

Leishmaniasis Tegumentaria Americana en la Provincia de Santiago del Estero, Argentina

TORNO CAFASSO, O*; VISCIARELLI, E*; PRAT, MI*;
GARCIA, S*; BARBIERI, G**; SUAREZ, L**; LEDESMA, O**

Resumen Se estudiaron tres casos de Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) en pacientes con formas clínicas cutáneas en la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Para el aislamiento de las cepas a partir de la lesión primaria se realizó: examen directo, cultivos e inoculación en animales receptivos. Para la tipificación de género y especie: biometría y utilización de anticuerpos monoclonales. Se realizaron exámenes serológicos de Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA, como así mismo la aplicación de la Intradermorreacción de Montenegro (IRM), empleando antígenos diferentes. En los tres casos estudiados la cepa aislada fue Leishmania Viannia braziliensis L (V) b.

Summary

The authors describe a study of 3 patients with American Tegumentary Leishmaniasis (LTA) with cutaneous lesions in the province of Santiago del Estero-Argentina. Direct examination, cultures and inoculation in receptive animals were performed in order to isolate the different strains from the primary lesion, biometrics studies and techniques with monoclonal antibodies in order to know the genus and specific epithet. Serological indirect immunofluorescence examination and ELISA, as well as the intradermal reaction of Montenegro (IRM) using different antigens. In the three examples studied the isolated strain was Leishmania Viannia braziliensis L (V) b.

Introducción

La Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) es una histoparasitosis caracterizada por lesiones cutáneas y viscerales cuyo agente transmisor es un insecto díptero de la familia Phlebotomidae, género Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzomya en el Nuevo Mundo. Por existir reservorios domésticos y silvestres puede considerarse una zoonosis. Se trata de una enfermedad parasitaria de características selváticas, periselváticas o rurales, rara vez urbana, que se presenta en altitudes que oscilan entre los 0-800 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media de 25-30 °C y una humedad relativa de 75-

80%. Se observa en distintas edades, sexo y raza y ataca con frecuencia a campesinos que realizan actividades de desforestación u otros trabajos selváticos. Los movimientos de trabajadores migrantes o por temporada y todo desplazamiento masivo de población pueden causar un aumento de la incidencia de la infección entre estos grupos (1).

En Argentina los primeros casos fueron citados por Folquer en 1926 en Tucumán y Romafia, Canejos y Lizondo en 1946 encuentran focos de LTA en esta provincia y Salta.

Del Ponte en 1947 describe casos en Burruyacú (Tucumán) y Urumbel, localidad situada al sur de Orán (Pcia. de Salta) (2). No se registran en el Medline trabajos publicados sobre esta parasitosis en Santiago del Estero.

El aumento del número de casos de LTA concentró desde hace años el interés por el diagnóstico de

(*) Cátedra de Parasitología Clínica, Dto. Biología y Bioquímica, UNS

(**) Centro de Chagas y Patología Regional. Santiago del Estero, Argentina

laboratorio de esta parasitosis, habida cuenta de los distintos subgéneros y especies descritas y su diferente patología. Hasta el presente en zonas endémicas y subendémicas el diagnóstico de la leishmaniasis se suele realizar a través del hallazgo de parásitos en los tejidos presuntamente infectados, aplicando además la prueba de leishmanina fundamentada en el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad tardía a la inyección intradérmica (Reacción de Montenegro).

En la actualidad es posible identificar una determinada especie aislando el parásito a partir de diferentes medios (Difco Blood Agar (DAB); Schneider's con suero bovino fetal o Schneider's más orina humana con 10% de suero bovino fetal) (3) e inoculación en animales receptivos o utilizando métodos biológicos como el desarrollo de flebotomos, inmunológicos como el empleo de anticuerpos monoclonales, bioquímicos como hibridación de KDNA o perfiles isoenzimáticos (4).

