

REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA E INTRADERMORREACÇÃO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM MORADORES NA ÁREA DE JACAREPAGUÁ (RIO DE JANEIRO). ESTUDO COMPARATIVO DOS RESULTADOS OBSERVADOS EM 1974 E 1978

Mauro Celio de A. MARZOCHI (1), Sergio G. COUTINHO (2), Paulo C. SABROZA (3) e Wilson Jacinto S. de SOUZA (4)

RESUMO

A partir de surto epidêmico de LTA ocorrido em 1974 na área periurbana de Jacarepaguá, realizou-se a pesquisa de anticorpos pela imunofluorescência indireta (IF) em 92 indivíduos da população, distribuídos em quatro grupos de acordo com as características das lesões e respostas à intradermorreação de Montenegro (IDRM). Em 1974 verificou-se nos indivíduos do **Grupo I** (lesão em atividade e IDRM positiva) 90,4% dos soros reagentes à diluição de 1:90 ou superior; no **Grupo II** (lesão cicatrizada espontaneamente e IDRM positiva) 30%, no **Grupo III** (sem lesão ou cicatriz e IDRM positiva) 39,4% e no **Grupo IV** (sem lesão e IDRM negativa) 14,3%. Entre 47 indivíduos daqueles mesmos grupos, reavaliados em 1978 pela IF, IDRM e exame clínico, verificou-se que 10% dos soros eram reagentes em diluições iguais ou superiores a 1:90 no **Grupo I** e 0% nos demais grupos. Observou-se também modificação da resposta à IDRM com tendência à negatificação, que variou de 42,8 à 57,9% nos grupos reavaliados.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), de ocorrência esporádica no Estado do Rio de Janeiro, tem apresentado surtos ocasionais de relativa importância^{19,20,26}, sem que se tenha logrado equacionar muitos dos aspectos relacionados à epidemiologia dessa parasitose. Por outro lado, conhecimentos básicos referentes à imunologia e ao diagnóstico laboratorial dessa protozoose estão ainda a merecer maiores estudos^{14,16,30}.

A intradermorreação (IDRM), utilizando formas promastigotas em suspensão preconizada por MONTENEGRO em 1926 e modificada por SALES GOMES em 1939, tem sido emprega-

da como o mais valioso recurso no diagnóstico imunológico da LTA dada sua grande sensibilidade, que varia segundo inúmeros Autores entre 86,4 e 97,5%, apesar de ser grupo-específico. No entanto, apresenta reações cruzadas com outras espécies de leishmânia parasitas do homem e de outros animais e também com outras afecções como pênfigo, lepra, blastomicose e tuberculose ganglionar e disseminada. A maior intensidade dessa reação depende da concentração do antígeno, do tempo de evolução da lesão, da multiplicidade das lesões e da presença de lesões mucosas. PESSOA & PESTANA²⁴ admitem que a IDRM permaneça indefinidamente positiva, após a cura clínica das lesões cutâneas e mucosas o

Trabalho realizado no Instituto Oswaldo Cruz (Laboratório de Protozoologia) e na Escola Nacional de Saúde Pública — FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

(1) Pesquisador Associado — IOC — FIOCRUZ

(2) Pesquisador Titular — IOC — FIOCRUZ

(3) Professor-Assistente do Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos da Escola Nacional de Saúde Pública — FIOCRUZ

(4) Bolsista do CNPq. na FIOCRUZ

que, no entanto, não tem sido comprovado por outros Autores, entre os quais FURTADO¹⁴ e MAYRINK & col.¹⁷.

FURTADO & PELLEGRINO¹³ ensaiaram como antígeno a fração polissacarídica de cultura de *L. brasiliensis* obtendo reação comparável em sensibilidade àquela obtida com a suspensão de 10 milhões de promastigotas por ml e com a vantagem de apresentar maior especificidade e mínimas reações do tipo tardio. Mais recentemente, PELLEGRINO & col.²³ ensaiaram o mesmo teste com extrato bruto proteico de *L. brasiliensis* conseguindo minimizar ainda mais as reações do tipo tardio. MELO & col.¹⁸ utilizaram esse mesmo antígeno na concentração de 40 µg de N proteico por ml, na tentativa de uma melhor padronização.

