

## ESTUDO EVOLUTIVO DE ANTICORPOS IMUNOFLUORESCENTES NO CALAZAR, COM ANTÍGENOS DE *L. brasiliensis*, *L. donovani*, "LEPTOMAS" *peessoai* E FORMA AMASTIGOTA DE *L. mexicana* \*

MARILENE DE ALMEIDA CORREIA \*\* WILLIAM BARBOSA \*\*\*

### RESUMO

Soros de 10 pacientes de Calazar, em número de 60 amostras, colhidas evolutivamente, foram examinadas, pela técnica de imunofluorescência indireta. Os antígenos empregados constaram de formas promastigotas de *L. brasiliensis*, *L. donovani* e "Leptomonas" *peessoai*, bem como de formas amastigotas de *L. mexicana*.

Como soros testemunhas, foram usados 100 soros de pacientes com Blastomicose Sul-Americana, Tuberculose, Esquistossomose, Doença de Chagas e Pênfigo, vinte de cada.

Soros de 39 pacientes de Leishmaniose tegumentar foram estudados com os antígenos de *L. brasiliensis*, *L. donovani* e "Leptomonas" *peessoai*.

Somente foram observadas falsas reações positivas em títulos iguais ou superiores a 1/20 com o antígeno de *L. donovani* nos grupos testemunhas.

Com o soro de Calazar, o antígeno homólogo se mostrou o mais sensível dentre os testados. A forma amastigota de *L. mexicana* foi a menos sensível.

Durante o período de observação, houve queda progressiva dos títulos de anticorpos, que não chegaram a se negativar.

### INTRODUÇÃO

A reação de imunofluorescência vem sendo experimentada na investigação da Leishmaniose visceral desde 1963, Oddo e Cassio verificaram a positividade de 4 casos de Calazar por esta técnica. (12).

Em 1964 Duxbury e Sadum obtiveram 70% de resultados positivos em 30 pacientes usando como antígeno forma promastigota de *L. donovani*, na ocasião obtiveram 22% de reações positivas em 31 casos de Leishmaniose cutâneo-mucosa e resultados negativos em 5 pacientes de Leishmaniose cutânea (9). Shaw e Voller (1964) além da observação da reação com antígeno homólogo em um caso de Calazar, encontraram um soro negativo para o mesmo antígeno em um caso de Leishmaniose tegumentar, verificaram, que imune soro humano de Calazar do mediterrâneo, reage com *L. brasiliensis* (do Panamá) formas promastigotas, com formas amastigota-

\* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical (IPT) da (UFGO.) realizado durante o 1º. Curso de Especialização em Imunologia.

\*\* Prof. Auxiliar de Ensino do Depto. de Parasitologia do IPT-UFGO.

\*\*\* Prof. Titular do Depto. de Medicina Tropical e Chefe do Depto. de Medicina Tropical do IPT-UFGO.

tas de *L. donovani* com promastigotas de *L. infantum*, com formas sanguíneas e de cultura de *T. cruzi* e com formas promastigotas de *Endotrypanum schaudini*. (15).

Bray e Lainson em 1965, conscientes da existência de uma reação do grupo entre o *Trypanosomatidae*, investigaram a possibilidade de haver uma variação antigênica entre as espécies de *Leishmanias* que pudessem ser diferenciadas pela diluição seriada dos anticorpos. Testaram 10 cepas diferentes de *Leishmania* como antígeno, 2 cêpas pertencentes ao grupo da *Leishmaniose visceral indiana (L. donovani)*; 1 cêpa da *Leishmaniose visceral da Europa (L. infantum)* e 1 cêpa da *Leishmaniose visceral do Novo Mundo (L. chagasi)*; do grupo das *Leishmanioses cutâneas*, usaram como antígeno 6 cêpas: 1 de *L. trópica*, 3 cêpas do Complexo Mexicano e 2 cêpas do Complexo Brasileiro, segundo o novo conceito taxonômico (5, 10). Eles verificaram que as reações são comuns, neste gênero, mas que as reações homólogas eram invariavelmente mais fortes ou tão fortes quanto as mais fortes da série.

Verificaram ainda, que o antisoro humano era 10 vezes mais ativo com antígeno de forma promastigota do que para a amastigota. As falsas reações foram observadas no máximo na diluição 1/25 com antígeno promastigota e 1/5 com o amastigota.

Mayrink e cols. em 1967, obtiveram bons resultados em 18 casos de Calazar, com antígenos promastigotas de *L. donovani* (11).

Araújo e Mayrink em 1968, obtiveram reações positivas com títulos altos em pacientes de Calazar com antígeno homólogo e verificaram reações cruzadas com antígenos de *L. brasiliensis* com o soro sem diluir, ou a 1/10, 2 e 1 caso respectivamente (1).

Quilici e cols. em 1968, usando o antígeno homólogo, formas promastigota, em 6 casos seguramente de Calazar, obtiveram resultados positivos na diluição de 1/100 no mínimo, e em um dos soros o título de 1/1600. Admitem a reação de imunofluorescência como uma técnica viável para o diagnóstico e o título de 1/100 como bastante específico (14).

Em 1969 Guimarães e cols. usando como antígeno formas de cultura de *T. cruzi*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *L. enrietti*, confirmaram que a reação de imunofluorescência é de grupo. Admitem que a técnica não se presta para o diagnóstico genérico da família *Trypanosomatidae*, embora reações de títulos mais altos sejam obtidos com antígenos homólogos (9a).

Camargo e Rebonato (1969) verificaram a possibilidade de diferenciar os soros de *Tripanosomoses* e *Leishmanioses*, por absorção específica e desenvolveram uma técnica de inibição da fluorescência (6).

Truong e cols. (1969), com antígenos homólogos de formas amastigota dão como reações específicas títulos superiores a 1/20 no Calazar. Referem-se também à diminuição evolutiva dos títulos da reação de imunofluorescência não precisando a constância do fenômeno nem o tempo necessá-

rio ao desaparecimento da reação (17).

Chiari (1971) usando como antígeno formas promastigotas de *L. chagasi*, experimentou 10 soros de Calazar obtendo 100% de positividade com títulos iguais ou superiores a 1/45, dentre estes, 3 com títulos 1/440. Na oportunidade observou reações cruzadas empregando o antígeno de *L. brasiliensis* que revelou 8 casos positivos com títulos similares e também com o antígeno de *T. cruzi* que evidenciou 7 casos positivos com título 1/45 a 1/720 (7).

