

## Avaliação imunológica da intradermorreação de Montenegro

### Immunological evaluation of the Montenegro's intradermal reaction

Arlene de Jesus Mendes Caldas<sup>1</sup>, Dorlene Maria Cardoso de Aquino<sup>1</sup>, Neidna Viegas Ferreira<sup>2</sup>, Maria Aparecida Pereira da Silva<sup>2</sup>, Elza Lima da Silva<sup>3</sup>, Alinne Silva Andrade Costa<sup>5</sup>, Aldina Prado Barral<sup>6</sup>

#### Resumo

**Introdução.** Na leishmaniose visceral, a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) utilizada em indivíduos sadios apresenta resultados controversos quanto à sensibilização após uma segunda aplicação. **Objetivo.** avaliar a resposta imunológica a sucessivas aplicações da IDRM. **Métodos.** Trata-se de um estudo de coorte realizado com 44 indivíduos, no período de agosto/2004 a julho/2005. A amostra foi dividida em quatro grupos sendo: 11 de área não endêmica(I) e 11 de área endêmica(II) realizaram o teste no dia zero e em intervalo de 30/30 dias; os outros 11 de área não endêmica (III) e 11 de endêmica (IV) em intervalo de 90/90 dias, ambos durante seis meses. **Resultados.** Os indivíduos de áreas não endêmicas (I e III) positiveram na segunda aplicação em 18% e 9% respectivamente, e após, não houve conversão para a positividade; nos participantes de áreas endêmicas, o grupo II obteve resultado positivo na segunda aplicação em 45% e todos positiveram no fim do estudo; já no grupo IV 64% e 18%, respectivamente, convergiram para a positividade com 90 e 180 dias. **Conclusão.** O percentual de positividade encontrado, não sugere sensibilização a partir de sucessivas aplicações da IDRM, sendo que a positividade observada pode ser devido a uma infecção assintomática ou reação cruzada.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose visceral humana. Intradermorreação de Montenegro. Área endêmica.

#### Abstract

**Introduction.** Concerning the diagnosis of Visceral Leishmaniasis, the Montenegro's intradermal reaction used in healthy individuals shows conflicting results related to sensitivity after a second analysis. **Objective.** To evaluate the immune response to successive Montenegro's intradermal reactions. **Methods.** Cohort study with 44 individuals during August 2004 to July 2005. The sample was divided into four groups. 11 individuals from non-endemic area (group I) and 11 from endemic area (group II) performed the Montenegro's test on day zero and at intervals of 30/30 days. The group III consisted of 11 individuals from non-endemic area and group IV of 11 from endemic area, both groups performed the test at intervals of 90/90 days during six months. **Results.** The group I and III were positive on the second test in 18% and 9% of individuals respectively, and there was no conversion to positivity afterwards. In the endemic areas, group II had positive results in the second analysis in 45% of individuals and all turned positive at the end of the study. In group IV, 64% of individuals converted into positivity within 90 days and 18% converted within 180 days. **Conclusions.** The percentage of positivity found in this study does not suggest sensitivity due to successive Montenegro's intradermal reactions. The observed positivity may be due to an asymptomatic infection or cross-reaction.

**Keywords:** Human Visceral Leishmaniasis. Montenegro's Intradermal reaction. Endemic area.

#### Introdução

A depressão da resposta imunológica mediada por células é marcante na Leishmaniose Visceral (LV), pois os indivíduos não respondem aos testes de hipersensibilidade tardia com antígenos de *Leishmania* durante a fase ativa da doença<sup>1</sup>. Além disso, células mononucleares de sangue periférico destes pacientes quando estimuladas in vitro com antígenos de *Leishmania*, apresentam respostas proliferativa significativamente inferior àqueles obtidas de indivíduos de grupo controle ou curados de calazar<sup>2</sup>. Entretanto, linfócitos de pacientes com doença ativa são incapazes de produzir IFN- $\gamma$  e IL-2 e, quando estimulados com antígenos de *Leishmania* não são capazes de ativar os mecanismos de destruição do parasita pelos macrófagos, mas os fatores séricos presentes na doença ativa são capazes de suprimir a resposta proliferativa<sup>3</sup>.