Em relação ao diagnóstico sorológico da LTA, a aplicação das técnicas de imunofluorescência tem apresentado resultados satisfatórios, se bem que algumas vezes contraditórios. Conforme BRAY & LAINSON⁶, enquanto na espúndia (*L. brasiliensis*) são elevados os títulos de anticorpos circulantes, em portadores da úlcera dos chicleros (*L. mexicana*) a reação de imunofluorescência é pouco sensível.

Utilizada pela primeira vez por ODDO & CASCIO²², a técnica de imunofluorescência tem sofrido modificações sendo adotado, na maioria das vezes, antígeno de formas promastigotas de *Leishmania* 1,5,6,7,8,9,12,27.

Em 62 indivíduos com lesões cutâneas e IDRMs positivas CHIARI encontrou 77,5% de positividade, utilizando antígenos diferentes com diluição dos soros a partir de 1:45. Verificou que a maior sensibilidade ocorre com o antígeno homólogo, proporcional ao tempo de duração da infecção e ao número de lesões, sendo porém grupo-específico para a família *Trypanosomatidae*.

Outros Autores utilizaram como antígeno para a IF as formas amastigotas a partir de tecido de hamster infectado, tendo CONVIT & PINARDI encontrado positividade de 63,5%.

WALTON & col.²⁹ obtiveram melhores resultados, com 89% de positividade, utilizando como antígeno formas amastigotas de *L. brasiliensis* obtidas em cultura de tecido o que, no entanto, não fora observado por BRAY & LAINSON⁶ anteriormente.

CHIARI⁸ tem dado ênfase à utilização da IF na avaliação da eficácia terapêutica na LTA, demonstrando que o soro pode tornar-se não reator 25 dias após a cicatrização das lesões tratadas com antimonialis. Outros Autores não têm referido, entretanto, resultados tão satisfatórios.

Apesar da sensibilidade que se tem verificado para o teste cutâneo e o exame sorológico, tanto BITTENCOURT & col.⁵, como NERY-GUIMARÃES & col.²¹ não observaram nenhuma relação entre os níveis de anticorpos detectados pela IF e a resposta cutânea à IDRMs em indivíduos com lesão de LTA em atividade.

O presente trabalho pretende avaliar o comportamento da IF e da resposta à IDRMs após quatro anos de um surto epidêmico de LTA, em quatro grupos de indivíduos que tiveram ou não lesão tegumentar por ocasião do surto. Este ocorreu no sudoeste do Bairro de Jacarepaguá (14.000 habitantes) da Cidade do Rio de Janeiro, em 1974, onde foram relacionados cerca de 150 casos com lesão tegumentar, distribuídos, predominantemente, nos povoados do Camorim, Sacarrão, Pacuí, Cabungui e adjacências²⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

Em 1974, no povoado do Camorim, examinou-se 591 indivíduos procurando-se identificar ulcerações ou cicatrizes compatíveis com LTA, com ou sem história de medicação antimonial. Desses relacionou-se 92 indivíduos sendo todos submetidos à IDRMs. Agrupados de acordo com idade e sexo, e segundo características clínicas e de respostas à IDRMs, procedeu-se em cada grupo a coleta de sangue para reação de imunofluorescência indireta (IF).

Os 92 indivíduos estudados em 1974 foram subdivididos em 4 grupos:

Grupo I — Lesão tegumentar em atividade e IDRMs positiva (21 indivíduos);

Grupo II — Lesão tegumentar cicatrizada sem tratamento e IDRMs positiva (10 indivíduos);

Grupo III — Ausência de lesão tegumentar ou cicatriz e IDRMs positiva (33 indivíduos);

Grupo IV — Ausência de lesão tegumentar ou cicatriz e IDRMs negativa (28 indivíduos).

