

## PADRONIZAÇÃO DO ANTÍGENO DE MONTENEGRO

M. N. MELO (1), W. MAYRINK (1), C. A. da COSTA (2), P. A. MAGALHÃES (3), M. DIAS (4), P. WILLIAMS (5), F. G. ARAUJO (1), M. V. COELHO (1) e S. M. BATISTA (1,6)

### RESUMO

São apresentados os resultados do teste de Montenegro realizados em 100 pacientes clínica e parasitologicamente diagnosticados como portadores de leishmaniose tegumentar americana, residentes em área endêmica e em 30 indivíduos sem história clínica da doença, residentes em área não-endêmica. Utilizaram-se antígenos com concentrações de 10, 20, 30 e 40  $\mu\text{g}$  de nitrogênio proteico por mililitro e salina mertiolatada como controle. Foi observado que existe uma relação linear entre as áreas médias das reações e as concentrações empregadas do antígeno. As reações obtidas com o antígeno de 40  $\mu\text{g}$  N/ml foram mais intensas e levaram a maior porcentagem de positividade. A fim de aumentar a sensibilidade da reação e de permitir uma comparação entre os resultados obtidos pelos vários pesquisadores em outras regiões da América, os Autores sugerem a padronização do antígeno de Montenegro com base na dosagem do nitrogênio proteico, cuja concentração deve ser de 40  $\mu\text{g}$  N/ml.

### INTRODUÇÃO

Em 1926 MONTENEGRO<sup>8</sup> introduziu na prática médica com a finalidade de auxiliar no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, uma reação alérgica realizada através da injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas de *Leishmania braziliensis*. Embora as publicações posteriores sobre esta reação sejam relativamente numerosas (CORREA & AMATO NETO<sup>4</sup>; PIFANO<sup>13</sup>; BARBOSA & col.<sup>1</sup>), as modificações introduzidas na mesma não resultaram na sua padronização de modo a permitir a comparação dos resultados obtidos por vários Autores. Não existe nenhuma tendência para uniformização das técnicas de preparo do antígeno, determinação de sua concentração e dos critérios utilizados na interpretação dos resultados.

O objetivo de nosso trabalho foi o de co-

lher dados que possam contribuir para a padronização da reação de Montenegro. Para isso foram realizadas em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, Vale do Rio Doce — Minas Gerais, Brasil, testes de Montenegro com antígeno padronizado em função do seu conteúdo proteico através da dosagem do nitrogênio. Foram utilizadas quatro diferentes concentrações do antígeno e estudadas as relações quantitativas entre a concentração do antígeno e a resposta obtida em pacientes com diagnóstico clínico e parasitológico de leishmaniose tegumentar americana.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material Humano

O teste de Montenegro foi realizado em 130 indivíduos, dos quais 100 procediam de

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais — Grupo de Estudos de Leishmanioses.

- (1) Do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG — Belo Horizonte, Brasil
- (2) Da Escola de Farmácia e Bioquímica — UFMG
- (3) Médico Sanitarista da SUCAM
- (4) Da Escola de Farmácia da UFOP
- (5) Professor Visitante — Conselho Britânico
- (6) Da Fundação Oswaldo Cruz

área endêmica e apresentavam lesões cutâneas diagnosticadas, clínica e parasitologicamente, como leishmaniose tegumentar americana. Trinta indivíduos controle residiam em área não-endêmica e não apresentavam história clínica de leishmaniose. Em ambos os grupos a idade dos pacientes variou de 3 a 70 anos.

### Antígenos

Os antígenos foram preparados com massas de promastigotas de *Leishmania braziliensis*, cultivadas em meio de LIT, (CAMARGO<sup>3</sup>) lavadas 3 vezes em solução fisiológica e centrifugadas a 2.000 r.p.m. à 4°C por 20 minutos. O sedimento foi resuspenso em solução fisiológica e submetido a ação de ultra-som (frequência de 800 quilociclos e o consumo de energia de cerca de 30 watts) 10 vezes durante 1 minuto, com intervalo de quatro minutos entre uma e outra sonificação. A dosagem do nitrogênio proteico foi realizada pelo processo de "nesslerização". A seguir foram feitas diluições do antígeno com volumes adequados de salina mertiolatada para se obter concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg N/ml.