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Antígenos:

*Leishmania donovani* — Cêpa provinda do Instituto de Medicina Tropical de Portugal, oriunda de Londres. Foi usada a forma promastigota de cultura de 7 dias em meio de Ducrey, após removidas e lavadas por três vezes em solução tamponada, resuspensas em tampão fosfato pH 7,2 e distribuídas em lâminas finas, marcadas industrialmente na média de 10 a 15 parasitas por campo.

*Leishmania brasiliensis* — Cêpa MT, recentemente isolada no Instituto de Patologia Tropical da UFGO. O antígeno foi preparado do modo anterior.

*Leishmania mexicana* — Cêpa provinda do Instituto de Ciências Biológicas de Minas Gerais e mantida por passagem em camundongos — swss. O antígeno se constituiu de impressão dos

cortes da lesão que permitiu a obtenção de amostras com várias formas amastigotas, ou da suspensão das células em tampão fosfato.

“Leptomas” pessoal — Cêpa princeps isolada no Instituto de Patologia Tropical da UFGO., mantida em meio de Ducrey. O antígeno se constituiu de formas de cultura de 3 dias, preparado do mesmo modo que a *L. brasiliensis* e *L. donovani*.

Até o uso das lâminas foram mantidas em lotes de 8, envolvidas em papel tipo Yes, individualmente, e o lote em papel de alumínio, guardadas a menos 20°C em câmara com sílica gel.

##### Sôros empregados:

1 — Sôro de 10 pacientes de Calazar, num total de 6 amostras colhidas evolutivamente, na Enfermaria do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical (Hospital das Clínicas) e mantidos à 4°C na soroteca do Departamento até o seu uso.

2 — Sôros Testemunhas — constituído de 100 sôros, divididos em 5 grupos de 20 — das seguintes doenças: Blastomicose Sul-Americana, Tuberculose, Doenças de Chagas, Esquistossomose e Pênfigo.

39 sôros de pacientes com *Leishmaniose tegumentar* com lesão da pele.

Todos os sôros testemunhas foram examinados inicialmente, sem diluir e depois os positivos na diluição até 1/160, com cada um dos antígenos, a exceção dos sôros de *Leishmaniose tegumen-*

tar que não foram testados com o antígeno de *L. mexicana*.

#### Reação de Imunofluorescência Indireta:

Foi realizada pela técnica clássica e conforme padronização em nosso serviço.

#### Conjugados Empregados:

As antigama globulinas marcadas com IgG e IgM usadas neste trabalho, foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Pesquisas do Laboratório Wellcome. Também usamos anti IgM marcado com fluoresceína preparado no Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo.

### RESULTADOS

Os resultados dos sôros testemunhas, acham-se resumidos na Tabela I.

O gráfico da fig. 8, expõe a média dos títulos de anticorpos ocorrentes nas diversas amostras agrupadas cronológica e sucessivamente.

As reações com antigama marcadas com fluoresceína do tipo IgM não evidenciaram anticorpos presentes mesmo em diluição a 1/2.

Os resultados dos sôros de Leishmaniose tegumentar encontram-se na tabela IV.

### COMENTÁRIOS

Em nosso experimento, podemos verificar que no Calazar existe uma diminuição progressiva dos títulos de anticorpos circulantes imunofluorescente do tipo IgG.

TABELA I

TÍTULOS DE ANTICORPOS FLUORESCENTES PARA CALAZAR COM ANTÍGENOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS ( 60 amostras de 10 casos ).

Nº DE SOROS TESTADOS.	ANTÍGENOS	R E S U L T A D O S						NEGA TIVO	SENSI-BILIDADE
		1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640		
60	<i>L. donovani</i>	2	18	21	16	2	1	0	96,66%
	<i>L. brasiliens.</i>	26	19	3	0	0	0	12	36,66%
	<i>Lep. pessoai</i>	15	24	17	4	0	0	0	58,33%
	<i>L. mexicana</i>	15	0	0	0	0	0	45	0%

Os resultados dos sôros de Calazar estudados com os diversos antígenos pelo emprego de antigama IgG, encontram-se esquematizados nas tabelas I e II e expressos com detalhes, evolutivamente nas figs. 1 a 7.

Esta evolução dos títulos de anticorpos, embora detectada por todos os antígenos empregados, é melhor acompanhada, por ser mais regularmente distribuído, quando se emprega o antígeno homólogo, conforme se pode

TABELA II

FREQUÊNCIA DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS FLUORESCENTES COM SOROS DE PACIENTES COM D. CHAGAS, TUBERCULOSE, PÊNFIGO, ESQUISTOSSOMOSE E PARACOCCIDIOIDÍASE ( B.S.A.) COM ANTÍGENOS DE L. donovani , L. brasiliensis, L. pessoai e L. mexicana .

DOENÇAS	Nº DE SORO	A N T Í G E N O S																			
		L. p.					L.b.					L.d.					L.m.				
		1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80
CHAGAS	20	9	4	2	0	0	13	2	0	0	0	5	1	1	1	0	3	3	2	0	0
TUBERCULOSE	20	4	2	1	0	0	4	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
PÊNFIGO	20	7	4	0	0	0	4	2	0	0	0	4	2	2	1	1	2	1	0	0	0
ESQUISTOS .	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B.S.A.	20	3	1	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0
T O T A L		23	11	3	0	0	23	7	0	0	0	12	6	5	3	2	6	5	2	0	0

L.p. - Leptomonas pessoai ; L.b. - Leishmania brasiliensis ; L.d. - Leishmania donovani;

L.m. - Leishmania mexicana.

TABELA III

SINOPSE DOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA COM SOROS DE CALAZAR COM ANTÍGENOS DE "LEPTOMONAS" pessoai, LEISHMANIA donovani, LEISHMANIA brasiliensis e LEISHMANIA mexicana.

