

AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HEMOAGLUTINAÇÃO INDIRETA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE INTESTINAL

Edward Félix Silva*, Maria Aparecida Gomes*, Maria das Graças Carvalho**

RESUMO

Testes de hemoaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI), foram realizados em 154 soros de indivíduos de ambos os sexos comprovadamente infectados com *Entamoeba histolytica*. Dentre estes 154 soros, 78 foram obtidos de pacientes com sintomas clínicos de amebíase (colite disentérica e colite não disentérica) e os restantes 76 soros de indivíduos assintomáticos. Os antígenos foram preparados das cepas HK-9, NIH-200 e ICB-462, todas mantidas em cultivo axênico. Os resultados obtidos, tanto para HAI como para IFI, foram analisados e relacionados à forma clínica, idade e sexo do paciente. Foi encontrada maior positividade nas reações de pacientes com idade superior a 18 anos (IFI: 12/21; HAI: 10/23) e apresentando sintomas clínicos (IFI: 21/57; HAI: 16/62).

UNITERMOS: Amebíase; Diagnóstico; Imunofluorescência indireta; Hemoaglutinação indireta.

INTRODUÇÃO

Estima-se que 500 milhões de pessoas, no mundo, se encontrem infectadas pelo protozoário parasito *Entamoeba histolytica*. Dentre estes indivíduos infectados, uma percentagem relativamente pequena desenvolve sintomas da doença. A amebíase sintomática é grave e muitas vezes fatal, levando a morte anualmente entre 40 a 110 mil pessoas (GUERRANT, 1986). O fato de um grande número de indivíduos com amebíase não apresentarem sintomas e dos indivíduos sintomáticos estarem restritos a determinadas áreas do globo, levou diversos pesquisadores nesta área a concordarem com a hipótese de Brumpt (1925), que sugere a dualidade de espécies, sendo a *E.*

* Depto. Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas-UFMG, CP 486, CEP: 31270-901.

** Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Recebido 08/04/96. Revisto em 26/08/96. Aceito em 05/09/96.

dispar, morfológicamente idêntica a *E. histolytica*, a forma infectante presente nos indivíduos assintomáticos. Considerando esta nova situação, indivíduos infectados com *E. dispar* seriam dispensáveis de tratamento e sem significância epidemiológica, fazendo-se necessário repensarmos a distribuição da *E. histolytica* e da *E. dispar* no mundo. Para estudos epidemiológicos, os testes sorológicos são os mais indicados por serem simples, rápidos, não precisarem, na maioria dos casos, de microscopistas treinados. Dentre as diversas provas sorológicas que foram testadas para detectar anticorpos e antígenos amebianos circulantes (GANDHI et al., 1987; NEAL et al., 1968), a hemoaglutinação indireta e a imunofluorescência indireta, são sensíveis, específicas e amplamente utilizadas no diagnóstico da amebíase e em levantamentos epidemiológicos (HEALY, 1986; KESSEL et al., 1965; KNOBLOCH et al., 1982; NEAL et al., 1968; SAVANAT et al., 1974; STAMM et al., 1976). A imunofluorescência indireta tem sido também usada como prova de cura em amebíase (CUNHA et al., 1977; STAMM et al., 1976).

Neste trabalho, foram utilizados soros de indivíduos infectados com *E. histolytica* apresentando diferentes quadros clínicos (colite disentérica [CD], colite não disentérica [CND] e assintomáticos) analisando-se a efetividade destas técnicas no imunodiagnóstico da amebíase no Brasil, onde predominam assintomáticos e sintomáticos com CND.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros humanos:

Para escolha dos soros utilizados neste estudo, foi feita uma pré-seleção dos indivíduos através de exame de fezes pelos métodos de conservação das fezes com mertiolate, iodo e formol, formol-éter e exame direto e coloração pela hematoxilina férrica nos casos de fezes diarréicas. Foram considerados os indivíduos que apresentaram em suas fezes cistos ou trofozoítos de *E. histolytica*. Foram encontrados positivos 154 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 6 e 60 anos. Foi feito o exame clínico destes indivíduos e colhido o sangue para obtenção do soro. Dos 154 positivos, 78 apresentaram sintomas de infecção, sendo 2 com CD e 76 com CND. Os restantes 76 eram assintomáticos. Utilizamos soros controles positivos e negativos da Ames Company - (Division Miles Laboratories Inc., Indiana, USA) e soros negativos obtidos de recém-nascidos, filhos de mães isentas de infecção pela *E. histolytica*. Foram utilizados ainda como controles 5 soros de indivíduos infectados unicamente com *E. coli*, 2 com *E. coli* e *E. hartmanni*, 1 com *Iodamoeba butschlii* e *Endolimax nana* e 1 com *E. coli* e *Dientamoeba fragilis*.