Em 1978 procurou-se reavaliar os mesmos indivíduos realizando-se tanto a IDRMs como a

IF, além da avaliação clínica, tendo sido possível reencontrar 47 daqueles 92 indivíduos.

Para a IDRM utilizou-se, nos dois inquéritos, o antígeno padronizado pelo processo de "nesslerização", na concentração de 40 µg de N/ml, preparado pelo Departamento de Parasitologia do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais e fornecido gentilmente pela SUCAM. O teste foi aplicado na superfície de flexão do antebraço esquerdo, na quantidade de 0,2 ml de antígeno e a leitura realizada após 72 horas. Foi considerado negativo, na ausência de reação ou com formação de pápula de diâmetro igual ou inferior a 5mm e, positivo, sendo o diâmetro da pápula de 5,1 mm ou superior.

Os casos, em 1974, com lesão ou lesões em atividade e IDRM positiva foram tratados com antimoniato de N-metilglucamina, na dose de 60 mg do sal por quilograma de peso, por via intramuscular, em séries de injeções, até cicatrização completa das mesmas. Para a realização das reações de imunofluorescência indireta o sangue foi colhido, na primeira fase — em 1974, através de veno-punção, sorado, centrifugado e preservado por refrigeração. Na segunda fase em 1978, foi adotada a coleta de sangue em tubo capilar de micro hematócrito após punção da polpa digital com lanceta descartável e preservado por refrigeração até o momento do uso. Estes tubos, com diâmetro padronizado, permitiram o desenvolvimento de técnicas sorológicas quantitativas, a partir do material coletado. Em ambos os casos foram utilizadas diluições ao dobro, a partir de 1:45, sen-

do usadas, como antígeno, formas promastigotas de *L. brasiliensis* (cepa J.O.F.) procedente de caso humano de LTA e mantida por vários anos em meio NNN.

O antígeno foi preparado através da adição de tampão PBS, pH 7,2, ao meio NNN onde formas promastigotas eram cultivadas por 8-9 dias, em temperatura em torno de 24°C. A esta suspensão adicionava-se formol a 2% tamponado e após centrifugações obtinha-se a concentração de formas promastigotas apropriadas para uma boa leitura ao microscópio, utilizando-se lâmpada HBO 200 e filtro BG 12. Os conjugados de isotiocianato de fluoresceína anti-imunoglobulinas humanas eram de origem Hyland (Travenol Laboratories, USA).

Para análise das reações, os títulos da IF foram agrupados de acordo com suas frequências. A comparação entre os resultados, nos diversos grupos de indivíduos examinados, foi realizada utilizando-se a média geométrica das recíprocas dos títulos (MGRT) e a proporção de reatores (soro reagentes à diluição 1:90 ou superior).

RESULTADOS

A reação de imunofluorescência indireta (IF) em indivíduos dos quatro grupos, em 1974, apresentou sensibilidade de 90,4% no grupo com lesão (**Grupo I**), já que 19 dos 21 casos apresentaram soros reagentes em diluições iguais ou superiores a 1:90 (Tabela I).

T A B E L A I

Frequência dos títulos de anticorpos para leishmânia tegumentar americana pela reação de imunofluorescência indireta em 92 indivíduos de Jacarepaguá, RJ, examinados em 1974 e divididos em 4 grupos de acordo com o aspecto clínico e o resultado da intradermorreação de Montenegro

Grupos de acordo com os resultados observados em 1974	N.º de soros examinados	Não-reatores (*)		Reatores		Recíproca dos títulos da IF				MGRT
		N.º	(%)	N.º	(%)	90	180	360	720	
I — Lesão em atividade e IDRM positiva	21	2	(9,5)	10	(90,4)	6	8	4	1	110.41
II — Lesão cicatrizada e IDRM positiva	10	7	(70,0)	3	(30,0)	1	—	1	1	5.46
III — Ausência de lesão ou cicatriz e IDRM positiva	33	20	(60,6)	13	(39,4)	8	4	1	—	6.69
IV — Ausência de lesão ou cicatriz e IDRM negativa	28	24	(85,7)	4	(14,3)	4	—	—	—	1.90

