

UTILIDAD DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA "IFI" EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN PACIENTES RESIDENTES DE UNA ZONA ENDÉMICA EN MADRE DE DIOS, PERÚ

USEFULNESS OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE "IFI" IN THE DIAGNOSIS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN PATIENTS LIVING IN AN ENDEMIC AREA IN MADRE DE DIOS, PERU

Jesús Eduardo Rojas Jaimes^{1,2}

RESUMEN

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica inmunológica usada para la detección de anticuerpos contra el parásito *Leishmania* sp. y es útil, en especial, para el diagnóstico de leishmaniasis mucosa como primainfección. Se estudió la detección de anticuerpos contra *Leishmania* sp. mediante la IFI en 21 pacientes residentes de una zona endémica de la enfermedad, con diagnóstico de leishmaniasis cutánea. El objetivo del estudio fue conocer la sensibilidad de la prueba y, por tanto, determinar su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad cutánea. Se observó que un 38,1% de las muestras analizadas fueron falsos negativos y la sensibilidad del IFI fue 61,91. Se concluye que el IFI usado en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea mostró una baja sensibilidad y un alto porcentaje de falsos negativos, por lo que se recomienda su uso en casos particulares como el diagnóstico de la leishmaniasis mucosa como primainfección.

Palabras clave: leishmaniasis, sensibilidad, diagnóstico, inmunofluorescencia indirecta

SUMMARY

Indirect Immunofluorescence "IFI" is an immunological technique used for the detection of antibodies against the parasite *Leishmania* sp. and is especially useful for the diagnosis of mucosal leishmaniasis as primainfection. The detection of antibodies against *Leishmania* sp. through the IFI in 21 patients residing in an area endemic to the disease, with a diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The goal of the study was to know the sensitivity of the test and therefore to determine its usefulness in the diagnosis of cutaneous disease. It was observed that 38.1% of the analyzed samples were false negatives and the IFI sensitivity was 61.91. It is concluded that the IFI used in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis showed a low sensitivity and a high percentage of false negatives, so it

¹ LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR, LIMA, PERÚ

² LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DEL CENTRO DE SALUD HUEPETUHE, MADRE DE DIOS, PERÚ

is recommended to be used in particular cases as the diagnosis of mucosal leishmaniasis as primainfection.

Keywords: leishmaniasis, sensitivity, indirect immunofluorescence, diagnosis

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo del género *Leishmania*. Los parásitos de este género son transmitidos por dípteros del género *Lutzomyia*, los cuales, al picar al ser humano, en la mayoría de casos, producen en la zona de la picadura una úlcera con tendencia a la cronicidad (1). Entre los métodos de diagnóstico más comunes están el frotis directo, el cultivo y, en algunos casos, se utilizan pruebas para la detección indirecta del parásito, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (1).

En ocasiones, la IFI es descrita como una prueba de buena sensibilidad y especificidad diagnóstica, y con un costo relativamente bajo, que se emplea para detectar los anticuerpos del paciente (2), aunque en otros ensayos se menciona su uso en la detección del parásito utilizando anticuerpos monoclonales (3).

Las pruebas serológicas como el IFI son útiles para el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria de tipo mucosa, debido a que en estos casos es difícil el reconocimiento parasitario directo, especialmente, por la baja parasitemia y las zonas donde se encuentran las lesiones, las cuales son difíciles de acceder. La mayor parte de los casos de leishmaniasis tegumentaria se presentan en países como Afganistán, Argelia, Brasil, Pakistán, Perú, Arabia Saudita y Siria. Cuando la especie vinculante a la enfermedad es *L. braziliensis*, es probable que exista ulceración cutánea y, posteriormente, daño a las mucosas, especialmente a nivel nasal y faríngea (4). Las

pruebas diagnósticas serológicas, como Elisa e IFI, han mostrado buenos resultados cuando se han comparado con pruebas moleculares, según un estudio español (5). Entre las pruebas de inmunofluorescencia se han detectado IgG, IgM e IgA, con diferentes grados de sensibilidad y especificidad (6).

