

DETECCION DE AMASTIGOTAS EN LEISHMANIASIS CUTANEA Y MUCOCUTANEA POR EL METODO DE INMUNOPEROXIDASA, USANDO ANTICUERPO POLICLONAL: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD COMPARADAS CON METODOS CONVENCIONALES DE DIAGNOSTICO

GRACIELA SALINAS, LILIANA VALDERRAMA, GLORIA PALMA\*, GUILLERMO MONTES\*\* & NANCY G. SARAVIA<sup>†</sup>

The Tulane University – COLCIENCIAS (International Collaboration in Infectious Diseases Research Program), Centro Internacional de Investigaciones Médicas, Apartado Aéreo 5390, Cali, Colombia \*Departamento de Microbiología \*\*Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Apartado Aéreo 2188, Cali, Colombia

**Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis by the immunoperoxidase method, using policlonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional diagnosis methods** – *The indirect immunoperoxidase method was evaluated in 265 biopsies with the purpose of increasing the sensitivity of the diagnostic histopathology of tegumentary lesions caused by subspecies of the Leishmania braziliensis complex. A diagnosis of leishmaniasis was established by parasitological methods (181) or clinical criteria (12) in 193 patients (72.8%). In the latter group of confirmed cases standard histochemistry and immunoperoxidase were compared with direct examination of tissue scraping and culture of lesion aspirates. The detection and localization of amastigotes was more efficient using the immunoperoxidase method (61.3%) than conventional histopathology with hematoxylin and eosin (34.6%) or direct examination of tissue scraping (43.9%). However, culture of lesion aspirates was the most sensitive procedure (89.8%). The efficiency of the immunoperoxidase method was greater in recent lesions, being positive in 75% of cases with less than 3 months evolution, while 55.6%, 37.5%, and 21.1% of cases with lesion evolution of 3-5.9, 6-11, and 12 months or greater, respectively, were positive. The combined use of the direct examination of lesion scraping and immunoperoxidase applied to histological sections of the biopsy from the lesion border allowed an etiologic diagnosis of 72% of confirmed cases. Cross-reactivity was observed with Paracoccidioides braziliensis but not with Mycobacterium leprae, Sporothrix schenckii, or Histoplasma capsulatum.*

Key words: immunoperoxidase – histopathology – tegumentary leishmaniasis – *Leishmania braziliensis* – amastigotes – immunohistochemistry

El diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis se basa en observación del parásito. Esto se logra con el examen directo o frotis, la biopsia histopatológica y/o el cultivo de material obtenido de las lesiones. La biopsia se usa muchas veces como método para el diagnóstico diferencial de las lesiones tegumentarias, sobre todo en sitios donde no hay facilidades para

cultivos microbiológicos. En algunos casos, la histopatología por sí sola permite hacer el diagnóstico, al detectar fácilmente los amastigotas; en otros, aunque las características de la reacción inflamatoria sugieren la presencia del parásito, es difícil su visualización (Thornburgh et al., 1952). Por tanto, se requieren nuevas alternativas de diagnóstico, en particular en las lesiones de evolución crónica donde el parásito es difícil de localizar (Hendricks & Wright, 1979; Kerdel-Vegas & Essensfeld-Yahr, 1966; Weigle et al., 1987). Han sido pocos los trabajos a nivel inmunoenzimático para la detección de amastigotas de *Leishmania* (Sells & Burton, 1981; Lynch et al., 1986) sin que hasta el momento se haya informado sobre resultados comparativos entre este método y los de diagnóstico convencional. En el presente estudio se evaluó la sensibilidad y especificidad de

Este trabajo fue auspiciado en parte por el Proyecto AI 16315 del National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USPHS, Proyecto 3-P-82-0090 del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CID) de Canadá, Proyecto 229-05-001-87 de COLCIENCIAS, y el Proyecto 840336 para Fortalecimiento Institucional de la Organización Mundial de la Salud.

<sup>†</sup> A quien se debe dirigir la correspondencia.

