BIOMEDICA
Vol. 3 No. 1 y 2 – 1983

LA REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA

MARCOS RESTREPO,* MARIA EUGENIA GOMEZ.**

Se estudiaron 380 pacientes con lesiones sospechosas de leishmaniasis. A cada uno de ellos se les practicaron exámenes directos coloreados, cultivos en medio NNN, biopsia, prueba de Montenegro e inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.). Esta última prueba fue el objeto del estudio, evaluándola en diferentes formas de la enfermedad y determinando su valor como método de diagnóstico. También se probó en 50 pacientes con malaria y 50 individuos clínicamente sanos. La I.F.I. fue positiva en el 98,7% de los pacientes en los que se demostraron también los parasitos, indicando un alto grado de sensibilidad. Además, hizo el diagnóstico por sí sola en un 37,4% de pacientes en quienes fue imposible ver el parásito. La prueba descartó la enfermedad en otro 21%. La especificidad fue del 97,2%. No se presentaron reacciones cruzadas de importancia cuando los títulos eran de 1:16 o mayores. Los títulos de anticuerpos I.F.I. no tuvieron variaciones significativas con el tiempo de evolución de las lesiones, su número o compromiso tisular. El valor predictivo positivo de la reacción fue de 97,2%.

Se concluye que la prueba I.F.I. propuesta, es de gran ayuda en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana, siendo para muchos de los pacientes, el único método que confirma la infección. Es importante ampliar los estudios en otros pacientes procedentes de zonas endémicas para otras parasitosis diferentes a malaria, como la enfermedad de Chagas.

La lesihmaniasis tegumentaria americana es una enfermedad parasitaria, limitada a ciertas áreas sub-urbanas, rurales y selváticas. El insecto transmisor es el mosquito del género *Lutzomyia (Diptera, Phlebotominae)*, el cual pica al huésped susceptible que generalmente es un animal y accidentalmente al humano. Este vector inocula los promastigotes de alguna de las especies del género *Leishmania*. En el sitio de entrada del parásito se inicia la lesión y más tarde se caracteriza por una ulceración con tendencia a la cronicidad.

En Colombia se desconoce la verdadera distribución geográfica y la prevalencia de la leishmaniasis, pues sólo recientemente es de notificación obligatoria y por eso se desconoce una gran cantidad de información. En Antioquia se ha calculado que la tasa por 100.000 habitantes para 1979 fue de 1,51 (1).

* Médico Jefe, Laboratorio Departamental de Salud Pública (SSSA) y Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín.

** Licenciada en Bacteriología. Laboratorio Departamental de Salud Pública (SSSA). Medellín.

Los métodos parasitológicos para hacer el diagnóstico consisten en: frotis coloreados del material tomado del reborde de la lesión, cultivos del mismo material y biopsia. Ayuda a complementar el diagnóstico la intradermorreacción de Montenegro. Con frecuencia la observación del parásito o su aislamiento es difícil, especialmente cuando las lesiones son crónicas o con infecciones secundarias. Debido a las limitaciones de los procedimientos parasitológicos, se exploran métodos indirectos, como la búsqueda de anticuerpos anti-leishmania. En el presente trabajo se estudia la inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.), como método de diagnóstico serológico para la entidad.

MATERIALES Y METODOS

Población:

Se estudian 5 grupos de personas:

a). 158 pacientes con leishmaniasis comprobada por observación del parásito.

b). 142 pacientes con lesiones clínicamente sospechosos de leishmaniasis, pero sin demostración del parásito.

c). 80 pacientes con lesiones que no eran leishmaniasis.

d). 50 pacientes con malaria y que procedían de zonas endémicas para leishmaniasis.

e). 50 Personas clínicamente sanas que nunca visitaron una zona endémica para leishmaniasis.

A cada uno de los pacientes con lesiones se les registraron los datos de edad, sexo, procedencia, descripción clínica de las lesiones y su tiempo de evolución; además, se les practicaron los exámenes parasitológicos e inmunológicos descritos a continuación.