Antígenos:

Foram utilizadas as cepas HK-9 (considerada como cepa padrão [KNOBLOCH et al., 1982; GOLDMAN, 1966; SAVANAT et al., 1974]) e a cepa NIH-200, isoladas de pacientes sintomáticos e axenizadas por Diamond (1968). Utilizamos também a cepa ICB-462, isolada e axenizada diretamente de cistos, de paciente assintomático, isolada e axenizada por um de nós (EFS). Para a prova de HAI, os antígenos foram preparados de acordo com a técnica descrita por KRUPP (1974), e para a IFI seguimos a técnica de GOLDMAN (1966). Os resultados foram considerados positivos quando apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:160 pela HAI e 1:64 pela IFI. Estes resultados foram analisados pelo χ^2 e os valores obtidos corrigidos para a continuidade proposta por Yates (AMBROISE-THOMAS, 1976).

RESULTADOS

Pelas técnicas de HAI e IFI foram detectados, respectivamente, 20,5% e 26,9% de indivíduos sintomáticos. Na forma assintomática a positividade foi de 1,3% para a HAI e 6,6% para a IFI (tabelas 1 e 2). Todos os soros de indivíduos infectados com outras amebas, diferentes da *E. histolytica*, foram não reativos em ambas as provas. O grupo etário acima de 18 anos representou 30,3% dos positivos para HAI e 36,4% para IFI e o grupo etário inferior a 18 anos constituiu 5,8% e 11,6%, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os sexos feminino e masculino (tabela 3).

Tabela 1. Hemoaglutinação indireta (HAI) em soros de indivíduos infectados com *Entamoeba histolytica*, segundo a forma clínica.

FORMA CLÍNICA	POSITIVOS ($\geq 1/160$)	NEGATIVOS	TOTAL
Sintomática	16 (20,5%)	62 (79,5%)	78
Assintomática	01 (1,3%)	75 (98,7%)	76
TOTAL	17 (11,0%)	137 (89,0%)	154

χ^2 1 gl = 13,16
p < 0,005

SILVA, E.F.; GOMES, M.A.; CARVALHO, M.G. Avaliação das técnicas de Hemoaglutinação Indireta e Imunofluorescência Indireta no diagnóstico da amebíase intestinal. Rev. Pat. Trop.25 (1): 5-11, jan/jun. 1996

Tabela 2. Imunofluorescência Indireta (IFI) em soros de indivíduos infectados com *Entamoeba histolytica* segundo a forma clínica.

FORMA CLÍNICA	POSITIVOS ($\geq 1/64$)	NEGATIVOS	TOTAL
Sintomática	21 (26,9%)	57 (73,1%)	78
Assintomática	05 (6,6%)	71 (93,1%)	75
TOTAL	26 (16,9%)	128 (83,1%)	154

χ^2 1 gl = 11,89
p < 0,05

Tabela 3 - Resultados das provas de HAI e IFI segundo idade e sexo dos indivíduos infectados.

IDADE	Nº DE SOROS	HAI				IFI			
		POSITIVOS		NEGATIVOS		POSITIVOS		NEGATIVOS	
		F	M	F	M	F	M	F	M
0-18 anos	121	4	3	58	55	6	8	53	54
18-66 anos	33	6	4	11	12	6	6	10	11
TOTAL	154	17(11,0%)		137(89,0%)		26(17,0%)		128(83,0%)	

HAI: χ^2 1 gl = 12,55, p < 0,05

IFI: χ^2 1 gl = 9,01, p < 0,05

F=feminino e M=masculino

Não houve diferença significativa (p<0,05) quando os antígenos provenientes das cepas NIH-200 e ICB-462 de *E. histolytica*, foram comparados com os resultados provenientes da cepa HK-9, empregada como cepa padrão.