Portanto, a incapacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imunológica eficaz à infecção

por *Leishmania* está relacionada a diversos aspectos da imunidade celular, tais como: diferenciação dos linfócitos, apresentação dos antígenos, produção de citocinas e ativação dos mecanismos de lise dos macrófagos<sup>2, 4</sup>. A reversibilidade da imunossupressão após terapêutica específica sugere uma participação importante do próprio parasita. A quantidade de citocina disponível precocemente no local da infecção influenciará no padrão de secreção das mesmas e, conseqüentemente, no controle ou não da infecção<sup>2</sup>.

Em decorrência da ativação de células B, a LV está associada não só a uma resposta de célula T ineficaz, o que pode ser comprovado por testes cutâneos de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativos e ensaios de proliferação ineficientes, mas também à considerável indução da resposta humoral, com elevados títulos de imunoglobulinas inespecíficas (IgM e IgG) ou específicas para *Leishmania*. A presença desses anticorpos, no entanto, apresenta papel pouco relevante no controle da infecção podendo, inclusive, participar

<sup>1</sup> Doutora em Patologia Humana. Departamento de Enfermagem. Docente da Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

<sup>2</sup> Enfermeiras. Bolsistas de PIBIC

<sup>3</sup> Mestre em Enfermagem. Departamento de Enfermagem. Docente da UFMA.

<sup>4</sup> Mestre em Saúde Coletiva. Enfermeira da Secretaria Municipal de Saúde- SEMUS-MA.

<sup>5</sup> Doutora em Imunologia. Docente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia - UFBA.

Contato: Arlene de Jesus Mendes Caldas. E-mail: ajmc@elo.com.br

na expansão da infecção opsonizando as amastigotas e facilitando a fagocitose e infecção de novos macrófagos. Sua participação fica restrita, portanto, à interação inicial do parasita com elementos inespecíficos da resposta inflamatória<sup>5,6</sup>.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é utilizada como diagnóstico na leishmaniose tegumentar, apresentando resultado positivo na doença. No entanto, na leishmaniose visceral, a IDRM tem outro comportamento, sendo negativa durante a fase ativa da doença e tornando-se positiva após semanas ou até anos de tratamento<sup>1,7,8</sup>. Por outro lado, a IDRM é útil no diagnóstico da forma assintomática ou inaparente de LV em áreas endêmicas<sup>9,10</sup>.

A negatividade da IDRM tem sido utilizada como critério de inclusão de indivíduos em estudos que visam caracterizar a resposta imune e a eficácia da imunização após a utilização de vacinas contra leishmaniose. A demonstração de que a IDRM pode sensibilizar o hospedeiro e fazer com que, em segunda oportunidade, a reação torne-se positiva, compromete a utilização do mesmo como indicador de proteção após vacinação. A capacidade da IDRM de sensibilizar o indivíduo, estimulando sua resposta imune, tem sido descrita por alguns autores que demonstraram maior positividade do teste numa segunda aplicação<sup>11, 12, 13</sup>.

O fenômeno de indução de hipersensibilidade tardia por repetição dos testes intradérmicos, em indivíduos sadios, é um assunto controverso na literatura. Keystone *et al.*<sup>14</sup>, verificaram que cerca de 40% dos indivíduos apresentando hipersensibilidade tardia após seis semanas de exposição aos antígenos PPD, estreptoquinase, estreptodornase, candida e da caxumba. Lesourd *et al.*<sup>15</sup>, não observaram sensibilização do sistema imune nessas circunstâncias.