II. METODOLOGÍA

Los pacientes fueron captados en forma pasiva en el centro de salud de Huepetuque, Madre de Dios. Los criterios de inclusión fueron características de daño tisular con presunción de leishmaniasis, a todos los pacientes se les informó sobre los procedimientos considerados en las acciones del sistema de salud y solo se obtuvo el consentimiento oral, posteriormente se les realizó una biopsia con procedimiento anestésico para el examen parasitológico directo por frotis. En el caso de los pacientes que dieron positivo por frotis, una parte de las biopsias fueron guardadas en crioviales con etanol de 96° para determinación molecular de la especie involucrada y, además, se procedió a extraer 5 ml de sangre venosa para el procedimiento de IFI antes del inicio terapéutico y, en algunos casos, se realizó el seguimiento a los pacientes hasta el término del tratamiento a los veinte días, cuando se procedió también a tomar una muestra de sangre venosa de 5 ml para evaluar el aumento o disminución de la titulación de anticuerpos relacionado con el término de la terapia.

Las muestras de suero fueron enviadas al Instituto Nacional de Salud para el desarrollo del IFI. Allí se determinaron puntos de corte mayores a 1/16 para informar un resultado como positivo.

III. RESULTADOS

CÓDIGO	LECTURA IFI	FROTIS	LEISHMANINA	ESPECIE VINCULADA
1	\$(NEGATIVO)	POSITIVO	NEGATIVO	<i>L. braziliensis</i>
2	\$(1/40)	POSITIVO	N. D.	N. D.
3	\$(1/40)	POSITIVO	N. D.	N. D.
4	\$(NEGATIVO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
5	%(NEGATIVO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
6	\$(INDETERMINADO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
7	\$(POSITIVO DÉBIL)%(POSITIVO DÉBIL)	POSITIVO	NEGATIVO	<i>L. lainsoni</i>
8	\$(NEGATIVO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
9	\$(NEGATIVO)%(INDETERMINADO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
10	\$(1/80)	POSITIVO	N. D.	<i>L. lainsoni</i>
11	\$(1/40)%(1/80)	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. braziliensis</i>
12	\$(1/40)	POSITIVO	N. D.	N. D.
13	\$(1/40)	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. braziliensis</i>
14	\$(POSITIVO DÉBIL)	POSITIVO	N. D.	<i>L. braziliensis</i>
15	\$(1/80)%(1/80)	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. braziliensis</i>
16	\$(1/80)	POSITIVO	POSITIVO	<i>L. braziliensis</i>
17	\$(POSITIVO DÉBIL)	POSITIVO	N. D.	<i>L. braziliensis</i>
18	\$(NEGATIVO)	POSITIVO	N. D.	N. D.
19	\$(NEGATIVO)	POSITIVO	N. D.	<i>L. amazonensis</i>
20	\$(POSITIVO DÉBIL)	POSITIVO	NEGATIVO	<i>L. braziliensis</i>
21	\$(POSITIVO DÉBIL)	POSITIVO	N. D.	<i>L. amazonensis</i>
22	&(NEGATIVO)	N. D.	N. D.	N. D.

Leyenda: \$ = Primera muestra antes del tratamiento, % = Segunda muestra después del tratamiento de 20 días, & = Muestra para confirmar leishmaniasis mucosa, N. D. = No determinado.

IV. DISCUSIÓN

Un estudio realizado en Colombia demostró que el 98,7% de pacientes infectados con *Leishmania* sp. con diagnóstico por frotis directo fueron positivos por IFI. En contraste, otro estudio menciona que no existe una correlación entre la enfermedad y la detección de anticuerpos en la infección por *L. mexicana* (1). Además, se menciona que no presentaron reacciones cruzadas con títulos iguales o mayores a diluciones 1/16 (1). Los títulos de anticuerpos de las personas infectadas no variaron con el tiempo de evolución de las lesiones, por lo que no podrían ser usadas como un buen marcador de evolución durante el tratamiento de la enfermedad y

posteriormente a este, además de no poder discriminar entre una infección primaria y una secundaria (1).

El IFI pueda presentar reacciones cruzadas en los casos de leishmaniasis y tripanosomiasis, aunque en forma interesante los patrones de fluorescencia son diferentes para la tripanosomiasis “patrón periférico” y leishmaniasis “patrón nuclear” cuando se usa como antígeno a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (2). Aunque un estudio español mostró una buena correspondencia entre la detección de IgG y las pruebas moleculares (5), en nuestro caso se observaron dos falsos negativos comparados con el diagnóstico molecular que detectó *Leishmania braziliensis* y *Leishmania*

amazonensis, respectivamente (tabla 1). En la comparación del IFI versus el frotis como prueba patrón, se observó un 38,1% de falsos negativos y una sensibilidad aproximada del 61,91% (tabla 1).