Recibido el 14 de Junio de 1988.

Aceptado el 3 de Enero de 1989.

la coloración de inmunoperoxidasa para la detección de amastigotas del complejo *L. braziliensis* en pacientes con lesiones tegumentarias.

#### MATERIALES Y METODOS

**Población estudiada** – Entre julio de 1985 y junio de 1987 se estudiaron 265 pacientes con lesiones sugestivas de leishmaniasis provenientes de zonas endémicas para *Leishmania* del complejo *braziliensis*: variantes de *L. b. panamensis* y *L. b. braziliensis* en la costa Pacífica y *L. b. guyanensis* y *L. braziliensis* en la región suroriental colombiana. Doscientos cincuenta y cinco presentaron lesiones exclusivamente cutáneas y 10 mucocutáneas. A 8 de éstos últimos, se les tomó biopsia de una lesión en piel y a 2 de la mucosa nasal. Todos los pacientes consintieron por escrito formar parte del estudio.

**Procedimientos de diagnóstico** – A. **Lesiones cutáneas**: previa limpieza de los bordes de la lesión se inyectaron 1-2 ml de xilocaína al 2% sin epinefrina (Astra, Bogotá) en el borde más indurado de la lesión. Luego, utilizando un sacabocados de 4 mm, estéril y desechable (Baker Laboratories, Miami), se tomó una biopsia la cual se fijó en formol al 10% con fosfatos, pH = 7.0. B. **Lesiones mucocutáneas**: en la mucosa afectada se hizo aplicación tópica de xilocaína en aerosol seguida por inyección de 0.5-1.0 ml de xilocaína al 2% con epinefrina (Astra, Bogotá). La biopsia se tomó con una pinza post-nasal (Storz Instrument Company, St. Louis) y se fijó en formol al 10% para posterior estudio histopatológico. Además, a todos los pacientes se les hizo aspirado de fluido tisular del borde de la lesión para cultivo en medio de Senekjic (Senekjic, 1939) y frotis para coloración de Giemsa de acuerdo con el trabajo de Weigle et al. (1987).

**Preparación de antisuero policlonal** – Como antígeno para la hiperinmunización de los conejos se utilizaron promastigotas de *Leishmania braziliensis panamensis* (HOM/COL/1981/Leish 13). El parásito se mantuvo en medio de Senekjic (Senekjic, 1939) a 27 °C; luego se cultivó en botellas planas que contenían 5 ml de medio Schneider (Gibco Laboratories, Nueva York) con 10% de suero fetal bovino inactivado a 56 °C por 30 minutos y 1000 U/ml de penicilina y 1000 µg/ml de estreptomycin (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.). Después de cuatro días las promastigotas se recolectaron por centrifugación a 400 g por 10 minutos y se

lavarón dos veces en un amortiguador salino fosfatado (PBS), pH 7.2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.003M, NaCl 0.119M). Se contaron los parásitos y se ajustaron a una concentración final de 2.0 x 10<sup>8</sup> promastigotas en 0.5-1 ml de PBS. Con esta suspensión se inocularon por vía intravenosa cada dos semanas conejos exocriados machos y hembras Nueva Zelandia.

Se titularon los anticuerpos específicos para *Leishmania* con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, hasta alcanzar una cifra igual o superior a 1:2048. Esta cifra se obtuvo después de la sexta o séptima inoculación. Luego, este suero anti-*Leishmania* se distribuyó en alícuotas y se congeló a -70 °C.

**Métodos histológicos e inmunohistológicos** – Las biopsias fijadas en formol se incluyeron en un compuesto de parafina purificada y polímeros plásticos, Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis) sin sobrepasar temperaturas de 57 °C; se hicieron cortes de 4 µm. Los tejidos se desparafinizaron en xilol y se hidrataron en alcohol de concentraciones decrecientes de 100 a 30%. Para el estudio histopatológico los cortes se colorearon con hematoxilina de Harris y eosina. En el caso de la inmunoperoxidasa se utilizó la técnica descrita por Sells & Burton (1981). Todo el procedimiento inmunohistoquímico se realizó a temperatura ambiente y en una cámara húmeda para evitar resecamiento de los tejidos.

Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena los tejidos se incubaron en 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol por 30 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS pH 7.2, cada vez durante 5 minutos, los cortes se trataron con suero normal de cerdo diluido 1:20 por 30 minutos para reducir uniones no específicas entre el tejido y el conjugado. Luego se incubaron con antisuero policlonal anti-*Leishmania* en una dilución 1:200 durante 1 hora y se lavaron tres veces con PBS. Se agregó el conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulinas de conejo (Accurate Chemical, Westbury) diluido 1:40 veces y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de usar se preparó la solución reveladora disolviendo 5 mg de 3,3'-tetracloruro de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en 10 ml de Tris salina, pH 7.6 y agregando 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Por último, los tejidos fueron incubados con la solución de DAB durante 4-7 minutos. Después de lavar con agua destilada se contrastaron ligeramente con hematoxilina de Harris.

**Controles** — En cada prueba se utilizó un control positivo y uno negativo. Como controles positivos se incluyeron biopsias de lesiones de hamsters inoculados con *L. braziliensis* o biopsias seleccionadas de pacientes ya estudiados, en los cuales se visualizaban fácilmente las amastigotas con hematoxilina y eosina. Como controles negativos se incluyeron 5 biopsias de personas sanas sometidas a cirugía estética y de hamster con lesiones causadas por otros agentes (*Sporothrix schenckii*, *Mycobacterium leprae*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides* sp.); también se usaron tejidos positivos para *Leishmania* incubados con suero normal de conejo en lugar del antisuero policlonal. Para verificar la actividad del revelador DAB, este se aplicó antes de bloquear la peroxidasa endógena.

**Reacción intradérmica de Montenegro** — En la mayoría de los pacientes se aplicó 0.1 ml de antígeno de Montenegro (leishmanina) (Instituto Nacional de Salud, Bogotá) en la cara medial del antebrazo derecho. La lectura se realizó 40-56 horas después, y se consideraron positivos los diámetros de induración mayores o iguales a 5 mm (Weigle et al., 1987).

**Análisis** — Para el estudio comparativo entre histopatología con hematoxilina-eosina (HE) e inmunoperoxidasa, se hicieron cortes seriados de cada una de las biopsias y la observación se realizó independientemente de los resultados parasitológicos (frotis y cultivo de aspirado) con igual número de pruebas en cada caso. La búsqueda de los parásitos en las secciones coloreadas con HE y en los frotis se realizó a la magnificación de 1000X. En el caso de la coloración con inmunoperoxidasa las secciones se observaron primero con la magnificación de 100X para localizar la coloración marrón específica de la prueba y, posteriormente, con la magnificación de 1000X para verificar la presencia de las amastigotas.

Como no se emplearon todos los métodos en todos los pacientes, se compararon en pares basados sobre los individuos evaluados por ambos procedimientos utilizando la prueba para muestras apareadas de McNemar's. La relación entre la duración de las lesiones y la eficiencia del diagnóstico por la inmunoperoxidasa se determinó mediante la prueba de Chi<sup>2</sup> para

muestras independientes. Para saber si la sensibilidad de la inmunoperoxidasa dependió de la especie de *Leishmania* presente en la biopsia se compararon por la prueba de Chi<sup>2</sup> los resultados obtenidos con los pacientes infectados con *L. braziliensis panamensis* y los del grupo infectado con *L. braziliensis braziliensis*.

## RESULTADOS

De los 265 pacientes con sospecha de leishmaniasis se logró confirmar el diagnóstico en 181 (68.3%) por métodos parasitológicos y en 12 (4.5%) por prueba terapéutica. En 14 (5.3%) se estableció otra etiología. A los 58 (21.9%) restantes no se les estableció un diagnóstico (Tabla I).

