

INVESTIGAÇÃO SOBRE IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. I — INTRADERMO REAÇÃO DE MONTENEGRO CONCOMITANTE COM ANTÍGENOS DE *LEPTOMONAS pessoai* E "*L. brasiliensis*"

WILLIAM BARBOSA ** MARIA DO CARMO MOREIRA DE SOUSA ***
DIVINO MIGUEL RASSI **** RAQUEL LOPES DE OLIVEIRA *****
LOURDES MOTA *****

RESUMO

Os autores constataram alta especificidade de um antígeno obtido de um *Tripanosomatídeo* — "*Leptomonas pessoai*" (*Herpetomonas*) Galvão, 1968, na intradermo reação para Leishmaniose tegumentar. Além da especificidade, demonstraram sensibilidade idêntica ao do antígeno homólogo normalmente usado na reação de Montenegro. Obtiveram 30 reações positivas em 30 pacientes de Leishmaniose tegumentar e entre 64 casos de outras doenças, além dos não reatores, observaram reações negativas, inferiores a 5 mm. Em 8 casos estes resultados foram concomitantes com os dois antígenos empregados, sugerindo

possível detecção de hipersensibilidade celular por infecção específica e o valor do emprêgo simultâneo dos dois antígenos em inquéritos epidemiológicos.

INTRODUÇÃO

A "*Leptomonas pessoai*" é um flagelado isolado do *Zellus leucogrammus* (Perty, 1834) por Galvão e cols., em 1968, neste Instituto (5) e que posteriormente teve sua colocação sistemática posta em dúvida pelos autores, tendo sido aventada a hipótese de pertencer ao gênero *Herpetomonas* que vem sendo estudado intensamente nos últimos anos em

* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás (IPT da UFGO), com auxílio financeiro da COPERCOPE da UFGO.

** Prof. do Dept.º de Medicina Tropical e do Dept.º de Parasitologia do IPT.

*** Prof. Assistente do Dept.º de Parasitologia do IPT.

**** Assistente do Dept.º de Medicina Tropical do IPT.

***** Técnica de Laboratório do Dept.º de Parasitologia do IPT.

***** Auxiliar de Laboratório do Dept.º de Medicina Tropical do IPT.

relação à sua biologia, nutrição, metabolismo e imunologia em vários Centros de Pesquisas Brasileiros (3,4,8,11,13).

Os dados referentes ao seu comportamento imunológico relacionado a outros Tripanosomatídeos, até agora efetuados, têm demonstrado a existência de antígenos comuns com o *T. cruzi* e várias cêpas de *Leishmanias brasiliensis* e *donovani*, bem como à *C. fasciculata* pelo estudo de imuno-precipitação em gel (12).

Provas de proteção em camundongos contra infecção por cêpas altamente virulentas de *T. cruzi*, sugeriram também a capacidade da *L. pessoai* conferir imunidade relativa aos animais previamente inoculados (vacinados), avaliados pelo parâmetro de parasitemia e mortalidade, relativos à grupos testemunhas (11,17).

No presente trabalho pretendemos verificar a possibilidade do emprêgo da *Leptomonas pessoai* como antígeno na reação intradérmica de Montenegro aplicada ao estudo da Leishmaniose tegumentar americana e secundariamente na doença de Chagas, admitindo, de início, sua capacidade de evidenciar a hipersensibilidade tardia, naquela doença, baseados nos dados anteriormente expostos, como também estribados na experimentação já efetuadas com este mesmo propósito em Costa Rica e na Europa (6,7, 14) com antígenos heterelógos de outros Tripanosomatídeos na Leishmaniose tegumentar.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTÍGENOS — Os antígenos para intradermo reação foram preparados da seguinte maneira:

a) antígeno de *Leishmania brasiliensis*: as formas promastigotos de culturas de 4 dias, em meio de Ducrey, eram retiradas, filtradas em gase e lavadas, por três vezes, em solução fisiológica tamponada, depois suspensas em solução fluoretada fenicada e submetida a congelamento e descongelamento até a rotura completa dos parasitas, rediluídas com a mesma solução de maneira a alcançar, por nefelometria, a escala 5 de Mc Farlane e o antígeno usado, após teste de esterilidade;

b) antígeno de *Leptomonas pessoai*: foi produzido pela mesma técnica, de culturas de 2 dias de crescimento.

PACIENTES — Grupo A: 30 doentes de Leishmaniose tegumentar comprovados parasitologicamente e ou imunologicamente.