ANTÍGENOS SÉRUMOS SOROS	TÍTULOS OBSERVADOS COM OS ANTÍGENOS																																							
	LEISHMANIA donovani										LEISHMANIA brasiliensis										"LEPTOMONAS" pessoai										LEISHMANIA mexicana									
	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109
1	640	640	160	160	160	80	80	-	-	-	80	80	80	40	40	40	20	-	-	-	160	160	160	160	80	80	80	-	-	-	20	20	20	10	10	10	5	-	-	-
2	160	160	160	80	40	40	40	40	20	20	20	20	20	20	10	10	10	N	N	N	80	80	80	80	40	40	40	40	20	20	10	10	10	5	5	5	5	N	N	N
3	80	80	80	40							40	40	20	20							80	80	80	40							5	5	N	N						
4	160	160	80	80							20	10	10	5							40	40	20	20							10	10	5	5						
5	160	160	160	80	40	40					40	40	40	20	20	20					40	40	40	40	20	20					20	20	10	10	5	5				
6	160	160	80	80	80	80	80	40	40	40	40	40	40	40	20	20	20	20	10	10	80	80	80	40	40	40	40	20	20	20	20	20	20	20	10	10	10	5	5	
7	160	160	160	80	80	80	40	40	40	40	40	40	40	40	40	20	20	20	20	20	80	80	80	80	40	40	40	40	20	20	20	20	20	20	10	10	10	5	5	
8	80	80	40								20	20	10								40	40	20								10	10	5							
9	40	40	20								20	20	10								40	20	20								5	5	5							
10	80	80	40								40	40	20								40	40	20								10	10	10							

observar na figura 8, onde se expressa em termos médios este fenômeno.

De fato, quando se analisa os títulos das reações, efetuadas com antígeno homólogo, representados pelas recíprocas das diluições, verifica-se que as primeiras amostras revelaram sempre títulos mais elevados: 1 caso com 320, 5 casos com 160, 3 casos com 80, apenas 1 paciente tinha o título de 40. A partir da 3ª. semana de

anticorpos específicos desta natureza, mesmo naqueles casos iniciais ou em surto de reagudização fossem os sôros testados em baixa diluição ou mesmo concentrados.

Quanto à sensibilidade dos antígenos, verificamos que a partir da diluição 1/20 a *L. brasiliensis* não deu falsas reações positivas; a *L. pessoai* deu 3% e a *L. donovani* 10%.

A partir da diluição 1/40, so-

TABELA IV

Títulos das reações de I.F. indireta com antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi* em 2 grupos de pacientes crônicos e recentes de *L. tegumentar*

Forma Clínica Antígenos Títulos	Crônicos (11 casos)				(28 casos) Recentes				Total
	L.p	L.b	L.d	T.c	L.p	L.b	L.d	T.c	
1/20	1	1	3	3	6	8	8	8	38
1/40	1	2	0	1	6	2	1	0	13
1/80	1	2	0	0	4	2	1	0	10
1/160	5	0	1	0	6	1	1	0	14
<b>T O T A L</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>75</b>

tratamento, os títulos começaram a baixar e em torno da 10ª. semana, alcançaram os títulos de 20 em 1 caso e 40 em 2 casos. nos 3 casos observados mais longamente (tabela III).

Muito embora tivéssemos observado, através de dosagem evolutivas de IgM, o seu aumento no sôro destes pacientes de Calazar em muitas amostras, e até sua possível conotação com as taxas de precipitinas específicas presentes (13) não fomos capazes de detectar pela imunofluorescência,

mente a *L. donovani* deu 5% de falsas positivas. Estas reações ocorreram com soros de um paciente de Doença de Chagas, dois de Blastomicose Sul-Americana e dois de Pênfigo foliceo; doenças que frequentemente, se associam à Doença de Chagas, pois as áreas endêmicas são comuns.

Nesses títulos o antígeno de *L. mexicana* forma amastigota, revelou apenas 2 falsas reações positivas a 1/20. Também em diluição mais baixa 1/10 ou em soros sem diluir, seu índice de es-

TABELA V

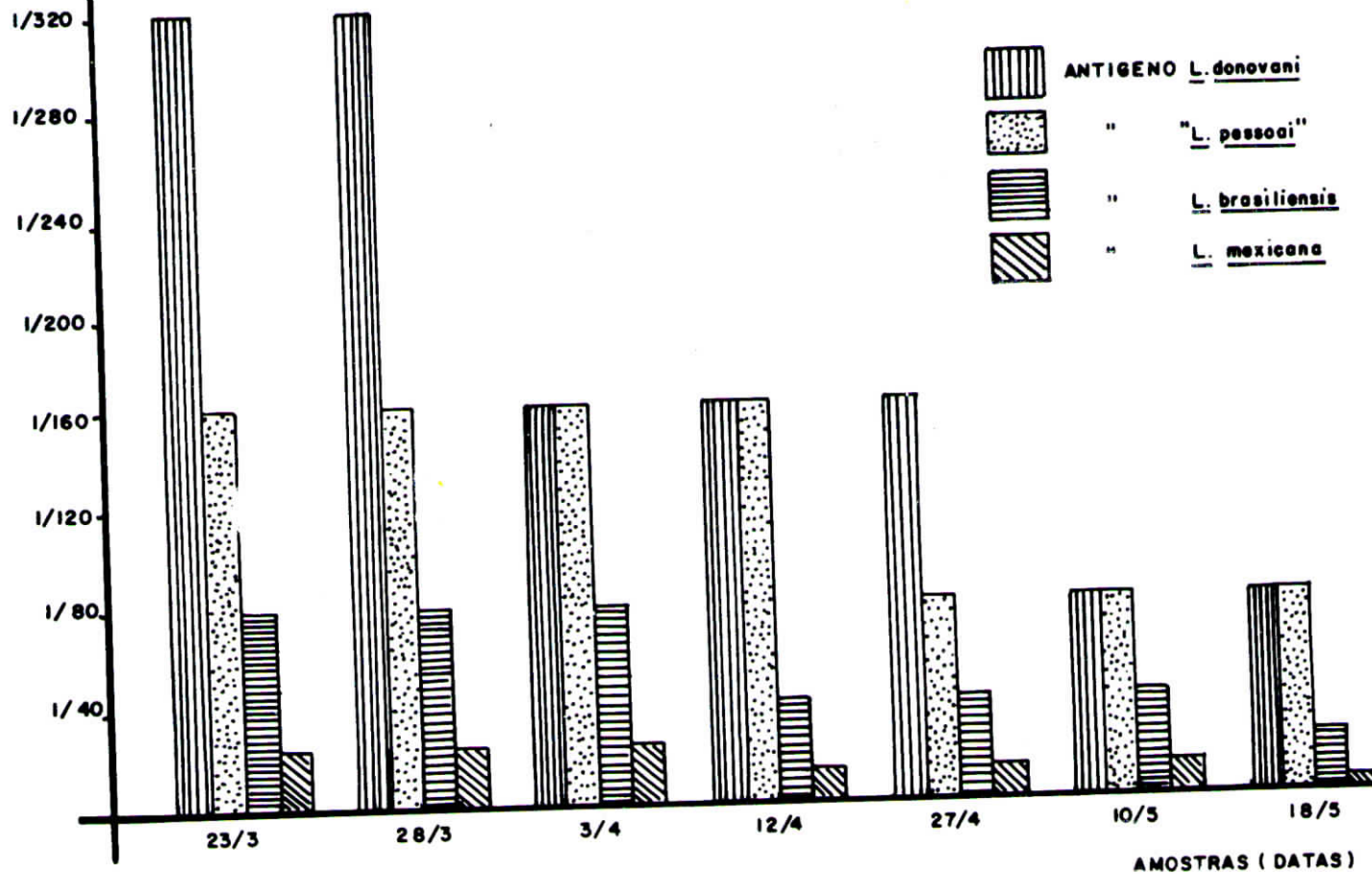
Resultado das reações de imunofluorescência indireta em 32 pacientes de Leishmaniose tegumentar, com antígenos de *L. pessoal*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi*.

