

ANA LUZIA MATOS RAMOS

**ANÁLISE DO TESTE DE ELISA ANTI HIV-1 EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

FORTALEZA-CEARÁ

1996

**Dedico este trabalho à Deus -
Senhor das nossas vidas - ao
meu marido e aos meus filhos,
que inspiram e compartilham
todos os meus momentos.**

ANA LUZIA MATOS RAMOS

**ANÁLISE DO TESTE DE ELISA ANTI HIV-1
EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

ORIENTADOR: PROF. Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho

TRABALHO APRESENTADO
COMO REQUISITO FINAL DO X
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO
EM HEMATOLOGIA E HEMO-
TERAPIA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

HEMOCE

FORTALEZA - CEARÁ

1996.

AGRADECIMENTOS

- Aos pacientes que tornaram possível a realização deste estudo.
- Ao Dr. José Murilo Martins, por sua admirável dedicação ao aprimoramento acadêmico e profissional do setor de saúde em nosso estado.
- Ao Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho pela relevante ajuda e abnegação na orientação desta pesquisa.
- A Dra. Vania Barreto A.F. Gomes pelo incentivo no decorrer do curso, e revisão desse trabalho.
- Ao Prof. Dr Mário Rigatto, pela cooperação nos conhecimentos estatísticos.
- Ao corpo de professores, e em especial a Dra Vilani Franco, Dra Alana J.M. de Castro e ao Dr. Plácido de Souza Basílio.
- A técnica M^a Lúcia Nascimento Souza de Oliveira pelo apoio na realização dos testes de laboratório.
- A todos que formam o Hemoce.

SUMÁRIO

1 . INTRODUÇÃO	04
2 . OBJETIVO	11
3 . MATERIAL E MÉTODOS	11
4 . RESULTADOS	18
5 . DISCUSSÃO	28
6 . CONCLUSÃO	31
7 . SUMMARY	32
8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9 . ANEXOS	37

ANÁLISE DO TESTE DE ELISA ANTI-HIV-1 EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO

As reações falso-positivas em testes de ELISA (Enzima Linked Immuno Sorbent Assay) podem acontecer.

O presente trabalho demonstra a existência de reação cruzada no teste de ELISA anti-HIV em 33 pacientes de 0 - 15 anos com diagnóstico de calazar. Foram observados 5 casos positivos para o teste de ELISA anti-HIV na primeira reação e em 4 (12,12%) houve a permanência da positividade na segunda reação sorológica. Estes pacientes positivos apresentaram Western Blot anti-HIV negativos. Devido o estigma da infecção pelo HIV, fica imperativo, em zonas endêmicas de Leishmaniose Visceral Americana, nos pacientes que tenham apresentado ELISA, anti-HIV positivo, a realização de outro teste comprobatório do HIV (Western Blot).

INTRODUÇÃO

A leishmaniose designa um distúrbio causado pelos protozoários do gênero *Leishmania*. Interessa-nos particularmente a leishmaniose visceral Americana (LVA), que tem como agente causal a *Leishmania donovani* ou *L. donovani chagasi*. Os vetores destes parasitas são insetos voadores *Plebótomos* ou *Lutzomia*. Os principais hospedeiros destes parasitas são os cães. (2)

Os parasitas do gênero *Leishmania* foram observados por Lunningham (1885) na Índia em casas de calazar; Furth em 1891, fez observações semelhantes e propôs o nome de *sporozoa furunculosa* para as grandes células que continham os esporos. Como o nome foi dado às células que supôs ser amebas e que hoje sabemos tratar-se de células do tecido, a denominação de Firth não pode ser aceita para o protozoário. (16)

Posteriormente (1898), o cientista russo Boravsky descreveu com detalhes estes parasitas em casos de leishmaniose cutânea, sem lhes dar nomes ou estabelecer sua posição sistemática. Em 1903, Leishman reconheceu formas redondas semelhantes nos tecidos de animais infectados por *Tripanossoma*. (7). Ainda em julho de 1903, Donovan descreveu as mesmas parasitas na moléstia denominada febre Dum-dum ou Calazar. Ross (1903), porém chegou a conclusão de que esse organismo não era um esporozoário, criando para ele o gênero *Leishmania*. Laveran e Mesnil (1903) retificaram o nome do agente etiológico do Calazar para *Leishmania Chagasi*. (16). Nicole (1908) deu o nome de *Leishmania Infantum* ao parasita que produz o calazar ao mediterrâneo. Wright, em 1903, descreveu um organismo semelhante num caso de botão-do-orientes em uma criança da Síria que tinha sido levada para

Boston. Propôs o nome de *Helcosarcoma tropicum* para esse parasita. Posteriormente foi ele incluído no gênero *Leishmania*, sendo esse o nome correto do parasita do botão-do-orientes: *Leishmania Trópica* (Wright, 1903). (16)

A leishmaniose visceral, foi diagnosticada pela primeira vez na América por Migone, em 1913, em Assunção. Posteriormente foram assinalados outros casos sendo dois em 1926 (Mazza e Arias) e um em 1934 (Inda e Cols), na Argentina. Nesse ano H. Pena (do Laboratório do Serviço Nacional de Febre Amarela na Bahia) relatou os primeiros casos no Brasil encontrados pelo exame de amostras do fígado colhidas para diagnóstico da febre amarela. Foi criada no mesmo ano uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz para o estudo da etiologia e epidemiologia desta protozoose. (16,2)

Baseado nas provas sorológicas de aglutinação, Marques da Cunha e Evandro Chagas (1937) separaram a *Leishmania* causadora da L.V.A. das outras (*L. donovani*, *L. infantum*) denominando-a *L. chagasi*. Em estudos posteriores, porém o próprio Marques da Cunha (1938-1942) chegou a conclusão de que a soroaglutinação não se prestava para a separação das espécies do gênero *Leishmania*. Durante mais de vinte anos reinou a crença de que a leishmaniose visceral, em algumas regiões do Brasil era esporádica quase uma curiosidade médica no Brasil. (16)

visceral
causada

A partir de 1953 começaram a surgir um número maior de casos diagnosticados em vida, principalmente no Ceará (T. C. Aragão, Mamede e outros clínicos locais). Como se avolumasse o número de casos, o Governo Federal criou a "Campanha Contra a Leishmaniose Visceral" cuja direção entregou ao ilustre professor cearense Joaquim Eduardo Alencar, quando foram realizados estudos que muito contribuíram para o esclarecimento dos aspectos clínicos, epidemiológicas e terapêuticas do calazar neotropical, importante endemia que ainda assola vários locais do país (16).

A leishmaniose visceral americana ou calazar americano ou neotropical é uma zoonose de canídeos que se transmite ao homem pela picada das fêmeas de *Luizomia Longipalpis* - pertencente à família *Psychodidae* e à subfamília *Phebotominae* - inseto hematófago considerado seu principal vetor no Brasil. (10)

O período de transmissibilidade perdura enquanto os protozoários estiverem no sangue, onde persistem, às vezes, depois de tratamento e cura clínica. Os flebotomos tornam-se infectantes sete a nove dias após terem sugado sangue contendo *Leishmanias*, assim permanecendo durante pouco mais de trinta dias. Em função de fatores geográficos, epidemiológicos e clínicos, assim como da influência de conhecimentos acerca de transmissão, dos reservatórios animais e da Idade das pessoas acometidas, distingue-se cinco tipos de leishmaniose visceral: o indiano, o mediterrâneo, o neotropical ou americano, o do sul da União Soviética e o sudanês. O encontrado no Brasil - neotropical ou americano - tem como principais reservatórios o cão, o gato e a raposa (9,16, 22).

