

# ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA DIAGNOSTICO RAPIDO Y MONITORIZACION DE LA RESPUESTA TERAPEUTICA EN LEISHMANIASIS CUTANEA EN COLOMBIA

Soto Mancipe, Jaime - Torres, María Claudia - Rodríguez, Marta P. - Tavera, Mariella - Escobar, Margarita - Pardo, Marta - Gutiérrez, Jorge.

## RESUMEN

La Leishmaniasis Cutánea es una enfermedad endémica entre nosotros: anualmente se reportan en Colombia unos 6.000 casos y es probable que la cifra real sea mucho mayor. La mayoría de las veces el diagnóstico es clínico pues no hay facilidades para la práctica de pruebas de laboratorio en el campo. Con los métodos convencionales (biopsia, directo y cultivo) se logró identificar el parásito en el 73,5%, 66,6% y 40,2% respectivamente. Con los Anticuerpos (AcM) monoclonales se visualizaron amastigotes en 95,2%, lo que demuestra la sensibilidad y especificidad del método que, unido a la facilidad, economía y rapidez hacen que la inmunofluorescencia indirecta con AcM (IFI-Am) sea el mejor método disponible en la actualidad para diagnóstico de leishmaniasis cutánea, tanto en el laboratorio especializado como en el campo. Adicionalmente se pueden emplear para verificar la respuesta a los medicamentos, haciendo evidente de una manera objetiva y cuantificable las alteraciones que va sufriendo el parásito como consecuencia de la terapia, representadas en distorsión de la arquitectura, defectos metabólicos que impiden la fijación del monoclonal y erradicación del parásito.

Palabras Clave: Leishmaniasis, Anticuerpos monoclonales, Diagnóstico parasitológico, Péntamidina.

## INTRODUCCION

La Leishmaniasis Tegumentaria es una enfermedad infecciosa, granulomatosa, crónica que afecta al hombre en forma accidental cuando penetra en los nichos ecológicos de prevalencia zoonótica<sup>1</sup>. Tiene una amplia distribución y la Organización Mundial de la Salud calcula en 500.000 los casos nuevos cada año<sup>2</sup>. En Colombia se habían descrito 1.865 pacientes entre 1872 y 1980 pero con una vigorosa campaña de búsqueda y reporte el Ministerio de Salud Pública reunió entre 1985 y 1990 un total de 17.829 casos<sup>4</sup> procedentes en su mayoría de

Jaime Soto Mancipe, Jefe Servicio de Dermatología  
 María Claudia Torres, Residente del Servicio  
 Marta P. Rodríguez, Residente del Servicio  
 Mariella Tavera, Residente del Servicio  
 Margarita Escobar, Residente del Servicio  
 Marta Pardo, Residente del Servicio  
 Jorge Gutiérrez, Residente del Servicio  
 Hospital Militar Central, Santafé de Bogotá

los Valles del Magdalena y el Cauca, del Urabá antioqueño, de la Costa Pacífica y, en menor proporción de los Llanos Orientales. Sin embargo, es de anotar que hay leishmaniasis a todo lo ancho de la geografía nacional, especialmente en aquellas áreas localizadas entre los 500 y 1.500 metros de altitud.

Las especies más frecuentes aisladas en nuestro país son *L. Panamensis* y *L. Braziliensis*: sobre un total de 340 cepas el 54% correspondió a la primera y el 30% a la segunda vez (183 y 103 cepas respectivamente)<sup>5</sup>. Recientemente se ha descrito la nueva especie *L. colombiensis sp.*, miembro del complejo braziliensis<sup>6</sup>. Otras especies menos frecuentes son *L. chagasis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*.

En Colombia el 70% de los casos son diagnosticados sólo clínicamente, en razón a las dificultades para la toma y transporte de las muestras desde las áreas endémicas hacia los laboratorios especializados<sup>4</sup>. Adicionalmente, se requiere personal entrenado, equipo de laboratorio, materiales y reactivos costosos y entre una y cuatro semanas para tener un resultado definitivo. Si bien es relativamente fácil distinguir las lesiones leishmaniásicas, el 22% de los enfermos remitidos con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis cutánea desde centros de primero y segundo nivel a nuestro servicio, corresponden a otras patologías. (Datos en archivo) Puesto que el tratamiento es costoso y puede tener efectos secundarios de alguna importancia, el establecer un diagnóstico certero de la infección es mandatorio. Con las técnicas actualmente disponibles para la visualización del parásito (único hallazgo definitivo para el diagnóstico) se obtienen resultados disímiles: Restrepo<sup>7</sup> reporta 31.7%, Weigle y cols<sup>8</sup>. 68.6%, Corredor<sup>9</sup> 50.7%, Low-A-Chee<sup>10</sup> 30% y Cuba-Cuba<sup>11</sup> 42.8%.

No se dispone en la actualidad de un método que permita, con certeza, monitorear la respuesta al tratamiento. Los hallazgos clínicos y serológicos dan una idea aproximada pero no satisfactoria, especialmente si se tienen en cuenta los bajos títulos de los anticuerpos detectados y la pobre correlación entre ellos y el estado de la enfermedad. La posibilidad de establecer el momento y la calidad de la acción de los medicamentos *in situ*, ofrece la oportunidad de comprobar la efectividad de los mismos, de determinar la duración del tratamiento -con la consecuente disminución de costos y riesgos de efectos secundarios- y le brinda al paciente la seguridad de ver desaparecer el agente causal de la lesión cutánea.

El presente estudio se planeó con el propósito de encontrar solución a dos problemas:

1. Necesidad de un método rápido, sensible, específico, económico, seguro y fácil de realizar para el diagnóstico de LC tanto en laboratorios especializados como en las áreas endémicas.
2. Necesidad de un método para establecer de forma objetiva y categórica la acción de los medicamentos en LC, cuyos resultados sean cuantificables y tengan una buena correlación con la clínica.