Pacientes	Títulos observados com os antígenos				Total de Pacientes
	L.p.	L.b.	L.d.	T.c.	
1	40				6
2	40				
3	20				
4	40				
5	20				
6	40				
7	160	20			6
8	160	80			
9	40	40			
10	160	80			
11	160	20			
12	80	20			
13	20		40		3
14	160		160		
15	20		20		
16	20	20	20		5
17	160	40	20		
18	80	80	20		
19	160	80	80		
20	40	20	20		
21	20	20	20	20	
22	80	20	20	20	6
23	160	40	20	40	
24	160	20	20	20	
25	160	160	160	20	
26	20	20	20	20	
27	80		20	20	
28	80	40		20	1
29	160			20	2
30	40			20	
31				20	2
32				20	

Leishmaniose tegumentar, com antígenos de *L. pessoal*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi*.

Estudo evolutivo de Anticorpos Imnofluorescentes no Calazar contra os Antigenos de: Leishmânia donovani, "Leptomonas pessoai", Leishmânia / brasiliensis e Leishmânia mexicana.

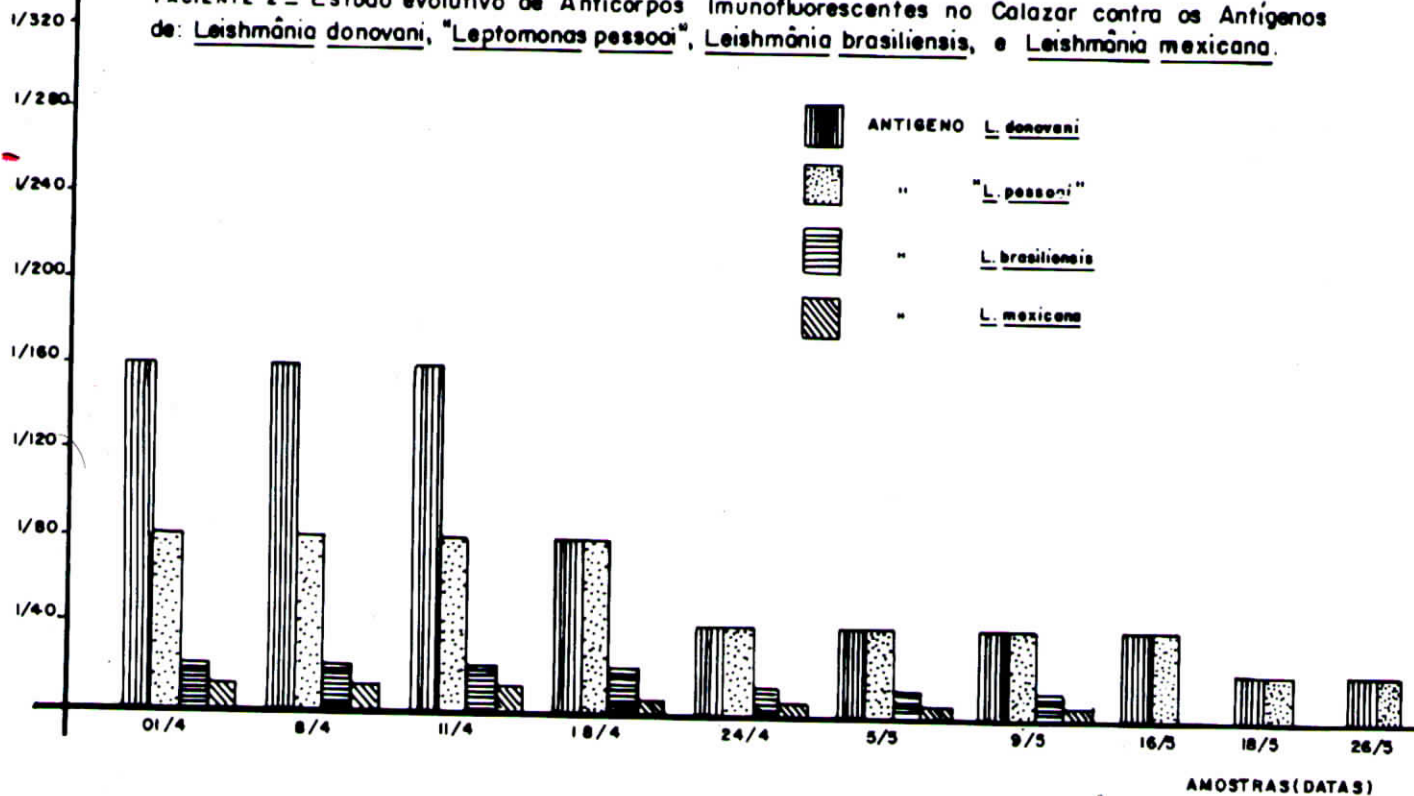
TITULOS PACIENTE I





TITULOS

PACIENTE 2 - Estudo evolutivo de Anticorpos Imunofluorescentes no Calazar contra os Antígenos de: Leishmânia donovani, "Leptomonas pessoai", Leishmânia brasiliensis, e Leishmânia mexicana.