O diagnóstico do calazar em áreas endêmicas pode ser suspeitado quando o paciente apresenta febre irregular ou recorrente, muitas vezes com dois picos diário, leucopenia e esplenomegalia; encontrando a forma amastigota do parasita em esfregaço de aspirado medular, de baço, defigado de linfonados. (17) A punção esplênica revela alta porcentagem de positividade, mas tem uso limitado pois depende da normalidade dos fatores de coagulação e contagem de plaquetas do paciente (21). Quando o número de parasitas é relativamente baixo as múltiplas culturas, em meio N.N.N., de material do baço ou da medula óssea mostram bons resultados. (13). A inoculação do material clínico infectado em hamsters causa infecção em algumas semanas.

Os anticorpos são detectáveis em todas as formas de leishmaniose. O teste de aglutinação direta detecta o anticorpo IgM sendo mais sensível na fase aguda (7,2). O teste positivo ($>1:32$) varia de 97%, na leishmaniose visceral, para 81% L. cutânea do Novo Mundo (8).

Outros testes sorológicos, como fixação do complemento, a hemaglutinação, os ensaios ELISA imuno absorventes ligados a enzimas (ELISA) e a imunafluorescência indireta são técnicas mais eficazes no diagnóstico do parasita (1, 14). Em um trabalho de Jaffe e Zalis (1988) identificaram 2 proteínas (70 e 72 KD) que reagiram com soro de portadores de L. visceral, mas não reagiram com soro de portadores de L. cutânea nem doença de chagas. Nós encontramos reconhecimento inespecíficos de antígenos de mesmo peso molecular no soro de pacientes com outras leishmanioses.

As provas sorológicas envolvem uma reação entre antígeno e anticorpo. O soro de um paciente ou de um animal de laboratório contendo anticorpos é empregado, e daí o nome sorológico. Como as provas sorológicas são altamente específicas e bem sensíveis, elas são um valioso instrumento de pesquisa, como também um útil auxiliar no diagnóstico. Alguns métodos são mais sensíveis do que os outros, isto é, irão detectar uma quantidade menor de anticorpos ou de antígenos numa determinada amostra. Algumas provas podem ser realizadas de um modo mais rápido que outras podendo antecipar o diagnóstico (14,15, 19, 25).

Vários fatores determinam o teste sorológico a ser escolhido tais como: a quantidade de amostra (soro) a ser usada, a sensibilidade, a especificidade, e o tempo necessário para a realização da prova, como também o estágio de doença em que se encontra o paciente (19).

Essas reações podem e devem ser quantificadas, isto é avaliando quanto de antígenos ou de anticorpo existe no material biológico (soro, urina

etc). Essa quantificação é feita pela determinação do “título” do soro que pode ser definido como sendo o valor da maior diluição do soro onde se observa a positividade da reação. (23).

Quando preparamos as diluições de um soro e adicionamos o antígeno para a quantificação de anticorpos, devemos observar as recomendações do fabricante dos “Kits” utilizados, no que tange ao tipo de tampão, volume das diluições, volume da solução (ou suspensão) de antígenos, o tempo e a temperatura de incubação da reação. Procede-se a “leitura” (concluída a reação) dos tubos e determina-se o “título” do soro como positivo com título 1: x ou resultado negativo de acordo com o valor de referência de cada teste (23, 15).

As reações quantitativas fazem a diferença entre doentes, não doentes e reações cruzadas, observamos que na população doente os títulos são altos, não doentes temos títulos baixos ou nulos e nas reações cruzadas os títulos geralmente baixos. O valor de referência é o título obtido experimentalmente em uma população de pessoas sabidamente doentes (para a enfermidade em estudo) e em pessoas sabidamente sadias (23).

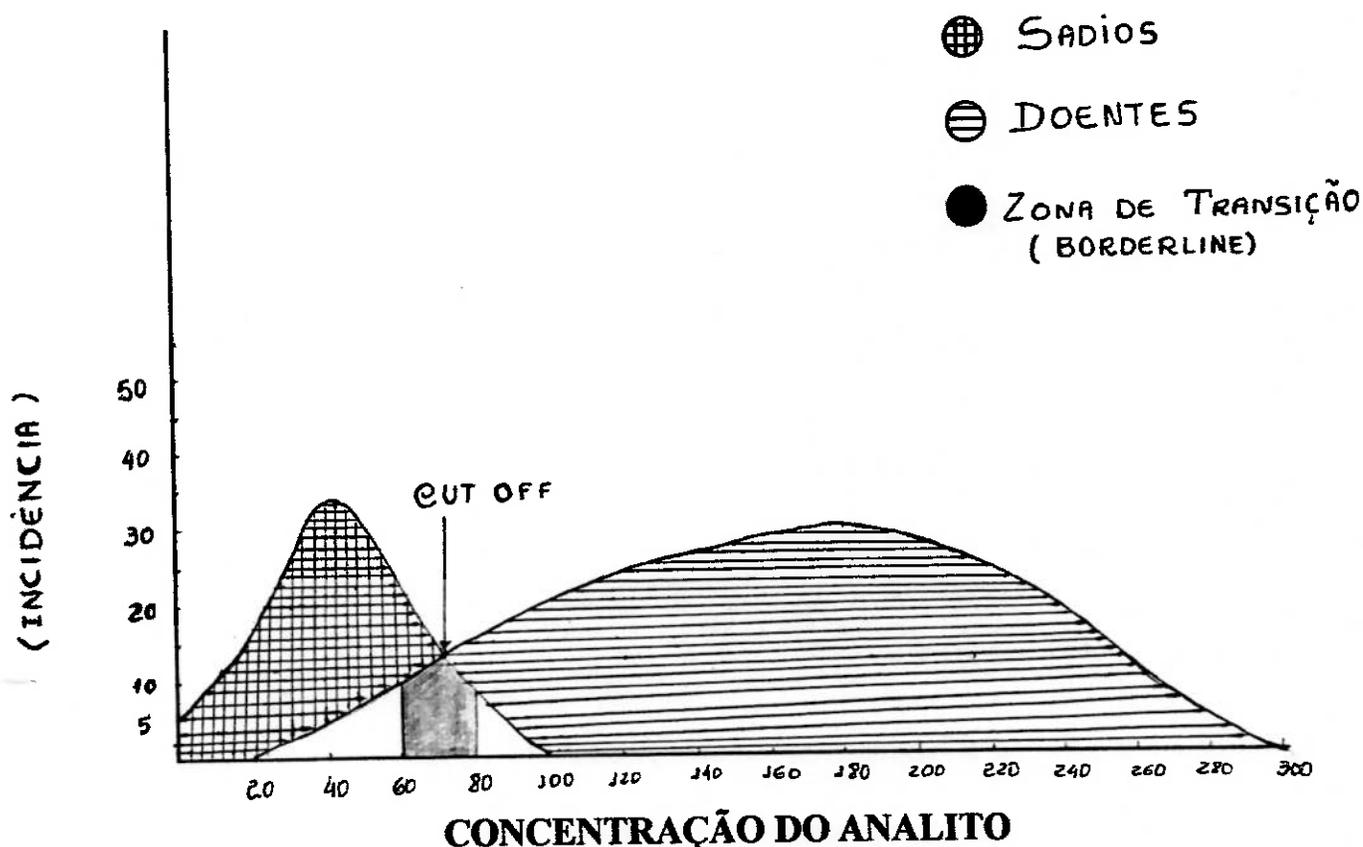
Este valor de referência limiar de positividade de um (teste) deverá ser um título que permite diferenciar os dois grupos, isto é, o título que permite distinguir se a reatividade se dá por conta do estado patológico. (23)

O limiar de positividade e também de negatividade do teste, “cut off point” é a zona em que se situam os resultados duvidosos, que devem ser repetidos com uma avaliação clínica criteriosa e o acompanhamento do paciente torna-se indispensável (Figura 1) (15, 23).