Estudios parasitológicos e inmunológicos

a). *Frotis coloreado.* Previa limpieza del reborde de la lesión, se hizo una incisión y raspado del tejido con hoja de bisturí, para obtener un buen número de células del tejido inflamado. Se extendió material de la lesión en varias preparaciones. Una vez secas al medio ambiente, se tiñeron con el colorante de Wright y se buscaron los amastigotes intra o extracelulares al microscopio de luz con objetivo 100X.

b). *Cultivo.* Con material obtenido en la manera descrita anteriormente, se hicieron cultivos en tubos con medio de Novy, Neal y Nicolle (NNN), compuesto por una fase sólida de agar, NaCl y 5% de sangre desfibrinada de conejo. El sobrenadante o fase líquida se formó con el agua de condensación, enriquecida con partes iguales de tampón salino fosfatado (PBS) e infusión de cerebro y corazón (2). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente de 26°C $\pm$ 3°C, durante 30 días. Cada 6 días se examinaba el sedimento para detectar al microscopio los promastigotes móviles.

c). *Biopsia.* En los pacientes en los cuales los exámenes anteriores fueron negativos, se intensificó la búsqueda de los parásitos, tomando un trozo de tejido del borde de la lesión, fijarlo en formalina al 10% y para procesarlo haciendo cortes histológicos, teñidos con hematoxilina-eosina. Al microscopio se buscaron los parásitos y se determinó la reacción inflamatoria.

d). *Prueba de Montenegro.* El antígeno se preparó con una suspensión de promastigotes procedentes de cultivos de *Leishmania braziliensis*, de acuerdo con la técnica descrita por Pifano (3). A cada individuo se le inyectó intradérmicamente en el antebrazo 0,1 del antígeno. La lectura se hizo a las 48 horas, midiendo la induración local; una induración de 5 mm o más se consideró como prueba positiva.

e). *Reacción de inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.).* A cada uno de los individuos del estudio se les tomó sangre por punción venosa, en tubo al vacío y sin anticoagulante. Después de la retracción del coágulo se obtuvo suero por centrifugación y éste se utilizó para la búsqueda de anticuerpos anti-leishmania. La técnica empleada se basó en la propuesta por Walton y col. (4), con algunas modificaciones sugeridas por nosotros.

Preparación del antígeno. Para su preparación se siguieron las recomendaciones de Guimaraes y col. (5) con ligeras modificaciones. Se utilizaron cultivos de *Leishmania braziliensis*, obtenida de un paciente con lesiones mucocutaneas, hace 5 años, los parásitos se obtuvieron después de 6 días de

incubación, en medio de NNN. El sobrenadante de estos cultivos con abundantes promastigotes, se lavó 2 veces en PBS con formalina al 2%, a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento final se resuspendió en P.B.S., pH 7,2, con formalina al 2%, ajustando el número de parásitos a 20-25 por campo, con aumento de 400X. Antes de distribuir el antígeno en las placas, se dejó la suspensión de parásitos a temperatura ambiente de 26°C ± 3°C, durante 24 horas.

En las placas grabadas con círculos se colocó una gota del antígeno en cada uno de ellos, retirando el exceso de líquido; las preparaciones se dejaron desecar completamente a temperatura ambiente, promedio de 24°C, para luego guardarlas a menos 20°C, hasta el momento de usarlas.

Ejecución de la prueba. Antes de iniciar la técnica, las placas con el antígeno y los sueros, se dejaron a temperatura ambiente de 26°C ± 3°C, durante 15 minutos y luego se pasaron rápidamente por agua destilada, para remover sales o elementos extraños. Los sueros se calentaron a 56°C durante 30 minutos y luego se hicieron diluciones progresivas al doble con PBS, a partir de 1:8 y hasta 1:8192. El suero sin diluír y cada una de las diluciones se colocaron sobre el antígeno de los círculos de la preparación y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se sumergieron en frascos de Coplin con PBS durante 10 minutos, repitiendo este lavado dos veces y luego uno en agua destilada neutra, durante el mismo tiempo. Se retiró el exceso de líquido secando con papel de filtro. Las preparaciones fueron cubiertas con el conjugado o antigamaglobulina humana marcada con fluoresceína, previamente titulada y con azul de Evans al 0,2% y se colocaron nuevamente a 37°C durante 30 minutos. Al retirarlas se lavaron con PBS en agua destilada neutra como se hizo anteriormente. Se secaron con papel filtro y se cubrieron con tampón de carbonato y glicerina, pH. 8,0 sobre el cual colocaron los cubre-objetos.