Continuando con el trabajo de aislamiento primario y su tipificación en pacientes con formas clínicas cutáneas en la Pcia. de Santiago del Estero ya presentado en el Congreso Latinoamericano de Caxambú (Mina Geraes-Brasil) (5); fue de interés

estudiar las cepas de *Leishmania* en tres nuevos casos clínicos procedentes de esta provincia.

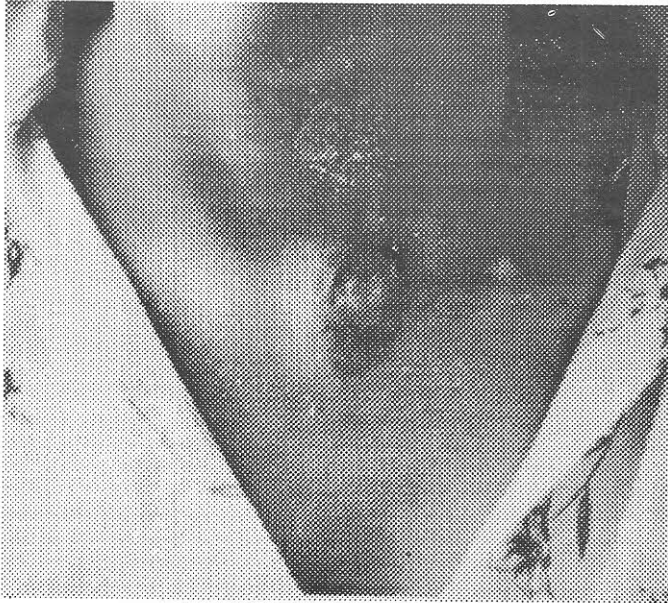
Materiales y Métodos

1) Los pacientes: fueron tomadas muestras de tres pacientes con lesiones cutáneas a los que se asignaron los códigos SE51, SE52 y SE53.

SE51: paciente de 15 años procedente del Departamento de Mariano Moreno. Lesión inicial sobre esternón. Evolución cuatro meses sin tratamiento (Fotografía N° 1).

SE52: paciente de 40 años procedente del Departamento de Avellaneda. Síntomas de primoinfección hace un año en pierna derecha. Tratado inicialmente con Meticorten y Cefalixina 500. Después del diagnóstico de LTA comienza tratamiento con Pentostal. Se observa cicatrización lenta a los cincuenta días. Paciente con Cardiopatía Chagásica Crónica (Fotografía N° 2).

SE53: paciente de 41 años procedente del Departamento de Avellaneda. Ulceración en parte posterior de pierna izquierda. Evolución un año. Artrosis deformante en manos y pies, tratada con corticoides. Después del diagnóstico de LTA comienza tratamiento con Pentostal (Fotografía N° 3).



Fotografía N° 1 - SE51:
Lesión inicial sobre esternón. Evolución cuatro meses sin tratamiento.



Fotografía N° 2 - SE52:
Lesiones en pierna derecha. Evolución
doce meses. Sin tratamiento específico.

2) Toma de muestra y aislamiento: El examen directo fue realizado observando frotis de material obtenido por raspado del margen interno de las lesiones con palitos finos tipo espátula siguiendo la técnica de Shaw y Lainson (6), fijando el material con alcohol metílico y coloreando con Giemsa.

Para la realización de los cultivos de las lesiones de los pacientes se limpió cuidadosamente la superficie del área a ser trabajada en forma secuencial con agua oxigenada, agua destilada estéril con detergente, alcohol iodado y luego alcohol de 95°, anestesiando por infiltración con xilocaína líquida la parte de la úlcera de donde se tomaron las muestras.

La aspiración del material fue hecha siguiendo las recomendaciones de Hendrick y Wrigth de tres diferentes partes de la lesión (7), con jeringa de 5 ml conteniendo 0,3 ml de solución fisiológica estéril.