Hary et al (1992) em uma pesquisa sobre anticorpos referiu que algumas citoquinas estão envolvidas na determinação da infecção por *Leishmanias*, incluindo gama-interferon, interleucina - 4 (IL-4), e fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos. A resistência para

infecção por *Leishmanias* depende essencialmente da imunidade mediada por células T. O caminho pelo qual se descobre antígenos contra células T é pesquisando-os pelo teste de Western blot para células T. (12) Martines P et al (1993), comprovaram ser possível o diagnóstico de leishmaniose, pelo achado de formas amastigotos nos leucócitos em esfregaço de sangue periférico, em indivíduos co-infectados com HIV. Esses estudos representam mais uma colaboração no diagnóstico da leishmaniose. (11)

Figura 1 (Gráfico)



Determinação do valor de referência em teste fictício em indivíduos sadios e doentes.

As reações cruzadas são motivo de preocupação em vários aspectos diagnósticos. Os testes de ELISA e Imunofluorescência Direta apresentam reações cruzadas fracas com algumas doenças como tripanossomíase, malária, esquistossomose, oneocercose, lepra, sífilis, micoses sistêmicas e leishmaniose tegumentar e visceral (10, 21).

Sendo o calazar uma doença extremamente complexa, a possibilidade de ocorrer reações cruzadas não nos surpreende. O motivo pelo qual acontecem reações cruzadas não está esclarecido, sabemos no entanto que a conformação molecular a localização dos sítios de ligação (EPÍTOPOS) e a existência de determinantes antigênicos são fatores que viabilizam a ocorrência destas reações (1, 3, 5, 7, 10).

Badaró e outros (1983), avaliaram a extensão de reação cruzada com *T. cruzi*, testando soro de 10 pacientes com doença de chagas, com 4 antígenos de *Leishmania*. Reação cruzada em vários graus foram observados com todos os antígenos (18).

Mary C. et al (1992), utilizando o método de Western blot (bandas de polipeptídeos 14-16 KD, 28-30 KD, 68 e 90 KD) para o reconhecimento de antígenos de *Leishmania*, detectou um grupo de antígenos parasitário representado pelas bandas 14 e 16 KD. Em todos os casos de leishmaniose foi encontrado anticorpo contra um ou outro desses antígenos. Os altos títulos de anticorpos nesta reação não mostraram mais que 2% de reação cruzada com anticorpos dirigidos contra agentes infecciosos. (12). Até onde sabemos, não foram desenvolvidas muitas pesquisas de reação cruzada entre calazar e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência de Anti-corpos). Consultamos trabalhos sobre reação cruzada entre outras doenças para podermos comparar nossos resultados.

V. no
inter-
net.

Falou muito pouco em HIV - que
a meu ver o tema principal.

OBJETIVO

Verificar a existência de reação cruzada no teste de ELISA anti-HIV, em pacientes com leishmaniose visceral Americana.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 1995 a janeiro de 1996, selecionamos para a nossa pesquisa pacientes com calazar internados no Hospital Infantil Albert Sabin - Fortaleza Ceará - de ambos os sexos com idade entre 0 e 15 anos. Coletamos sangue com rigorosa assepsia em tubos de ensaio sem anticoagulante, centrifugamos separamos e congelamos o soro para ulterior análise, que foi realizada em duas etapas: metade dos testes foram feitos em outubro e o restante em janeiro, no setor de sorologia do HEMOCE.

Aplicamos um protocolo de investigação para avaliação da queixa principal, do tempo de febre, dos sintomas hemorrágicos, das queixas respiratórias e cardíacas, do aumento do abdome, das infecções associadas etc.

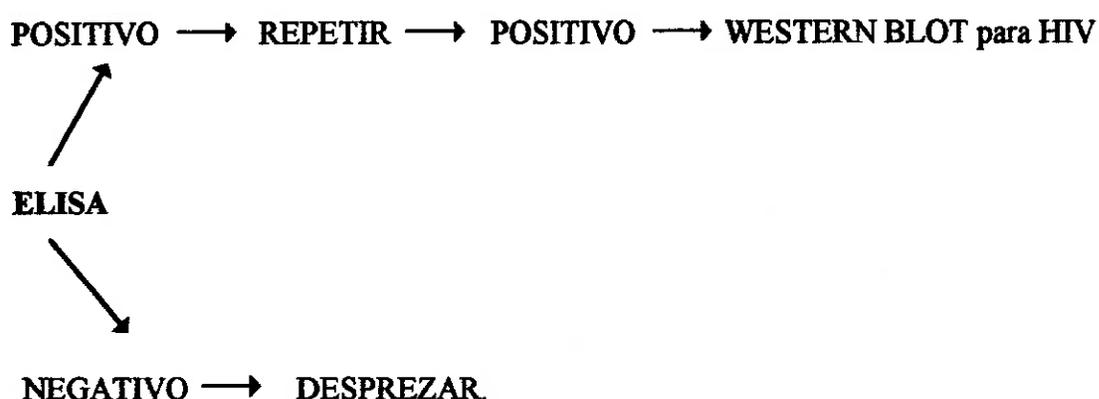
Sendo as alterações hematológicas (2,17) um fator decorrente e agravante para os portadores de leishmaniose visceral, avaliamos dados dos prontuários tais como: hematócrito, hemoglobina, número de leucócitos e plaquetas, dosagem de proteínas totais albumina e globulina.

O diagnóstico da leishmaniose visceral foi obtido pela pesquisa direta de protozoários por punção medular, imunofluorescência direta para calazar ou ambas (10).

*Tratados ou
não?*

Para verificar a nossa hipótese realizamos testes de ELISA anti-HIV em duplicata em todas as amostras, repetimos o referido teste nas amostras com sorologia positiva e em seguida aplicamos o teste confirmatório Western blot.

FIGURA 2



Métodos utilizados

ELISA - ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY - são reações baseadas na capacidade de conjugação de moléculas de anti-corpos com moléculas de enzimas, por ligações covalentes, conservando, tanto por parte do anticorpo como por parte da enzima, suas propriedades biológicas, isto é, anticorpo conjugado com enzima é capaz de reconhecer e de reagir com o antígeno específico e a enzima também conjugada, é capaz de catalizar a

reação de seu substrato (15,23). Para melhor compreensão do método, de forma simplificada, o sistema funciona pelo desenvolvimento final de coloração da reação empreendida, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional a concentração de antígenos ou anticorpo pesquisado. A leitura dos resultados é efetuada por equipamentos denominados espectrofotômetros (12, 15).