Lectura. Las preparaciones se observaron con un microscopio Leitz, con condensador de campo oscuro, fuente de luz ultravioleta con lámpara de mercurio HBO-200, filtro excitador BG12 de 3 mm, filtro de barrera K510, objetivo 40X y ocular 10X. Cada vez que se practicaron las reacciones se colocaron controles positivos y negativos, este último a la dilución 1:16, obtenidos, el primero de un paciente con infección comprobada y el segundo de individuo sano que nunca había salido de la ciudad. La prueba se consideró positiva cuando los parásitos mostraron fluorescencia verde brillante en su periferia, en los sueros diluídos al 1:16 o mayores. Títulos por debajo de esta dilución se consideraron no específicos y por lo tanto se declararon engativos. En la prueba negativa sin fluorescencia, se observan los parásitos de color rojo.

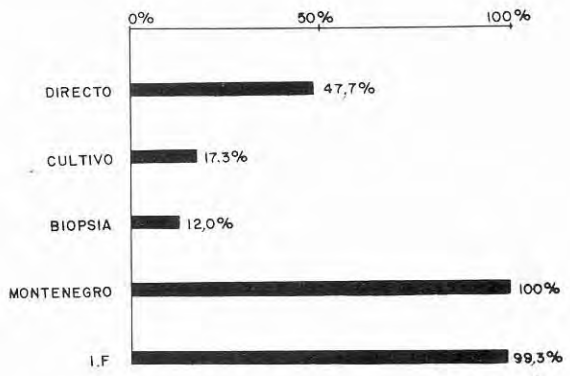
RESULTADOS

De los 380 pacientes con lesiones inicialmente sospechosas de leishmaniasis, en 158 (41,6%) se confirmó el diagnóstico visualizando o aislando el parásito. En 142 (37,4%) no se encontraron los parásitos, aunque clínicamente y por la prueba terapéutica, se concluyó que tuvieron la infección sin haber sido posible su demostración parasitológica. Los 80 pacientes restantes (21,0%), a pesar de tener clínicamente lesiones sospechosas, no tenían leishmaniasis.

En la figura No. 1 observamos la efectividad de cada uno de los procedimientos para hacer el diagnóstico en los 300 pacientes con la enfermedad. El examen directo sirvió en el 47,7%. De los 52 casos con cultivo positivo, en5 se aisló el parásito

FIGURA No I

EFECTIVIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA EN 300 PACIENTES



sin haberlo podido observar al examen directo. La biopsia por sí sola hizo el diagnóstico de certeza en el 12% de los pacientes, en los otros fue informada como "granuloma inespecífico compatible con leishmaniasis". La prueba de Montenegro fue altamente sensible y positiva en el 100% y la I.F.I. en el 99,3% de los casos.

La distribución de las edades en el grupo de pacientes del estudio se muestra en el cuadro No. 1. Es interesante observar que las edades más afectadas estuvieron entre 21 y 30 años.

Al analizar los resultados de los anticuerpos fluorescentes anti-leishmania, cuadro No. 2, observamos que el diagnóstico por I.F.I. coincidió con los procedimientos parasitológicos en el 98,7% y además hizo el diagnóstico en el 88,8% de los pacientes en quienes no fue posible demostrar el parásito. La prueba descartó el diagnóstico de la infección por *Leishmania*, en el 93,8% de los pacientes. Ningún paciente sano o con malaria presentó la reacción de I.F.I. positiva. En el mismo cuadro vemos que en los pacientes sin la infección, los títulos fueron bajos o la prueba fue totalmente negativa. La especificidad de la prueba fue del 97,2% y el valor predictivo de 98,9%. En la figura No. 2 se muestran más detalladamente los títulos de anticuerpo ; en general fueron bajos, oscilando la mayoría entre 1:16 y 1:64; el título más alto fue de 1:2048.