La comparación de la inmunoperoxidasa con otros tres métodos comúnmente utilizados en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria se resume en el Tabla II. Mientras el cultivo fue superior a cualquiera de los métodos de visualización, la inmunoperoxidasa resultó más sensible que el examen directo de frotis (61.9 vs. 43.9%) o la histopatología convencional (61.3 vs. 34.6%). Las diferencias observadas alcanzaron una alta significancia estadística ( $P < 0.0001$ ).

La facilidad de visualizar los amastigotas en los cortes fue mayor con la inmunoperoxidasa, por el contraste específico que confiere, comparada con la hematoxilina-eosina. En los cortes positivos procesados por el método inmunohistoquímico, los amastigotas se localizaron por su coloración marrón específica, aún en la magnificación 100X. Esto permitió que la lectura fuera más rápida (1-2 minutos) que con las secciones histopatológicas HE (4-8 minutos).

La sensibilidad de la inmunoperoxidasa fue del 60.6% con el grupo de pacientes cuyo diagnóstico de leishmaniasis se estableció parasitológicamente o por prueba terapéutica (Tabla III). La especificidad se evaluó tanto en controles sanos como en lesiones debidas a una etiología distinta a leishmaniasis (Tabla III). En los tejidos tomados de lesiones producidas por *S. schenckii*, *M. leprae*, y *H. capsulatum* no se observaron reacciones cruzadas. Aunque se presentó reacción del suero anti-*Leishmania* con

TABLA I

Diagnostico, respuesta al antígeno de Montenegro, cepa aislada y tiempo de evolución de las lesiones de los 265 pacientes estudiados

Diagnóstico	Pacientes		Respuesta a Montenegro (mm)*		Tiempo de evolución de la lesión		Especie de leishmaniasis** aislada			
			Probados	Positivos	Meses		Lbb	Lbp	Lbg	
	n	%	n	n	%	n	X	n	n	n
Leishmaniasis (Parasitológico)***	181	68.3	154	109	70.8	177	5.7	18	137	2
Leishmaniasis (Clínico) <sup>+</sup>	12	4.5	12	11	91.7	12	45.5			
Sin diagnóstico <sup>++</sup>	58	21.9	50	33	66.0	58	0.2			
Otra etiología <sup>+++</sup>	14	5.3	13	0	0.0	12	13.2			
Total	265	100.0	229	56	24.0	259	6.3	18	137	2

\* No todos los pacientes se probaron con el antígeno de Montenegro.

\*\* Clasificación isoenzimática y/o por anticuerpos monoclonales. Diez de las cepas aisladas no fueron identificadas.

\*\*\* El diagnóstico se confirmó por aislamiento y/o visualización del parásito.

<sup>+</sup> Diagnóstico parasitológico negativo, pero con historia epidemiológica y clínica características de *Leishmania* y respuesta inmune y prueba terapéutica positiva.

<sup>++</sup> No se logró confirmar una leishmaniasis u otra etiología.

<sup>+++</sup> Etiologías producidas por otras entidades diferentes a *Leishmania*.

TABLA II

Comparación entre metodos de diagnóstico de la leishmaniasis americana\*

Métodos**	Positivo		Negativo	Total	Discordante Positivo	Prueba McNemar $\chi^2$	P
	N	%					
Histopatología vs Inmunoperoxidasa	66	34.6	125	191	3	43.9	<0.0001
Frotis vs Inmunoperoxidasa	83	43.9	106	189	19	15.1	0.0001
Cultivo de aspirado vs Inmunoperoxidasa	167	89.8	19	186	56	48.4	<0.0001
	113	60.8	73		2		

\* Se incluyeron únicamente pacientes con diagnóstico parasitológico y/o clínico.

\*\* Sólo se compararon pacientes probados por ambos métodos.

