Teste intradérmico e biópsia cutânea no diagnóstico das filarioses humanas: estudo comparativo (1)

José João Ferraroni (2)
Mário A. P. Moraes (3)

Resumo

Resultados comparativos entre os testes "biópsia cutânea e intradérmico" para o diagnóstico das filarioses, são apresentados e discutidos. O antígeno usado no teste intradérmico foi obtido de frações proteícas purificadas, extraídas de vermes adultos de **Dirofilaria immitis**. Os testes foram realizados em silvícolas pertencentes às tribos Sanomã e Mayongong, localizadas ao noroeste da Amazônia brasileira, próximo a Venezuela. Testes foram também realizados em indivíduos residentes na cidade de Belém, Estado do Pará. Houve uma alta concordância entre os dois testes no caso de oncocercose e pouco concordância nos pacientes com mansonelose. O teste intradérmico foi negativo em todos os indivíduos portadores de bancroftiase.

Introdução

Dentre as filarioses, a *Mansonella ozzardi* e a *Onchocerca volvulus* são as que predominam no continente americano, com localização especial na América Central e parte norte da América do Sul. No Brasil, a *M. ozzardi* foi descrita pela primeira vez em 1949 no Estado do Amazonas (Deane, 1949). O primeiro foco de oncocercose no Brasil foi descrito em 1973, também no Estado do Amazonas (Moraes *et al.*, 1974).

A biópsia cutânea ainda é soberana no diagnóstico das filarioses, se bem que a possibilidade do uso de testes imunológicos para detectar essas infecções tem sido muito especulada recentemente (Grieve *et al.*, 1981; Gittelman *et al.*, 1981; Mwaiko & Mkufya, 1977; Singh *et al.*, 1980; Weiss & Degremont, 1976).

Após os trabalhos de Taliaferro (1930), empregando o teste intradérmico para o diagnóstico das filarioses, muitos trabalhos têm enriquecido a literatura neste assunto. O teste intradérmico realizado com vários antígenos, vem recebendo uma atenção crescente nos últimos anos, assim como todos os métodos sorológicos de investigação das infecções por filárias, em especial a imunofluorescência (Lacasse, 1962; Ten Eyck, 1973; Singh *et al.*, 1979; Wrong & Suter, 1979).

Os antígenos para o teste intradérmico têm sido preparados de vários parasitas, incluindo: *O volvulus, Dracunculus medinenses, Litomosoides carinii, Loa loa, Dirofilaria immitis, Dipetalonema* sp, e *Setaria* sp. As frações protéicas purificadas extraídas de *D. immitis*, são os antígenos empregados em maior escala (Fife, 1971). Diversos estudos foram realizados usando esses extratos, principalmente aqueles extraídos pela técnica descrita por Sawada *et al.*, (1965).

Melcher (1943) realizou testes intradérmicos com frações protéicas extraídas de *Trichinella spiralis*, obtendo resultados positivos paralelamente ao número de parasitas. Sadun *et al.* (1959) testaram frações protéicas extraídas de *Schistosoma japonicum* e inoculadas em pacientes portadores de schistosomiase obtendo resultados bastante satisfatórios, observando, no entanto, reações cruzadas com outras infecções por trematódios. Resultados concordantes com estes, foram observados por Ishii & Morizawa (1961) que realizaram testes intradérmicos em pacientes portadores de *Paragonimus westermani*, usando preparado antigênico oriundo da mesma cepa do parasita. Kagan (1963) realizou uma revisão da literatura sobre testes intradérmicos nas infecções por helmintos e enfatiza a facilidade com que

(1) — Pesquisa patrocinada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INPA, Manaus e Instituto Evandro Chagas, Belém.
(2) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas, Manaus.
(3) — Universidade Federal do Pará e Instituto Evandro Chagas, Belém.

se encontram reações cruzadas neste grupo de parasitas. Sawada *et al.*, (1962), usando antígeno altamente purificado, extraídos de *D. immitis* conseguiram mais de 85% de reações positivas em pacientes com filarioses.

Apesar da ausência de uma informação básica, vários tamanhos da reação foram observados como indicativo de infecção por filária. Quanto ao critério para reação positiva, tem variado muito de autor para autor. Todas, no entanto, em torno do diâmetro da pápula formada, após a introdução do antígeno na derme. A maioria dos autores acha que deve ser considerada positiva, a reação que apresentar um diâmetro papular igual ou superior a 7 mm (Desowitz *et al.*, 1966), enquanto alguns (Katamina, 1969) argumenta que um diâmetro papular acima de 3 mm já deve ser indicativo de positividade.