Al observar la distribución de los títulos de anticuerpos según el tiempo de evolución de la enfermedad y sin haber recibido tratamientos previos, (cuadro No. 3), vemos que no hay variaciones substanciales, pues pacientes con lesiones de 6 a 24 meses de evolución, no presentaron títulos altos y

CUADRO No. 1

DISTRIBUCION SEGUN SEXO Y EDAD DE LOS 300 PACIENTES CON LEISHMANIASIS.

GRUPOS DE EDAD (años)	HOMBRES		MUJERES		TOTAL DE PACIENTES	
	#	%	#	%	#	%
<1	3	1,0	1	0,3	4	1,3
1-10	12	4,0	15	8,3	27	9,0
11-20	43	14,3	26	8,7	69	23,0
21-30	72	24,0	23	7,7	95	31,7
31-40	34	11,3	7	2,3	41	13,7
41-50	18	6,0	12	4,0	30	10,0
51-60	17	5,7	2	0,7	19	6,3
61-70	6	2,0	1	0,3	7	2,3
71-80	4	1,3	4	1,3	8	2,7
TOTAL	209	69,7	91	30,3	300	100

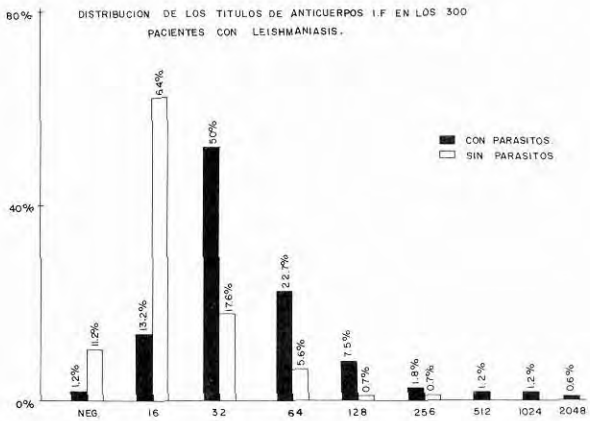
CUADRO No. 2

RESULTADOS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES

GRUPOS DE PACIENTES	I.F. NEGATIVA		I.F. POSITIVA				TOTAL	
			TITULOS < 1:16		TITULOS ≥ 1:16			
	#	%	#	%	#	%	#	%
CON PARASITOS Y MONTENEGRO POSITIVO	1	0,6	1	0,6	156	98,8	158	100
SIN PARASITOS Y MONTENEGRO POSITIVO	6	4,2	10	7,0	126	88,8	142	100
SIN PARASITOS Y MONTENEGRO NEGATIVO	69	86,3	6	7,5	5	6,2	80	100
CON MALARIA	44	88,0	6	12,0	0	0	50	100
SANOS	50	100	0	0	0	0	50	100
TOTAL	170	35,4	23	4,8	287	59,8	480	100

FIGURA Nº 2

DISTRIBUCION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS I.F EN LOS 300 PACIENTES CON LEISHMANIASIS.



por el contrario, pacientes con úlceras recientes de 2 ó 3 meses tuvieron títulos elevados. Observación similar hacemos en relación con el número de lesiones (cuadro No. 4). En cuanto al compromiso de las lesiones (cuadro No. 5), tampoco encontramos diferencias grandes, a pesar del compromiso linfático en algunos pacientes.