TABLA III

Sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoperoxidasa

Diagnóstico	Inmunoperoxidasa				Total
	Negativos		Positivos		
	N	%	N	%	
Leishmaniasis*	76	39.4	117	60.6	193
vs. otra etiología	13	92.9	1**	7.1	14
			Sensibilidad = 60.6%		
			Especificidad = 92.9%***		
Leishmaniasis	76	39.4	117	60.6	193
vs. sanos	5	100.0	0	0.0	5
			Especificidad = 100.0%		

\* Leishmaniasis confirmada por métodos clínicos y parasitológicos.

\*\* Cuerpos coloreados en una biopsia de un paciente con paracoccidioidomycosis identificados fácilmente como hongo.

\*\*\* Teniendo en cuenta la morfología del paracoccidioides, la especificidad sería del 100%, ya que no podría considerarse como un falso positivo.

*Paracoccidioides* en un tejido utilizado como control, la coloración permitió visualizar claramente las características morfológicas del hongo, por lo cual no se consideró como falso positivo en términos de confusión con *Leishmania*. O sea, que al tener en cuenta la coloración y morfología del patógeno, como se hizo en este estudio, la especificidad fue del 100%. Los tejidos de controles sanos fueron negativos. Con la histopatología HE la especificidad fue del 100%.

La eficiencia del método de inmunoperoxidasa es mayor en lesiones recientes que en lesiones con más tiempo de evolución (Fig.). En los pacientes crónicos, con un tiempo de evolución mayor de 6 meses, la inmunoperoxidasa diagnosticó la leishmaniasis con una frecuencia superior (25.0%) a la obtenida por el método histoquímico HE (11.6%). En este grupo crónico los resultados obtenidos fueron de 24.4% con el frotis y 62.5% con el cultivo del aspirado.

No se apreciaron diferencias significativas en los resultados de inmunoperoxidasa entre biopsias con lesiones producidas por *L. braziliensis panamensis*, y *L. b. braziliensis* ( $\chi^2 = 0.76$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.38$ ) (Tabla IV).