TÍTULOS

1/320

1/280

1/240

1/200

1/160

1/120

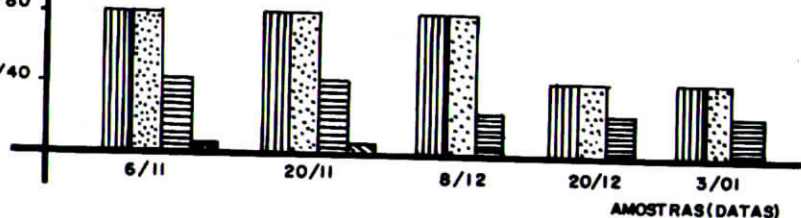
1/80

1/40

Estudo evolutivo de Anticorpos Imunofluorescentes no Calazar, contra os Antígenos de: Leishmânia donovani, "Leptomonas pessoai", Leishmânia brasiliensis e / Leishmânia mexicana.

PACIENTE 3

ANTÍGENO L. donovani  
 " "L. pessoai"  
 " "L. brasiliensis"  
 " "L. mexicana"



AMOSTRAS (DATAS)

TÍTULOS

1/320

1/280

1/240

1/200

1/160

1/120

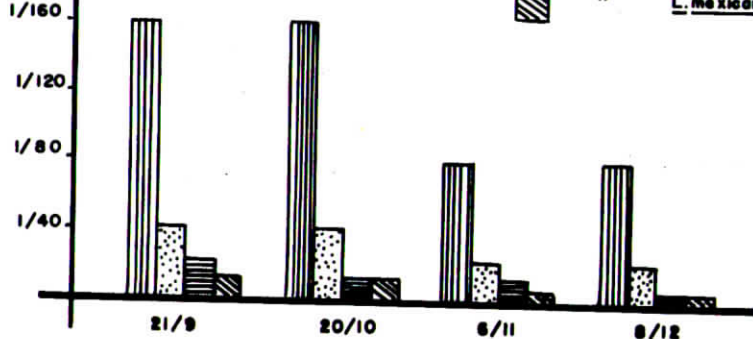
1/80

1/40

Estudo evolutivo de Anticorpos Imunofluorescentes no Calazar, contra os Antígenos de: Leishmânia donovani, "Leptomonas pessoai", Leishmânia brasiliensis e / Leishmânia mexicana.

PACIENTE 4

ANTÍGENO L. donovani  
 " "L. pessoai"  
 " "L. brasiliensis"  
 " "L. mexicana"



AMOSTRAS (DATAS)

TITULOS

1/320

1/280

1/240

1/200

1/160

1/120

1/80

1/40

Paciente 5

Estudo evolutivo de Anticorpos Imunofluorescentes no Calazar contra os Antigenos de:

Leishmânia donovani, "Leptomonas pessoai",  
Leishmânia brasiliensis, Leishmânia mexicana.



ANTIGENO L. donovani



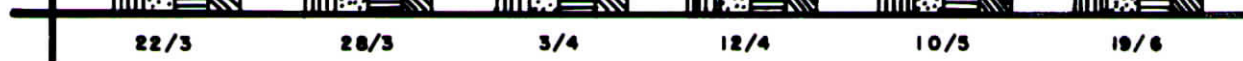
" "L. pessoai"



" "L. brasiliensis



" "L. mexicana



AMOSTRAS (DATAS)



TITULOS

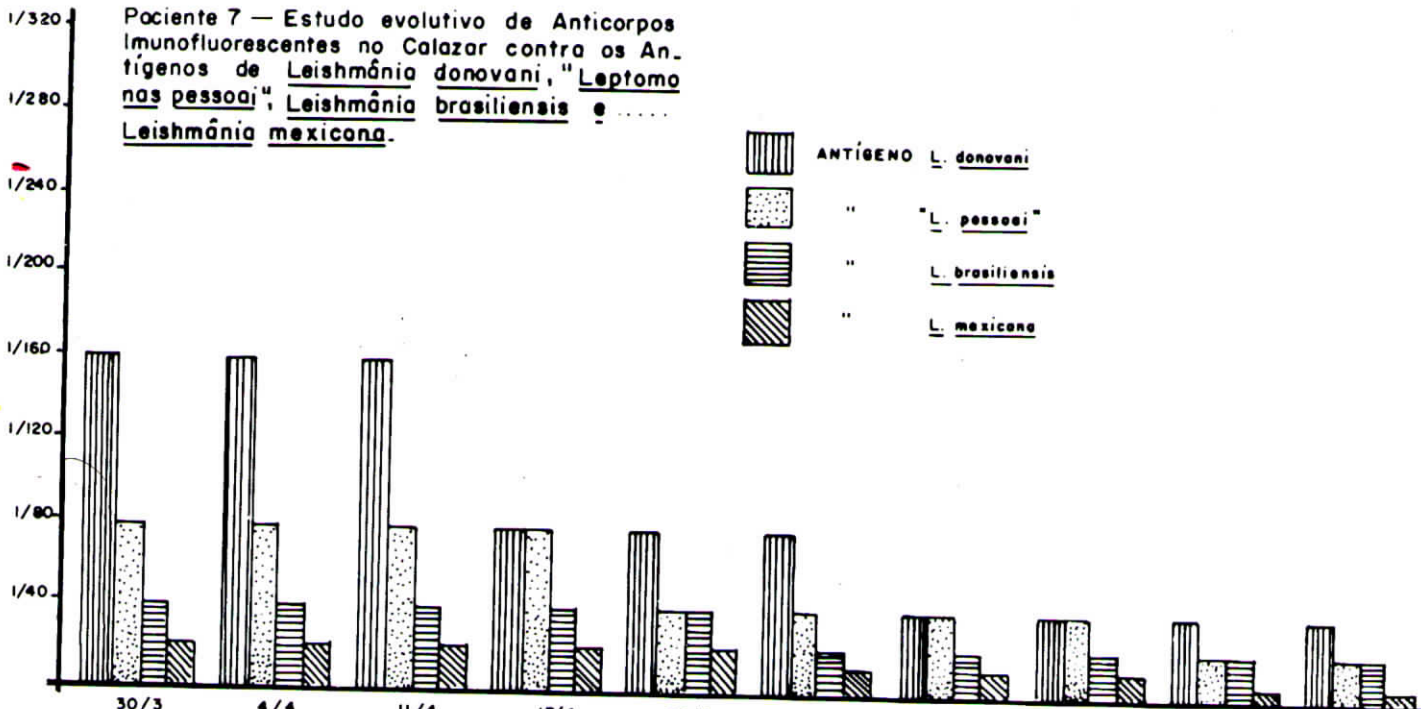
1/320  
1/280  
1/240  
1/200  
1/160  
1/120  
1/80  
1/40