Los medios empleados fueron el Difco Blood Agar (DAB) Medium N° 0045-01-6 (enriquecido con sangre desfibrinada de conejo y el Scheneider's Drosophila Medium más orina humana filtrada a través de filtro Corning (8). Todos los medios contenían Gentamicina 250 µg/ml de medio y 5-Fluorcytosina (Sigma, USA) 150 µg/ml y fueron realizados por



Fotografía N° 3 - SE53: Lesión ulcerada en parte posterior de pierna izquierda. Evolución doce meses. Artrosis deformante. Sin tratamiento.

duplicado, cultivados en estufa de temperatura regulada a 25 °C examinados cada cinco días a través del microscopio de luz invertida.

3) Identificación del parásito: para la identificación taxonómica de los parásitos aislados se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta descrita por Mc Mahon-Pratt et al (9). Se emplearon los siguientes clones como marcadores inmunológicos:

- XIII-3E6-B11 (B16) y XIII-2A5-A10 (B18): género, subgénero y especie específicos para *Leishmania (Viannia) braziliensis*: L (V) b.
- VII-2C5-C5 (B5): género y subgénero específico para *Leishmania (Viannia)*: L(V) b.
- XLIV-5A2-H39 (B19): género, subgénero y especie específico para *leishmania (Viannia) guyanensis*: L(V) g.
- VIII-4E12-D8: género, subgénero y especie específico para *Leishmania (Leishmania) mexicana*: L(L) m.
- IX-1F9-D8: género, subgénero y especie específico para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: L(L) a.

Estos anticuerpos monoclonales fueron aportados por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Brasilia.

4) Inmunodiagnóstico:

Intradermorreacción de Montenegro

Fueron utilizados para su comparación dos tipos de antígenos diferentes:

a) El antígeno propuesto por la OMS obtenido por lisado de formas promastigotas clonadas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, de 40 g de Nitrógeno total/ml.

b) El antígeno de leishmanina tradicional preparado en nuestra cátedra a partir de 5×10^6 formas promastigotas de cultivos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Ambos antígenos fueron aplicados por vía intradérmica en dosis de 0,1 ml en cada antebrazo. Paralelamente se inoculó igual cantidad de solución fisiológica estéril como testigo. La lectura se registró en mm de induración a las 48 hs..

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se prepararon improntas con promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y se siguió el esquema de Guimaraez et al (10).

ELISA

El antígeno empleado fue un sonocado de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en una concentración de 2,5 g de proteínas por pocillo. Se utilizó un conjugado de anti-inmunoglobulina G humana marcada con fosfatasa alcalina en dilución 1/5000.

5) Prueba de Gelificación: a 1 ml de suero en estudio se le agregó una gota de formol al 40%. La lectura se realizó a los 20 minutos (Wery 1983).

6) Caracterización biológica: se estudió la evolución del parasitismo en hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*). Se inoculó un hámster de 250 g por paciente. El inóculo fue preparado a partir de la trituración, en solución fisiológica estéril, del material obtenido por biopsia de las lesiones de cada paciente con Acupunch descartable de 3 mm. Cada hámster inyectado con 0,1 ml de dicho inóculo por vía intradérmica en las patas y peritoneo, realizando la lectura cada siete días. Posteriormente se practicó la necropsia de los animales que resultaron positivos y el viscerotropismo para observar y demostrar posibles metástasis.

7) Biometría de formas amastigotas: se realizó la biometría de formas amastigotas en láminas patrones de L(V) b, L(V) g, L(L) a para determinar si existían diferencias significativas en el tamaño de estas formas. Se realizó paralelamente la biometría de las formas amastigotas de los pacientes SE51, SE52 y SE53. Las medidas se obtuvieron utilizando un ocular micrométrico 7X y la tabla de conversión correspondiente. Para analizar estadísticamente los datos se utilizó el modelo de Anova Simple con igual número de réplicas y el test de Contraste de a pares de Tukey.

Resultados

Los resultados obtenidos de los exámenes directos, cultivos, inmunodiagnóstico (IRM, ELISA, IFI) y prueba de gelificación se detallan en la tabla I.

Los resultados del empleo de una batería de anticuerpos monoclonales que permitió demostrar que los aislamientos pertenecen a la especie L(V) b están consignados en la tabla II.