## MATERIAL Y METODOS

El presente estudio está dividido en dos segmentos. En el primero se realizó un análisis de concordancia de pruebas diagnósticas y en el segundo se determinó la validez de los anticuerpos monoclonales para verificar la respuesta al tratamiento de la leishmaniasis con pentamidina.

**Pacientes.** De los 227 pacientes que consultaron entre mayo de 1990 y octubre de 1991 a la Clínica de Leishmaniasis y Dermatitis Tropicales del Servicio de Dermatología del Hospital Militar Central, se tomaron 189 para la primera fase de este trabajo. Estos enfermos procedían de áreas endémicas de leishmaniasis y su cuadro clínico era muy sugestivo de Leishmaniasis Cutánea. Treinta de los pacientes a quienes se les comprobó el diagnóstico sirvieron para la segunda parte de este estudio. De todos se obtuvo consentimiento escrito.

**Pruebas Parasitológicas.** A todos los pacientes se les practicó reacción de Montenegro, y biopsia por elipse del borde de la lesión. El material de biopsia fue dividido en tres porciones: una para histopatología, otra para cultivo en Schneider enriquecido con 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) y la tercera porción para hacer dos láminas por frotis por aposición; (una para examen directo y otra para anticuerpos monoclonales). Los materiales y procedimientos para la intradermorreacción, la biopsia, el cultivo y el examen directo fueron pormenorizadamente descritos por Soto<sup>1</sup>. A continuación se describen brevemente.

**Intradermorreacción.** Mediante jeringa de 1 ml con aguja 27 g 3/8, se inoculó por vía intradérmica en la superficie flexora de antebrazo izquierdo 0,1 ml de una solución de promastigotes muertos por fenol en concentración de  $1 \times 10^6$  por ml. (Suministrado por la Sección de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, Bogotá). La lectura se hizo a las 72 horas empleando la técnica del bolígrafo y la regla<sup>1</sup> y se interpretó como positiva cuando la induración era mayor de 4 mm<sup>12</sup>.

**Anatomía patológica.** El espécimen fue fijado en formol tamponado al 10% durante 24 horas e incluido en parafina. Cortes de 5  $\mu$ m fueron coloreados con Hematoxilina - eosina y observados al microscopio a 40x y 100x. Se consideró positivo cuando se visualizaron amastigotes y negativos cuando después de examinar 100 campos no fue posible observar parásitos<sup>13</sup>.

**Frotis Directo.** Una porción de la biopsia fue lavada con suero fisiológico y aplicada suavemente sobre una lámina de vidrio. Se dejó secar al aire ambiente durante 10 minutos y posteriormente se sometió a coloración de Giemsa. Se examinó a microscopio de luz con objetivo 40x. Se consideró positiva

cuando se observaron amastigotes intra o extracelulares y se procedió a contarlos para establecer la graduación en la escala que más adelante se describe. Se consideró negativa cuando en 100 campos examinados no se observaron amastigotes<sup>1</sup>.

**Cultivo.** El material de biopsia fue macerado en condición de esterilidad y sembrado en medio de Schneider -Drosophila enriquecido con 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) y adicionado con 100  $\mu$ g/ml de sulfato de gentamicina<sup>14</sup>. Los cultivos se mantuvieron a 25°C, fueron observados cada 48 horas en búsqueda de promastigotes y se conservaron al menos durante un mes antes de ser declarados negativos, haciendo recambio del medio cada 4-5 días.

**Anticuerpos Monoclonales.** Para la inmunofluorescencia indirecta se empleó un anticuerpo monoclonal (83-J3D2) producido por la fusión de células esplénicas de ratón BALB/c con células singénicas P3X63-Ag8 de plasmocitoma. Las células esplénicas donantes habían sido inmunizadas con un extracto no fraccionado de promastigotes de *L.b. braziliensis* en fase estacionaria. El medio que servía para mantener el hibridoma fue la fuente de los anticuerpos monoclonales empleados en el examen para la detección de los antígenos de superficies que, en este caso, fueron glicoproteínas de 103 Kd comunes para amastigotes y promastigotes<sup>15</sup>. En las Figs. No. 1 y No. 2 se muestran ejemplos de cómo se ven los promastigotes y los amastigotes con este método. La técnica del examen fue descrita por Grogil<sup>16</sup>. En resumen, se procede a:

1. Hacer frotis por aposición y dejar secar al aire como para examen directo.
2. Cubrir la muestra con 25-30  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal e incubar en cámara húmeda, durante 54 minutos.
3. Decantar el anticuerpo monoclonal excedente mediante lavado con PBS a pH 7.2, por tres veces durante tres minutos cada vez.
4. Cubrir la muestra con 25-30  $\mu$ L del conjugado cabra-anti-ratón marcado con fluoresceína a dilución de 1: 20 en PBS con azul de Evans al 1: 100.000, durante 45 minutos, en cámara húmeda.
5. Decantar y lavar como en 3,
6. Montar una laminilla con glicerol a pH 9.0 en PBS (1: 9 v/v) y
7. Observar al microscopio de fluorescencia a 40x.

En la segunda fase del estudio, en razón a la necesidad de tomas múltiples repetidas, el material se obtuvo por aspiración con aguja 27g 3/8, montada en jeringa de 1 ml, que contenía 0,1 ml de suero fisiológico. Luego de inyectar unas gotas de suero fisiológico, se movilizó suavemente la aguja para favorecer la aspiración de linfa. El material obtenido se colocó en una lámina de vidrio, se dejó secar al aire ambiente durante diez minutos y se guardó protegido con papel de aluminio a -70°C, hasta el momento de procesarlo.

Para la interpretación se establecieron las siguientes escalas:



Fig. No. 1 La glicoproteína que reconoce el anticuerpo monoclonal es común para amastigotes y promastigotes. Aquí vemos promastigotes tomados de cultivo y colocados en lámina de vidrio para su procesamiento. (aumento original 100x).