Técnica de ELISA anti-HIV

- 1 . Preparamos o suporte com nove tiras microelisa.
- 2 . Pipetamos 100 ml de diluente de amostra em todos os poquinhos, inclusive os controles.
- 3 . Pipetamos 50 ml de cada amostra de soro do paciente e controles nos poquinhos apropriados. Incluimos três controles negativos e um controle anti-HIV-1 positivo.
- 4 . Agitamos por 15 segundos manualmente, e incubamos as tiras a 37°C por 60 minutos.
- 5 . Lavamos (em aparelho apropriado) cada poquinho seis vezes com tampão fosfato.
- 6 . Pipetamos 100 ml de substrato TMB em cada poquinho, sem misturar nem agitar.
- 7 . Incubamos as tiras a 24°C, durante 30 minutos.
- 8 . Paramos a reação adicionando 100 ml de ácido sulfúrico 1mol/l em cada poquinho.
- 9 . Fizemos a leitura de cada poquinho em absorvância de 450 nm.

Princípio do Western blot

No ensaio de Western blot para HIV as proteínas inativadas e desorganizados do HIV1 se separam por eletroforese de acordo com seu peso molecular, utilizando-se um gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato sódico (505). As bandas protéicas obtidas se transferem a uma lâmina de nitrocelulose. Esta lâmina de nitrocelulose se corta em tiras que se faz reagir com as espécies do soro. No caso de estarem presentes anticorpos específicos para o vírus, ocorrerá a união das bandas correspondente às bandas dos antígenos virais. Tais bandas se visualiza utilizando um conjugado (imunoglobulina anti-humana de cabra marcada com peroxidase), e posteriormente um substrato para ação da enzima. A presença de imunoglobulinas específicas para HIV nas espécimes do soro se manifestam pela coloração das bandas das proteínas específicas do vírus HIV1 nos tiras de nitrocelulose. Os antígenos virais reconhecidos produzem as bandas p 18, p 24, p 31, gp 41, p 51, p 55, p 56, gp 120 e gp 160. Esses números se referem ao peso molecular aparente em Kilodaltons (FIGURA 3) (25).

Procedimento dos testes Western blot

1. Preparação do tampão amostra: realizamos a diluição do diluente de amostra concentrado 1:10. Para 15 tiras que seriam utilizadas preparamos 400 ml de tampão (360 ml de água deionizada para 40 ml do diluente de amostra concentrado). Em seguida acrescentamos 12 gramas de leite em pó a solução tampão e misturamos sob agitação por 20 minutos.
2. Em tubos de ensaio 12 x 75mm etiquetados, fizemos diluições 1:50 dos controles e das amostras, dispensando 40 ml da amostra e 2 ml do tampão de amostras em cada tubo.
3. Com os devidos cuidados para evitar contaminação, colocamos em cada câmara uma tira prenumerada, com a marca indicadora voltada para cima.
4. Homogeneizamos as amostras e as transferimos para a câmara correspondente. Cobrimos e levamos para agitação em plataforma rotatória por 10 minutos.
5. Incubamos em temperatura ambiente sob agitação (50-60 r.p.m.) por mais 60 minutos.
6. Terminada a incubação, levamos cada câmara três vezes. Dispensamos 2 ml de tampão de amostra, em cada câmara e pusemos sob agitação por 4 minutos.
7. Preparação do conjugado:
Retiramos o Conjugado concentrado da geladeira no momento do uso e fizemos a diluição 1:500, para as 15 tiras preparamos \cong 32 ml de conjugado, (32 ml de tampão de amostras + 64 ml do conjugado concentrado).

8. Depois de lavarmos aspirarmos o conteúdo das câmaras e dispensamos 2,0 ml do conjugado diluído em cada câmara contendo as tiras e cobrimos com papel impermeabilizado.
9. Incubamos em plataforma giratória (50-60 rpm) durante 45 minutos em temperatura ambiente.
10. Depois de incubar, aspiramos completamente as câmaras e lavamos quatro vezes com tampão de amostra. Dispensamos 2,0 ml de água deionizada em cada câmara, e colocamos as placas sob agitação por quatro minutos.
11. Depois de lavar aspiramos o conteúdo das câmaras e dispensamos 2,0 ml de cromógeno (homogeneizado) em cada tira. Cobrimos as placas e balançamos suavemente três vezes cada uma e deixamos em repouso por dez minutos para o aparecimento da cor.
12. Paramos a reação aspirando o cromógeno (reagente de cor) e submergindo as tiras em 2 ml de água deionizada. Deixamos as tiras secar dentro da placa.
13. Retiramos as tiras das placas e guardamos ao abrigo da luz, para evitar descoloração.

KIT

Western blot 2.0

detecção de anticorpo anti-HIVI

Produzido por Epitope, Inc

Distribuído por Organon TeKniKa Corporation

Lote N° MO 420501

Venc /03/96

RESULTADOS

Dos 33 pacientes com calazar selecionados para a pesquisa 15 (45,45%) eram do sexo masculino e 18 (54,54%) eram do sexo feminino. A idade variou de 0 a 15 anos, com uma média de 4,2 anos (Tabela 1).

No que se refere ao tempo de doença de cada paciente, 27 (81,81%) tinha de 0 a 4 meses, 5 (15,15%) de 4 a 8 meses e 1 (3,03%) mais de 8 meses (Tabela 2).

Com relação a queixa principal a febre (69,6%) e aumento do volume abdominal (54,5%), foram os que predominaram (Tabela 3).

Quanto ao estado físico dos pacientes foram avaliados os aspectos: palidez acentuada, desnutrição, adnâmia, debilidade, comprometimento, caquexia, edema de membros inferiores, ausência de anormalidades. Os resultados estão apresentados na (Tabela 4).

Com relação a infecção associadas a pneumonia foi encontrada em 36,3% dos pacientes, os resultados estão relatados na (Tabela 5).

Na investigação de visceromegalias foram encontradas hepatoesplenomegalia 63,6% dos casos, hepatomegalia em 18,1%, esplenomegalia 9,09% e ausência de alterações em 9,09%. Os resultados do número de casos e dados percentuais integram a tabela 6.

Componentes hematológicos. (7)

Foram realizados: determinação do hematócrito 23,18%, dosagem de hemoglobina 6,63%, contagem de leucócitos $4.215/\text{mm}^3$ e contagem de plaquetas $141,6 \times 10^3/\text{mm}^3$, em média. Os resultados estão apresentados nas figuras de 4 a 7. (7)

comprido

A dosagem das proteínas séricas, albumina em 97% dos pacientes estava acima de 2,0mg/dl, de globulina 91% estava acima de 3,0mg/dl e proteínas totais 91% apresentaram resultado das dosagens sorológicas entre 6,0e 10mg/dl compõem as figuras de 8 a 10.

TABELA 1 - Distribuição dos pacientes com calazar por faixa etária e sexo.

Idade	0 — 5a(%)	5 — 10(%)	10 — 15(%)	Total (%)
Sexo				
M	9 (27,27)	4 (12,12)	2 (6,06)	15 (45,45)
F	13 (39,39)	3 (9,09)	2 (6,06)	18 (54,54)
T	22 (66,66)	7 (21,21)	4 (12,12)	33 (100)

TABELA 2 - Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com o tempo de doença.