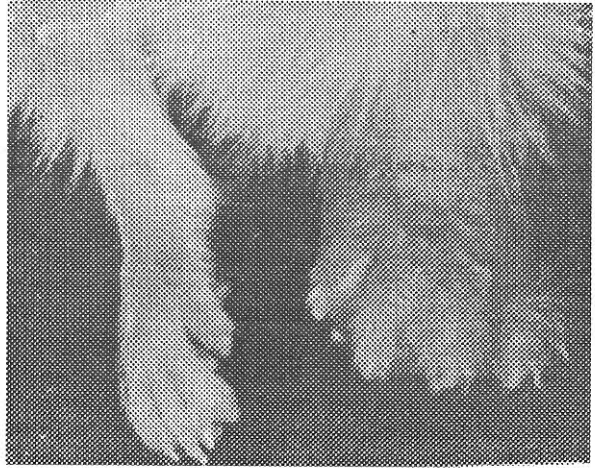
Los hámsters evidenciaron infección con nódulos no ulcerados eritematosos discretos a las seis semanas; en solamente dos animales con inóculos del SE51 y SE53. A los sesenta días aparecen con

nódulos parasitarios subcutáneos eritematosos con ulceración en patas posteriores (Fotografía N° 4). El SE52 no tiene lesiones aparentes hasta la fecha manteniéndose en observación.

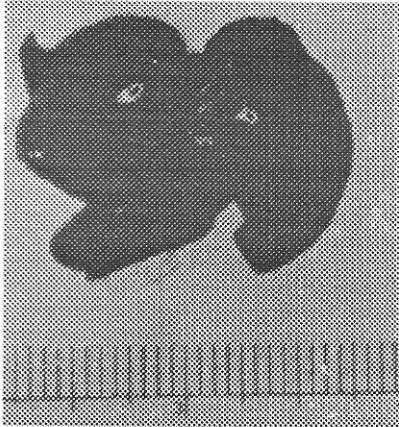
Los dos hámsters con lesiones aparentes fueron sacrificados mostrando hígado aumentado de tamaño, con necrosis y ganglios regionales (Fotografía N° 5 y 6).

Se estudió el viscerotropismo realizando frotis y cultivos en medio DAB del hígado, bazo, médula ósea y ganglios regionales, examinándolos en forma periódica a las 96 hs., a los siete y diez días, fecha en que todos los cultivos resultaron positivos (tabla III).

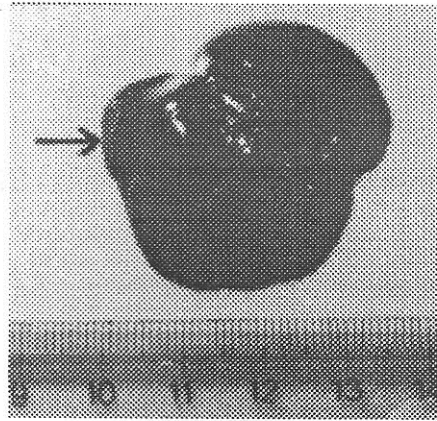
En cuanto a la biometría de la formas amastigotas no se hallaron diferencias significativas entre L(V) b patrón y las cepas aisladas (nivel de significación del 5%) pero sí entre estas últimas y L(V) g y L(L) a (error menor del 1%).



Fotografía N° 4:
Nódulos parasitarios subcutáneos con ulceración en pata de hámster con inóculo del paciente SE51.

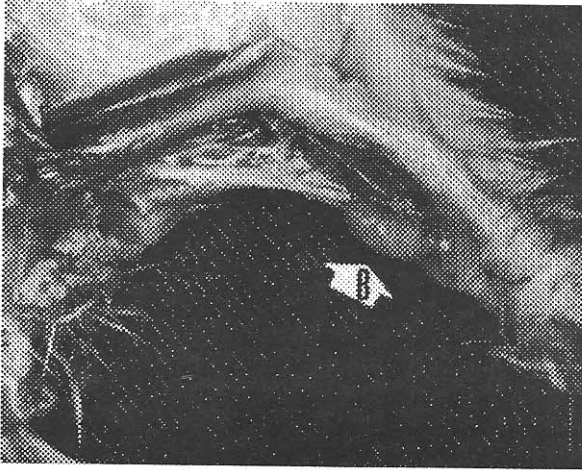


a)



b)

Fotografía N° 5:
a) Hígado normal;
b) Hígado parasitado. La flecha indica necrosis hepática.