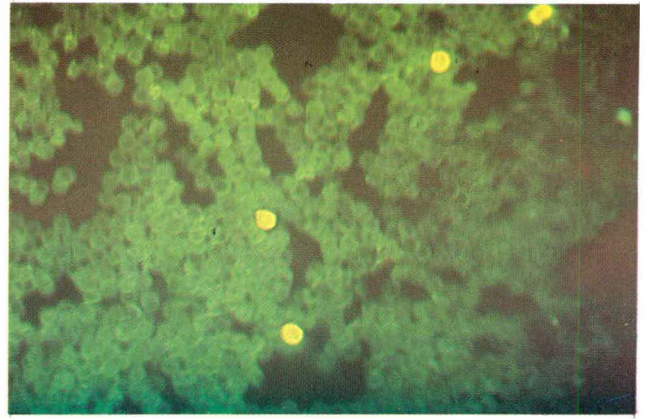
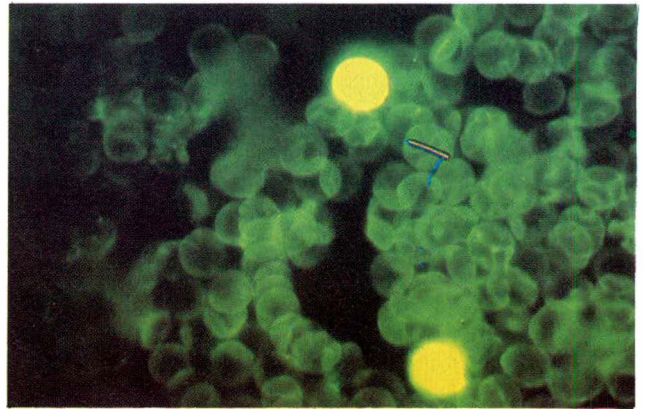


Fig. 2.



Figs. Nos. 2 y 3 La brillantez de la fluorescencia, la nitidez de los bordes y la forma redondeada son las características que distinguen a los amastigotes de las demás células con el método de IFI-AM. Aquí los vemos a 400x y 1000x respectivamente.

**Número de amastigotes por campo de 40x**

- 0 No se observan amastigotes
- 1 1 a 4 amastigotes
- 2 5 a 9 amastigotes
- 3 10 a 14 amastigotes
- 4 15 o más amastigotes.

**Fluorescencia de los amastigotes**

- 0 No fluorescencia
- 1 Fluorescencia tenue en el borde
- 2 Fluorescencia tenue en todo el amastigote
- 3 Fluorescencia brillante en el borde
- 4 Fluorescencia brillante en todo el amastigote.

**Calidad de los amastigotes**

- 0 No se ven amastigotes
- 1 Destrucción total
- 2 Contorno y cuerpo irregular
- 3 Contorno irregular
- 4 Contorno y cuerpo regular.

Para el análisis de concordancia se tomó como patrón de oro, la combinación de examen directo, biopsia y/o cultivo, donde cualquiera de ellos positivo indicaba la presencia de la enfermedad y contra ello, se comparaba el resultado de la inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales.

En lo que respecta a la segunda parte del estudio, monitorización de la respuesta al tratamiento, se tomaron láminas antes de iniciarlo, y a los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 20 y se guardaron a -70°C.

Todas se procesaron simultáneamente, empleando el mismo paquete de reactivos. Adicionalmente se tomaron muestras los días 45 y 90 y se procesaron siguiendo igual método.

Estos enfermos recibieron como tratamiento siete inyecciones intramusculares de Isotionato de Pentamidina, a la dosis de 2 mg por kilo de peso corporal en esquema interdiario. La Pentamidina ha sido empleada desde 1980 en la Guayana Francesa como tratamiento de elección para la leishmaniasis cutánea<sup>17</sup> y en nuestro Servicio se considera como primera alternativa a los antimoniales, después de haberlo administrado a 185 pacientes obteniendo una tasa de curación a 12 meses superior al 90%. (J. Soto, manuscrito en revisión).

**ANALISIS ESTADISTICO**

Para el manejo estadístico de los resultados se siguieron las instrucciones que para el análisis de pruebas diagnósticas recomiendan Fletcher y cols<sup>18</sup>.

**RESULTADOS**

A todos los pacientes que consultaron con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis Cutánea (LC) a la Clínica de Leis-

hmaniasis y Dermatitis Tropicales del Servicio de Dermatología del Hospital Militar Central entre mayo de 1990 y octubre de 1991 se les practicaron los exámenes relacionados en la sección anterior. En total ingresaron a la primera fase del estudio 189 varones pertenecientes al Ejército Nacional de Colombia, con edades entre 17 y los 36 años (promedios de 23,5 +/- 2,35), 90% de los cuales eran mestizos, 7% negros y 3% blancos. De ellos a 148 se les pudo comprobar la enfermedad activa mediante la visualización del parásito por cualquiera de los exámenes de laboratorio.

<b>Tabla No. 1</b>				
<b>RESULTADOS DE LOS METODOS DIAGNOSTICOS PARA LEISHMANIASIS CUTANEA, H.M.C. MAYO/90 - OCTUBRE/91</b>				
		Enfermedad*		
		+	-	
<b>IFI con monoclonales</b>	+	138	3	189
	-	7	41	

\* Definida como: Positividad de cualquiera de los métodos parasitológicos.

<b>Tabla No. 2</b>		
<b>SENSIBILIDAD DE LOS EXAMENES CONVENCIONALES PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA. HOSPITAL MILITAR CENTRAL, MAYO/90 - OCTUBRE/91</b>		
	+	%
Biopsia	109	73.5
Directo	98	66.6
Cultivo	45*	40.2
Montenegro	141	79.6

\* Sólo se practicaron 112 cultivos.

En la Tabla 2 se muestra la positividad de los diferentes métodos: en 109 biopsias (73.5%) fue identificado el amastigote, así como en 98 directos (66.6%). El cultivo fue positivo en un 40.2% pero se debe anotar que por dificultades técnicas apenas se tomaron 112 muestras. La intradermorreacción fue positiva en el 74.6% (141/189) del grupo general, pero cuando se comparó con los verdaderamente enfermos de leishmaniasis fue del 93.5% (138/148). En los diez enfermos con prueba de Montenegro negativa el tiempo de evolución de la infección era de 4 a 7 semanas. La prueba se repitió en estos diez sujetos entre 4 y 12 semanas después y en todos resultó positiva. Hubo tres pacientes con resultado positivo sin enfermedad activa en el momento del estudio: dos tenían cicatrices sugestivas de leishmaniasis previa y el otro, aunque había vivido en área endémica, no recordaba haber padecido la enfermedad ni tenía cicatrices.