CUADRO No. 3

DISTRIBUCION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS SEGUN EL TIEMPO DE EVOLUCION DE LAS LESIONES

TIEMPO DE EVOLUCION (mes)	TITULO DE ANTICUERPOS									TOTAL
	NEG.	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
<1	2	13	2	1	-	-	-	-	-	18
1	2	14	23	6	1	1	-	1	1	49
2	7	17	28	12	3	-	1	-	-	68
3	4	21	16	10	7	-	1	1	-	60
4	1	9	8	6	1	1	-	-	-	26
5	1	9	5	3	-	1	-	-	-	19
6	-	6	4	1	2	-	-	-	-	13
>6	1	26	13	5	1	1	-	-	-	47
TOTAL	18	112	104	44	13	4	2	2	1	300

CUADRO No. 4

DISTRIBUCION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS SEGUN EL NUMERO DE LESIONES

NUMERO DE LESIONES	TITULO DE ANTICUERPOS									TOTAL
	NEG	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
UNICA	14	76	59	23	4	3	0	0	0	179
MULTIPLES	4	36	45	21	9	1	2	2	1	121
TOTAL	18	112	104	44	13	4	2	2	1	300

CUADRO No. 5

DISTRIBUCION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS SEGUN EL COMPROMISO DE LAS LESIONES

COMPROMISO DE LAS LESIONES	TITULO DE ANTICUERPOS									TOTAL
	NEG	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
CUTANEO PURA	14	93	72	27	10	3	2	1	1	223
CUTANEO LINFATICO	1	12	23	11	3	1	0	1	0	52
MOCOCUTANEO	3	7	9	6	0	0	0	0	0	25
TOTAL	18	112	104	44	13	4	2	2	1	300

DISCUSION

La confirmación parasitológica de la leishmaniasis tegumentaria americana no siempre es posible, aunque existen varios procedimientos para buscar el parásito. El más sencillo de practicar y que da un certeza al diagnóstico es el examen directo coloreado. El cultivo complementa el examen anterior y en algunos casos puede hacer el diagnóstico por sí solo, como ocurrió en 5 de nuestros pacientes, en quienes no se logró ver el parásito al examen directo y a los 6 días los cultivos aparecieron positivos. Desafortunamente los cultivos se contaminan con facilidad, especialmente en lesiones crónicas y contaminadas secundariamente con bacterias u hongos.

La biopsia no constituyó un buen método para visualizar el parásito, aunque ayuda a orientar el diagnóstico para observar las características de la reacción inflamatoria.

La prueba de hipersensibilidad retardada de Montenegro, aunque indica que existió un contacto previo con el parásito, no aclara si la infección está activa; una población sin lesiones puede tener la prueba positiva (6). Además, se han informado reacciones cruzadas con otras leishmaniasis y con infecciones crónicas de otro origen (7).

El diagnóstico serológico de la leishmaniasis tegumentaria americana y en especial la técnica de I.F.I., de acuerdo al método propuesto por Walton (4,8), ha mostrado tener aplicación al diagnóstico de las diferentes formas de la leishmaniasis, como ha sido informado por varios autores (8-12). Algunos, como Bray y Lainson (13) han tenido resultados contradictorios porque encontraron infecciones con *L. braziliensis* con títulos altos de anticuerpos circulantes, mientras que en infecciones por *L. mexicana* no encontraron correlación entre la enfermedad y los anticuerpos fluorescentes, concluyendo que la prueba tiene poca utilidad para el diagnóstico. En nuestro trabajo encontramos una alta correlación entre la prueba y la enfermedad, aunque con títulos bajos. Es importante advertir que nosotros no disponemos de la tecnogología suficiente para hacer la clasificación de los complejos, especies y subespecies de *Leishmania*, presentes en las lesiones de nuestros pacientes para poder compararlas con los anticuerpos circulantes; este aspecto será motivo de otros

trabajos, pero en la actualidad nos limita la interpretación de las pruebas según las especies. Posiblemente los títulos bajos en ciertos pacientes corresponde a infecciones por *Leishmania* de diferente especie o subespecie a la utilizada como antígeno. Otros investigadores (14) encontraron títulos bajos semejantes a los nuestros en pacientes infectados con *L. braziliensis* y otros (15) tampoco encontraron variaciones de los títulos según el número de lesiones y el tiempo de aparición de las úlceras.

