, D. T. - Immune responses in human infections with *Brugia malayi* specific cellular responsiveness to filarial antigens. *J. clin. Invest.*, 65: 172-179.
  12. SANTOS, L. G.; SANTOS, D. S. & AZEVEDO, R. - Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* by Immunofluorescence using microfilariae as antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 70: 219-225, 1976.
  13. SCOTT, M. G.; BRILES, D. E.; SHACKELFORD, P. A.; SMITH, D. S. & NAIM, M. H. - Human antibodies to phosphocholine IgG anti-PC antibodies express restricted numbers of V and C regions. *J. Immunol.*, 138: 3325-3331, 1987.

Recebido para publicação em 02/08/1990.  
Aceito para publicação em 02/08/1991.