

## Intradermoreação de Montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinha, MG

Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil

Verônica Carneiro Borges<sup>1</sup>, Miguel César Merino Ruiz<sup>1</sup>, Patrícia Moreira Gomes<sup>1</sup>,  
André Ratto Colombo<sup>1</sup>, Luciana de Almeida Silva<sup>1</sup>,  
Héctor Dardo Romero<sup>1</sup> e Aluizio Prata<sup>1</sup>

**Resumo** Para avaliar a resposta a sucessivas aplicações da intradermoreação de Montenegro (IDRM), repetimos quatro vezes o teste em moradores de uma área endêmica de calazar que tiveram o exame negativo há 3-4 anos. Inicialmente, repetimos três IDRM nos que permaneceram negativos, com intervalo de 60 dias entre elas. Na segunda etapa, realizamos uma última reação em todos participantes do estudo. Do total de 49 indivíduos com IDRM prévia negativa, 19 (38,8%) positivaram o teste em alguma das vezes, 17 (34,7%) abandonaram o estudo e 13 (26,5%) permaneceram com resultado negativo em todas as aplicações. Na segunda etapa, a repetição da IDRM mostrou que dos 14 que eram positivos em algum dos testes, 8 assim permaneceram e 6 tornaram-se negativos. Nossos resultados confirmam a possibilidade de indução de hipersensibilidade tardia em alguns indivíduos pela aplicação da IDRM.

**Palavras-chaves:** leishmaniose visceral humana. Intradermoreação de Montenegro.

**Abstract** With the purpose of evaluating the response of sequential applications of Montenegro intradermoreaction (IDRM), we have repeated four times the test in the inhabitants of an endemic area for kala-azar, that resulted negative 3-4 years ago. Firstly, we have repeated three IDRM in those who remained negative, with a 60-day interval among them. In the second stage, we have performed a last reaction in all participants of the study. From the total of 49 individuals with prior negative IDRM, 19 (38.8%) have positivated the test in some of the times, 17 (34.7%) have given up the study and 13 (26.5%) remained with a negative result in all the applications. In the second stage, the repetition of IDRM has shown that from the 14 positive in some of the tests, 8 remained like this and 6 have become negative. Our results confirm the possibility of late hypersensitivity induction in some individuals as a consequence of IDRM application.

**Key-words:** Kala-azar. Montenegro intradermoreaction.

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é utilizada como teste diagnóstico na leishmaniose tegumentar, tendo sido mencionada sensibilidade variando entre 80 e 100% e especificidade chegando a 100%<sup>2 5 8 12</sup>. Na leishmaniose visceral, a IDRM tem outro comportamento, sendo negativa durante a doença ativa e tornando-se positiva após semanas ou até dois anos do tratamento<sup>7 9 13</sup>. A capacidade da IDRM sensibilizar

o indivíduo, estimulando sua resposta imune, tem sido defendida por autores que demonstraram maior positividade do teste numa segunda aplicação, após curto intervalo, em voluntários sadios<sup>3 6</sup> e negada por outros<sup>11 15</sup>. Neste contexto, temos como objetivo avaliar a resposta a sucessivas aplicações de IDRM em moradores de área endêmica de calazar sem antecedente de leishmanioses.

1. Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. Trabalho realizado com o auxílio do CNPq (Programa Centro Oeste de Pesquisa e Pós-Graduação) e da Fundação Nacional de Saúde. Endereço para correspondência: Dr<sup>a</sup> Luciana de Almeida Silva. DIP/FMTM, Caixa Postal 118, 38001-970 Uberaba, MG. e-mail: tropicalfmtm@mednet.com.br  
Recebido para publicação em 15/1/2003

## POPULAÇÃO E MÉTODOS

Em 1998 foi realizado na área endêmica de calazar, em Porteirinha, MG, um estudo transversal com moradores de dois bairros – Vila União e Vila Vitória – onde havia registro do maior número de casos no município. Dos 1252 indivíduos estudados, 147 (11,7%) apresentaram IDRMs positivos e 433 (42,5%) pelo menos um dos seguintes testes sorológicos para leishmânia positivos: teste em fita imunocromatográfica com antígeno rK39 (TRALd), ELISA com antígeno de promastigotas (ELISAp), ELISA com antígenos recombinantes (ELISArK39 e ELISArK26) e reação de imunofluorescência indireta com antígeno de promastigota (RIFI)<sup>10</sup>. Dos indivíduos com IDRMs e todos os testes sorológicos negativos, foram selecionados 80 para compor nosso grupo de estudo. Todos apresentavam idade superior a 15 anos, distribuídos de forma semelhante em todas as faixas etárias. Foram convidados a participar do trabalho através de carta individual, entregue no domicílio por um funcionário da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). O período de estudo foi de março a outubro de 2002.