Não-reatores: soro não reagente à diluição 1:90

MGRT: Média geométrica da frequência das recíprocas dos títulos da IF

(*) P < 0.01, segundo teste do Qui-quadrado para comparação da frequência de não-reatores nos quatro grupos

Entre os indivíduos dos grupos II e III, com IDRDM positiva mas sem lesão em atividade, a proporção de soros reagentes foi cerca de três vezes menor que no Grupo I. Entre os indivíduos do Grupo II, apesar da ausência de lesão ativa ou cicatrizada e IDRDM negativa, a proporção de soros reagentes pela IF foi de 14,3%. Esse grupo foi constituído com indivíduos da mesma área, na vigência de um surto epidêmico de LTA.

A distribuição da frequência dos títulos entre os quatro grupos foi significativamente diferente, de acordo com o teste de X^2 para um nível de significância de 0,01. A MGRT foi muito maior no grupo com lesão em atividade (Grupo I) que nos grupos restantes, sendo que entre os não-reatores e os reatores sem lesões em atividade também foi encontrado diferença nas

médias, apesar do pequeno número de indivíduos estudados.

Entre os 64 indivíduos com IDRDM positiva em 1974, pertencentes aos grupos I, II e III, não foram evidenciadas diferenças significantes entre os títulos da IF em relação à idade e ao sexo.

Quatro anos após, em 1978, foi possível reavaliar-se tanto clinicamente como através da IDRDM e da IF, 47 dos 92 indivíduos, sendo 10 do Grupo I; 7 do Grupo II; 19 do Grupo III e 11 do Grupo IV. Em nenhum deles foi observado lesões de LTA, cutânea ou mucosa, em atividade.

Os resultados da reação de imunofluorescência indireta e de IDRDM nestes 47 indivíduos, em 1978, são apresentados segundo os quatro grupos originais de 1974 (Tabela II).

T A B E L A II

Frequência dos títulos de anticorpos para Leishmaniose Tegumentar Americana pela reação de imunofluorescência indireta assim como resultados da intradermorreação de Montenegro (IDRM) em 47 indivíduos em Jacarepaguá (RJ) reexaminados em 1978 entre os 92 anteriormente estudados e agrupados segundo aspectos clínicos e de resposta a IDRDM em 1974

Grupos de acordo com os resultados de 1974	N.º de indivíduos examinados	Recíproca dos títulos da IF em 1978						Resultados da IDRDM em 1978			
		NR		90		180		Positivos		Negativos	
		N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
I — Lesão em atividade (*) e IDRDM positivo	10	9	(90,0)	1	(10,0)	—	—	5	(50,0)	5	(50,0)
II — Lesão cicatrizada e IDRDM positiva	7	7	(100,0)	—	—	—	—	4	(57,2)	3	(42,8)
III — Ausência de lesão ou cicatriz e IDRDM positiva	19	19	(100,0)	—	—	—	—	8	(42,1)	11	(57,9)
IV — Ausência de lesão ou cicatriz e IDRDM negativa	11	11	(100,0)	—	—	—	—	1	(8,3)	10	(90,9)

N.R. Soro não reagente à diluição 1:90

(*) Os 10 casos com lesões em atividade em 1974, apresentaram lesões cicatrizadas em 1978

DISCUSSÃO

Os resultados da IF em 1974, apresentaram uma porcentagem de soros reagentes relativamente superior ao obtido por CHIARI³, em Minas Gerais, que encontrou 77,5%.

Em 1978 as coletas de sangue para IF foram feitas em tubos capilares que, em experimentos prévios, forneceram resultados semelhantes aos da veno-punção. Entretanto, parecidos mais apropriado considerar-se a diluição 1:90 como limite de especificidade da reação, ao contrário de alguns Autores que preferem como limite a diluição 1:45.