### Reações Intradérmicas

As reações foram realizadas injetando-se intradermicamente 0,1 ml de cada concentração do antígeno e igual volume de solução salina mertiolatada como controle, na face anterior do antebraço direito (antígenos de 10, 20 µg N/ml e salina mertiolatada) e esquerdo (antígenos de 30 a 40 µg N/ml). A leitura foi feita 72 horas após a injeção. A positividade da reação foi indicada pela formação de vesícula ou pápula, ou uma área de infiltração perceptível pelo tacto. Os limites das infiltrações foram marcados com tinta e transferidos

para um papel absorvente previamente umedecido. As áreas delimitadas no papel foram medidas segundo método proposto por PEL-LEGRINO & MACEDO<sup>9</sup>.

### Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de regressão múltipla. As variáveis foram as áreas das pápulas, a concentração do antígeno, sexo e idade dos pacientes.

### RESULTADOS

As porcentagens de reações positivas e as áreas médias obtidas em cada concentração do antígeno são apresentadas no Quadro I.

A análise estatística dos resultados obtidos mostrou que há uma relação linear entre as áreas médias das pápulas e a concentração do antígeno. A equação da reta de regressão foi a seguinte:

$A = 1,37427 + 0,19495C$ , onde A = área em cm<sup>2</sup> e C = concentração de nitrogênio proteico em µg por mililitro de antígeno.

O coeficiente de determinação desta equação foi da ordem de 18,9%, ou seja, 43,5% da variação da área das pápulas é justificada pela concentração do antígeno.

Embora o erro experimental tenha sido elevado o efeito da concentração foi significativo ( $p < 0,01$ ). Os efeitos de idade e sexo não foram significativos nesta análise.

A possível causa de erro foi a não inclusão da variação individual na análise de variância.

Nos indivíduos controles, em todas as concentrações do antígeno, as reações foram negativas.

### Q U A D R O I

Resultados da intradermorreação de Montenegro realizada em 100 pacientes com leishmaniose tegumentar americana ativa, com antígenos na concentração de 10, 20, 30 e 40 µg N/ml

Concentração dos antígenos em µg de nitrogênio proteico por mililitro de antígeno	Áreas médias das pápulas em cm <sup>2</sup>	Desvio padrão	Reações positivas (%)
10	0,401	0,207	59
20	0,517	0,284	69
30	0,611	0,557	78
40	0,997	0,854	96
Salina	0,056	0,237	—

## DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos com antígenos de diferentes concentrações de nitrogênio proteico (Quadro I), observamos que a resposta cutânea ao antígeno ou seja a intensidade da reação é função de sua concentração, dentro dos limites por nos utilizados (10 a 40  $\mu\text{g N/ml}$ ), e que a intensidade de reação e a porcentagem de positividade são maiores quando se utiliza o antígeno de 40  $\mu\text{g/N}$ .

Padronizamos o antígeno de Montenegro pela determinação quantitativa do nitrogênio proteico, método já utilizado por outros Autores para padronização biológica de antígenos (KAGAN & col. 6). Os antígenos até agora utilizados na intradermoreação de Montenegro variam enormemente em sua concentração e de modo geral melhorias técnicas no preparo e na purificação, tem sido introduzidas por vários Autores (CORREA & AMATO NETO 4 e PIFANO 13) mas sem nenhuma preocupação com padronização.

Os testes quantitativos na reação de Montenegro foram estudados inicialmente por BUSS 2 e SALLES GOMES 15 que utilizaram 1.000.000 promastigotas por mililitro do antígeno, e mais tarde por ROTBERG 14 que fez estudo detalhado sobre as diferenças na reatividade do antígeno, em 55 casos de leishmaniose tegumentar americana. Utilizou concentrações de 1.000 até 10.000.000 promastigotas por mililitro de antígeno e observou reações mais intensas com as maiores concentrações, decrescendo com as diluições sucessivas. Em nossa experiência também o antígeno mais concentrado 40  $\mu\text{g N/ml}$  mostrou áreas médias das pápulas maiores (Quadro I).

Com a utilização do antígeno de 40  $\mu\text{g N/ml}$  não encontramos reações duvidosas mencionadas por PESSOA & PESTANA 12 e cujo significado é discutível. A intensidade de reação sendo maior facilitaria enormemente a leitura qualquer que seja o critério utilizado para fazê-la: medida do diâmetro das pápulas (MENEZES & col. 7, BARBOSA & col. 1); determinação da área das pápulas (FURTADO & PELLEGRINO 5), critério que procura classificar as reações positivas em diferentes graus (PESSOA 10; PESSOA & BARRETTO 11).