Tempo de doença (meses)	Frequência	%
0 — 4	27	81,8,0
4 — 8	05	15,15
8 — 15	01	3,05
TOTAL	33	100,0

TABELA 3 - Distribuição dos pacientes com calazar quanto a queixa principal.

Queixa Principal	Frequência	%
Febre	23	69,6
Aumento do vol. abdominal	18	54,5
Palidez Cut. Mucosa	14	42,4
Fraqueza Geral	05	15,15
Perda de peso	02	6,06
Diarréia	01	3,03
Tosse	01	3,03
Adnamia	01	3,03
Edema de membros inferiores	01	3,03

TABELA 4. Distribuição dos pacientes com calazar quanto ao estado geral.

Estado geral	Frequência	%
Palidez acentuada	19	57,57
Desnutrido	12	36,36
Adnâmico	08	24,24
Debilitado/Comprometido	08	24,24
Sem anormalidades	04	12,12
Caquético	01	3,03
Edema de membros inferiores	01	3,03

TABELA 5. Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com as infecções associadas.

Infecções associadas	Nº. de casos	%
Pneumonia	12	36,36
Gripe	05	15,15
Diarréia	04	12,12
Infecção urinária	03	9,09
Derrame pleural	01	3,03
Infecção orofaringe	01	3,03
Linfangite	01	3,03
Miocardite	01	3,03

TABELA 6. Distribuição dos pacientes com calazar de acordo com a apresentação das vísceras.

Apresentação das vísceras	Frequência	%
Hepatoesplenomegalia	21	63,63
Hepatomegalia	06	18,18
Esplenomegalia	03	9,09
Sem Visceromegalias	03	9,09

Só se
tratados
Na maioria se recuperam
e positiva em 60%
dos casos

TABELA 7. Distribuição da Amplitude, Média e Desvio padrão de valores hematológicos em pacientes com calazar

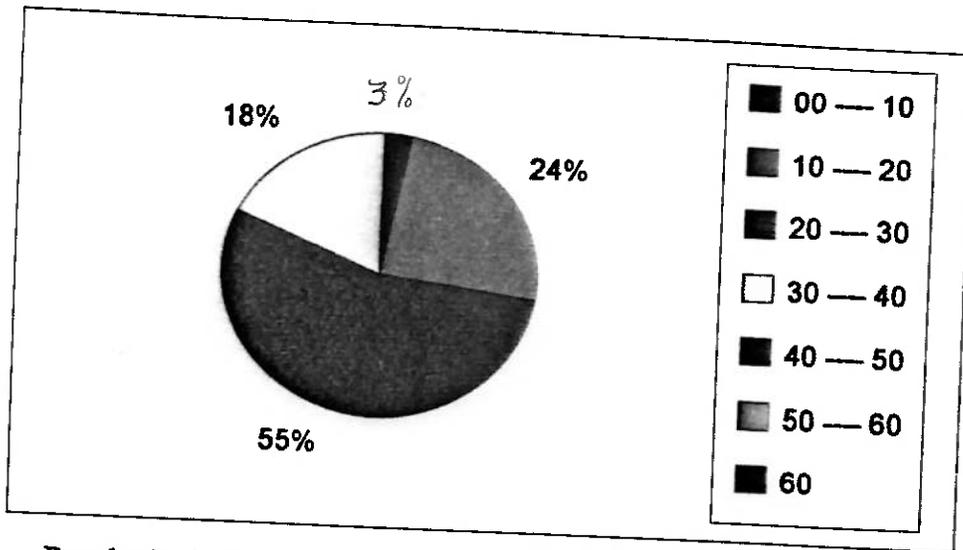
	PLAQUETAS x 10 ³ /mm ³	LEUCÓCITOS TOTALS (mm ³)	HEMOGLOBI NA (g%)	HEMATÓCRI TO (%)	GLOBULINA (mg/dl)	ALBUMINA (mg/dl)	PROT. TOTALS (mg/dl)
AMPLITUDE	10.000 - 435000	1200 - 20.400	2,0 - 10,3	8,0 - 36,0	2,0 - 7,3	1,96 - 4,52	5,4 - 9,8
MÉDIA	141.606	4.215	6,63	23,18	4,59	3,13	7,73
D. PADRÃO	86.363	3.648	1,88	6,2	1,33	0,7	1,08

d.o. tratados

→ frequência % 7

Figura 4

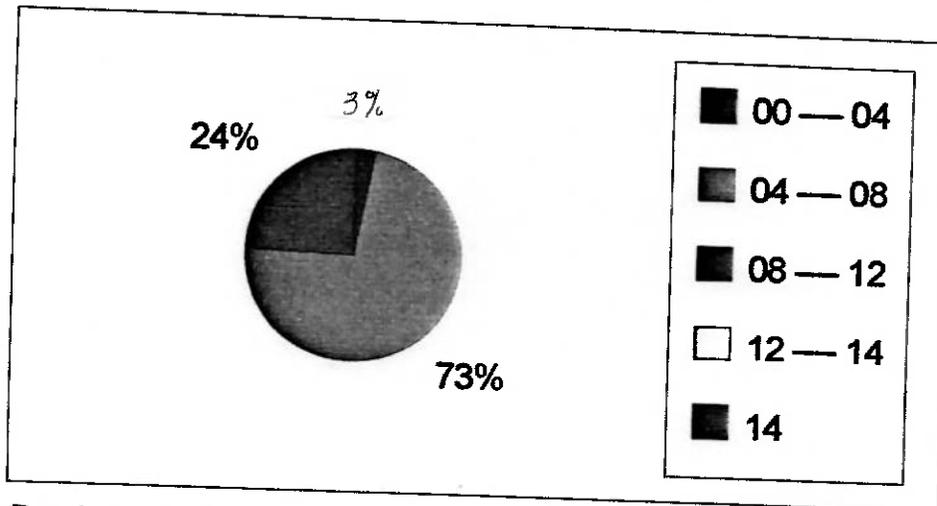
- 00 - 10 → 1
- 10 - 20 → 8
- 20 - 30 → 18
- 30 - 40 → 6
- 40 - 50 → 0
- 50 - 60 → 0
- > 60 → 0



Resultado da determinação do hematócrito em pacientes com *L. Visceral*

Figura 5

- 00 - 04 → 1
- 04 - 08 → 24
- 08 - 12 → 8
- 12 - 14 → 0
- > 14 → 0



Resultado das dosagens de hemoglobina em pacientes com *L. Visceral*

Figura 6

000.000 - 050.000 → 4
 050.000 - 100.000 → 6
 100.000 - 150.000 → 8
 150.000 - 200.000 → 8
 200.000 - 250.000 → 4
 250.000 - 300.000 → 2
 > 300.000 → 1