Quando se compara os resultados da IF obtidos em 1974 e 1978 (Tabelas I e II), pode-se observar uma redução dos níveis de anticorpos pela IF, em todos os grupos, inclusive no Grupo I de pacientes com lesão em atividade e que receberam tratamento antimonial em 1974. Apenas um soro reagente à diluição de 1:90 foi observado entre os 47 estudados.

BITTENCOURT & col.⁵ trabalhando com soros não diluídos, referem resultados duvidosos ou negativos após terapêutica antimonial porém sem precisar a época da reavaliação. Em indivíduos tratados pelo pamoato de cicloguanil (Camolar), WALTON observou tanto redu-

ção dos níveis de anticorpos como flutuações irregulares e estabilidade em níveis relativamente altos, vários meses após o tratamento. Esse quimioterápico, no entanto, é considerado pouco eficaz.

Segundo CHIARI⁸ resultados positivos da IF, pós-tratamento, devem ser atribuídos à persistência de leishmânias causadoras de infecção latente, por má resposta ao antimonial, apesar da cicatrização da lesão, podendo aparecer no futuro manifestações clínicas decorrentes da reativação da infecção. No presente trabalho, a reavaliação realizada quatro anos após não evidenciou nenhum caso de lesão mucosa, porém foi observado um caso em que a IF permaneceu positiva, apesar da cura-clínica da lesão.

Ao contrário do que tem sido admitido em relação à persistência da positividade da IDRM, muitas vezes tem sido observada a negatificação do teste após a cura clínica, como referem FURTADO¹⁴ e MAYRINK & col.¹⁷. Estes últimos verificaram a negatificação do teste em 52% dos casos após algum tempo do tratamento antimonial. Resultados semelhantes foram recentemente obtidos com respeito à evolução da intradermorreação comparando-se respostas positivas, nos mesmos indivíduos, nos anos de 1974 e 1978. Foi observada uma negatificação em 50% dos indivíduos no **Grupo I** (lesão em atividade e tratamento em 1974), 42,8% no **Grupo II**, 57,9% no **Grupo III** e positificação em 8,3% no **Grupo IV** (negativo em 1974). Em todos os grupos com IDRM positiva anteriormente, ocorreu uma redução semelhante da porcentagem, não havendo, portanto, diferenças significativas entre eles (Tabela II).

Como discutem MAYRINK & col.¹⁷, essas observações diferem do que se observa com a *L. tropica* e a *L. mexicana* onde a IDRM permanece positiva mesmo após a cura clínica das lesões, conferindo imunidade duradoura. Esses mesmos Autores questionam ainda se o estado imunitário adquirido nas infecções por *L. mexicana* e *L. tropica*, com evolução para cura espontânea, não seria o fator responsável pelo comportamento da IDRM e se na infecção pela *L. brasiliensis* e negatificação da IDRM não estaria relacionada com a ausência da imunidade adquirida ou pré-municação, nos indivíduos tratados, uma vez que a cura espontânea na *L. bra-*

siliensis embora admitida, não teria sido ainda confirmada.

No entanto, o encontro de indivíduos com cicatrizes típicas e história compatível com leishmaniose, associada à presença de uma IDRM positiva e sem tratamento específico anterior, é relatado por NERY-GUIMARÃES²⁰ e MENEZES & col.¹⁹ no Estado do Rio de Janeiro, por ARAUJO FILHO² na Ilha Grande, RJ, além de Marcus Luiz Barroso BARROS na região Amazônica (Informação pessoal). ARAUJO FILHO² admite que a cura espontânea das lesões cutâneas, associada à ausência de lesões mucosas, fala a favor da benignidade da LTA decorrente de um pauciparasitismo, de uma maior resistência do hospedeiro ou uma atenuação da cepa predominante em uma determinada área. Por outro lado, a positividade do teste em indivíduos aparentemente normais, sem cicatrizes, em áreas endêmicas, tem sido observado com frequência, o que justificaria a possível existência da forma frusta ou subclínica da infecção^{2,3,14,25}.