Con la inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos monoclonales (IFI-AM) se detectaron 3 casos que habían pasado como negativos en todos los demás exámenes. Sin embargo, hubo siete pacientes en quienes, aun cuando algún examen estaba positivo, no fue posible observar los amasti-

gotes con los AcM. Cinco de estos pacientes estaban incluidos entre los primeros 40 sujetos y es posible que no se hubiera alcanzado aún el grado óptimo de entrenamiento de la persona que leyó el examen, pues apenas en dos (1.35%) de los 149 restantes se volvió a presentar este falso negativo. En la Figura 3 se aprecia un amastigote con su forma característica y una fluorescencia brillante homogénea.

<b>Tabla No. 3</b>	
<b>ANALISIS ESTADISTICO</b>	
<b>ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA H.M.C. MAYO/90 - OCTUBRE/91 (n=189)</b>	
Sensibilidad	95.1%
Especificidad	93.2%
Valor predictivo +	97.8%
Valor predictivo -	85.4%
Prevalencia	76%
Likehood ratio +	13.9%
Likehood ratio -	0.05
Exactitud	94.7%

En la Tabla 3 se relacionan los resultados de los diversos análisis estadísticos, que comparan la IFI-AM contra la combinación de los demás métodos parasitológicos. De ellos los que más reflejan la capacidad de la IFI-AM son la sensibilidad (95.1%), la especificidad (93,2%) y el valor predictivo positivo (97.8%).

En razón a la alta sensibilidad y especificidad del método, se determinó realizar una segunda parte del estudio, que consistía en aplicar los IFI-AM en el seguimiento de la respuesta terapéutica en 30 enfermos comprobados. En la Tabla 4 se relacionan los resultados de cada individuo en cada uno de los días en que se practicó la prueba. Es de notar que los pacientes 15 y 23 hicieron recidivas, el primero a los 90 días y el segundo a los 45 días de terminado el tratamiento. En ambos enfermos había cicatrización de la lesión, pero se observaba eritema e infiltración, por lo que se hicieron nuevos análisis. En el paciente No. 15 tanto la biopsia como el directo y los AcM fueron positivos. En el paciente 23 sólo los AcM fueron positivos. Si bien, apenas son dos pacientes, podría pensarse que, en los casos de recidivas la IFI-AM es una prueba que se positiviza más precozmente que los demás métodos convencionales y, por lo tanto, podría ser de utilidad para el diagnóstico precoz de tales eventos. Estos pacientes recibieron tratamiento con antimonio de meglumina a 20 mg/k durante 20 días y curaron (datos no mostrados). Todos los demás permanecieron negativos hasta el día 90 del estudio y continuaron en observación clínica hasta que completen un año de terminado el tratamiento, de acuerdo con el protocolo de manejo que se consigue en el Servicio para los enfermos que reciben Pentamidina. De los 21 que ya han cumplido el período de observación hay 14 que han venido a control y sus AcM son negativos (datos no demostrados).

En la Tabla 5 se muestran los valores promedios del grupo de estudio durante los días de tratamiento y en la Tabla 6 durante el seguimiento a 20, 45 y 90 días. Las Figs. No. 4 y No. 5 representan más gráficamente la evolución de los valores.

**Tabla No. 4**  
**RESULTADOS INDIVIDUALES DE AC,**  
**MONOCLONALES EN 30 PACIENTES TRATADOS CON PENTAMIDINA**

PCTE	PRE			1			3			5			7			9			11			13			20			45			90							
	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C	N	F	C		
1	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	3	1	1	2	0	0	0	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
2	3	2	4	3	2	4	3	2	4	3	2	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
3	4	3	4	4	3	4	3	2	3	2	2	3	2	2	3	3	1	1	*	*	*	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0				
4	1	4	4	1	4	4	1	3	4	1	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
5	4	2	4	*	*	*	3	2	4	3	2	3	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0			
6	4	3	4	3	3	4	4	3	4	*	*	*	3	2	3	2	2	3	2	2	2	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
7	3	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	1	2	2	1	1	1	1	0	*	*	*	0	0	0	0				
8	3	4	4	2	4	3	3	4	4	*	*	*	3	3	3	*	*	*	2	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	3	4	4	3	3	4	3	3	4	3	2	3	2	2	3	2	2	3	2	1	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
10	3	2	4	4	2	4	3	2	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	*	*	*	0	0	0	0	0		
11	2	1	4	*	*	*	2	1	3	1	1	2	*	*	*	1	1	1	0	0	0	0	0	0	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
12	1	4	4	3	3	4	2	3	4	2	3	3	2	2	3	1	2	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13	4	3	4	4	3	4	*	*	*	3	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	1	3	*	*	*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
15	4	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	*	*	*	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	4			
16	3	1	4	2	1	4	3	1	3	2	1	3	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
17	2	3	4	2	3	3	1	3	4	*	*	*	2	1	2	1	1	1	*	*	*	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
18	3	4	4	3	4	4	3	4	4	3	3	4	3	3	3	2	2	3	2	1	2	*	*	*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
19	4	3	4	4	3	4	4	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	2	4	4	2	4	4	2	4	3	*	*	*	1	2	2	1	2	3	1	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	2	4	4	2	4	4	2	4	3	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	3	3	4	*	*	*	3	3	3	2	1	3	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	4	3	4	4	3	4	4	3	3	4	3	4	3	1	3	3	1	3	3	1	2	2	1	2	2	2	0	3	3	4	&	&	&	&	&	&		
24	2	3	4	*	*	*	2	3	3	2	3	3	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	2	2	4	3	2	4	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	3	2	4	3	2	4	3	2	4	*	*	*	2	1	2	3	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	4	2	4	3	2	4	4	2	4	3	2	3	2	1	2	3	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
28	3	3	4	3	2	4	2	3	3	*	*	*	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	*	*	*	0	0	0	0	0	0	
29	2	4	4	2	4	4	2	3	4	3	2	3	2	3	3	1	2	2	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	3	2	4	*	*	*	3	1	3	3	2	3	3	2	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	*	*	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N = Número, F = Fluorescencia, C= Calidad  
 La calificación de 0 a 4 corresponde a las escalas descritas en el texto.  
 Pre, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 20, 45 y 90 corresponden al día en que se tomaron las muestras.  
 \* Indica que esas láminas no pudieron ser interpretadas  
 & Indica que esas láminas no fueron tomadas por haber Reactivación de las lesiones.

