

REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA EM ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL (CALAZAR) HUMANA

Paulo Rocha de Pádua Júnior (Bolsista PIBIC/CNPq), Carlos Henrique Nery Costa (Orientador, Departamento de Medicina Comunitária CCS/UFPI), Humberto Feitosa Pereira (Colaborador, UFPI).

Introdução

O calazar é uma síndrome que se caracteriza pelo comprometimento do sistema reticulo-endotelial. Dessa forma, os sinais e sintomas da doença plenamente manifesta são mais pronunciados no fígado, baço e medula óssea. Se o diagnóstico não for feito inicialmente e o tratamento adequado iniciado, essa doença pode ser fatal.

A LV é uma doença cuja pesquisa avançou pouco nas últimas décadas, provavelmente por duas razões principais: primeiro, por ser doença negligenciada, que prevê pequeno retorno comercial ao investimento em pesquisa e desenvolvimento; e segundo, pela complexidade biológica própria da infecção. Dessa forma, há uma carência de estudos visando o aperfeiçoamento do diagnóstico em tempo ágil e com menor complexidade.

Sendo assim, este estudo tem o objetivo de aprimorar o diagnóstico de leishmaniose visceral humana com uso de reações de imunofluorescência em esfregaços de medula óssea e avaliar as vantagens e as limitações deste método proposto com a pesquisa direta do protozoário na medula óssea e com a reação de imunofluorescência indireta tradicional, buscando, desta forma, padronizar um método acurado, de baixo custo financeiro, de rápida realização e fácil reprodução em outros centros.

Metodologia

O estudo foi realizado no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP no município de Teresina - PI, no período de agosto de 2011 a julho de 2012. Foram convidados a participar do estudo, pacientes de qualquer idade e sexo com a suspeita diagnóstica de calazar na internação e que tenha se submetido à punção de medula óssea, sendo, depois, o diagnóstico confirmado pelo exame parasitológico direto e/ou cultura. Os pacientes que tiveram a suspeita de LV excluída ou com diagnóstico confirmado para outra patologia foram excluídos do trabalho.

Trata-se de estudo transversal e analítico no qual se realizou o estudo de colorações com imunofluorescência em aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral. Foram realizados cinco testes de imunofluorescências: 1) Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tradicional que utiliza como antígeno formas promastigotas isoladas adicionando soro do próprio paciente em diferentes diluições; 2) Coloração com imunofluorescência do aspirado de medula óssea, que contém formas amastigotas, com soro do próprio paciente; 3) Coloração com imunofluorescência do aspirado de medula óssea com soro de outro paciente já sabidamente positivo (controle positivo); 4) Coloração com imunofluorescência do aspirado de medula óssea com soro controle negativo; 5) Coloração com imunofluorescência do aspirado sem adicionar o soro do paciente para testarmos a hipótese de que as formas amastigotas na medula óssea já estejam

ligadas ao anticorpo anti-leishmania humano. Além disso, realizou-se a coloração com panótico, de acordo com o método de Romanowski, para pesquisa direta do protozoário no esfregaço do aspirado de medula óssea de cada paciente para posteriores comparações entre os resultados obtidos em cada método.

A análise das lâminas foi realizada mediante observação da fluorescência em torno das formas parasitárias presentes nas lâminas contendo, ou as formas promastigotas isoladas, no caso da RIFI tradicional; ou formas amastigotas no aspirado de medula óssea, nos outros testes, ao microscópio de imunofluorescência do próprio hospital. Utilizou-se uma diluição de 1:150 do corante Azul de Evans conjugado ao anticorpo anti-humano para as reações de acordo com o manual de teste de RIFI da FIOCRUZ / Bio-Manguinhos. Como controle positivo utilizou-se o soro de paciente sabidamente positivo para leishmaniose visceral. Como controle negativo utilizou-se o soro de uma pessoa saudável da mesma região endêmica. A análise das lâminas de esfregaço de medula óssea, corado pelo método Romanowski e analisada em microscópio simples, é realizada de rotina pelos técnicos do laboratório do Instituto de Doenças Tropicais.

Resultados e Discussão:

Ao todo, foram convidados 82 pacientes que se submeteram ao procedimento de aspirado de medula óssea no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela para participarem da pesquisa, dos quais 76 concordaram e, destes, somente de 71 conseguiu-se aspirar quantidade suficiente para a confecção das lâminas.

Dentre os pacientes selecionados, 18 foram excluídos por não terem amostras de sangue colhidas pelo laboratório de pesquisas do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela por motivos diversos, restando apenas 53 pacientes dentro dos critérios de inclusão para a pesquisa.