Fato semelhante foi observado no presente trabalho, entre os indivíduos do **Grupo III** que apresentavam IDRM positiva e ausência de lesões ou cicatrizes compatíveis com LTA. No entanto, o comportamento da IDRM e da IF, nestes indivíduos, não diferiu muito do observado entre os indivíduos do **Grupo II**, fazendo crer que possam apresentar comportamento semelhante. Por outro lado não podemos deixar de admitir a possibilidade de ocorrência em uma mesma área, e mesmo na vigência de um surto epidêmico, de diferentes cepas de *Leishmania* se comportando segundo padrões dos dois complexos (*mexicana* e *brasiliensis*) definidos por LAINSON & SHAW¹⁵, ou com comportamento intermediário como o referido por BARBOSA & col.⁴. No entanto, com relação à resposta a IF os indivíduos do **Grupo I**, em 1974, se comportaram como portadores de *L. brasiliensis*. Impõe-se entretanto, como já referem alguns Autores, além do conhecimento das cepas predominantes em determinadas áreas, a necessidade de desenvolvimento de antígenos, que possam oferecer maior sensibilidade, tanto à IDRM como, principalmente, à IF, possibilitando melhor acompanhamento laboratorial da afecção, inclusive da cura parasitária após a terapêutica instituída.

SUMMARY

Indirect immunofluorescence and Montenegro intradermal test for American cutaneous leishmaniasis in residents of Jacarepaguá (Rio de Janeiro, Brazil). Comparative study of results in 1974 and 1978.

During an epidemic outbreak of American cutaneous leishmaniasis occurring in the peri-urban area of Jacarepaguá in 1974, 92 residents were tested by indirect immunofluorescence (IF) for antibodies to leishmanial antigens. Subjects were divided into four groups on the basis of responses in the Montenegro intradermal test (MIDT) and characteristics of leishmanial lesions. Results in 1974 showed 90.4% IF positive, titer 1:90 or higher, in **Group I** (active lesions and positive MIDT). In **Group II** (spontaneously healed lesion and MIDT positive), 30% were IF positive, while in **Group III** (no lesion or scar and MIDT positive) 39.4% were IF positive, and in **Group IV** (no lesion and MIDT negative) 14.3% were IF positive.

Forty seven subjects from the same groups were reevaluated in 1978 by IF, MIDT and clinical examination. Of the original **Group I**, 10% of sera were IF positive at dilutions of 1:90 or greater; no positive reactions were found in the other groups. MIDT responses were also modified, showing a tendency to reversion to negative, with 42.8% to 57.9% positive reactions in the groups tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, F. G. & MAYRINK, W. — Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II — Studies on the specificity of the test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10: 41-45, 1968.
2. ARAUJO FILHO, N. A. — *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores.* [Tese de Mestrado]. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978, 148 p.
3. ASTON, D. L. & THORLEY, A. P. — Leishmaniasis in Central Brazil: Results of a Montenegro skin-test survey among amerindians in Xingú National Park. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64: 671-678, 1970.
4. BARBOSA, W.; SOUZA, M. C. M.; SOUZA, J. M.; RASSI, D. M.; GERAIS, B. B. & OLIVEIRA, R. L. — Note on the classification of the *Leishmania* sp. responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brasil. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 70: 389-399, 1976.
5. BITTENCOURT, A. C.; SODRÉ, A. B. & ANDRADE, Z. A. — Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10: 247-252, 1968.
6. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I — The fluorescent antibody staining technique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59: 535-544, 1965.
7. CAMARGO, M. E. & REBONATO, C. — Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 500-505, 1969.
8. CHIARI, C. de A. — *Pesquisa de anticorpos circulantes na leishmaniose tegumentar americana pela reação de imunofluorescência indireta.* [Tese de Mestrado]. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1971, 64 p.
9. CHIARI, C. de A.; MAYRINK, W. & MAGALHÃES, P. A. — Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15: 298-303, 1973.
10. CHIARI, C. de A.; MAGALHÃES, P. A. & MAYRINK, W. — Pesquisa de anticorpos por imunofluorescência, em soro de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões recentes. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15: 304-309, 1973.
11. CONVIT, J. & PINARDI, M. E. — Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Derm. Inter.* 8: 17-20, 1969.
12. DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 525-529, 1964.
13. FURTADO, T. A. & PELLEGRINO, J. — Intradermal test in American Leishmaniasis with a polysaccharide fractions isolated from *Leishmania brasiliensis*. *J. Invest. Dermat.* 27: 53-59, 1956.
14. FURTADO, T. — Diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar americana. *An. Brasil. Dermat.* 47: 211-227, 1972.
15. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — Leishmaniasis of the new world: Taxonomic problems. *Brit. Med. Bull.* 28: 44-48, 1974.
16. MARSDEN, P. D. & NONATA, R. R. — Mucocutaneous leishmaniasis — a review of clinical aspects. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 9: 309-326, 1975.
17. MAYRINK, W.; MELO, M. M.; COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; COELHO, M. V.; ARAUJO, F. G.; WILLIAMS, P.; FIGUEIREDO, Y. P. & BATISTA, S. M. — Intradermorreação de Montenegro na leishmaniose tegumentar americana após terapêutica antimonial. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 182-185, 1976.
18. MELO, M. N.; MAYRINK, W.; COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; WILLIAMS, P.; ARAUJO, F. G.; COELHO, M. U. & BATISTA, S. M. — Padro-