**Tabla No. 5**  
**EVOLUCION DURANTE EL TRATAMIENTO DEL**  
**NUMERO, FLUORESCENCIA Y CALIDAD DE LOS**  
**AMASTIGOTES EN LA IFI CON AC**  
**MONOCLONALES (n=30)**

	Pre	1	3	5	7	9	11	13
Número	2.83	2.84	2.68	2.50	2.14	1.82	1.46	1.06
Fluorescencia	2.86	2.88	2.58	2.08	1.78	1.41	1.07	0.82
Calidad	4.00	3.92	3.51	2.83	2.28	1.72	1.30	1.06

**Tabla No. 6**  
**EVOLUCION DE LOS VALORES MEDIOS DE**  
**NUMERO, FLUORESCENCIA Y CALIDAD DE LOS**  
**AMASTIGOTES EN LA IFI CON AC**  
**MONOCLONALES (n=30)**

	Pre	13	20	45	90
Número	2.83	1.06	0.59	0.11	0.06
Fluorescencia	2.86	0.82	0.55	0.11	0.06
Calidad	4.00	1.06	0.14	0.14	0.13

**EVOLUCION DURANTE EL TRATAMIENTO DEL NUMERO, FLUORESCENCIA Y CALIDAD DE LOS AMASTIGOTES EN LA IFI CON Ac MONOCLONALES (n= 30)**

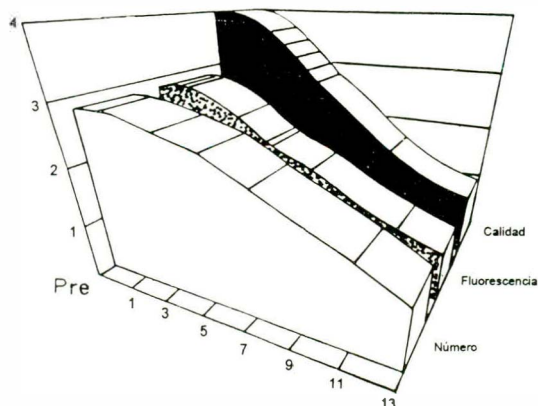


Fig. No. 4

**EVOLUCION DE LOS VALORES MEDIOS DE NUMERO, FLUORESCENCIA Y CALIDAD DE LOS AMASTIGOTES LA IFI CON Ac MONOCLONALES (n= 30)**

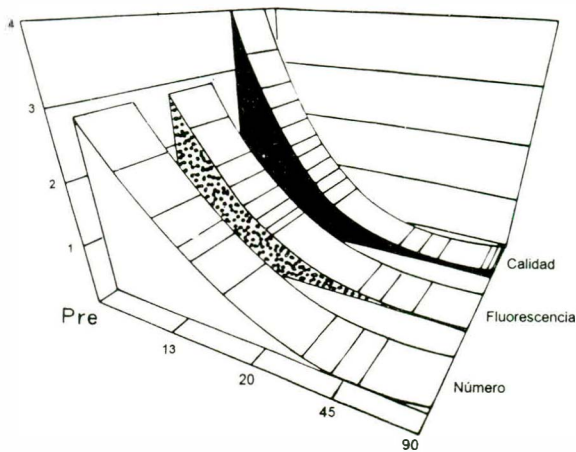


Fig. No. 5

Figs. No. 4 y 5 En estas imágenes está representado el resultado de la acción de la Pentamidina sobre los amastigotes. Es evidente que la calidad de la fluorescencia y la morfología se afectan desde un comienzo. La cantidad de amastigotes disminuye aunque un poco más lentamente. Hacia el día 45 ya no se observan parásitos en las muestras.

Es evidente que la calidad de los amastigotes dada por su forma y el tipo de fluorescencia se afectan más rápidamente que el número de los mismos, que prácticamente desaparecen al día 45 de iniciado el manejo (que corresponde a un mes después de terminada la administración de la droga). En las Figs. No. 6, 7, 8 y 9 se presenta la evolución de las alternativas de los amastigotes, que se inician muy precozmente, pues al momento de la tercera inyección (día 5) (Fig. No. 6) hay distorsión e irregularidades en los bordes y una captación no homogénea del inmunorreactivo demostrada por parches opacos dentro de la brillantez general del amastigote. Una imagen

equivalente al microscopio electrónico revela importantes alteraciones de la morfología del parásito. (Figs. No. 10 y 11) Después de la quinta inyección (día 9) los cambios son más evidentes (fig. No. 7) con pérdida de, al menos, el 80% de la fluorescencia inicial (compárese con la Fig. No. 3 que corresponde al mismo paciente como todas las demás fotografías aquí presentadas). Para el día 13 -último del tratamiento- los daños infligidos por la Pentamidina al amastigote son tan severos que, difícilmente, puede esbozarse la morfología del parásito (Fig. No. 8). Una semana después de terminado el tratamiento (día 20) aún es posible encontrar algunos esbozos