Un estudio brasileño menciona la alta especificidad de la inmunofluorescencia para detectar la IgA, aunque una muy baja sensibilidad (6). En el caso de nuestro estudio, se corrobora la baja sensibilidad del IFI, debido probablemente al deterioro de los anticuerpos en la cadena de transporte hasta un laboratorio de referencia y a la hemólisis de la muestra. Adicionalmente, la producción de anticuerpos está mediada por el estado nutricional del paciente o la especie infectante que en ocasiones puede ocasionar inmunodepresión e inmunomodulación, en especial en el caso de *Leishmania amazonensis* (7). Un reporte de la OMS (2010) corrobora la baja sensibilidad en la variable especificidad del IFI para la leishmaniasis cutánea, mientras que en el caso de la leishmaniasis mucocutánea puede ser usado como un predictor de la enfermedad, aunque esta técnica no puede distinguir una primera infección de una posterior (8). Por tanto, debe ser evaluado su uso, recomendándose para los casos de presunción de leishmaniasis mucosa, en los que el acceso al tejido patológico es complicado desde el punto de vista procedimental y de estudios de la respuesta inmune. Adicionalmente, el uso del IFI en los laboratorios referenciales podría enfocarse en el monitoreo activo de personas y otros animales reservorios /huéspedes con leishmaniasis asintomática "latente", dentro del sistema de vigilancia de la enfermedad.

Un dato interesante es que, entre las muestras que se tomaron antes del tratamiento y al término de este, en ningún caso hubo disminución del título de anticuerpo y, en contraste, en un caso el título subió de 1/40 a 1/80 (tabla 1). Esto se debe, probablemente, al

deterioro de la primera muestra en la cadena de transporte o a un reforzamiento de la respuesta Th2 durante el tratamiento.

La comparación entre el IFI, que mide la respuesta Th2, y la leishmanina, que mide la respuesta Th1, muestra concordancia. Se muestra una baja o nula respuesta inmunológica en tres casos de infección por *L. braziliensis* y *L. lainsoni*, y una respuesta inmunológica marcada en cuatro casos de infección por *L. braziliensis* (tabla 1). Estos datos pueden estar relacionados con el estado nutricional del paciente.

Entre las limitaciones del presente estudio estuvieron la falta de rigurosidad en la mantención de la cadena en frío para preservar la naturaleza de los anticuerpos a estudiar; además, la falta de seguimiento a un grupo importante de pacientes para medir el título de anticuerpos al final del tratamiento.

En conclusión, se observó que el IFI, como prueba de diagnóstico de la leishmaniasis, posee una baja sensibilidad, y es además una técnica que no se practica en muchos centros asistenciales por su relativa complejidad y costos.

V. AGRADECIMIENTOS

Con mucha estima, agradezco al colega Nyshon Rojas-Palomino y a la colega Gloria Minaya del Laboratorio de Leishmaniasis del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú) por todo el apoyo brindado el presente estudio.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Restrepo M. La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomédica*. 1983; 3 (1), 15-21.
2. Vázquez Huerta L, Ruelas Llerena N, Córdova Benzaquen E. Patrones de colocación en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas. *Acta Med Per*. 2011; 28 (1), 19-22
3. Jennings YL, de Souza AAA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. *Parasite*. 2014; 21: 39.
4. Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, Melo MN et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of leishmania in skin. *PLoS One*. 2013; 8 (5).
5. Rodríguez Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J. Leishmania infection: Laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82 (2): 251-6.
6. Guimaraes M, Celeste B, Franco E. Rendimiento diagnóstico de la inmunofluorescencia y el ensayo inmunoenzimático en sueros de pacientes con leishmaniasis del norte y el nordeste de Brasil. *Bol. of Sanit. Panam*. 1992; 113 (4): 290-6
7. Rodríguez G, Corredor A, Cáceres E, Cassiano G, Arroyo C, Palau MT et al. Leishmaniasis difusa. *Biomédica*. 1985; 5 (3): 95-111.
8. OMS. Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 2010.

RECIBIDO: 23/02/2017

ACEPTADO: 06/04/2017

AUTOR: JESÚS EDUARDO ROJAS-JAÍMES

CORRESPONDENCIA: jesus.rojas.jaimes@gmail.com