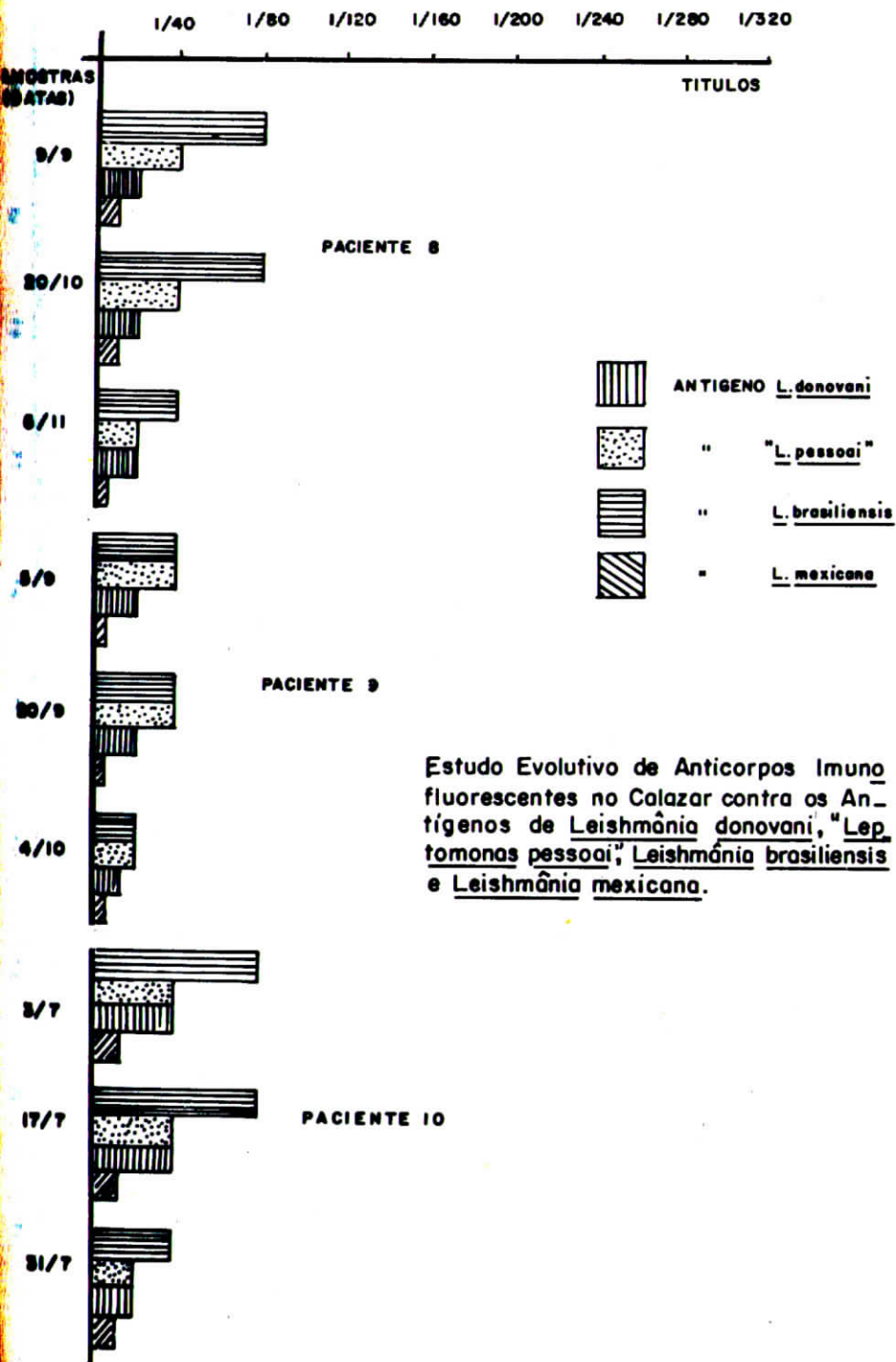
Paciente 7 — Estudo evolutivo de Anticorpos  
Imunofluorescentes no Calazar contra os An-  
tígenos de Leishmânia donovani, "Leptomo-  
nas pessoai", Leishmânia brasiliensis e .....  
Leishmânia mexicana.

ANTÍGENO L. donovani  
" "L. pessoai"  
" "L. brasiliensis"  
" "L. mexicana"