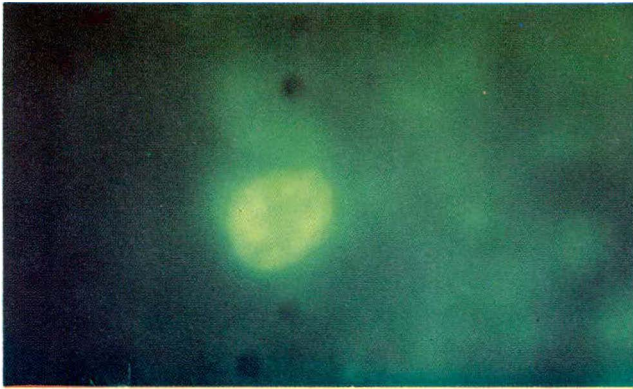


Fig. No. 6

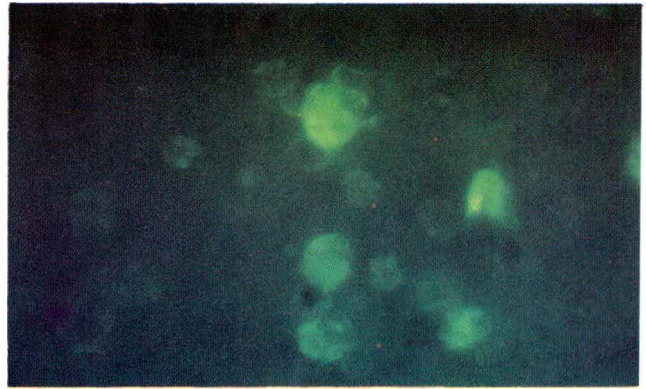


Fig. No. 7

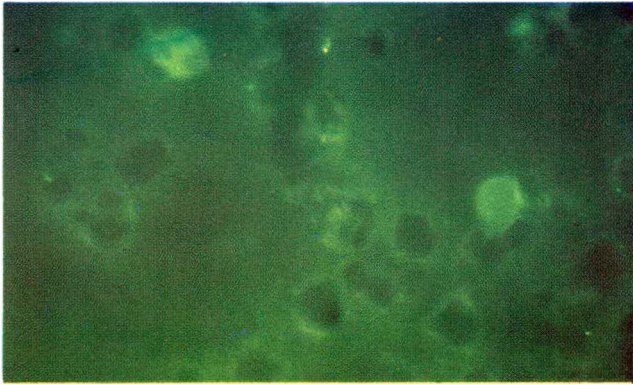


Fig. No. 8

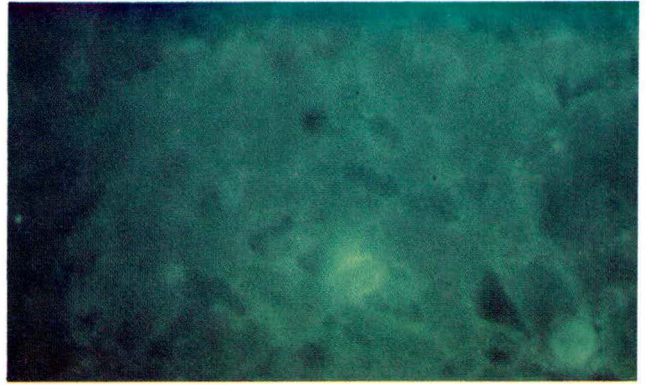


Fig. No. 9

Figs. No. 6, 7, 8 y 9 Fotografías del mismo paciente. Compárese la calidad de la fluorescencia y la morfología para constatar cómo se va deteriorando la arquitectura después de la tercera, quinta y séptima inyección y a la semana después de terminada la terapia (días 5, 9, 13 y 20 del protocolo, respectivamente). Todas las fotografías así como las Figuras 2 y 3, corresponden al mismo paciente.

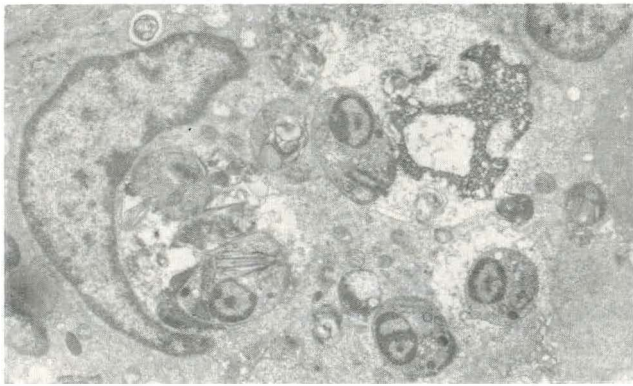


Fig. No. 10. Este macrófago contiene en fagolisosomas al menos ocho amastigotes (A), la mayoría de ellos claramente identificables por su núcleo, flagelo y kinetoplasto. Otros muestras diversas fases de desintegración (\*) como resultado de la medicación.

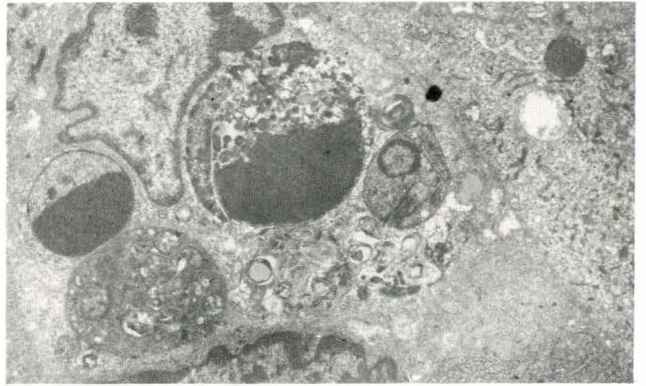


Fig. No. 11 Macrófago con amastigotes en estado de destrucción más avanzada que aparecen como cuerpos densos con fragmentación (\*). Apenas un amastigote (A) es plenamente identificable.

de lo que fueron amastigotes pero, ya son muy pocos en relación con los hallados antes de iniciar el tratamiento (Fig. No. 9).

En síntesis se puede resumir que el resultado de la acción de la Pentamidina sobre los amastigotes *in vivo* en la IFI-AM está demostrado por:

- 1- Pérdida de la capacidad de la fluorescencia,
- 2- Distorsión de la arquitectura, y
- 3- Disminución del número hasta la desaparición total.