Considerando-se a importância do teste de Montenegro como meio auxiliar no diagnóstico e acompanhamentos de indivíduos curados de leishmaniose visceral, bem como em inquéritos epidemiológicos para determinar prevalência e incidência de infecção assintomática, fez-se necessário a realização deste estudo. Tem-se como objetivo avaliar a resposta imunológica a sucessivas aplicações de intradermorreação de Montenegro (IDRM).

## Métodos

Trata-se de um estudo de coorte realizado em municípios da Ilha de São Luís (São Luís, Ribamar e Raposa) no estado do Maranhão, com indivíduos residentes em área endêmica e não endêmica de leishmaniose visceral, no período de agosto/2004 a julho/2005.

A amostra de conveniência, foi constituída por 22 acadêmicos de Enfermagem da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, selecionados aleatoriamente das listas de frequência das disciplinas, não procedentes e não residentes de áreas endêmicas de LV, e que durante o período do estudo, tivessem baixo risco de serem expostos à infecção por *Leishmania*, e sorologia negativa para *Leishmania*; e 22 indivíduos de área endêmica de LV do município da Raposa-MA, também, selecionados aleatoriamente da comunidade, sem história atual ou prévia de Leishmaniose visceral e sorologia negativa para *Leishmania*. Portanto, totalizando 44 indivíduos sadios.

O estudo foi planejado e delineado em duas fases: a primeira, realizado o teste de Imunofluorescência

Indireta (IFI) em todos os indivíduos, com a finalidade de detectar infecção por *Leishmania*; e a segunda, os indivíduos que atenderam os critérios de inclusão foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos.

Grupo I (11 acadêmicos de enfermagem) e grupo II (11 indivíduos da comunidade): eram coletados 5 ml de sangue periférico para dosagem de IFN- $\gamma$  e após, realizado o teste de IDRM no dia zero e em intervalo de 30 em 30 dias, durante seis meses;

Grupo III (11 acadêmicos de enfermagem) e grupo IV (11 indivíduos da comunidade): eram coletados 5 ml de sangue periférico para dosagem de IFN- $\gamma$  e após, realizado o teste de IDRM no dia zero e em intervalo de 90 em 90 dias, durante seis meses. Convém ressaltar que os indivíduos que fossem positivando ao IDRM não realizariam os testes posteriores.

O antígeno utilizado para a realização do IDRM foi preparado no laboratório de Imunopatologia (LIP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/ FIOCRUZ, a partir de uma cepa previamente caracterizada por anticorpos monoclonais e isoenzimas com *L. chagasi* (MHOMBr-83-BA-3) conforme técnica de Reed *et al.*<sup>16</sup>. O teste foi considerado positivo quando a enduração era igual ou maior que 5 mm.

As dosagens de citocinas (IFN- $\gamma$ ) no plasma dos indivíduos foram realizadas pela técnica de ELISA utilizando-se kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante (PharMingem, Sam Diego, CA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm e os resultados expressos em pg/ml baseados numa curva padrão.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada com antígenos produzidos por Biomaninhos-FIOCRUZ. O soro foi preparado nas diluições 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640. Foram considerados positivos os que apresentaram fluorescência a partir da diluição 1:80.

Os dados foram inseridos em banco de dados e analisados nos programa EPI-INFO versão 2003 (CDC-Atlanta-EUA). As diferenças dos resultados dos testes de Montenegro foram analisadas através do teste exato de Fisher. O estudo foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário/UFMA (Processo: nº 33104-0418/2004).

## Resultados

Os testes de Montenegro realizados com o Grupo I (acadêmicos) e com o grupo II (comunidade) mostraram que todos participantes na primeira aplicação (dia zero) do IDRM apresentaram resultado negativo. Avaliando os resultados no grupo I (acadêmicos) foi observado que dois acadêmicos (18%) positivaram na segunda aplicação (30 dias) do teste e a partir de então não houve conversão para a positividade. Ressaltando que um indivíduo não retornou para a leitura do teste e o mesmo não foi encontrado em sua residência. Por outro, no grupo II (comunidade) observou-se que a partir da segunda aplicação (45,5%) até o final dos seis meses todos os indivíduos convergiram para positividade (Tabela 1).