Este trabalho descreve a comparação dos resultados obtidos, usando a biópsia cutânea e o teste intradérmico em indivíduos com oncocercose e mansonelose pertencentes a duas tribos indígenas e em pacientes portadores de infecções por *Wuchereria bancrofti* residentes na cidade de Belém.

Materiais e métodos

Um total de 137 indivíduos, adultos e crianças de ambos os sexos, fizeram parte do estudo. Destes, 102 eram silvícolas; 38 pertencentes a tribo Sanomã 64 faziam parte da tribo Mayongong e 35 pacientes residentes na cidade de Belém.

Os membros da tribo Sanomã pertencem ao grupo dos Yanomama e os da tribo Mayongong, fazem parte do grupo dos Yekuana ou Maquiritari. Ambas as aldeias localizam-se a uma altitude de aproximadamente 600 m acima do nível do mar, latitude de 4° 8' norte e longitude de 64° 29' oeste, e distam 450 km em linha reta a oeste da cidade de Boa Vista, Território Federal de Roraima (Fig. 1). A população estudada na cidade de Belém consta, na sua maioria, de caboclos oriundos da própria região.

Os antígenos foram preparados de vermes adultos de *D. immitis*, segundo a técnica descrita por Sawada *et al.*, (1965). Treze frações

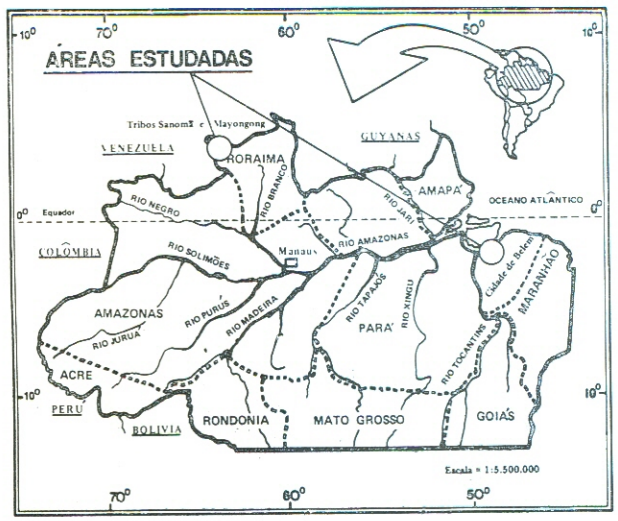

Fig. 1 — Mapa da localização geográfica das tribos Sanomã e Mayongong e cidade de Belém, na Amazônia brasileira.

protéicas foram separadas e cada uma foi utilizada como antígeno, identificadas da seguinte maneira: 1a. (FS), 2a. (FSC1), 3a. (FSC3), 4a. (FSC4), 5a. (FST), 6a. (FST1), 7a. (FST2), 8a. (FST3), 9a. (FST4), 10a. (FST5), 11a. (FST1-1), 12a. (FST3-1), 13a. (FST3-3). Esses antígenos foram mantidos em temperaturas de 2 a 4°C até o momento de serem inoculadas na derme para a realização do teste.

Em cada indivíduo, inoculou-se pela via intradérmica 0,02 ml de antígeno, contendo um total de 0,05 microgramas de proteína. Foram inoculadas treze frações protéicas diferentes em cada paciente, sendo sete na face anterior do antebraço direito e seis na face anterior do antebraço esquerdo. A reação era lida 15 minutos após a introdução do antígeno na derme. A leitura foi realizada delimitando-se a pápula formada, por uma linha circular contínua, feita com tinta azul, usando caneta esferográfica comum. Em seguida, tomava-se um papel de filtro de forma retangular, previamente preparado e identificado, o qual era embebido em álcool comercial e colocado sobre a pele, no local das inoculações dos antígenos. Desta maneira, a impressão da linha que delimitava a pápula era impregnada no papel de filtro, o qual era secado em temperatura ambiente para posterior verificação do diâmetro papular. O teste foi considerado positivo quando o diâme-

tro papular era igual ou superior a 7 mm. Como controle negativo, 0,02 ml de solução salina foi inoculado na derme de cada indivíduo. Silvícolas não infectados por *O. volvulus* ou *M. ozzardi* serviram como controle negativo para os testes.