Los cambios siguen este orden y se completan hacia el día 20 de iniciada la terapia.

## DISCUSION

Existe en la actualidad una urgente demanda de métodos diagnósticos que permitan la identificación de los agentes causales de infecciones e infestaciones con el propósito de iniciar el tratamiento sobre bases ciertas y con menos demora. Los métodos disponibles en el momento para el diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea son complejos, costosos y poco accesibles. En países en desarrollo, como el nuestro, en donde hay una alta incidencia y los centros especializados están lejos de las áreas endémicas es, todavía, más urgente disponer de exámenes sencillos, prácticos, económicos, sensibles y específicos que puedan realizarse en las unidades de salud periféricas. (J. Soto, manuscrito en revisión).

Desde la descripción de Kohler y Milstein en 1975<sup>19</sup>, son numerosas las comunicaciones del empleo de los anticuerpos monoclonales para el diagnóstico etiológico de muchas enfermedades infecciosas. En el caso particular de la leishmaniasis, en que el diagnóstico depende de la visualización del parásito los métodos tradicionalmente empleados (biopsia, frotis directo y cultivo) tienen una sensibilidad cercana al 50%<sup>7,8,9,10</sup>. Por esta razón desde 1981 se han empleado los anticuerpos monoclonales como una alternativa: Mc-Mahon Pratt<sup>20</sup> y posteriormente Lynch<sup>21</sup> publicaron reportes de su uso. Sin embargo, el método de Mc-Mahon Pratt es dispendioso pues requiere del aislamiento del parásito y la aplicación de la prueba se hace sobre promastigotes lo que, necesariamente, implica demoras y costos que no los hacen accesibles salvo para laboratorios especializados. Si bien Lynch empleó los monoclonales conjugados con técnicas histoquímicas (P-AP) y demostró los amastigotes *in situ*, el método requiere un proceso algo laborioso.

En 1987 Anthony<sup>15</sup> comunicó la detección rápida de amastigotes de *Leishmaniasis* en biopsias y aspiración de lesiones humanas y en 1989 Grogg<sup>16</sup> los aplicó en estudios de campo. Posteriormente han aparecido reportes de otros AcM<sup>22</sup> que identifican nuevas especies de *Leishmania*.

En el presente estudio, la visualización de los parásitos con los métodos convencionales es comparable con los reportes recientes de la literatura<sup>23,26</sup>. La ventaja de la IFI-AM es evidente: la posibilidad de detectar el parásito en el grupo de enfermos verdaderos es alta. (sensibilidad: 95,1% y valor predictivo positivo: 97,8%), así como la discriminación de los verdaderos negativos (especificidad 97,8% y valor predictivo negativo: 85,4%). Estos datos significan que la probabilidad de que el paciente realmente sufra de leishmaniasis cuando el amastigote es visto en la IFI-AM es casi 14 veces mayor que si no se ve (LH +: 13.9) y que, en el caso de no encontrar el parásito en el examen la probabilidad de que el paciente tenga la enfermedad es apenas de 1 en 20 (LH -: 0.05).

Nuestro Servicio es centro de referencia para leishmaniasis en las Fuerzas Militares, razón por la cual la prevalencia de la enfermedad en el presente estudio fue muy alta. Esto debe tenerse en cuenta el extrapolar los datos a la población general en la que la prevalencia es menor. Sin embargo, al disminuir artificialmente esta tasa a la mitad e, incluso, a la cuarta parte, los datos de sensibilidad y especificidad se mantienen en valores muy cercanos a los aquí consignados.

No se conoce aún el mecanismo exacto de acción de los medicamentos en Leishmaniasis<sup>27</sup>, pero en estudios *in vitro*

Langreth<sup>28</sup> demostró alteraciones ultraestructurales desde el segundo día de exposición a diferentes medicamentos, incluida Pentamidina. El criterio para definir curación de la leishmaniasis se basa en los hallazgos clínicos combinados con un cultivo negativo y título de anticuerpos séricos negativos<sup>1</sup>. Pero el cultivo es dispendioso y los títulos de anticuerpos son bajos, aun en presencia de enfermedad severa.

Nuestros hallazgos en la segunda parte del presente estudio muestran la destrucción del parásito y sirven para constatar que es posible vigilar al paciente para comprobar recidivas mediante un examen confiable, económico, rápido y seguro. La preservación de las muestras durante varios meses antes de procesarlas y la conservación de la reactividad en esas circunstancias hacen que se pueda aplicar el método de IFI-AM en el campo, pues las láminas pueden ser tomadas allí y remitidas al centro en donde se disponga del microscopio de fluorescencia para su procesamiento.

La pérdida de la calidad de la fluorescencia y la distorsión de los amastigotes, en nuestros pacientes que recibieron Pentamidina, pudiera relacionarse con la inhibición de la dihidrofolato reductasa o de la RNA polimerasa, mecanismos de acción propuestos para el medicamento<sup>29</sup>, que terminan en la destrucción y desaparición. Si bien no se sabe con exactitud el tiempo requerido para que ello suceda, nuestros hallazgos indican que una semana después de terminado el esquema de 2 mg de Pentamidina x kilo x día por siete inyecciones en días alternos el 80% de los parásitos había desaparecido de las lesiones cutáneas y que para el día 45 había desaparecido el 100%.

En los dos pacientes que presentaron reactivación de las lesiones, la IFI-AM detectó precozmente la presencia de amastigotes, incluso cuando el número era todavía bajo y, quizá por ello, los métodos convencionales no los mostraban.

En conclusión, el empleo de los anticuerpos monoclonales marcados con isotionato de fluoresceína demostró en el presente estudio una gran afinidad por los amastigotes de *Leishmania sp in vivo*, superando por amplio margen a los métodos convencionales de detección del parásito. Adicionalmente aportaron un instrumento válido para monitorear la evolución de los cambios infligidos a los amastigotes por la Pentamidina y dieron un dato objetivo de la destrucción y desaparición del parásito de las lesiones cutáneas. Es probable que la aplicación de este método permita en el futuro determinar el(los) sitio(s) en donde la *Leishmania* permanece quiescente en los casos no tratados o parcialmente tratados y desde los cuales pueda producir lesiones a distancia o actuar como germen oportunista.