DISCUSSÃO

Utilizando as técnicas de HAI e IFI, observamos um maior número de reações positivas nos soros provenientes de indivíduos sintomáticos, quer seja com CND ou CD, que nos assintomáticos. Contudo, analisando as tabelas 1 e 2, podemos verificar que a maioria dos soros provenientes de sintomáticos com colite não disentérica não foram reativos em nenhuma das duas técnicas estudadas, sendo que a forma clínica de CD apresentou títulos elevados de anticorpos tanto para HAI (1/4096 e 1/8192) como para IFI (1/512 e 1/1024). Esta variação de reatividade pode depender das características dos antígenos, da eficiência do hospedeiro em produzir anticorpos, do

SILVA, E.F.; GOMES, M.A.; CARVALHO, M.G. Avaliação das técnicas de Hemoaglutinação Indireta e Imunofluorescência Indireta no diagnóstico da amebíase intestinal. Rev. Pat. Trop.25 (1): 5-11, jan/jun. 1996

tempo de exposição ao parasita, como também pode significar infecção dos hospedeiros por amebas distintas. Considerando esta última hipótese, os indivíduos apresentando a forma clínica de CND poderiam estar infectados com outra espécie de ameba que não a *E. histolytica*, a *E. dispar*. Esta ameba seria patogênica, contudo não muito virulenta, provocando erosão da parede intestinal sem invadir de forma definitiva a mucosa, como acontece com a *E. histolytica* (CLARK & DIAMOND, 1994).

Analisando os resultados obtidos com as técnicas de HAI e IFI, observamos que 98,7% e 93,4% dos soros dos indivíduos assintomáticos e 79,5% e 73,1% dos sintomáticos, não reagiram frente a HAI e IFI, respectivamente. Estes resultados poderiam ser devidos a dois motivos: 1) baixa sensibilidade e especificidade de ambos os testes; 2) existência de cepas, raças, "clones geográficos", ou outra espécie, semelhante a *E. histolytica*, que não invadiria tecidos. O primeiro destes motivos poderia justificar o encontro de reações negativas em indivíduos sintomáticos com CND, e o segundo, os casos assintomáticos e sintomáticos de CND não reativos, uma vez que nestes indivíduos não deve existir invasão tissular.

Neste trabalho empregamos as cepas NIH-200, HK-9 e ICB-462, as duas primeiras isoladas de casos de amebíase sintomática, sendo uma delas a HK-9 usada como cepa padrão e a última, isolada de portador assintomático. Procuramos verificar se a utilização da cepa ICB-462 como antígeno aumentaria a especificidade e sensibilidade no imunodiagnóstico dos indivíduos assintomáticos, como também dos indivíduos apresentando a forma clínica de CND, pouco detectada com a utilização de antígenos obtidos de cepas patogênicas. Não observamos diferença significativa (p < 0,05) quando comparamos os resultados obtidos com os antígenos destas três cepas. Estes resultados sugerem que a forma clínica de CND, muito comum em nosso país, não invade a mucosa intestinal, não sensibilizando o sistema imune do indivíduo infectado. No caso dos indivíduos sintomáticos com amebíase ativa (CD ou abscesso hepático), possivelmente ocorre invasão tissular facilitando o contato do antígeno com o sistema imunológico, o que estimula a produção de anticorpos. Portanto, quanto maior a capacidade de invasão do parasita, maior seria a quantidade de antígeno disponível e mais altos os níveis de anticorpos detectados pelas reações imunológicas (NEAL et al., 1968). Contudo os indivíduos estudados neste trabalho poderiam não possuir a eficiência necessária à produção de anticorpos que depende de fatores individuais como, debilidade, má nutrição, deficiência imunológica e mesmo o tamanho do inóculo influenciando no estabelecimento e qualidade da infecção (KRUPP, 1974). Realmente, isto poderia estar ocorrendo uma vez que a maioria destes indivíduos pertencem a um nível sócio-econômico mais baixo.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A.; CARVALHO, M.G. Avaliação das técnicas de Hemoaglutinação Indireta e Imunofluorescência Indireta no diagnóstico da amebíase intestinal. Rev. Pat. Trop. 25 (1): 5-11, jan/jun. 1996

Com relação a idade foi detectada uma maior positividade das reações imunológicas em soros de indivíduos acima de 18 anos, fato este que, provavelmente, se deva principalmente aos hábitos alimentares dos adultos.