Grupo B: 12 casos de doença de Chagas.

Grupo C: 52 pacientes de outras doenças parasitárias, sem nenhuma evidência clínica de Leishmaniose tegumentar.

TÉCNICA DA REAÇÃO — Inoculação intradérmica de 0,10 ml dos antígenos A (*Leishmanias brasiliensis*) e B (*Leptomonas pessoai*) concomitantemente na face anterior do antebraço esquerdo e direito, respectivamente. Leitura da reação fei-

ta em 24 ou 48 horas. **A priori** considerávamos reações negativas aquelas com halo de endureção menores que 6 mm; reações fracamente positivas (-|-|-) com 6 a 9 mm e reações positivas as maiores de 10 mm (-|-|-|-).

RESULTADOS

As reações efetuadas nos pacientes de Leishmaniose tegumentar foram positivas tanto nos recentemente infectados quanto nos crônicos, com período de evolução, variando de 3 meses e 20 anos, dando pápulas iguais ou superiores a 10 mm, pelo menos com um dos antígenos. Destas, 23 reações com ambos os antígenos, foram exatamente do mesmo tamanho; em 7 outras a variação foi superior a 3 mm; com

a maior diferença em um caso que foi de 10 mm.

Os 12 pacientes de doenças de Chagas responderam negativamente. Em 2 casos, todavia, foi observado uma reação de 5 a 6 mm com ambos os antígenos.

Nos 52 outros pacientes testemunhas, 20 de esquistossomose, 3 de blastomicose sul americana, 9 de malária e nos 20 outros, de outras verminoses, doenças bacterianas ou aparentemente saudias, observamos 8 reações, que não ultrapassaram 5 mm, destas, 6 foram concomitantes com ambos os antígenos e 2 exclusivamente com antígeno de *Leptomonas pessoai*, sendo pois todas negativas.

Todos estes dados acham-se resumidos na tabela I.

TABELA I

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS REAÇÕES INTRADÉRMICAS COM ANTÍGENOS DE *L. pessoai* E *L. brasiliensis* EM DOENTES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E DOS GRUPOS CONTRÔLE EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA PÁPULA

Diagnóstico	Casos	Resultados concordantes		Diferença entre 3 e 10 mm		Resultados das reações	
		Nº. Abs.	%	Nº. Abs.	%	Pos.	Neg.
Leishmaniose	30	23	76,6	7	23,33	30*	—
D. Chagas	12	12	100	—	—	—	12**
Esquistossom.	20	18	90	—	—	—	20**
B.S.A.	3	3	100	—	—	—	3**
Malária	9	9	100	—	—	—	9**
Verminose e outras	20	20	100	—	—	—	20**

* Positividade acima de 10 mm

** Houve 10 reações inferiores a 5 mm além dos não reatores, sendo que 2 reações apenas com o antígeno *L. pessoai*.

COMENTÁRIOS

A verificação da capacidade de um novo agente da família Trypanosomatidae para detectar a alergia cutânea na leishmaniose tegumentar pôde ser demonstrada (fig. 1). Devendo destacar-se a grande semelhança de resultados com os obtidos com o antígeno homólogo. Sem a preocupação de ampla revisão da literatura, constatamos que, ao que parece, a *Leptomonas pessoai*, até agora, foi o antígeno heterólogo que propiciou melhores resultados. Foi assim que, em 1965, Ranque e Dunan (6) descreveram a atividade do *T. equiperdum*, da *Leptomonas ctenocephale*; da *Strigomonas (Crithidia) fasciculata* e da *Strigomonas (Crithidia) oncopelti* em testes cutâneos na leishmaniose clínica e experimental, no homem e em cães. Verificaram a positividade da reação com *T. equiperdum* no boião do oriente e positividade de 15 em

17 destes casos, com a *Crithidia oncopelti*.

Observaram resultados menos intensos, porém similares, com os outros 2 flagelados.

Resultados bem mais modestos com *Crithidia oncopelti* tinham sido relatados por Zeledom e cols., em 1960 (14) que dentre 26 pacientes com história clínica de *L. tegumentar* só encontraram 7 reações positivas.

Mais recentemente, em 1970, Ranque e Quilice (7) em comunicação ao Segundo Congresso Internacional de Parasitologia, referem-se a resultados "geralmente" positivos em casos de Leishmaniose cutânea após 3 meses de infecção, com antígenos, seja de *L. tropica major*, *Crithidia (Strigomonas oncopelti)* e ou de *T. equiperdum*.