Em uma primeira etapa foi programada a aplicação de uma IDRMs, seguida de duas outras, com intervalo entre elas de 60 dias, nos indivíduos que permanecessem negativos. Na segunda etapa, após 70 dias da última aplicação, todos os indivíduos do estudo deveriam repetir o teste.

Para a IDRMs empregamos o antígeno da UFMG®, fabricado pela Biobrás em colaboração com o Instituto de Ciências Biológicas da UFMG – Belo Horizonte. É obtido de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), apresenta concentração padronizada de 40mg de nitrogênio protéico/ml e utiliza como veículo solução salina mertiolatada 1/10.000<sup>1 4 5</sup>.

O antígeno foi injetado na face anterior do antebraço esquerdo, na quantidade de 0,1ml, via intradérmica. Procedemos a leitura após 48 a 72 h, delimitando o tamanho da pápula com caneta esferográfica<sup>14</sup>. Consideramos positivas as reações cuja média das medidas dos diâmetros transversos e longitudinais fossem iguais ou maiores que 5 mm. Tanto a aplicação quanto a leitura foram feitas pelo mesmo pesquisador.

A análise estatística foi feita pelo programa *SigmaStat for Windows 2.0* (Jandel Corporation, San Raphael, CA), utilizando o teste qui-quadrado, com intervalo de confiança de 95%.

Todos os indivíduos do estudo assinaram o Termo de Consentimento após esclarecimento, em respeito à resolução 196 que regulamenta pesquisa com seres humanos.

## RESULTADOS

Dos 80 indivíduos inicialmente com IDRMs negativa convidados a participar do estudo, 53 (66,3%) compareceram para a aplicação da 2ª IDRMs, e apenas 49 procederam a leitura, sendo que 12 (24,5% [IC95%; 13,8%-39,2%]) positivaram o teste. O número de positivos nesta primeira repetição foi significativamente superior que o encontrado no estudo transversal prévio de 11,7% ( $p=0,02$ ). Dos 37 indivíduos esperados para a 3ª IDRMs, 14 faltaram, e dos 23 avaliados, 3 (13% [IC95%; 3,4%-34,7%]) apresentaram este teste positivo.

Para a 4ª IDRMs, mais 3 pessoas abandonaram o estudo e das 17 analisadas, 4 (23,5% [IC95%; 7,8%-50,2%]) positivaram o teste. Sendo assim, na primeira etapa, do total de 49 indivíduos com IDRMs prévia negativa, 19 (38,8%) positivaram o teste em alguma das vezes, 17 (34,7%) abandonaram o estudo e 13 (26,5%) permaneceram com resultado negativo em todas as aplicações. A análise estatística mostrou diferença significativa de positividade nas repetições do teste ( $p=0,003$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da repetição da IDRMs em indivíduos de área endêmica de calazar.

n°	IDRMs	data	Total	Resultado (%)		
				negativo	positivo	
1ª		1998	49	49	100,0	0 -
2ª		3/2002	49	37	75,5	12 24,5
3ª		5/2002	23	20	87,0	3 13,0
4ª		8/2002	17	13	76,5	4 23,5