SUMMARY

This paper refers to the study of 380 patients showing dermal or mucous lesions clinically compatible with leishmaniasis. The following examinations were perfomed to all cases: direct stained smears, cultures in NNN medium, biopsy, Montenegro skin test and indirect immunofluorescence (I.I.F.). The main objetive of the study was to evaluate the I.I.F. test in the different forms of the disease and to determine its value as a diagnostic method. The test was used in 50 patients with malaria and in 50 normal individuals. Positive results were obtained in 98.7% of the patients that had positive findings for *Leishmania* parasites, which means a high sensitivity. In 37.4% the test was positive, when parasites were not visualized, a finding interpreted as diagnostic. In 21% of the cases the negative results discarded the diagnosis. No cross reactions were observed when the titers were 1:16 or higher. The specificity was 97.2%. The antibody titers did not show any significant variations in relation to the time of evolution of the lesions, its number and the tissue invasiveness.

It can be concluded that the I.I.F. test is a great diagnostic aid in American mucocutaneous leishmaniasis, for which it is the only way to make the diagnoses in a considerable number of cases. It is suggested that similar studies should be performed in endemic areas for other parasitc infections, such as Chagas disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Restrepo, M., De los Ríos, J. y Carvajal, P. Leishmaniasis tegumentaria americana. Antioquia 1965-1979. Bol. Epidemiol. Antioquia 5:3-10, 1980.

2. Restrepo, M., Velásquez, J., Cortés, A., Cárdenas, V., Robledo, M. Leishmaniasis tegumentaria americana. Tribuna Med. 52: A.13 - A.16, 1975.

3. Pifano, F. La evolución de la leishmaniasis tegumentaria americana en el Valle de Aroa, Estado Yaracuy, mediante el índice alérgico (Intradermorreacción) con antígeno de *Leishmania braziliensis*. Arch. Venezolanos Med. Trop. Parasit. Med. 4: 25-33, 1962.

4. Walton, B.C., Brooks, W.H. and Arjona, L. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 296-299, 1972.

5. Guimaraes, M.C.S., Giovannini, V.L. and Camargo, M.E. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis inmunofluorescence test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 16: 145-148, 1974.

6. Restrepo, M. La reacción de Montenegro en la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria americana. Bol. Of. Sanit. Panam. 89: 130-137, 1980.

7. Marzochi, M.C.A., Countinho, S.G. Sabroza, P.C. e Souza, W.J.S. Reacao de inmunofluorescencia indirecta e intradermorreacao para leishmaniose tegumentar americana en moradores na área de Jacarepaguá (Río de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 22: 149-155, 1980.

8. Walton, B.C. Evaluation of Chemotherapy of American Leishmaniasis by the Indirect Fluorescent Antibody Test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 747-752, 1980.

9. Maryrink, W., Araujo, F.G. and Magalhaes, P.A. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I. Sensitivity of the test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 9: 172-174, 1967.

10. Bittencourt, A-L., Sodré, A. e Andrade, Z.A. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescencia na leishmaniase tegumentar. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 10: 247-252, 1968.

11. Duxbury. R.E. and Sadun, E.H. Fluorescent antibody test for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am. J. Tropo. Med. Hyg. 13: 525-529, 1969.

12. Convit, J. and Pinardi, M.E. Applying to indirect immunofluorescency test to the study of American

Cutaneous Leishmaniasis. Dermatol. Internat. 8: 17-20, 1969.

13. Bray, R.S. and Lainson, R. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 59: 535-544, 1965.

14. Chiari, C.A., Mayrink, W. e Magalhaes, P.A. de imunofluorescencia indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Rev. Inst. Med. Sao Paulo. 15: 298-303, 1973.

15. Chiari, C.A. Magalhaes, P.A. e Mayrink, W. Pesquisa de anticuerpos, por imunofluorescencia, em soros de pacientes con leishmaniose tegumentar americana apresentando lesoies cutaneas recentes. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 15: 304-309, 1973.