Somos levados a crer, baseando na experiência de termos submetidos o antígeno a

uma standardização em bases experimentais, que nos inquéritos epidemiológicos e em diagnósticos individuais, o uso do antígeno de 40  $\mu\text{g N/ml}$  permitiria detectar reações específicas mais fracas e aumentar a positividade sem prejuízo para a especificidade da reação. Como se pode ver (**Resultados**) os 30 indivíduos utilizados como controles deram reações negativas. A padronização do antígeno com 40  $\mu\text{g/N}$  permitiria uma comparação entre vários trabalhos realizados em diferentes locais do país, o que até agora é extremamente difícil ou praticamente impossível de ser estabelecido.

Desejamos que nossos resultados possam contribuir para padronização do antígeno de Montenegro, o que seria um importante passo para a padronização da própria técnica da reação. Embora não seja de absoluta especificidade, podendo dar reações falso-positivas e falso-negativas, a reação de Montenegro é extensamente empregada em pesquisas epidemiológicas, estudos de incidência, prevalência e ainda é o método indireto mais prático e seguro de diagnosticar leishmaniose tegumentar americana nas condições de trabalho nas zonas rurais, onde se localizam os principais focos endêmicos da América.

## SUMMARY

### Standardization of the Montenegro antigen for intradermal test in American Leishmaniasis

One hundred patients with active cutaneous leishmaniasis were skin-tested with four concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g N/ml}$ ) of the Montenegro antigen. Merthiolated saline was used as control. Thirty people without clinical histories of the disease were also tested; all members of this control group failed to respond to the antigen.

In patients giving positive reactions to the test, there was a linear relationship between the mean area of the wheal and the concentration of the antigen. The proportion of positive reactions and the degree of cutaneous response were greatest when tests were performed with the 40  $\mu\text{g N/ml}$  antigen.

In order that results from different parts of America may be more readily compared, we

propose that a concentration of 40  $\mu\text{g}$  N/ml should be adopted as the standard for Montenegro tests. At this concentration, the antigen is highly sensitive without loss of specificity.

### AGRADECIMENTO

Os Autores agradecem ao Dr. Ivan Sampaio pela análise estatística dos dados obtidos no presente trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; RASSI, D. M.; OLIVEIRA, R. L. & MOTA, L. — Investigação sobre imunologia da leishmaniose tegumentar americana. I — Intradermo reação de Montenegro com antígenos de *Leptomonas pessoai* e *L. brasiliensis*. *Rev. Pat. Trop.* 3: 377-383, 1972.
2. BUSS, G. — Untersuchungen mit *Leishmania* vakzine. *Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg.* 21: 65-72, 1929.
3. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic tripanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 93-100, 1964.
4. CORRÊA, M. D. A. & AMATO NETO, V. — Intradermoreações com antígeno de culturas de *Leishmania brasiliensis* submetidas à ação do ultrassom. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 17: 39-42, 1957.
5. FURTADO, T. & PELLEGRINO, J. — Intradermal test in American Leishmaniasis with a polysaccharide fraction isolated from *Leishmania brasiliensis*. *J. Invest. Dermat.* 27: 53-59, 1965.
6. KAGAN, I. G.; PELLEGRINO, J. & MEMÓRIA, J. M. P. — Studies on the standardization of the intradermal test for the diagnosis of bilharziasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 10: 197-207, 1961.
7. MENEZES, J. A.; REIS, V. L. L. & COURA, J. R. — Inquérito preliminar pela reação de Montenegro em população rural no Município de Trajano de Moraes, RJ. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 6: 171-176, 1972.
8. MONTENEGRO, J. — A cutis reação na leishmaniose. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo* 1: 323-330, 1926.
9. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. C. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. *Rev. Brasil. Malariol.* 8: 499-509, 1956.
10. PESSÓA, S. B. — *Parasitologia Médica*. 8ª edição. Rio de Janeiro, Livraria Editora Guanabara Koogan, 1974.
11. PESSÓA, S. B. & BARRETTO, M. P. — *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro, Ministério de Educação e Saúde, 1948.
12. PESSÓA, S. B. & PESTANA, B. R. — A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. *São Paulo Médico* 15: 133-151, 1926.
13. PIFANO, F. — La evaluación de la leishmaniasis tegumentaria americana en el Valle de Aroa, Est. Yaracuy, mediante el índice alérgico. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.* 4: 25-35, 1962.
14. ROTBERG, A. — *Contribuição para o estudo da alergia na Leishmaniose tegumentar americana*. [Tese doutorado]. São Paulo, USP, 1952.
15. SALLES-GOMES, L. — A intradermo-reação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil Méd.* 53: 1079-1087, 1939.

Recebido para publicação em 12/5/1976.