Uma lista contendo 35 nomes de pacientes portadores de microfilaremia, *(Wuchereria bancrofti)*, residentes na cidade de Belém, foi-nos gentilmente cedida pelo setor das Campanhas de Saúde Pública do Ministério da Saúde (SUCAM), daquela cidade. Testes com as 13 frações antigênicas foram realizados nos 35 indivíduos portadores de bancroftíase. Nas populações indígenas, foram realizadas biópsia cutânea e esfregaço de sangue em gota espessa para pesquisa de microfilárias, usando a técnica previamente descrita por Moraes *et al.*, (1979).

Resultados

As primeiras quatro frações protéicas FS, FSC1, FSC3 e FSC4 reagiram simultaneamente nos índios que foram reatores ao teste intradérmico. Nenhuma das outras frações antigênicas apresentou reatividade. Na tribo Sanomã, onde o número de positivos foi maior em ambos os testes, verificou-se que 18 silvícolas foram positivos para *O. volvulus* na biópsia cutânea, e também foram reatores ao teste intradérmico. Deste total, 10 indivíduos apresentaram concomitantemente os dois tipos de microfilárias *(M. ozzardi* e *O. volvulus)* na biópsia cutânea. Três índios apresentaram biópsia cutânea positiva para *M. ozzardi* e negativa para *O. volvulus*. Foram, no entanto, reagentes ao teste intradérmico. Por outro lado, três pacientes foram positivos para *M. ozzardi* e negativos para *O. volvulus* na biópsia cutânea e foram não reatores ao teste intradérmico. Os 14 indivíduos que não apresentaram microfilária na biópsia cutânea, também não reagiram ao teste intradérmico (tab. 1).

Na tribo Mayongong, o número de positivos foi menor. Dois silvícolas apresentaram biópsia cutânea positiva para *O. volvulus* e *M. ozzardi* simultaneamente e ambos foram reagentes ao teste intradérmico. Quatro índios foram positivos para *O. volvulus* e foram reatores ao teste intradérmico. Dois pacientes foram positivos para *M. ozzardi* na biópsia cutânea e apresentaram reatividade ao teste intradérmico. Doze silvícolas foram positivos para *M. ozzardi* na biópsia cutânea e não reatores ao teste intradérmico. Quarenta e quatro índios foram negativos na biópsia cutânea e não reagentes ao teste intradérmico (tab. 1). Os 35 pacientes portadores de *W. bancrofti* diagnosticados pela SUCAM de Belém, foram todos não reatores ao teste intradérmico.

TABELA 1 — Relação entre a biópsia cutânea e testes intradérmicos na população Sanomã e Mayongong.

Biópsia cutânea			POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL DE INDIVÍDUOS
MICROFILÁRIA	POSITIVO	NEGATIVO	Teste intradérmico		
TRIBO SANOMÃ (38 indivíduos)					
O. volvulus + M. ozzardi	10	14	10	14	24
O. volvulus	8	0	8	0	8
M. ozzardi	6	0	3	3	6
TRIBO MAYONGONG (64 indivíduos)					
O. volvulus + M. ozzardi	2	44	2	44	46
O. volvulus	4	0	4	0	4
M. ozzardi	14	0	2	12	14

Discussão

Com exceção dos casos de *Loa loa* e *O. volvulus*, onde os vermes adultos são freqüentemente isolados, o diagnóstico das filarioses humanas torna-se difcíil e se baseia nos achados clínicos e na identificação da microfilária. Sabe-se, no entanto, que em muitas infecções recentementes adquiridas ou crônicas, praticamente não existe microfilária (Beaver, 1970). Desta maneira, este último método nem sempre é seguro. Paralelamente, as estimativas de segurança dos métodos imunológicos de diagnóstico para esse grupo de organismo, torna-se difícil pelas mesmas circunstâncias. Contudo, em indivíduos imunologicamente competentes às infecções por filárias parecem induzir a formação de elevados índices de anticorpos os quais podem ser detectados paralelamente ao nível de microfilárias. Ikeda *et al.* (1979) encontraram alta especificidade para oncocercose, usando o teste de hemaglutinação indireta. Uma alta concordância nos resultados entre testes sorológicos (imunofluorescência) e número de filárias foi observado por Collins & Skinner (1979), em pacientes portadores de *O. volvulus*, utilizando secções nodulares como antígeno. Assim como antígenos extraídos de microfilárias de *O. volvulus* e utilizados em testes intradérmicos tem apresentado uma alta especificidade em pacientes portadores desta infecção (Schiller *et al.*, 1980).