A par da simples constatação da resposta mediada por célula usando este novo antígeno heterólogo (*L. pessoai*), pareceu-nos óbvio que na padronização da

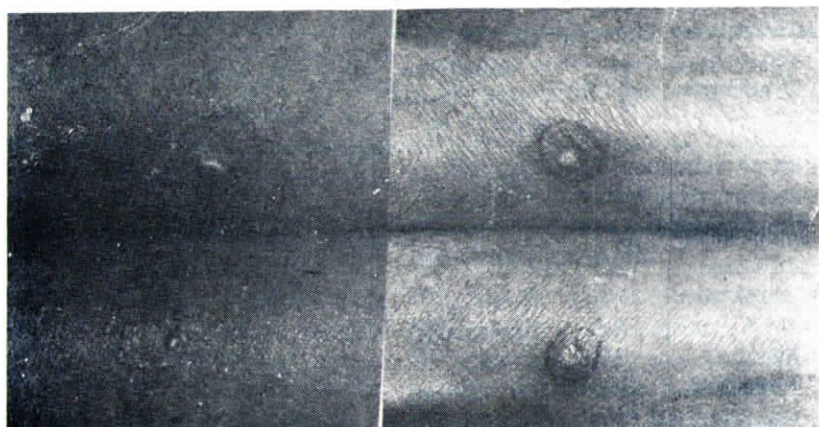


Fig. 1 — Reações intradérmica e comparativa com antígenos de *L. brasiliensis* e "*Leptomonas*" *pessoai*.

leitura da reação deva se admitir, seja qual for o antígeno empregado, que somente reações iguais ou superiores à 10 mm tenham significado definitivo de Leishmaniose cutânea mucosa doença, presente ou pretérita. Pois nos 30 casos de doença, comprovados na sua maioria parasitologicamente, estudados por nós, obtivemos reações deste tipo, pelo menos com um dos antígenos. Nos grupos testemunhas: o primeiro constituído de 12 casos de doenças de Chagas, onde se poderia esperar alguns resultados falsos positivos, embora se saiba da dificuldade, e mesmo dos resultados infrutíferos em se demonstrar a alergia cutânea nesta doença (1), constatamos apenas 2 casos com reação de 5 mm; e no grupo, constituído de 52 pacientes de endemias comuns em nosso meio, verificamos apenas 8 casos entre 3 e 5 mm. Fato que parece traduzir a detecção de reação por infecção anterior pelo agente, vez que os resultados percentualmente, se superpõem aos observados por um de nós (2) em inquérito intradérmico com antígeno homólogo realizado em pacientes portadores de várias doenças nesta mesma área.

A especificidade da reação para a infecção é sugerida também pela concordância dos resultados que ocorreram 8 vezes nos 10 casos, no que pese a intensidade da reação que jamais ultrapassou 6 mm.

Se fôssemos analisar os resultados obtidos pelas referências da literatura, "a rigor" poderíamos considerar todas as reações, entre

os grupos testemunhas, simplesmente como negativas e concluiríamos pela alta especificidade e sensibilidade das cêpas de *L. brasiliensis* e de *Leptomonas pessoai* com que trabalhamos — que dariam 100% de resultados positivos na Leishmaniose cutânea e sempre resultados negativos na ausência da doença clínica ou retrospectiva. Todavia, somos levados a crer na especificidade daquelas reações pouco intensas, menores que 6 mm, pois as mesmas ocorreram nos 8 dos 10 casos concomitantemente com os dois antígenos, sugerindo infecção.

Um argumento de base experimental parece confirmar essas assertivas seria as observações de Serguiev e Shuikina (10) que fazendo reações intradérmicas, com antígenos homólogos, bem padronizados (*L. tropica major*) formas promastigotos, suspensos na fase líquida do meio, ou após lavagem, suspenso em solução de Hanks e usados após inativação com 0,25% de fenol na concentração de 10^3 a 10^6 em 0,1 ml em pacientes imunizados por vacinação prévia com culturas de *L. tropica major* observaram após a vacinação, 90% e mais de positividade quando usaram concentrações 10^5 ou 10^6 . O importante é ressaltar que os autores consideraram apenas como positividade o diâmetro de hiperemia, sendo de 6 a 8 mm fracamente positiva; maior que 9 mm positiva e as reações menores de 6 mm negativa. Embora se trate de uma imunização artificial por vacinação, convém lembrar, to-

davia, que a mesma implica na inoculação de culturas vivas e que devem produzir nódulo, úlcera e escara para serem eficazes: uma verdadeira doença (9).