MARZOCHI, M. C. de A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C. & SOUZA, W. J. S. de — Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 22:149-155, 1980.

- nização do antígeno de Montenegro. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 161-164, 1977.
19. MENEZES, J. M.; REIS, U. 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: 170-176, 1972.
20. NERY-GUIMARAES, F. — Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 53: 1-11, 1955.
21. NERY-GUIMARAES, F.; LAGE, H. A.; VENANCIO, A. & GRZYMBERG, N. F. — Estudo comparativo de reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, leishmanioses tegumentares e calazar com vários antígenos de *Leishmania* e *Trypanosoma*. *Hospital (Rio)* 75: 299-313, 1969.
22. ODDO, F. G. & CASCIO, G. — Il test di immunofluorescenza nella leishmaniosi viscerale e cutanea. *Rev. Ist. Sieroter. Ital.* 38: 139-145, 1963.
23. PELLEGRINO, J.; PEREIRA, L. H. & FURTADO, T. A. — Muco-cutaneous leishmaniasis: intradermal test with a promastigote suspension and a crude extract from *Leishmania brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 393-396, 1977.
24. PESSOA, S. B. & PESTANA, B. R. — A intradermorreação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. *São Paulo Med.* 13: 133-151, 1940.
25. PESSOA, S. B. & BARRETO, M. P. — *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro, Ministério da Educação e Saúde, 1948.
26. SABROZA, P. C.; WAGNER, M. S. & SOBRERO, N. — Inquérito epidemiológico de leishmaniose tegumentar americana em Jacarepaguá, RJ. In: Rio de Janeiro, XI Cong. Soc. Brasil. Med. Trop., 1975.
27. SADUN, E. H.; DUXBURY, R. F.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. J. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis on American Leishmaniasis and American Trypanosomiasis in man. *J. Parasit.* 19: 385-388, 1963.
28. WALTON, B. C. — The indirect fluorescent antibody test for the avaluation of effectiveness of chemotherapy in American leishmaniasis. 2nd. Washington, *Int. Congr. Parasit.* 1970.
29. WALTON, B. C.; BROOKS, W. H. & ARJONA, I. — Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 296-299, 1972.
30. ZUCKERMAN, A. — Current status of the immunology of blood and tissue protozoa. I. — *Leishmania*. *Exp. Parasit.* 38: 370-400, 1975.

Recebido para publicação em 26/6/1979.