Nesta associação e comparação de dois métodos de diagnóstico das filarioses, observou-se uma grande semelhança nos resultados dos testes usados, principalmente nos casos de oncocercose. Nota-se que todos os indivíduos negativos na biópsia cutânea foram também negativos para o teste intradérmico. Houve uma concordância neste caso, de 100%. Nas infecções por *O. volvulus* houve também 100% de concordância nos resultados. Não houve total concordância nos pacientes portadores de *M. ozzardi*, neste caso, a maioria foi positivo para o esfregaço em lâmina e não reator para o teste intradérmico. Dando impressão que o antígeno tem certa especificidade para *O. volvulus*. Na tribo Mayongong, por exemplo, 14 indivíduos foram positivos para *M. ozzardi* e somente dois deles foram reagentes ao teste intradérmico. Sendo que, por hipótese, haveria chance de que estes dois silvícolas poderiam estar infectados por *O. volvulus* e as microfilárias não terem aparecidos nas biópsias de pele, para maiores detalhes ver Moraes *et al.* (1978).

No caso de pacientes positivos para *W. bancrofti*, na cidade de Belém, verificou-se que todos os testes intradérmicos foram não reagentes. Tendo-se a impressão que não existe especificação antigênica para este tipo de microfilária, embora o número de amostragem ter sido relativamente pequeno, apenas 35 indivíduos. Deve ser lembrado, no entanto, que existe a possibilidade de perda parcial da reactividade dos antígenos utilizados para *W. bancrofti*, uma vez estes testes terem sido realizados após um ano de preparação dos antígenos. Embora se tenha tido o cuidado de manter esses antígenos constantemente em baixa temperatura.

Acha-se que as frações protéicas FS, FSC1, FSC3 e FSC4, ou seja, as quatro primeiras, deveriam ser melhor estudadas, pois parece que uma delas poderá servir, senão para o diagnóstico, pelo menos para a triagem de indivíduos que residem em áreas suspeitas. Uma vez que, o teste intradérmico é de fácil execução, econômico, rápido e de maior receptividade por parte da população quando comparado com a biópsia cutânea e/ou outros testes imunológicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. M. Suzuki pelo fornecimento dos antígenos e ao Dr. Lélio B. Calheiros pelo fornecimento da lista de pacientes portadores de *W. bancrofti* da cidade de Belém.

Summary

Comparative results between skin snips and intradermal skin tests for the diagnosis of filariasis are presented and discussed. Purified protein extracted from adult worms of **Dirofilaria immitis** were used as antigens for the skin test. Tests were performed on members of the Sanomã and Mayongong Indian tribes

located in the northwest region of the Brazilian Amazon near Venezuela as well as on residents of Belém, state of Pará. There was a high degree of correlation between the two tests in the case of onchocerciasis and a low degree of correlation in mansoneliasis. Individuals with bancroftian filariasis had negative reactions to the **D. immitis** antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAVER, P.C.
1970 — Filariasis without microfilaremia. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:** 181.

COLLINS, W.E. & SKINNER, J.C.
1979 — The use of fixed-tissue sections to determine antibodies to **Onchocerca volvulus** in a fluorecent antibody test. **J. Parasitol., 65:** 827.

DEANE, M.P.
1949 — Sôbre a incidência de filárias humanas em Manaus, Estado do Amazonas. **Rev. Serv. Esp. Saúde Publ., 2:** 849.

DESOWITZ, R.; SAAVE, J. & SAWADA, T.
1976 — Studies on the immunoepidemiology of parasitic infections in New Guinea. I. Population studies on the relationship of a skin test to microfilaremia. **Ann. Trop. Med. Parasitol., 60:** 257.

FIFE, E.H. Jr.
1971 — Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. **Exp. Parasitol., 30:** 132.

GITTELMAN, H.J.; GRIEVE, R.B.; HITCHINGS, M.M.; JACOBSON, R.H. & CYPERS, R.H.
1981 — Quantitative Fluorescent Immunoassay for measurement of antibody to **Dirofilaria immitis** in dogs **J. Clin. Microbiol., 13:** 309.

GRIEVE, R.B.; MIHA-JOHSON, M.; JACOBSON, R.H. & CYPERS, R.H.
1981 — Enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of antibody responses to **Dirofilaria immitis** in experimental infected dogs. **Am. J. Vet. Res., 42:** 66.

IKEDA, T.; AOKI, Y,; TADA, L.; RECINOS, M.M.; OCHOA, J.A. & MOLINA, P.A.
1979 — A sero-epidemiological study of onchocerciasis with indirect hemagglutination test. **J. Parasitol., 65:** 855.