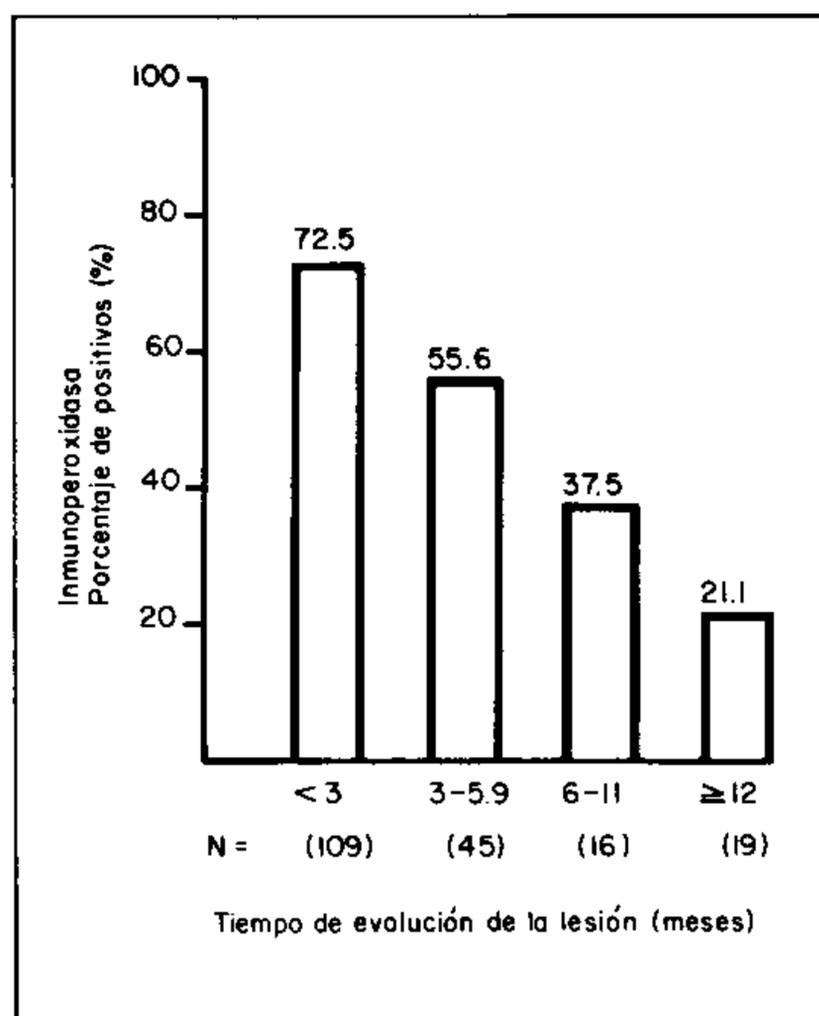


Fig. 1: relación entre tiempo de evolución e inmunoperoxidasa positiva en pacientes con leishmaniasis (diagnosticados clínica y/o parasitológicamente).

TABLA IV

Relación entre la respuesta a inmunoperoxidasa y cepas del complejo *L. braziliensis*\*

Inmunoperoxidasa indirecta	<i>L. b. braziliensis</i> **		<i>L. b. panamensis</i> **	
	N	%	N	%
Positiva	14	77.8	88	64.2
Negativa	4	22.2	49	35.8
Total	18	100.0	137	100.0

$\chi^2 = 0.76$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.38$ .

\* Sólo se incluyen pacientes a los cuales se les aisló el parásito.

\*\* Las leishmanias se identificaron por electroforesis de isoenzimas y análisis de anticuerpos monoclonales.

DISCUSION

Actualmente la confirmación parasitológica de la leishmaniasis no es posible en todos los casos. El cultivo, aunque es el más sensible de los métodos y en ocasiones puede hacer el diagnóstico por sí solo, puede presentar problemas de contaminación (Weigle et al., 1987). Además, requiere un laboratorio para preparar

medios estériles y contar con incubadoras que mantengan temperaturas por debajo de 30 °C para el buen desarrollo del parásito. El frotis de la lesión y la impresión de la biopsia coloreados con Giemsa, son procedimientos fáciles y rápidos, pero son de mayor ayuda cuando hay un número abundante de amastigotas. Queda entonces la alternativa de la biopsia histopatológica, la cual generalmente requiere una búsqueda prolongada para visualizar el parásito (Kerdel-Vegas & Essensfeld, 1966; Restrepo & Gómez, 1983; Magalhães et al., 1986).

El método inmunoenzimático tiene importancia en el diagnóstico de la leishmaniasis por su mayor sensibilidad comparada con el frotis y el estudio histoquímico convencional de la biopsia histopatológica, pero es menor si se compara con el cultivo. Con la coloración de inmunoperoxidasa se pueden localizar rápida y específicamente los amastigotas por el contraste de su coloración. En algunas biopsias hemos observado coloración positiva en la periferia y en el citoplasma, tanto de macrófagos parasitados como no parasitados, que sugiere la existencia de antígeno libre o amastigotas destruidos (Sells & Burton, 1981). Cuando no se observaron amastigotas, por no tener seguridad que dicha reacción fuese debida a exo-antígeno, o a coloración inespecífica no se consideraron tales tejidos como positivos. Para el desarrollo de esta prueba se utilizó suero policlonal anti-*L. b. panamensis* debido a que presentó reacción con las tres subespecies del complejo *braziliensis* y porque todos los parásitos aislados de los pacientes se identificaron por isoenzimas (Saravia et al., 1985) o por análisis de anticuerpos monoclonales (McMahon-Pratt & David, 1981) como *L. braziliensis* sp., siendo la mayoría *L. b. panamensis*.