Fotografía N° 6:
La flecha indica
un ganglio regional en hámster SE51.

TABLA I
Resultados obtenidos de los exámenes directos, cultivos,
Inmunodiagnóstico y pruebas de gelificación.

Paciente Código	Ex. Directo	Cultivos		IRM		Serología		Prueba de gelificación
		DAB	Schneider's + orina	OMS	UNS	ELISA	IFI	
SE51	+	+	+	20 x18	15 x15	1/160	-	+++
SE52	+	+	conta- minado	15 x15	10 x8	1/1280	1/80	++++
SE53	+	+	+	-	-	1/320	1/80	++++

TABLA II
Tipificación de cepas de Leishmania aisladas por anticuerpos monoclonales.

Código de Clones	Especialidad	Resultados		
		SE51	SE52	SE53
XIII-3E6-B11 (B16)	L(V) b	+	+	+
XIII-2A5-A10 (B18)	L(V) b	+	+	+
VII-2C5-C5 (B5)	L(V)	+	+	+
XLIV-5A2-H39 (B19)	L(V) g	-	-	-
VIII-4E12-D8	L(L) m	-	-	-
IX-1F9-D8	L(L) a	-	-	-

TABLA III
Resultados de las autopsias de los hámsters con lesiones en los sitios de inoculación.

Código	Organo investigado	Frotis	Cultivo (DAB)
SE51	Hígado	+	+
	Ganglios	+	+
	Médula ósea	+	+
	Bazo	-	-
SE52	Sin lesiones aparentes a los 60 días. Continúa en observación		
SE53	Hígado	+	+
	Ganglios	+	+
	Médula ósea	-	-
	Bazo	-	-

Discusión

Actualmente existe un marcado interés por el aislamiento primario y posterior identificación taxonómica de *Leishmania* a partir de isoenzimas y anticuerpos monoclonales ya que es prioritario identificar los parásitos responsables por las diversas manifestaciones clínicas, en especial en infecciones mucocutáneas (13).

El crecimiento en cultivos de L(V) b ha sido un problema que ha dificultado la investigación epidemiológica de LTA.

Esto demuestran Cuba y col. (11) donde aproximadamente y en el aislamiento primario de L(V) b sólo se logra éxito entre un 50 y 60%; por esa razón se siguió la siguiente secuencia en el diagnóstico a partir de lesiones primarias para aumentar la certeza en el mismo:

- 1) Examen directo previa coloración
- 2) Empleo de dos medios de cultivo duplicados
- 3) Biopsia e inoculación en hámsters
- 4) Intradermorreacción de Montenegro
- 5) Exámenes serológicos
- 6) Tipificación de especies

Los resultados obtenidos nos demuestran la importancia de la secuencia programada. El medio DAB y el Schneider's más orina humana funcionan en forma similar, no obstante la experiencia demostrada por Haward y col. (8) donde el medio Schneider's suplementado con orina humana más 10% de suero bovino fetal ha dado buenos incrementos en el crecimiento de formas viscerales y cutáneas.

Si bien la intradermorreacción de Montenegro resultó positiva con los dos antígenos utilizados, se observó una mayor sensibilidad con el antígeno de la OMS. La negatividad de esta prueba en el paciente SE53 sugiere la presencia de trastornos inmunológicos ya que la paciente presentaba artrosis deformante y estaba bajo tratamiento con corticoides.

La negatividad de la prueba de IFI y la positividad de la prueba de ELISA en el paciente SE51 pueden deberse a la mayor sensibilidad de este último método. Es probable que el uso de formas amastigotas provenientes de cultivos celulares como antígeno para IFI, aumente la sensibilidad de esta metodología (11).