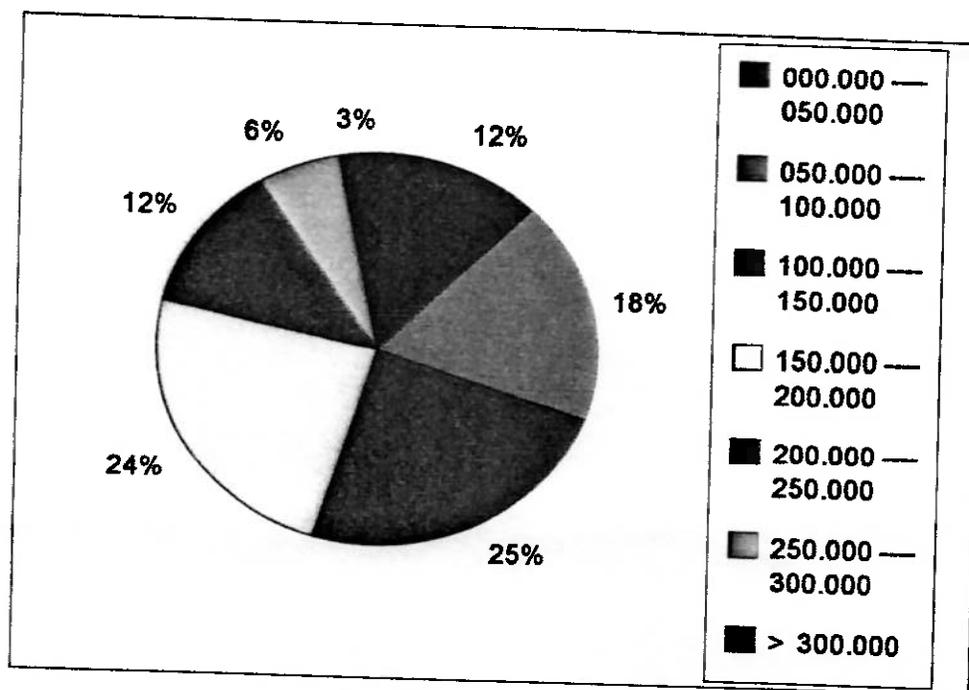
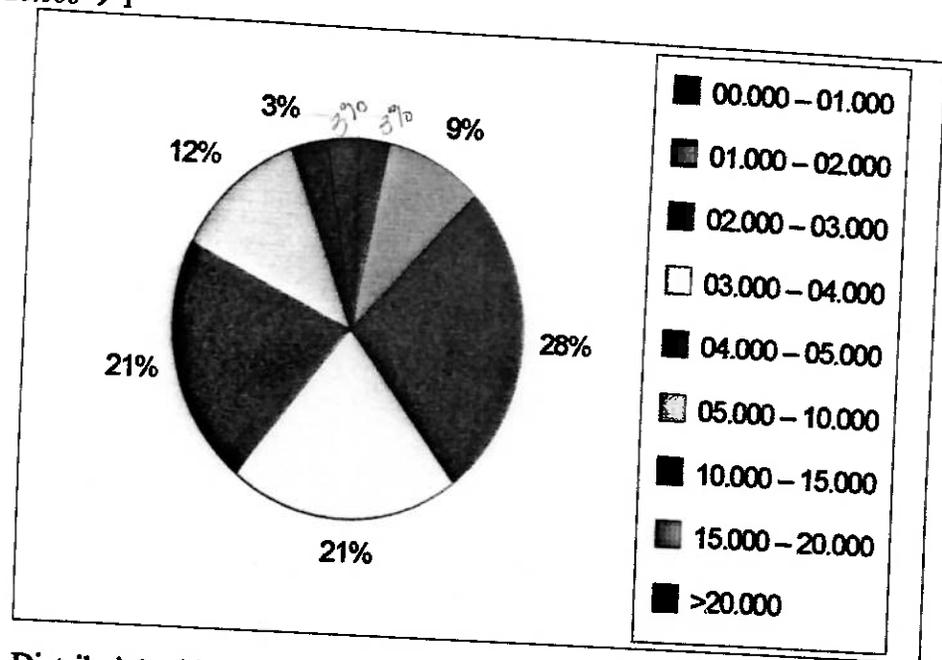


Figura 7

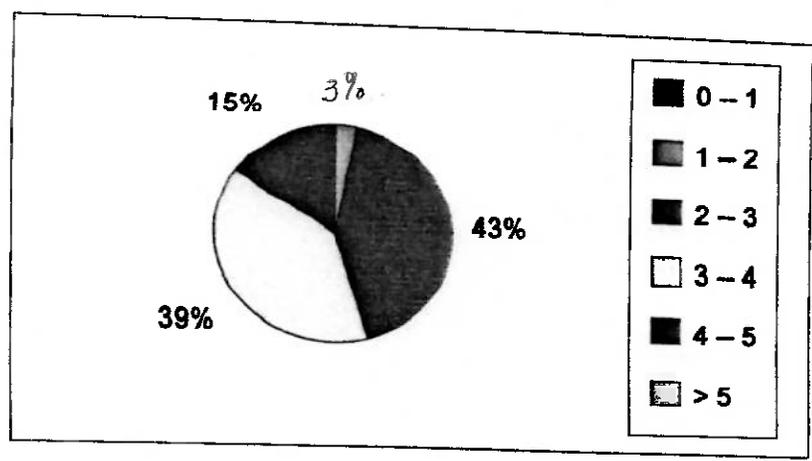
00.000 - 01.000 → 1
 01.000 - 02.000 → 3
 02.000 - 03.000 → 9
 03.000 - 04.000 → 7
 04.000 - 05.000 → 7
 05.000 - 10.000 → 4
 10.000 - 15.000 → 1
 15.000 - 20.000 → 0
 > 20.000 → 1



Distribuição histográfica da contagem de leucócitos em pacientes com *L. Visceral*

Figura 8

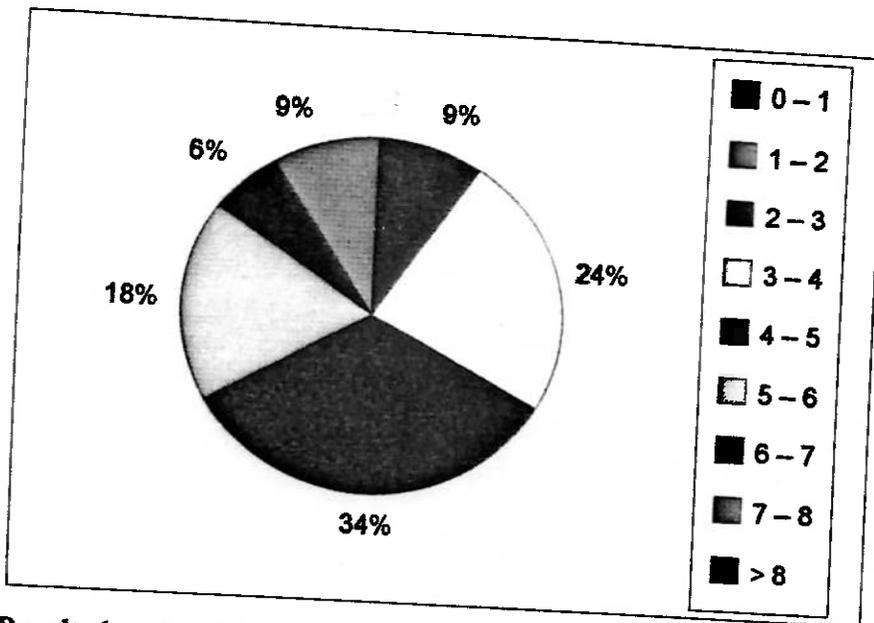
0 - 1 → 0
 1 - 2 → 1
 2 - 3 → 14
 3 - 4 → 13
 4 - 5 → 5
 > 5 → 0



Resultado das dosagens sorológicas de albumina em pacientes com *L. Visceral*.