Analisado o resultado da IDRM no grupo III (acadêmicos) e grupo IV (comunidade), observou-se que 9,0% dos acadêmicos apresentaram o teste positivo somente na segunda aplicação e, nas demais aplicações foram negativas. Entretanto, no grupo IV (comunidade) o resultado foi diferente, pois somente no dia zero todos os indivíduos apresentaram resultado negativo

**Tabela 1.** Resultado da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) no Grupo I (acadêmicos) e Grupo II (comunidade). São Luis-MA, 2006.

Dias	Grupo I - acadêmicos (n=11)				Grupo II - comunidade (n=11)			
	IDRM* positivo		IDRM negativo		IDRM positivo		IDRM negativo	
	f	%	f	%	f	%	f	%
zero	-	-	11	100,0	-	-	11	100,0
30	2	18,0	9	82,0	5	45,5	6	55,5
60	-	-	9	100,0	1	9,0	5	45,5
90	-	-	9	100,0	4	36,4	-	-
120	-	-	9	100,0	2	18,0	2	18,0
150	-	-	9	100,0	2	18,0	-	-

\*Intradermorreação de Montenegro  $\geq$  5mm**Tabela 2.** Resultado da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) no Grupo III (acadêmicos) e Grupo IV (comunidade). São Luís-MA, 2006.

Dias	Grupo III - acadêmicos (n=11)				Grupo IV - comunidade (n=11)			
	IDRM* positivo		IDRM negativo		IDRM positivo		IDRM negativo	
	f	%	f	%	f	%	f	%
zero	-	-	11	100,0	-	-	11	100,0
90	1	9,0	10	91,0	7	64,0	4	36,0
180	-	-	10	100,0	2	18,0	2	18,0

\*Intradermorreação de Montenegro  $\geq$  5mm

ao teste, enquanto que 64,0% e 18,0% dos indivíduos, respectivamente, convergiram para a positividade ao teste com 90 e 180 dias (Tabela 2). Não foi observada produção de IFN- $\gamma$  nos soros dos indivíduos envolvidos no estudo.

## Discussão

O teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um importante teste de hipersensibilidade tardia utilizado como método de diagnóstico na Leishmaniose tegumentar e é amplamente empregado em inquéritos epidemiológicos para a identificação de indivíduos expostos e sem doença e indivíduos curados de Leishmaniose visceral. Entretanto, a IDRM quase sempre é utilizada em estudos epidemiológicos nas áreas endêmicas de LV bem como vários tipos de antígeno de *Leishmania*<sup>9,10</sup> devido, no Brasil, não ser padronizada. Por esta razão, a avaliação do poder imunizante da IDRM, no presente estudo, foi realizada com indivíduos de área não endêmica (acadêmicos) e de área endêmica de LV utilizando o mesmo antígeno de *Leishmania Chagasi*.

Na literatura a indução de hipersensibilidade tardia por repetição dos testes em indivíduos sadios é controverso. Fato este, encontrado no presente estudo quando comparou-se as duas populações estudadas (indivíduos de área não endêmica versus de área endêmica de LV). Na primeira, houve positividade ao teste somente na segunda aplicação, tanto no grupo de 30 dias (18,0%) quanto no de 90 dias (9,0%) após a 1ª aplicação; entretanto, na segunda população (área endêmica), todos os indivíduos positivaram ao longo dos seis meses de aplicação independente do intervalo (30 ou 90 dias).