Somos levados a crer que, em inquéritos epidemiológicos o uso de dois antígenos com potencialidade similares, tais o da *Leptomonas pessoai* e *L. brasiliensis*, permitirão também detectar reações específicas mais fracas comprovadas pela positividade simultânea das reações, que traduzem, sem dúvida, ou pelo menos, sugerem infecções pretéritas pela *L. brasiliensis*.

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON AMERICAN MUCOCUTANEOUS LEISHMANIASIS — CONCOMITANT INTRADERMAL MONTENEGRO REACTION WITH OF LEPTOMONAS PESSOAI AND L. BRASILIENSIS

S U M M A R Y

High specificity of an antigen obtained from Trypanosomatid — "*Leptomonas pessoai*" (Herpetomonas) Galvão, 1969, was observed in the intradermal test for cutaneous leishmaniasis. Besides specificity, a sensitivity similar to the homologous antigen normally used in the Montenegro reaction was found. 30 positive reactions were obtained in 30 patients with mucocutaneous leishmaniasis and in 64 patients with other diseases ten negative reactions, less than 5 mm were observed. In 8 cases these weakly positive reactions were concomitant with the two

antigens, suggesting a probable cellular hypersensitivity by specific infection and the value of the simultaneous use of both antigens in epidemiologic surveys.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; MAGALDI, C. & PESSOA, S.B. — Intradermo reação para o diagnóstico da doença de Chagas com Antígeno de *Trypanosoma cruzi* obtido de cultura de tecido. — Rev. Goiana Med. 10:121, 1964.
2. BARBOSA, W. — Investigação epidemiológica na Leishmaniose tegumentar — XXVI Congr. brasil. Dermat. Recife, 1969.
3. CARVALHO, A.L.M. — Biologia da *Leptomonas pessoai*. In Tese. Belo Horizonte (em preparação). 1972.
4. CARVALHO, A. L. M.; & GALVÃO, A.B. — *Leptomonas pessoai*. Revisão sistemática. (comunicação pessoal), 1971.
5. GALVÃO, A.B.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, A.L.M.; & VEIGA, G.P. — *Leptomonas pessoai* sp. n (Trypanosomatidae, Kinetoplastidae, protozoa). — Rev. Goiana Med. 16:229, 1970.
6. RANQUE, J. & DUNAN -- Summary of recent abstracts — Leishmaniasis. Trop. Dis. bull. 63:610, 1966.
7. RANQUE, J. & QUILLICE, M. — Recent advances in immunodiagnosis of Leishmaniasis — Resume of second Internat. Congr. of Parasit. — J. of Parasit. 56:277, 1970.
8. ROITMAN, C. — Nutrição e metabolismo de um Trypanosomatídeo de inseto cultivado em meio definido a 37°C — Tese doutoramento. — Inst. de Microb. da UF Rio de Janeiro, 1972.
9. SERGUIEV, V.P. and al. — Results of mass vaccinations against zoonotic cutaneous Leishmaniasis. Madskey Parasit. 39:541, 1970. In Trop. dis. bull., 1971
10. SERGUIEV, V.P. & SHUIKINA, E.E. — The manifestation of Leishmaniasis test in artificially immunised persons — Resume of second Congr. Internat. of Parasit. — J. of Parasit. 56:470, 1970.
11. SOUSA, M.C.M. — Estudo imunológico da *L. pessoai* — Investigação contra infecção por *T. cruzi* em camundongos — Tese (em preparação), 1972.
12. SOUSA, M.C.M. & BARBOSA, W. — Estudo do antígeno de *Leptomonas pessoai* em comparação com antígenos de *Criethidia fasciculata*, *T. cruzi* e *L. brasiliensis* pela imunoprecipitação. Apresentado no VIII Cong. Soc. Brasil. Med. Trop. vereiro, 1972. (mimeografado).
13. SOUSA, M.C.M. & ROITMAN, I — Protective effect of *L. pessoai* against the infection of mice by *Trypanosoma cruzi* Rev. Microbiol. 1971.
14. ZELEDOM, R.; HIDALGO, R. W. & De HIDALGO, H.I. — Intradermo reação de Montenegro com antígeno de *Strigomonas oncopelti*. Nota previa. Rev. Biol. Trop. San José, Costa Rica 8:146,1960.