Figura 9

0-1 → 0
 1-2 → 0
 2-3 → 3
 3-4 → 8
 4-5 → 11
 5-6 → 6
 6-7 → 2
 7-8 → 3
 > 8 → 0

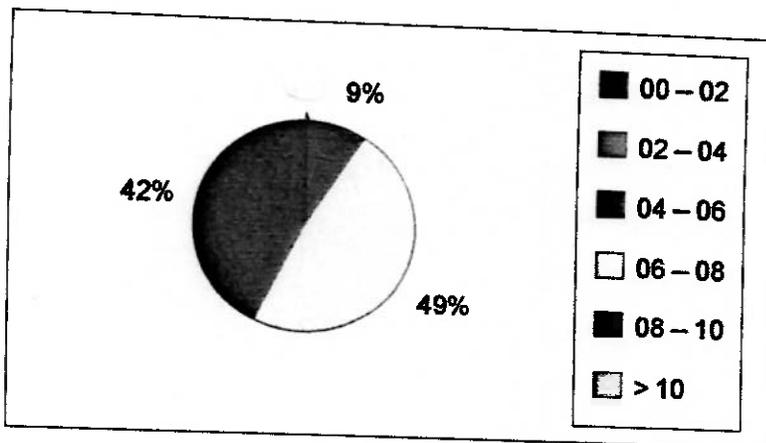


Resultados das dosagens sorológicas de globulina em pacientes com *L. Visceral*.

Handwritten note: Muito fraco em muitos

Figura 10

00-02 → 0
 02-04 → 0
 04-06 → 3
 06-08 → 16
 08-10 → 14
 > 10 → 0



Distribuição dos valores encontrados nas dosagens sorológicas de proteínas em pacientes com *L. Visceral*.

TOTAL 35

Handwritten note: Também foi feita a pesquisa p' achados do HPT. Vou dar + pontos ao calafate

DISCUSSÃO

O relato verbal de casos envolvendo testes de ELISA anti-HIV falso-positivo em portadores de leishmaniose visceral americana (LVA), incentivou-nos, a pesquisar em pacientes portadores de L.V.A a frequência destes resultados. Investigamos também outros fatores-sinais e sintomas - que pudessem levar a uma associação causa-efeito destas reações.

A avaliação hematológica fornece subsídios de grande valor para o diagnóstico do calazar, encontrando-se costumeiramente leucopenia, linfocitose, monocitose, anemia e plaquetopenia. A patogênese da doença é complexa, estando envolvidos o hiperesplenismo, as alterações medulares e mecanismos imunológicos. (2,17)

Em nosso estudo houve discreta predominância do sexo feminino na L.V.A., no entanto, a literatura refere que a doença incide duas vezes mais no sexo masculino do que no sexo feminino. No entanto, isto deve-se ao fato de termos estudado pacientes abaixo de 15 anos. (21)

Um dado bastante comum, encontrado nestes pacientes, foi a hipertrofia do baço e do fígado 21 (63,63%), fato este causado pelo tropismo visceral do parasito, hipertrofiando e hiperplasiando o sistema macrofágico das vísceras. (6,17,21).

Encontramos na medula óssea a presença de macrófagos parasitados que pouco a pouco substituem o tecido hemopoiético. Em virtude das alterações que atingem os órgão formadores e reguladores de composição sanguínea sobrevém anemia (21), em geral normocítica e normocromica (10). A anemia no calazar não é devida apenas à superpopulação histocitária dos órgãos hematopoiéticos. Constatou-se que a vida média das hemácias está

is 00 21
vem

diminuída provavelmente por mecanismos de auto-imunidade e ativação do complemento. (10, 21)

A diminuição das plaquetas foi observada em 18 pacientes (54, 54%), expondo estes pacientes a risco de hemorragias particularmente a epistaxe. (10)

A leucopenia (menos de 4.000 leuc/mm^3) foi encontrada em 20 casos (60,60%), justificando a predisposição dos indivíduos a infecções secundários. A redução acontece principalmente nos granulócitos. Os linfócitos apresentam aumento percentual, mas há ligeira queda no número absoluto por milímetros cúbicos. (10,21)

A análise das proteínas totais e frações apresentou globulina acima de 2,0mg/dl em 32 casos (96,9%). A hipergamaglobulinemia é do tipo policlonal (demonstrada pela eletroforese) em sua maioria inespecíficas não contribuindo para a proteção contra a doença. O aumento da concentração sérica de imunoglobulinas da classe IgM e IgG é responsável pelo resultado positivo de várias provas sorológicas, como a do formol gel e Bramachari por exemplo. (2,4)

Nos testes para verificar a existência de reação cruzada (falso-positivas) 5 pacientes (15,15%) deram resultados positivo para o teste de ELISA anti-HIV, todos os testes foram realizados em duplicata. Após a repetição dos testes de ELISA anti-HIV positivos, 4 casos (12,2%) permaneceram positivos. Subsequentemente aplicamos o teste confirmatório de Western blot para HIV que deu resultado negativo (ausência de anticorpos contra o vírus HIV), confirmando a nossa hipótese de reação cruzada em testes de ELISA anti-HIV no soro de pacientes com calazar.

A realização desta pesquisa não nos permite explicar, o porque da

ocorrência dessas reações, no entanto a desordem causada pela doença na produção de anticorpos inespecíficos (2) pode ser considerado como um fator predisponente a essas reações.

Conviver com o estigma da AIDS é uma situação, por demais vexatória, se não caótica. Diante dos resultados desta pesquisa sugerimos que numa região endêmica de calazar seja realizado um teste confirmatório da HIV, como o Western blat anti-HIV evitando assim que pessoas recebam tratamento inadequado, ou cheguem até mesmo ao óbito por conclusão diagnóstica equivocada e não ser instituída a terapêutica necessária.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo nos leva a concluir que o teste de ELISA anti-HIV apresenta resultado falso-positivo em pacientes com Leishmaniose Visceral Americana em 18,2%. ? ?

Em área endêmica de calazar os pacientes que apresentarem no teste ELISA anti-HIV positivo devem ser submetidos a um outro teste comprobatório para HIV (Western Blot para HIV).

SUMMARY

False-positive cross-reactions are observed with a certain frequency, in the immunoenzymatic test of ELISA. The present investigation reveals one such occurrence, in serological tests conducted on patients positive for American visceral leishmaniasis (AVL). In a total of 33 ELISA assays on the sera of AVL patients, 4 were observed to be positive for anti-HIV (12,12% positivity). However, subsequent Western blot assays did not confirm the positive results for anti-HIV observed with ELISA.

SUMMARY

False-positive cross-reactions are observed with a certain frequency, in the immunoenzymatic test of ELISA. The present investigation reveals one such occurrence, in serological tests conducted on patients positive for American visceral leishmaniasis (AVL). In a total of 33 ELISA assays on the sera of AVL patients, 4 were observed to be positive for anti-HIV (12,12% positivity). However, subsequent Western blot assays did not confirm the positive results for anti-HIV observed with ELISA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS A. K. et al. Antibodies and antigens. In: - **Celular and molecular immunology**. 2^a ed. Philadelphia: M.B. Saunders Company. Cap. 3, p. 56,57,59.
2. AMATO V. N., NICODEMO C., Leishmaniose Visceral (Calazar). In: - AMATO V.N., BALDY J.L.S **Doenças transmissíveis**. 3 ed. São Paulo: Sarvier 1989. p. 559 - 62.
3. BENTLEY G. A., BOYLOT G., CHITARRA V. Cross-reactivity in antibody-antigen interactions. **Res. immunologie**. V. 145, n. 15, p 45 - 8, jan., 1994.
4. BERHE N, HAILU A, WOLDAY D. et. al. Ethiopian visceral Leishmaniasis patients co-infected with human imunodeficiency. **Transactions of the royal society of tropical medicina & higgiene**. V. 89, n. 2, p. 205 - 7, Mar - Apr 1995.
5. BIER, OTTO G. et. al. **Imunologia básica e aplicada**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 180 - 183, 1989.
6. DUERDEN B. I. et. al. **Microbial and parasite infection**. 3. ed., London: Edward Arnold, p. 181, 1993.