Em resumo, embora a maioria dos testes sorológicos empregados no Brasil apresente resultados satisfatórios para separar formas assintomáticas das formas sintomáticas de CD, elas não foram capazes no entanto, de diagnosticar a maioria dos casos de amebíase sintomática de CND e assintomática, que são as formas predominantemente encontradas no Brasil, principalmente na região centro-sul do país.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos: PRPq-UFMG, FAPEMIG e FINEP.

SUMMARY

Evaluation of Indirect Haemagglutination and Indirect Immunofluorescence on the Diagnosis of Intestinal Amoebiasis.

Tests of indirect haemagglutination (IHA) and indirect immunofluorescence (IIF), were carried out on 154 sera of individuals of both sex with a proven *Entamoeba histolytica* infection. Amongst these 154 sera, 78 were obtained from patients with clinical symptoms of amoebiasis (dysenteric colitis and non dysenteric colitis) and the remaining 76 sera were from asymptomatic individuals. The antigens were prepared from strains HK-9, NIH-200 and ICB-462, all of them maintained in an axenic culture. The obtained results, both for the IHA and IIF, were analysed and related to the patient's clinical presentation, age and sex. A higher positivity was found in the reactions of patients of 18 years and older (IIF: 12/21; IHA: 10/23) and with clinical symptoms (IIF: 21/57; IHA: 16/62).

KEYWORDS: Amoebiasis; Diagnosis; Indirect hemagglutination; Indirect immunofluorescence.

REFERÊNCIAS

01. AMBROISE-THOMAS, P. Immunofluorescence in the diagnosis, therapeutic follow up and seroepidemiological studies of some parasitic diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70:107-112, 1976.
02. ARMITAGE, P. Statistical methods in medical research. London. Blackwell Scientific Publ., 1973, 503p.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A.; CARVALHO, M.G. Avaliação das técnicas de Hemoaglutinação Indireta e Imunofluorescência Indireta no diagnóstico da amebíase intestinal. Rev. Pat. Trop. 25 (1): 5-11, jan/jun. 1996

03. BRUMPT, E. Étude sommaire de l'E. dispar n. sp., amiba a kystes quadrinucléées, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.* 44:943, 1925.
04. CLARK, C. G. & DIAMOND, L. S. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today* 10(2):46, 1994.
05. CUNHA, A. S.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, F. G.; COSTA, C. A.; MELLO, S. M. & RASO, P. Patogenia da amebíase III - Comportamento de provas sorológicas em pacientes infectados pela *Entamoeba histolytica*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19:387-392, 1977.
06. DIAMOND, L. S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* like amoebae. *J. Parasit.* 54:1047-1056, 1968.
07. GANDHI, B.M.; IRSHAD, M.; CHARVIA, T. C. & TANDON, B. Enzyme linked protein-A, an ELISA for detection of amebic antibody. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:183, 1987.
08. GOLDMAN, M. Evaluation of a fluorescent antibody for amebiasis using two widely differing amoeba strains as antigen. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15:694-700, 1966.
09. GUERRANT, R. L. The global problem of amebiasis: current status, research needs and opportunities for progress. *Rev. Infect. Dis.* 8:218-223, 1986.
10. HEALY, G. R. Immunological tools in the diagnosis of amoebiasis epidemiology in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 8:239-246, 1986.
11. KESSEL, J. F.; LEWIS, W. P.; MOLINA PASQUEL, C. & TURNER, J. A. Indirect haemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. *Am. J. Trop. Med.* 14:540-551, 1965.
12. KNOBLOCH, J.; MANNWEILLER, E.; HOELER, W. & KERN, P. Efficiency of serodiagnosis in amebiasis. Results obtained by for different tests in 1,458 persons with varying exposure. *Tropenmed. Parasit.* 33:107-110, 1982.
13. KRUPP, L. M. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in diagnosis of amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 23:27-30, 1974.
14. NEAL, R. A.; ROBINSON, G. L.; LEWIS, W. P. & KESSEL, J. F. Comparison of clinical observation on patients infected with *Entamoeba histolytica* with serological titers sera and virulence of other amoebae to rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:69-75, 1968.
15. SAVANAT, T.; SABCHARDEN, A.; CHARPEMONG, K.; TANTIVANICH, S. & KLONGKAMNANKARN, K. Immunological tests in asymptomatic intestinal amoebiasis. *The Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 5:359-364, 1974.
16. STAMM, W. P.; ASHLEY, M. J. & BELL, K. The value of amoebic serology in an area of low endemicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70:49-53, 1976.