Na segunda etapa, a 5ª IDRMs foi realizada em 31 dos 49 indivíduos convocados. Em 14 dos que eram positivos em algum dos testes, 8 (58%) assim

permaneceram e 6 (42%) tornaram-se negativos. Dos 17 negativos em uma ou mais vezes nenhum se positivou.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam os achados de Nascimento e cols<sup>6</sup> e José e cols<sup>3</sup> quanto à possibilidade de indução de resposta imunológica em alguns indivíduos

pela aplicação da IDRMs. Como trabalhamos em área endêmica, torna-se difícil afastar completamente a possibilidade de infecção assintomática em alguns destes

indivíduos, no intervalo de 3-4 anos entre a primeira e a segunda IDR. Entretanto, se esta ocorreu, a percentagem de positividade deveria ser, no máximo, semelhante à encontrada no estudo inicial de Romero<sup>10</sup>, que foi de 11,7%, já que no referido período não houve exacerbação da frequência do calazar em Porteirinha. Contudo, na repetição do teste encontramos aumento significativo de positividade (24,5%). Mais difícil ainda seria explicar os aumentos de positividade nos curtos períodos entre os testes feitos posteriormente. Tais dados sugerem que outro fator deve estar interferindo nos resultados. Um efeito *booster* exercido em alguns indivíduos pela aplicação da primeira IDR foi sugerido como explicação para o fato<sup>13</sup>. Indivíduos previamente sensibilizados teriam sua resposta imune ativada pela injeção de leishmanina ou pelo próprio conservante (timerosal), o que resultaria na positividade de reações posteriores.

Verificamos que 38% dos indivíduos tornaram-se positivos. Mas, fazendo-se a correção estimada, para os sucessivos testes, incluindo os que abandonaram a

pesquisa, o número chegou a 61% de positividade. Após o 5º teste não houve novos exames positivos, mostrando que em 39% dos indivíduos a repetição do teste, em alguns até por cinco vezes não o tornou positivo, ao contrário dos 61% que possivelmente foram sensibilizados pela IDR.

Considerando os 14 indivíduos que positivaram a reação, como explicar sua negativação posterior em 6 casos? Se estes indivíduos que tiveram a IDR positiva foram realmente sensibilizados pela leishmanina ou pelo organomercúrio usado como veículo, como perderiam esta resposta imunológica num intervalo de tempo tão pequeno.

No diagnóstico de leishmaniose tegumentar e em estudos epidemiológicos de leishmanioses, o teste de Montenegro positivo tem sido considerado como indicativo de infecção atual ou pretérita por leishmaniose. A ocorrência de IDR positiva induzida apenas pela inoculação de leishmanina deve ser levada em consideração.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa CA, Toledo VPCP, Genaro O, Williams P, Mayrink W. Montenegro skin test. Evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:193-194, 1996.
- Cuba CAC, Marsden PD, Barretto AC, Jones TC, Richards F. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in american cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 231-236, 1985.
- José FF, Silva MI, Araújo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 537-542, 2001.
- Mayrink W, Melo MN, Costa CA, Coutinho SG, Hermeto MV, Genaro O, Toledo VPCP, Guerra H. Multinational development of a standard skin test antigen in America: preliminary results in the Minas Gerais State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88 (supl):226, 1993.
- Melo MN, Mayrink W, Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Williams P, Araújo FG, Coelho MV, Batista SM. Padronização do antígeno de Montenegro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19(3):161-164, 1977.
- Nascimento MDSB, Alcântara-Neves NM, Muniz MEB, Nunes SF, Paranhos M, Carvalho LCP. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87:91-93, 1975.
- Pampiglione S, Manson-Bahr PEC, Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. Studies on Mediterranean leishmaniose. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 447-453, 1975.
- Pessoa SB, Barretto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Trabalho do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Serviço de documentação, Ministério da Educação e Saúde, 1944.
- Prata A. Quadro clínico e laboratorial do calazar. Tese de Docência Livre, Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia, Bahia, BA, 1957.
- Romero HD. Reações imunológicas no diagnóstico da leishmaniose visceral em uma área endêmica. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2000.
- Satti I, EL Hassan A, Khalil TAG, Akuffo H. The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in healthy volunteers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:565-567, 2002.
- Shaw JJ, Lainson R. An immediate intradermal reaction to leishmanial antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68:168-169, 1974.
- Silva LA. Estudo prospectivo de indivíduos com testes imunológicos e reação em cadeia da polimerase para calazar em Porteirinha, MG. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2002.
- Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test response. *The New England Journal of Medicine* 293:501-502, 1975.
- Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 260-271, 1991.