Em relação ao intervalo das aplicações, Nascimento *et al.*<sup>17</sup>, quando utilizaram intervalo de duas semanas encontrando mais de 60% de positividade no segundo

teste, no entanto, quando utilizaram intervalos maiores não foi observado positividade do teste em nenhum indivíduo. Outra questão defendida por alguns autores, é que a IDRM pode sensibilizar o indivíduo a partir de uma segunda exposição ao teste, em pequeno intervalo de tempo em indivíduos sadios<sup>13,17</sup>. Porém, essa idéia é negada por outros autores<sup>11,18</sup>. Diferente, portanto, dos nossos achados, pois, cada grupo estudado apresentou resultado diferente independente de intervalo de aplicação. Observou-se que alguns indivíduos de área não endêmica apresentaram resposta positiva ao teste, demonstrando que esta resposta possivelmente pode estar associada a outros fatores.

A positividade ao IDRM em um dos acadêmicos de enfermagem pode ser explicada por uma possível infecção assintomática no intervalo de uma aplicação e outra, devido residir em localidade próxima a uma área endêmica de LV em São Luis-MA. Situação esta cogitada, também, por Borges *et al.*<sup>12</sup>, em Porteirinhas-MG. Há, também, a possibilidade de se pensar que alguns fatores podem interferir sobre a resposta de testes intradérmicos, como a técnica de leitura, o preparo do antígeno, bem como o acondicionamento do antígeno<sup>19</sup>.

Da mesma forma, pode ter acontecido com os grupos de área endêmica para LV. O resultado da primeira IDRM nos dois grupos revelou em média 30% de positividade. Como são moradores há mais de seis meses de localidades reconhecidas endêmica de LV, podem ter sido infectados (infecção assintomática) ou reações cruzadas com outras doenças, principalmente a malária que é comum naquele município. Existem evidências que em áreas endêmicas de LV a maioria dos indivíduos infectados por *L. Chagasi* apresenta infecção subclínica, podendo permanecer assintomático ou oligossintomático<sup>1,20,21</sup>. Observou-se, também, uma positividade de 34% para o grupo mensal e 29% para o grupo trimestral, sendo inferiores aos resultados de

Borges *et al.*<sup>12</sup>, que foi de 61%.

Segundo Jesus *et al.*<sup>22</sup>, após a inoculação da *Leishmania* na pele e invasão macrófaga, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e ativar macrófagos, a *Leishmania* dissemina-se e, na dependência da espécie, causa a leishmaniose visceral. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- $\gamma$  e alta produção de IL-10. A restauração da resposta imune *in vitro* na LV pode ser observada pela neutralização de IL-10. Fato este, encontrado por Caldas<sup>8</sup> que quando avaliou dosagem de citocina em indivíduos com LV, observou que à medida que os indivíduos apresentavam melhora clínica havia um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , ocorrendo no final do tratamento uma diminuição na concentração desta citocina.

Alguns autores defendem a hipótese que células de indivíduos sadios expostos a *Leishmania* podem apresentar resposta linfoproliferativa e produção de

IFN- $\gamma$  *in vivo* quando estimuladas pelo antígeno deste parasita<sup>23</sup>. Por outro lado, Jose *et al.*<sup>13</sup>, detectaram IFN- $\gamma$  a partir de 30 dias após a primeira aplicação do IDRM, sendo que essa citocina se encontrava ausente no dia zero da 1ª aplicação, quando avaliadas em células mononucleares do sangue periférico. Diferente, portanto, dos nossos achados, pois em nenhum indivíduo foi detectado IFN- $\gamma$  nos tempos estudados. Talvez seja porque o material utilizado em nosso estudo foi de soro de sangue periférico e não sobrenadante de células mononucleadas.

Assim, o desenvolvimento deste estudo sobre a avaliação imunológica da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) diante do percentual de positividade encontrado no estudo não sugere sensibilização a partir de sucessivas aplicação da IDRM, sendo que a positividade observada pode ser devido a uma infecção assintomática ou reação cruzada. Não houve produção de IFN- $\gamma$ , quando analisada em soro de sangue periférico.