Deste seletivo grupo, 29 pacientes obtiveram a confirmação diagnóstica para leishmaniose visceral (LV) por métodos diretos (pesquisa direta e/ou cultura) e 24 tiveram a hipótese de calazar excluída.

A média de idade foi de 27,2 anos variando entre 1 e 68 anos. Com relação ao sexo, 44 (83%) foram do sexo masculino e 9 (17%) do sexo feminino.

A presença de retrovirose foi pesquisada através do teste rápido em 26 pacientes por possuírem suspeita clínica e epidemiológica. Destes, 10 obtiveram resultado positivo. Dentre os 29 pacientes com LV, 9 eram portadores de retrovirose. Dentre os 24 sem LV, apenas um possuía retrovirose.

A pesquisa direta, considerando todos os pacientes dentro da pesquisa, obteve 79,3% de sensibilidade e 100% de especificidade, com uma acurácia de 88,7%. A cultura obteve, considerando todos os pacientes dentro da pesquisa, uma sensibilidade de 96,4%, uma especificidade de 100% e uma acurácia de 98,1%.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) possuiu, considerando todos os pacientes, uma sensibilidade de 79,3%, uma especificidade de 83,3%, uma acurácia de 81,1%. Considerando apenas os pacientes portadores de imunodeficiência adquirida pelo HIV, a sensibilidade foi de 77,8% e a especificidade e acurácia não foram possível calcular devido ao único paciente com retrovirose e não portador de LV, o resultado da RIFI ter sido positivo. Dentre os negativos e os que não foram

testados para retrovirose, a pesquisa direta possuiu uma sensibilidade de 80,0%, especificidade de 87,0% e acurácia de 83,7%.

Os testes de imunofluorescência nas lâminas de aspirado de medula óssea apresentaram resultados bastante específicos, porém a imunofluorescência muitas vezes era emitida, além das formas amastigotas de leishmania nos pacientes portadores de LV, também pelos neutrófilos, o que muitas vezes confundia e dificultava a identificação de leishmanias nas áreas vizinhas aos mesmos.

Esse fato pode ser explicado pelo anticorpo presente no soro humano ter a característica policlonal e atacar outras estruturas, principalmente, membranas de neutrófilos sensibilizados, o que prejudica a leitura após a emissão de fluorescência também por essas membranas.

Quando adicionado o soro de paciente soro positivo, o teste obteve a maior sensibilidade, quando comparado aos outros três testes de fluorescência sobre as lâminas de aspirado de medula óssea.

Quando foi acrescentada somente a solução com PBS, Azul de Evans e conjugado anti-humano, notou-se em 13 lâminas ausência de fluorescência, em 7 lâminas uma fluorescência em torno da membrana de neutrófilos, em duas lâminas a fluorescência era emitida apenas em torno das formas amastigotas e em 10 lâminas a presença concomitante de fluorescência em torno dos neutrófilos e das leishmanias.

Isso demonstra que as formas amastigotas de leishmania já se encontram ligadas ao anticorpo humano na lâmina de aspirado de medula óssea. Existe a possibilidade de elas estarem ligadas desde o interior da medula no paciente e a possibilidade delas se ligarem após a aspiração quando há maior contato das formas livres com o anticorpo presente no sangue do paciente.

Conclusão:

A cultura é um teste direto de maior sensibilidade quando comparado à pesquisa direta de aspirado de medula óssea, sendo ambos bastante específicos. A reação de imunofluorescência indireta possui uma sensibilidade menor do que os testes diretos, principalmente em pacientes portadores de HIV. Os testes com imunofluorescência sobre lâminas de aspirado de medula óssea utilizando o soro humano contendo um anticorpo policlonal, não se mostraram tão aplicáveis como rotina. Porém o teste adicionando apenas conjugado anti-humano mostrou que as formas amastigotas estão ligadas ao anticorpo humano na lâmina. Mais testes são necessários para discorrer melhor sobre essa estratégia diagnóstica.

Apoio: CNPq

Referências:

1. Badaró, R.; Duarte, M.I.S.. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi R, Focaccia R. Veronesi: Tratado de Infectologia. 4ª Ed. Atheneu, São Paulo, 2009, vol. 02.; cap. 98; pp. 1707 - 1735.
2. Silva, M.R.B.; Stewart, J.M.; Costa, C.H.N.. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2005; 72(6), pp. 811 - 814.
3. Chappuis, F.; Sundar, S.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. Microbiology, 2007; 5, pp. 873 - 882.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Imunofluorescência. Medula óssea.