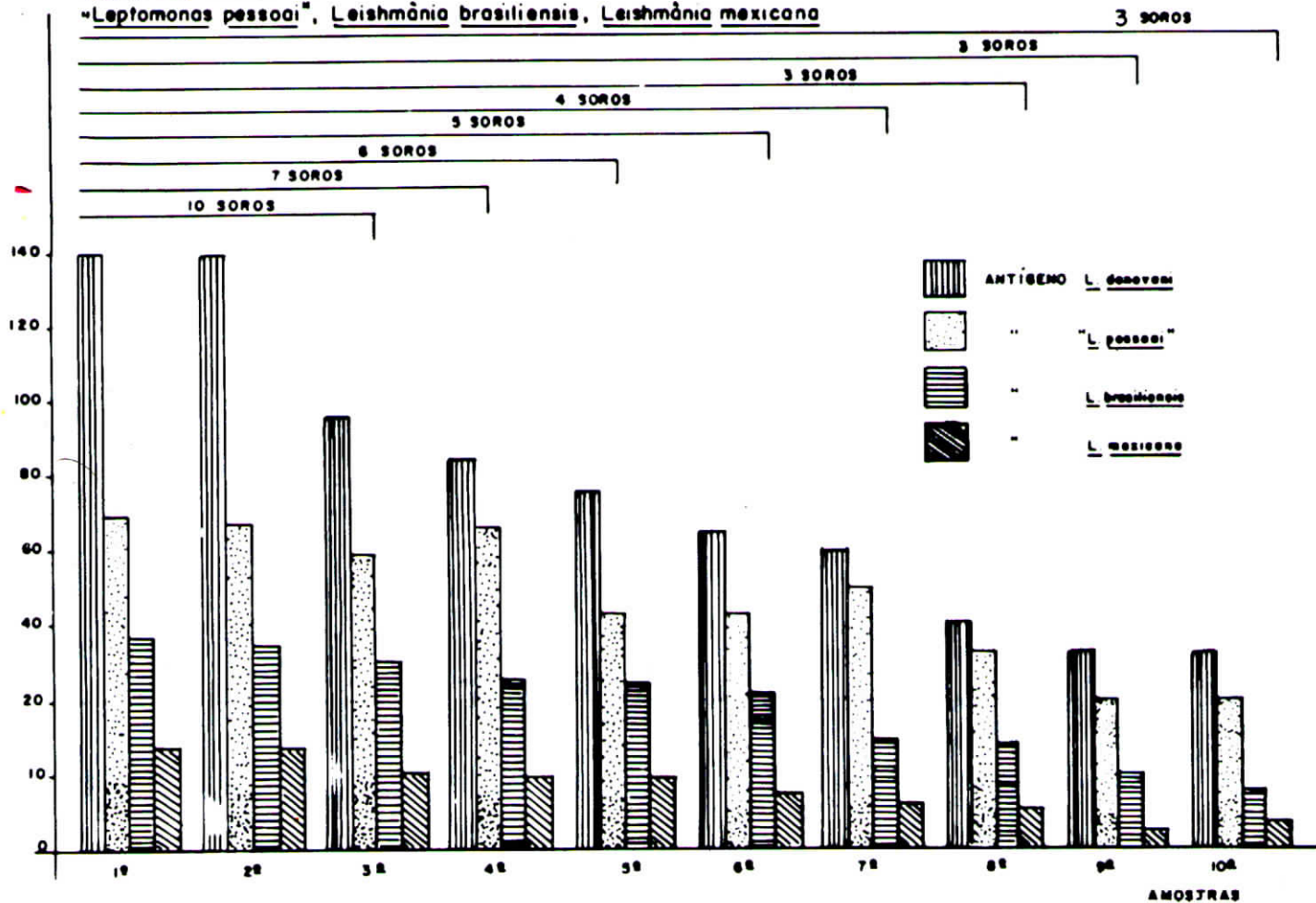
30/3 4/4 11/4 17/4 24/4 30/4 8/5 16/5 23/5 30/5

AMOSTRAS (DATAS)





Média dos Títulos de Anticorpos Imunofluorescentes no Calazar contra os Antígenos: Leishmânia donovani,  
 «Leptomonas pessoai», Leishmânia brasiliensis, Leishmânia mexicana



pecificidade foi da ordem de 94 e 96% respectivamente.

Quanto à sensibilidade dos antígenos observamos que a *L. donovani* revelou 58 de 60 soros (96,66%) com títulos iguais ou superiores a 40, enquanto que *L. brasiliensis* revelou apenas 22 em 60 (36,66%) com esses títulos, a *L. pessoai* 35 em 60 (58,33%) e a *L. mexicana* nenhum (0%). Aliás quanto a este antígeno, é digno de nota que ele se mostra sem nenhuma sensibilidade quando analisado sob os mesmos parâmetros dos antígenos anteriores, isto é, considerando a positividade específica somente em diluições iguais ou superiores a 1/40. No entanto, se o analisarmos, baixando o limiar da especificidade, verificamos que ele se comportou de maneira similar aos outros antígenos usados no experimento.

O fato dos antígenos de forma amastigota, de maneira geral, evidenciar os anticorpos, em títulos baixos, já havia sido verificado por Bray e Laison em 1965. (5)

Recentemente, Convit e Pinar-di admitiram que formas amastigotas de *L. pifanoi* (do Complexo Mexicano) ainda que absolutamente específicas, não dando reações falsas com soros controles nas diluições a 1/5, geralmente reagem a títulos baixos com imune soros específicos, se prestando ao estudo imunológico evolutivo da Leishmaniose tegumentar, mas não para seu diagnóstico. (8)

Opinião similar a este respeito é a de Walton (1972) que trabalhando com formas amastigotas de cultura de tecidos de *L. brasiliensis* (do Panamá) verificou es-

pecificidade da ordem de 93%, com títulos máximos de 8 e sensibilidade de 89% em 75 pacientes. (18).

Reportando-se aos 39 soros de pacientes de Leishmaniose tegumentar, verificamos que o antígeno de *L. donovani* reagiu em títulos significativos, 40 ou maior, com 4 dentre os 39 (10,25%); o de *L. pessoai* com 23 em 39, (58,97%); o de *L. brasiliensis* com 10 em 39 (25,64%) o de *L. mexicana* com nenhum, 0 em 39, (0%).

Estes resultados, quando comparados aos obtidos com os mesmos antígenos, frente a soros de pacientes com Calazar, parecem indicar que a técnica de imunofluorescência indireta, no sistema Calazar, (usando-se como antígeno figurado a forma promastigota de *L. donovani*) se comporta com bastante sensibilidade (96,66%) e adequada especificidade (95%). Ao contrário, no sistema Leishmaniose tegumentar o antígeno homólogo revela apenas 25,64% de positividade, percentual menor do que o alcançado neste experimento com este antígeno frente a soros de Calazar, 22 em 60 (36,66%). (2)

Este fato, a primeira vista, ressalta de maneira inequívoca o valor da técnica de imunofluorescência indireta no Calazar com o emprego do antígeno homólogo e, aparentemente, demonstra a sua ineficiência no sistema Leishmaniose tegumentar. Se levamos em conta todavia que soros testemunhas normais ou de outras doenças em diluições inferiores a 1/20 dão apenas 3 a 5% de reações falsas positivas frente a estes



antígenos figurados e não reatores a 1/20, concluímos pela possibilidade do emprego da reação, tomando como diluição específica a de 1/20. Mesmo assim, ficou evidenciada a pobreza dos resultados, da técnica no sistema Leishmaniose tegumentar com o antígeno de *L. brasiliensis* cuja sensibilidade foi apenas de 4% (tabela V).