El uso de los anticuerpos monoclonales para la detección de amastigotas de *Leishmania* (Lynch et al., 1986) es de importancia potencial para diferenciar entre especies y subespecies causantes de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea y cuando se requiere una identificación específica además del diagnóstico. En nuestro caso, el propósito era aumentar la sensibilidad de la evaluación histopatológica. Se demostró que la verificación definitiva y rápida de los amastigotas se pudo realizar confiablemente con el uso del antisuero policlonal. Una ventaja práctica de la polivalencia del antisuero empleado es la de poder utilizarlo para detección

de amastigotas de cualquier subespecie de *Leishmania* del complejo *braziliensis*. Además, el antisuero polivalente resulta económico y fácil de preparar.

La especificidad que mostró este procedimiento confirma que la inmunoperoxidasa es una alternativa valiosa en el diagnóstico diferencial entre *Leishmania* y agentes patógenos como *S. schenckii*, *M. leprae*, e *H. capsulatum*. Aunque hubo una reacción cruzada en una biopsia de un paciente con paracoccidioidomicosis, donde se observaron las levaduras multigemantes claramente coloreadas con inmunoperoxidasa, fue fácil hacer el diagnóstico diferencial con leishmaniasis al constatar las características morfológicas del hongo.

El hecho de encontrar un mayor número de positivos entre los pacientes con tiempo de evolución reciente, indica que éste influye en la sensibilidad de la prueba. Otros autores han informado sobre esta asociación (Magalhães et al., 1986; Weigle et al., 1987) durante la aplicación de una variedad de métodos diagnósticos de leishmaniasis.

La discrepancia observada entre el cultivo de aspirado y la inmunoperoxidasa se debe a que con el primero, a partir de pocas amastigotas se puede amplificar la sensibilidad por la replicación del parásito, mientras que con el segundo, es posible que en un corte determinado no haya ninguna, ya que las leishmanias no están distribuidas en una forma uniforme en la biopsia. Nosotros, empleando el método de inmunoperoxidasa, logramos visualizar los amastigotas en un tercer corte en 16 biopsias de 48 pacientes que inicialmente fueron negativos para dos secciones. Por tanto, es conveniente probar varios cortes de una misma biopsia para aumentar la sensibilidad del método inmunoenzimático. Esto también resulta conveniente en el caso de la coloración histoquímica HE.

Ninguno de los métodos de diagnóstico parasitológico utilizado en este estudio, aun el cultivo de aspirado, logró confirmar la leishmaniasis por sí solo en todos los casos. Es de anotar que mediante el frotis simple se visualizaron las leishmanias en 19 muestras que fueron negativas para inmunoperoxidasa, y que la combinación de estos dos métodos incrementó el porcentaje de casos diagnosticados a 72.0%. Esta combinación puede ser una alternativa de diagnóstico en aquellos laboratorios donde no

hay la infraestructura necesaria para realizar el cultivo del parásito. Esto indica la importancia de aplicar varios procedimientos para llegar a un diagnóstico definitivo de la leishmaniasis y resalta la necesidad de seguir buscando métodos aún más sensibles.

Es interesante que el 66.0% de los 58 pacientes a los cuales no se les pudo establecer un diagnóstico, presentaron reacción positiva con el antígeno intradérmico de Montenegro. Sin embargo, eso no permite afirmar que las lesiones por las que consultaron hayan sido ocasionadas por *Leishmania*, ya que el antígeno de Montenegro, aunque es muy sensible y específico, no puede diferenciar entre infección actual y previa. Además, es común encontrar una alta proporción de personas reactivas y sin lesiones en áreas endémicas (Melo et al., 1977).

La técnica de inmunoperoxidasa indirecta es fácil de realizar, aunque requiere el equipo básico para procesamiento histológico. Los costos adicionales a la histopatología rutinaria son relativamente bajos, y el método provee un archivo permanente de láminas y permite evaluaciones retrospectivas de biopsias conservadas en formol o incluidos en parafina.