## SUMMARY

Cutaneous Leishmaniasis is endemic in Colombia: There are, at least, 6,000 cases each year. In most cases the diagnosis is only by clinic because there aren't enough access to a simple methods in the field. With conventional tests (biopsy, direct smear and culture) we can saw the parasite in 73.5%, 66,6% and 40,2% respectively. With indirect immunofluorescent with monoclonal antibodies (IFA-MA) we identified the amastigote in 95,2%. This method is faster, cheaper and easier than traditionally used methods. Furthermore we employed



IFA-MA in orden to follow the response of leishmaniasis to pentamidine, a very active drug against this protozoa, and founded that shape and brightness disappear rapidly: at the end of treatment their values were only 20% of the initial results. The number of amastigotes decreases slower but at the 45 day's control was not possible to found parasited of the scar.

## BIBLIOGRAFIA

1. Soto. J. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Manual de Normas Técnicas y Administrativas. Hospital Militar Central, Bogotá, 1989.
2. WHO Expert Committee. Control of the leishmaniasis. Technical Report Series No. 793. World Health Organisation, Geneva, 1990.
3. Wermer JK, Barreto P. Leishmaniasis in Colombia, a review. Am J Trop Med Hyg. 1981; 30: 751-61
4. Ministerio de Salud Pública. Grupo de Dermatología Sanitaria. Casos nuevos de Leishmaniasis. Colombia, 1985-1990.
5. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh R, et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990; 42: 206-14.
6. Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, et al. Characterization of Leishmania colombiensis sp. A new parasite infecting humans, animals and phlebotomine sand flies in Colombian and Panama. Am J Trop Med Hyg. 1991; 44: 662-75.
7. Restrepo M, Velázquez JP, Cortés A, et al. Leishmaniasis tegumentaria americana. Tribuna Médica, 1975; 54: A13-A16.
8. Wiegler KA, De Davales M, Heredia P, et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg. 1987; 36: 489-96.
9. Corredor A, Vanegas P, Gómez G, et al. Estudio de la leishmaniasis tegumentaria en el municipio de Arboledas, Norte de Santander. Estudio de la población humana (resumen). Biomédica, 1987; 7 (supl 1): 31.
10. Low-A-Chee RM, Rose P, Ridley DS. An outbreak of cutaneous leishmaniasis in Guyana: epidemiology, clinical and laboratory aspects. Ann Trop Med Parasitol. 1983; 77: 255-60.
11. Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, et al. Diagnóstico parasitológico e inmunológico de leishmaniasis tegumentaria americana. Bol Of Sanit Panam. 1980; 89: 195-207.
12. Naiff RD, Barrett TV, Arias JR, et al. Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, paracoccidiodomicosis y leishmaniasis mediante pruebas cutáneas. Bol Of Sanit Panam. 1988; 104: 35-49.
13. Rodríguez G, Jaramillo F, Chalela JG. La biopsia de piel. Biomédica, 1987; 7: 42-64.
14. Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME. Haemoflagellates: Commercially available liquid media for rapid cultivation. Parasitology, 1978; 76: 309-16.
15. Anthony RL, Grogl M, Sacchi JB, et al. Rapid detection of Leishmania amastigotes in fluid aspirates and biopsies of human tissues. Am J Trop Med Hyg. 1987; 37: 271-276.
16. Grogl M, Milhous WK, Martin Rk, et al. Kits for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in field laboratories. Proc Soc Armed Forces Med Lab Sci, 1989; 18: 22.
17. Dedet JP. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. Am J Trop Med Hyg. 1990; 43: 25-28.
18. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. Clinical Epidemiology. 2nd edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 1988.
19. Kohler G, Milstein G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1981; 256: 495-497.
20. Mc-Mahon-Pratt D, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish New World species of Leishmania. Nature, 1981; 291: 581-582.
21. Lynch NR, Malavé C, Infante B, et al. In situ detection of amastigotes in american cutaneous leishmaniasis. using monoclonal antibodies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986; 60: 6-9.
22. Hanham CA, Zhao F, Shaw JJ et al. Monoclonal antibodies, for the identification of New World Leishmania. Tran R Soc Trop Med Hyg. 1991; 85: 220.
23. Guderian RH, Chico ME, Rogers MD, et al. Placebo controlled treatment of Ecuadorian cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1991; 45: 92-7.
24. Sáenz RE, Paz H, Bernan JD. Efficacy of ketoconazole against L.b. panamensis cutaneous leishmaniasis. Am J Med, 1990; 89: 147- 55.
25. Hepburn NC. The management of American cutaneous leishmaniasis. J Dermatol Treta, 1992; 3: 95-98.
26. Rodríguez G, Hernández CA. Leishmaniasis vs. Esporotricosis y otros diagnósticos diferenciales de la leishmaniasis tegumentaria. Rev Soc Col Dermatol. 1992; 1: 186-198.
27. Bernan JD. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. Rev Infect Dis, 1988; 10: 560-585.
28. Langreth SG, Bernan JD, Riordan GP, et al. Finestructural alterations in Leishmania tropica within human macrophages exposed to antileishmanial drugs in vitro. J Protozool, 1983; 30: 555-561.
29. Van Voorhis WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. Drugs, 1990; 40: 176-202. Sanis

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Max Grogl del Walter Reed Army Institute of Research que facilitó los anticuerpos monoclonales. Al Dr. Gerzaín Rodríguez Toro, del Grupo de Patología del Instituto Nacional de Salud, por las fotografías de microscopia electrónica. Al Grupo de Parasitología del INS que facilitó el antígeno para la reacción de Montenegro. A los demás especialistas y residentes del Servicio de Dermatología del Hospital Militar Central por su valiosa ayuda y comentarios.*