Esses dados vieram, no entanto, valorizar o emprego do antígeno heterólogo de tripanosomatídeo monoxênico a *L. pessoai* que nestes parâmetros revelaram 77% de sensibilidade. Falta-lhe contudo a adequada especificidade, pois como já vimos, mesmo em diluição 1/40, este antígeno revelou 35 em 60 soros de Calazar (58,33%). Confirmando sua comunidade antigênica, anteriormente, demonstrada (2 e 16).

Contrariamente, às observações de Quilici e cols. (14) em relação aos antígenos *S. oncopelti* e *S. faciculata*, experimentados na reação de imunofluorescência e fixação de complemento, a *L. pessoai* é capaz de revelar soros específicos de títulos baixos e mesmo isoladamente no sistema Leishmaniose tegumentar. Daí se concluir pela possibilidade e, interesse do uso da reação de imunofluorescência para diagnóstico e controle evolutivo da Leishmaniose tegumentar empregando-se a *L. pessoai*, só ou paralelamente ao antígeno homólogo.

#### SUMMARY

PROGRESSIVE STUDY IMMUNOFLUORESCENTS ANTIBODIES AGAINST ANTIGENS OF: LEISH-

*MANIA donovani*, "LEPTOMONAS" *peessoai*, *LEISHMANIA brasiliensis* AND *LEISHMANIA mexicana*.

6 sera from ten patients known to be Calazar, confirmed parasitologically were studied progressively by the reaction of indirect immunofluorescence, in our experiment we used four types of antigens: homologous antigen and heterologous antigens: "Leptomonas" *peessoai*, *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania mexicana*.

We used one hundred sera of various diseases, such as: South American Blastomycosis, Chagas disease and Pemphigus as witness, 20 sera of each.

Será of 39 patients of tegumentar leishmaniasis were studied with the antigens of *L. brasiliensis*, *L. donovani* and "Leptomonas" *peessoai*.

The false positive reactions (titer over 20) occurred only with antigen of *L. donovani* in the witness groups.

The homologous antigen showed itself to be more specific, as well as it detected the higher titers.

During the study of the disease there were a progressive fall in antibodies but never the total disappearance of the same.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, F. G. & MAYRINK, W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I. Studies on the specificity of the test. Rev. Pat. Trop. São Paulo, 10: 41-45, 1968.
2. BARBOSA, W.; ALMEIDA, M.; LEÃO, D. A. & SOUZA, M. C. M. — Imunologia da Leishmaniose Tegumentar Americana — II. Imunofluorescência indireta com antígenos de "Leptomonas" *peessoai*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania donovani*, e *T. cruzi*. Rev. Pat. Trop. 1: 403-414, 1972.
3. BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; RASSI, D. M.; OLIVEIRA, R. L. & MOTA, L. — Imunologia da Leishmaniose Tegumentar — I.: Intradermo reação concomitante com antígenos *L. pessoai* e *L. brasiliensis*. Rev. Pat. Trop. 1: 377-383, 1972.
4. BITTENCOURT, A. C.; SODRÉ, A. & ANDRADE, Z. A. — Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na Leishmaniose tegumentar. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10: 247-252, 1968.
5. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. Trans. Roy. Soc.

- Trop. Med. Hyg. 59: (5), 1965.
6. CAMARGO, M. E. — Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18: 500-505.
7. CHIARI, C. A. — Pesquisas de anticorpos circulantes na leishmaniose tegumentar americana pela reação de imunofluorescência indireta. Tese de mestrado. I.C.B. da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1971.
8. CONVIT, J. & PINARDI, M. E. — Applying the indirect immunofluorescence test to the study of american cutaneous leishmaniasis. Dermat. Intern. 17-20, 1969.
9. DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13: 525-529, 1964.
- 9a. GUIMARÃES, N. F., LAGE, H. A., VENANCIO, J. A. & GRIMBERG, 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*. O Hospital, 75(5): 299-313.
10. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — Leishmaniasis of the new world: Taxonomic problems. Br. Med. Bull. 28: 44, 1972.
11. MAYRINK, W.; ARAÚJO, F. G. & MAGALHÃES, A. — Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II. Sensibility of the test. — Rev. Med. Trop. São Paulo, 9: 172-174, 1967.
12. ODDO, F. G. & CASSIO, G. — II. Test de immunofluorescence nelle leishmaniosi viscerali e cutanea. Rev. Inst. Seroter. Ital. 38: 138-145, 1963.
13. PINHEIRO, Z. B.; OLIVEIRA, O. S. & BARBOSA, W. — Reações de Imunoprecipitação em gel aplicadas ao estudo do Calazar. Rev. Pat. Trop. 3: (2), 153-171, 1974.
14. QUILICI, M.; DUNAN, S. & RANQUE, J. — L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la reaction de fixation du complement. Med. Tropicale, 28: 38-43, 1968.
15. SHAW, J. J. & VOLLER, A. — The detection of circulating antibody to Calazar by means of immunofluorescent techniques. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 58: 349-352, 1964.
16. SOUZA, M. C. M. & BARBOSA, W. — Immunological relationship between "Leptomonas" *peessoai* (Strain principles) *C. fasciculata*, *L. brasiliensis* and *T. cruzi*. By the agar gel diffusion technique previous note. Rev. Pat. Trop. 1: 415-419, 1972.
17. TRUONG, T.; AMBROISE-THOMAS, P.; QUILICE, M.; DUNAN, S. & RANQUE, J. — Diagnostic serologique des leishmanioses par immunofluorescence sur coupes de fôis ou de pates de hamsters infectés avec leishmania donovani. Bull. Soc. Exot. 62: 1077-1084, 1969.
18. WALTON, C. B.; BROOKS, W. H. & ARJOANA, I. — Serodiagnosis of American Leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 296-299, 1972.