7. GOLUB, EDWARD S.. The Nature of antigens. In: - **Immunology, a synthesis**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, INC. Publishers, Cap. 2, p. 27, 28, 40. 1991.
8. LOCKSLEY, M. R., PLORDE J. J. Infecções por protozoários e helmintos. In: HARRISON T. R. e **Medicina interna**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1984. Cap. 13, p., 1338.
9. MAGILL A. J.. Epidemiology of the leishmanioses [Review]. **Dermatologie clinics**. v. 13, n. 3, p. 505 - 23, Jul., 1995.
10. MARSDEN D. P., WAARREN D. J. Jr. Leishmania Gorbach S. L., BARTLETT J. G., BLACKLOW N.R **Infections diseases**. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 1978 - 82. 1992.
11. MARTINEZ P., LAGUNAF et. al. Diagnosis of visceral Leishmaniasis in HIV - infected individuals using peripheral blood smears. **AIDS**. v.7, n.2, p. 227 - 30, Feb., 1993.
12. MARY C., LAMOURUX D. et. al. Western Blot Analysis of antibodies to leishmania infantum antigens: Potential of the 14-KD and 16 KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **The american society of tropical medicine and higiene**. V. 46, n. 6, p. 764 - 771. 1992.
13. NEVA A. FRANKLIN. **Basic clinical parasitology**. Ed. G. London: Prattice - Hall International. Inc., p. 73, 74, 75. 1994.

14. NEVES & D. PEREIRA. **Parasitologia Humana**. Ed. 9. São Paulo: ATHENEU. p 77 - 78. 1995.
15. OLIVEIRA, E. B. Chlamydia, Métodos Diagnósticos especial. **ARS CURANDI**, v. 28, n. 9, p. 27 e 29. Out., 1995.
16. PESSOA, S. B., MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. ed. 10. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 83 - 85, 113, 119. 1978.
17. RIBEIRA E. CURCULLE et. al. Visceral Leishmaniasis in patients with HIV infection. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clínica**. V.13, n.2, p. 73 - 9, Feb., 1995.
18. ROBERTO BADARÓ, STEVEN G. REED, EDGAR M. CARVALHO. Immunofluorescent antibody test in american viscewral Leishmaniais: Sensitivity and specificity of different morfological forms of two Leishmania species. V. 32, n. 3, p. 480 - 484. 1993.
19. ROESEL C. E. **Imunologia um método auto-instrutivo**. São Paulo: Mc Gran - Hildo Brasil Ltda. p. 99 - 100. 1978.
20. ROITT, IVAN M. **Imunologia**. Ed. 2. Rio de Janeiro. ATHENEV S.A. p. 18, 260, 261 1976.
21. REY, LUIZ. **Parasitologia. Parasitose e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Ed. 2. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan. S.A., p. 218 - 219. 1991.

22. Versonesi, R.; Jamra, M.; Silva O.R.S.; Cruz, O.; Florillo, A. **Leishmaniose visceral (KALAZAR)**. Rev. Hosp. Clin. Ceniv. São Paulo, v.9 (1): 13 - 50. 1994.
23. Vieira, H.F., Vieira, M.L.C. **Imunologia no laboratório**. Fortaleza: 1993. p. 18 - 20.
24. ZIYLSTRA E.E., ZIDDIG ALI M. et. al. **KALA-AZAR: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis**. Royal society of tropical medicina and hyggiene. v. 86, p. 505 - 507. Jan., 1992.
25. ZUNINO N. J. ISRAEL G. **Infecção por HIV, diagnóstico laboratorial**. ARSCVRANDI. v. 2, n.5, p. 124 e 125. Jun, 1994.

ANEXO

HEMOCE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEMOTERAPIA E
HEMATOLOGIA
PESQUISA DE REAÇÕES CRUZADAS EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL

Prontuário nº _____
Unidade de Saúde: _____
Localidade: _____ Data: ___/___/___

I. IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Sexo: _____
Data Nasc.: ___/___/___ Idade: _____ Cor: _____
Naturalidade: _____ Estado Civil: _____
Endereço: _____
Bairro: _____ Cidade: _____
Telefone: _____ Profissão: _____

II. HISTÓRIA CLÍNICA:

QP: _____
Tempo de QP: _____
Febre: _____ Tempo: _____
Perda de Peso: _____ Tempo: _____
Palidez Cutânea-Mucosa: _____ Tempo: _____
Gânglios: _____ Tempo: _____
Aumento do Abdômen: _____ Tempo: _____
Epistaxe: _____ Tempo: _____

Gengivorragia: _____ Tempo: _____
Tosse: _____ Tempo: _____
Apetite: _____ Tempo: _____
Diarréia: _____ Tempo: _____
Outros: _____

III. EXAME FÍSICO:

Aspecto Geral: _____

Temperatura: _____ Pulso: _____ Respiração: _____
PA: _____ x _____ Peso: _____ Altura: _____
Pele e Mucosas: _____

Fâneros: _____
 Edemas: _____
 Adenomegalias: _____
 Orofaringe: _____
 A. Cardíaca: _____
 A. Pulmonar: _____
 Abdome: _____
 Fígado: _____
 Baço: _____

IV. LABORATÓRIO:

A) Diagnóstico: Pesquisa Direta:

Sorologias (titulação):

DATA				

B) Exames Complementares:

Hemograma e Plaquetas:

Data	Ht	Hb	leuc	Mb	Pm	Ml	Met	Bat	Seg	Eo	Bas	Lif	Mo	Plaq

Raio X: _____

Outros: _____

V. TRATAMENTO: Droga: _____

Início: _____ / _____ / _____ Término: _____ / _____ / _____

DOSAGEM: _____

TEMPO: _____

OUTROS: _____

VI. ACOMPANHAMENTO CLÍNICO:

DATA					
Peso					
Febre					
Apetite					
Baço					
Fígado					

VIII. OBSERVAÇÕES:

Ana Luzia Matos Ramos

10.10.95

1) - APRESENTAÇÃO - Esc -

2) - REDAÇÃO - com alguns erros -

3) - PORTE CIENTÍFICA -

Perdeu muito tempo com o adu-
do, tem a ideia por em geral de ca-
lutar que não era o objetivo prin-
cipal do trabalho!

Dificil dar mais desta que a maior
falha por falta de H1 e discutir outros
eventualidades que poderiam dar -

4) PORTUGUÊS - frequentes erros, entre
frases de taxonomia - uso im-
proprio de maiúscula (V. Anexo)

NOTA 9 (nove)

(Nota dada pelo resultado
que chegou, meu ver que a
discussão dos dados foi muito
boa)

Y. Cultural