ISHII, Y & MORIZAWA, S.
1961 — Intradermal test for paragominiasis "Specificity of skin test with purified peptides". **Fukuoca Acta Med., 52:** 594.

KAGAN, I.G.
1963 — A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. **J. Parasitol., 49:** 773.

KATAMINE, D. IN: SMITH, D.H.; WILSON, T.; BEREZANCEV, A.; LYKOV, V.; PAING, M.; CHARI, M.V. & DAVIS, A.
1971 — Evaluation of the **Dirofilaria immitis** filaria skin test antigen in the diagnosis of filariasis. **Butt. Wld. Hlth. Org., 44:** 771.

LACASSE, C.
1962 — Fluorescent antibody test for onchocerciasis. **Z. Tropenmed. Parasitol., 13:** 404.

MELCHER, L.R.
1943 — An antigenic analysis of **Trichinella spiralis. J. Inf. Dis., 73:** 31.

MORAES, M.A.P.; CALHEIROS, L.B.; PORTO, M.A.S.; NEVES, R.N.A.; SHELLEY, A.
1978 — Novas observações sobre o foco de oncocercose da área do Rio Tootobi, Estado do Amazonas, Brasil. **Bol. Of. Sanit. Panam., 84:** 510.

MORAES, M.A.P.; FRAIHA, H.; CHAVES, G.M.
1974 — Onchocercose no Brasil. **Bol. Of. Sanit. Panam., 76:** 48.

MORAES, M.A.P.; PORTO, M.A.S.; CALHEIROS, L.B. & SHELLEY, A.J.
1979 — Novas observações sobre o foco de encocercose na área do rio Auaris, Território de Roraima, Brasil. **Bol. Of. Sanit. Panam., 86:** 509.

MWAIKO, G.L. & MKUFYA, A.
1977 — Demonstratition of antibodies in people infected with **Onchocerca volvulus** using **Onchocerca gutturosa** antigen. **East African Med. J., 54:** 680.

SADUN, E.H.; LIN, S.S. & WALTON, B.C.
1959 — Studies on the host parasite relationships to **Schistosoma japonicum** III. The use of purified antigens in the diagnosis of infections in humans and experimental animals. **Milit. Med., 124:** 428.

SAWADA, T.; KONO, M.; SATO, S.; YAMAMOTO, T.; TAKEY, K.
1962 — Immunological studies on filariasis. I. Intradermal and precipitin tests with **Dirofilaria immitis** antigen on canine and human filariasis. **Gunma J. Med. Sci., 6:** 7.

SAWADA, T.; TAKEY, K.; KATAMINE, D.; YOSHIMURA, T.
1965 — Immunological studies on filariasis. III. Isolation and purification of antigens for intradermal skin test. **Japan. J. Exp. Med., 125:** 132.

SCHILLER, E.L.; D'ANTONIO, R.; MARROQUIN, H.F.
1980 — Intradermal reactivity of excretory and secretory products of onchocercal microfilariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:** 1215.

SINGH, M.; KANE, G.I.; YAP, E.H.; HO, B.C.; MAK, J.W.; KANG, K.L.
1979 — Studies on human filariasis in Malaysia: Immunodiagnosis using indirect immunofluorescence. **Southest Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth., 10:** 486.

SINGH, M.; MACKINLAY, L.M.; KANE, G.J.; MAK, J.W.; YAP, E.H.; HO, B.C.; KANG, K.
1980 — Studies on human filariasis in Malaysia: The application of an indirect hemagglutination technique for immunodiagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:** 548.

TALIAFERRO, W.H. & HOFFMAN, W.A.
1930 — Skin reactions to **Dirofilaria immitis** in persons infected with **Wuchereria bancrofti. J. Prev. Med., 4:** 261.

TEN EYCK, D.R.
1973 — **Onchocerca volvulus** and **Wuchereria bancrofti:** Fluorescent antibody staining of frozen homologous sections for diagnosis. **Exp. Parasitol., 34:** 154.

WEISS, N. & DEGREMONT, A.
1976 — Vergleichende untersuchungen zur immunodiagnostik der filariasis. **Z. Tropenmed. Parasitol., 27:** 377.

WRONG, M.M. & SUTER, P.F.
1979 — Indirect fluorescent test in occult dirofilarias. **Am. J. Vet. Res., 40:** 414.

(Aceito para publicação em 14/10/81)