## Referências

1. Badaró R, Rocha H, Carvalho EM, *et al.* *Leishmania Donovanii*: an opportunistic infection associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *The Lancet*, 1986; 327(8482): 647-649.
2. Carvalho E, Teixeira R, Jonhson JR, *et al.* Cell mediated immunity in american visceral *Leishmaniasis*: reversible immune supression during aciet infection. *J Immunol*, 1981; 33: 498-502.
3. Barral A, Carvalho EM, Badaró R, *et al.* Supression limphocyte proliferative response by from patients with american visceral *Leishmaniasis*. *Am J Trop Med Hyg*, 1986; 35: 735-742.
4. Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YAM, *et al.* interleukin 1ª production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin. Invest.* 1993; 92: 324-329.
5. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of *Leishmaniasis*. *Adv parasitol.* 1993; 32: 162-222.
6. Anam K, Afrin F, Banerjee D, *et al.* Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin g3 in indian kala-azar patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999; 6(2):231-235.
7. Prata A. *Quadro clínico e laboratorial do calazar*. [Tese]. Salvador(BA); Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia; 1957.
8. Caldas, AJM. *Marcadores de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em crianças e adultos*. [Tese]. Salvador(BA); Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz. 2004; 103 p.
9. Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, *et al.* Risk factores associated with asymptomatic by *Leishmania Chagasi* in north-east brazil. *Trans R Soc Trop Med. Hyg.*, 2001; 96: 21-28.
10. Nascimento MDSB, Sousa EC, Siva IM, *et al.* Prevalence of infection by *Leishmania Chagasi* using elisa (rk39 and crude) and montenegro skin test in a endemic *Leishmaniasis* área of Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública*, 2005; 21: 1801-1807.
11. Satti I, El Hassan A, Khalil, ET, *et al.* The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in reathy volunteers. *Trans R Soc. Trop Med Hyg*, 2002; 96: 565-567.
12. Borges VC, Ruiz MCM, Gomes PM. Intradermorreação de montenegro após sucessivas repetições do teste em Porteirinhas-MG. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003; 36: 249-251.
13. Jose FF, Silva MI, Araújo MI, *et al.* Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. *Rev Soc Bras Med. Trop*, 2001; 34: 537-542.
14. Keystone EC, Demerix P, Gladman D, *et al.* Echansed dealyned hipersensitivty skin test reactive with serial skin testing in volunteers. *Clin Exp Immunol*, 1998; 40: 202- 205.
15. Lesourd BM, Wang A, Moulias R. Serial delayed cutaneous hypersensitivity skin testing with multiple recall antigens in healthy volunteers: Booster effect study. *Annals of Allergy*, 1985; 55:729-735.
16. Reed SG, Badaró R, Masur H, *et al.* Selection of a skin test antigen for american visceral *Leishmaniasis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35: 79-85.
17. Nascimento MDSB, Alcântara-Neves NM, Muniz MEB, *et al.* Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by montenegro' skin test. *Transactions of the Roy Soc of Trop Med and Hyg*, 1993; 87:91-93.
18. Weigle KA, Valderrama I, Arias AL, *et al.* Leishmanin skin test estandardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med and Hyg.*, 1991; 44: 260-271.

19. Guedes ACM, Cucé IC, Furtado T. Avaliação imunológica e histopatológica de reação de Montenegro. *Ana Bras Dermatol*, 1990; 65: 34s-40s.
20. Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW, *et al.* Epidemiology of visceral *Leishmaniasis* in north. *Braz J Infect Dis*, 1992; 166: 1124-1132.
21. Marzochi MCA. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Rev Pat Trop*, 1994; 23(2): 82-84.
22. Jesus AR, Almeida RP, Lessa H, *et al.* Cytokine profile and pathology in human *Leishmaniasis*. *J Bras Med Biol Res*, 1998; 31: 143-148.
23. Kutzais JA, Kemp M, Pousem IK, *et al.* interleukin-4 and interferon-gama production by *Leishmania* stimated peripheral blond coll from nom-exposed individuais. *J Scand Immunol*. 1995; 41: 343-349.