#### RESUMEN

**Detección de amastigotas en leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convencionales de diagnóstico** — Con el objeto de aumentar la sensibilidad del diagnóstico histopatológico de lesiones cutáneas y mucocutáneas causadas por subespecies del complejo *Leishmania braziliensis* y para lograr una mejor visualización de los parásitos en las lesiones, se evaluó el método de la inmunoperoxidasa indirecta para localizar en forma rápida y específica los amastigotas en biopsia de tejido afectado. Los cortes de tejidos se fijaron en formol y se incluyeron en parafina; después se evaluaron por inmunohistoquímica usando un antisuero policlonal producido en conejo, como reactivo primario. Se examinaron 265 biopsias de pacientes con lesiones sospechosas de leishmaniasis de la costa Pacífica y región suroriental colombiana. A 193 (72.8%) pacientes se les estableció el diagnóstico por métodos clínicos y/o parasitológicos. Los resultados obtenidos por la inmunoperoxidasa en el grupo de pacientes a los cuales se les confirmó la

leishmaniasis se compararon con la histopatología convencional, el examen directo de frotis y el aislamiento del parásito por cultivo del aspirado de la lesión. La localización inmunoenzimática de las amastigotas fue más efectiva (61.3%) que la histopatología con hematoxilina y eosina (34.6%), y que el frotis (43.9%). En cambio, el cultivo de aspirado fue más sensible (89.8%). La eficiencia del método de inmunoperoxidasa fue mayor en las lesiones recientes (72.5% positivos en los casos con menos de tres meses de evolución) que en las lesiones más antiguas (55.6, 37.5 y 21.1% para 3-5.9, 6-11 meses y mayores o iguales a 12 meses, respectivamente). La combinación de frotis e inmunoperoxidasa incrementó el porcentaje de casos diagnosticados a 72.0%, lo que indica la importancia de combinar métodos para obtener una mayor eficiencia de diagnóstico. La especificidad fue de 100% en controles sanos y 92.9% en pacientes con lesiones causadas por agentes etiológicos distintos a *Leishmania*.

Palabras claves: inmunoperoxidasa — histopatología — leishmaniasis tegumentaria — *Leishmania braziliensis* — amastigotas — inmunohistoquímica

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Maricel Labrada por la titulación de los sueros y a Beatriz Davis por la preparación del manuscrito.

#### REFERENCIAS

- HENDRICKS, L. & WRIGHT, N., 1979. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by *in vitro* cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila medium. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 962-964.
- KERDEL-VEGAS, F. & ESSENFELD-YAHR, E., 1966. Histopatología de la leishmaniasis americana. *Medicina Cutánea*, 3: 267-276.
- LYNCH, N. R.; MALAVE, C.; BENITO-INFANTE, R.; MODLIN, R. L. & CONVIT, J., 1986. *In situ* detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis using monoclonal antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 6-9.
- MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; M. L. COSTA, J.; CUBA-CUBA, C. & MARSDEN, P. D., 1986. Histopatología da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 28: 253-262.
- McMAHON-PRATT, D. & DAVID, J. R., 1981. Monoclonal antibodies that distinguish New World species of *Leishmania*. *Nature*, 291: 581-583.
- MELO, M. N.; MAYRINK, W.; DA COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; WILLIAMS, P.; ARAUJO, F. G.; COELHO, M. V. & BATISTA,

- S. M., 1977. Padronização do antígeno de Montenegro. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 19: 161-164.
- RESTREPO, M. & GOMEZ, M. E., 1983. La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomedica (Colombia)*, 3: 15-21.
- SARAVIA, N. G.; HOLGUIN, A. F.; McMAHON-PRATT, D. & D'ALESSANDRO, A., 1985. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 714-720.
- SELLS, P. G. & BURTON, M., 1981. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 461-468.
- SENEKJIE, H. A., 1939. Studies on the culture of *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 33: 267-269.
- THORNBUGH, D. B.; JOHNSON, C. M. & ELTON, N. W., 1952. The histopathology of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 46: 550-554.
- WEIGLE, K. A.; DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, N. G. & D'ALESSANDRO, A., 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 489-496.