La prueba de gelificación realizada es solamente complementaria ya que se trata de una reacción no específica, pues cualquier paciente con un cuadro de hipergamaglobulinemia puede dar positiva la reacción (12).

Respecto a la inoculación en hámsters solamente dos mostraron lesiones evidenciadas por examen directo y cultivos lo que confirmaría lo citado por Cuba y col (11). El viscerotropismo resultó positivo en ganglios, hígado y médula ósea, demostrado por examen directo y cultivos, lo que revela el grado de infectividad de la cepa aislada. El empleo de una batería de anticuerpos monoclonales y la biometría permitirían demostrar que los aislamientos pertenecen a la especie L(V) b; no obstante sería conveniente corroborar esta tipificación con un estudio isoenzimático.

Conclusiones

Si bien es cierto que el aislamiento y tipificación de estos tres casos de Leishmaniasis no son datos suficientes para establecer un estudio epidemiológico, nuestros hallazgos demuestran que sería de interés llevar adelante un proyecto de investigación en esta provincia a los efectos de estudiar el parásito circulante y su tipificación, especialmente si tenemos en cuenta que las cepas aisladas en estos pacientes y en los ocho casos ya presentados en el Congreso de Cayambú (5) pertenecen a la especie L(V) b responsable en el hombre de la forma cutáneo mucosa de la enfermedad. Esto es obviamente importante para el pronóstico y tratamiento del individuo portador. Sería asimismo alentador investigar el agente transmisor, su prevalencia y proliferación en las distintas estaciones del año.

Bibliografía

- 1- Comité de Expertos de la OMS. Ginebra 1984. Las Leishmaniasis.
- 2- Del Ponte, E. Leishmaniasis Tegumentaria en Burruyacú (Tucumán) y Urumbel (Salta). Argentina. Instituto Regional de Entomología Sanitaria. N° 1-8 (1948) Bs. As., 1952.
- 3- Cuba C; Netto E; Costa J; Barreto A. C.; Mardsen P. D. Cultivo "in vitro" como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis*. Rev. Inst. Med. Trop. San Pablo 28 (5): 317-324, set. a oct., 1986.
- 4- Barkell D. C. y Butchner J. The use of DNA probes in the identification of *Leishmania*: discrimination between isolation of the *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complex. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 285-297, 1983.
- 5- Cuba C; Tomo Cafasso O; Ledesma O; Barbieri G; Visciarelli E; Prat M; Costamagna R y Evans D. A. Human cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Santiago del Estero, Prov., Argentina. Identification of parasite by monoclonal antibody and isoenzymes. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz An. International Journal of Biological and Biomedical Research. Vol. 88. Suppl., 1993.
- 6- Shaw J y Lainson R. The in vitro cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 75: 127, 1981.
- 7- Hendricks L. D. y Wright N. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by "in vitro" cultivation of saline aspirate in Schneider's medium. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 28: 962-964, 1979.
- 8- Howard M., Pharoah M.M.; Ashall M; Miles M. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 477-479, 1991.
- 9- Morell C. Genes and Antigens of Parasites. 2nd ed. UNDP/WHO/TDR. Rio Jan. 1212-135.
- 10- Guimaraez M.C.S. y col. Antigenic standardization for mucocutaneous Leishmaniasis immunofluorescence test. Rev. Inst. Med. Trop. San Pablo 16: 145-148, 1974.
- 11- Cuba C. y col. Diagnóstico parasitológico e inmunológico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Bol. Ofic. San Panam. 89 (3), 1980.
- 12- Zuna Hugo y col. Descripción de un caso de Leishmaniasis visceral proveniente del noreste del departamento de Santa Cruz. Bolivia. Boletín Científico de CENETROP. Vol. XIV 44-49, 1993.
- 13- Peter W; Evans D.A. y col. The importance of parasitic identification in cases of Leishmaniasis. J. Roy. Soc. Med. 76: 540-542, 1983.