

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINA ESPECIFICA A *LEISHMANIA* EN LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA

MARICEL LABRADA, KRISTEN WEIGLE*, LILIANA VALDERRAMA & NANCY G. SARAVIA (†)

The Tulane University – COLCIENCIAS – (International Collaboration in Infectious Diseases Research Program), Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM), Apartado Aéreo 5390, Cali, Colombia

* Department of Epidemiology, School of Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27514, USA

Evaluation of specific immunoglobulin isotype response to *Leishmania* in American tegumentary leishmaniasis – *Leishmania-specific immunoglobulin subclass response was evaluated in 133 patients infected with Leishmania braziliensis. The indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) was employed with amastigotes of L. mexicana amazonensis as antigen. Among the 133 sera obtained at consultation for diagnosis of active lesions, IgM was detected in 54 following absorption with Staphylococcus aureus Cowan strain I, and in 5 sera prior to absorption. IgM reactive with Leishmania antigen was only found in sera from patients whose lesions had evolved over the past two months or less. Leishmania-specific IgG was detected in all sera prior to absorption. Sera obtained at the time of recurrence or after complete healing of lesions presented only specific IgG. The combined use of the Montenegro skin test and specific IgM increased the sensitivity of immunodiagnostic methods in patients with lesions of less than 2 months duration. Normal control volunteers were negative for specific IgM and unreactive to Montenegro skin testing. Among 16 patients with non-leishmanial lesions, 3 with sporotrichosis showed IgG reactive with Leishmania; none, including 4 with lesions of less than two months duration, showed specific IgM. We conclude that in patients infected with L. braziliensis the presence of specific IgG and IgM is associated with the time of lesion evolution and the primary or recurrent nature of the lesions. In addition, the combined use of IgM titer and Montenegro reactivity is of potential utility in the diagnosis of early lesions.*

Key words: indirect immunofluorescence – *Leishmania braziliensis* – amastigotes – tegumentary leishmaniasis – isotypes – early diagnosis

La leishmaniasis tegumentaria es una enfermedad resultante de la infección con protozoos del género *Leishmania*, que afecta la piel y las superficies mucosas. Aunque los mecanismos mediados por células, especialmente los macrófagos activados, son necesarios para la curación de las lesiones y la adquisición de resistencia, los anticuerpos pueden influir en las tempranas

interacciones del parásito con el macrófago o en la entrada del parásito a la célula hospedera, lo cual es crítico para el desarrollo de la infección (Pearson et al., 1983). Estudios previos sobre anticuerpos en infección humana por *Leishmania*, han demostrado anticuerpos específicos contra el parásito de la clase IgG, IgM y rara vez de la clase IgA (Guimarães et al., 1984; El Amin et al., 1986). Sin embargo, la relación entre características clínicas y la cinética de isotipos específicos en la leishmaniasis tegumentaria no es clara.

Mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, la cual ha sido ampliamente usada para detectar anticuerpos circulantes en leishmaniasis (Badaró et al., 1983), estudiamos los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea con el fin de determinar las clases

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 (CIID) de Canadá, Proyecto 229-05-001-87 de COLCIENCIAS, y el Proyecto 840336 para Fortalecimiento Institucional de la Organización Mundial de la Salud.

(†) A quien se debe dirigir la correspondencia.

Recibido el 11 de noviembre de 1988.

Aceptado el 16 de junio de 1989.

de inmunoglobulina específica contra el parásito, y correlacionarlas con el tiempo de evolución de las lesiones y la forma clínica de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Población estudiada — entre enero de 1981 y noviembre de 1986 se diagnosticaron parasitológicamente para leishmaniasis 378 pacientes con inmunoglobulinas reactivas a *Leishmania* por inmunofluorescencia indirecta (IFAT). De estos pacientes se seleccionaron para este estudio los que tenían más de 2 ml de suero almacenado. Los 133 pacientes incluidos provenían 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. b. braziliensis* en la región suroriental de Colombia; 106 presentaron lesiones cutáneas y 27 lesiones mucocutáneas. Los pacientes fueron en su mayoría del sexo masculino y su edad osciló entre 1 y 61 años (Tabla I).

A cada paciente se le estudió la muestra de suero obtenida cuando se presentó para el diagnóstico de lesiones típicas activas. Se define como cicatriz típica de leishmaniasis aquella cicatriz redondeada con bordes regulares, lisa, brillante y deprimida. Dentro del grupo estudiado, a 6 pacientes que fueron recurrentes también se les estudió serológicamente en el momento de la recurrencia. Con el fin de determinar la cinética de los isotipos de inmunoglobulina, a 10 pacientes, 6 cutáneos y 4 mucocutáneos, se les estudió las muestras de suero obtenidas a los 3, 6, y 12 meses después del tratamiento y cicatrización completa de las lesiones.

Como controles negativos se incluyeron 10 voluntarios sanos que nunca vivieron en área endémica para leishmaniasis. Además se estudiaron 16 pacientes con etiología diferente a leishmaniasis; 7 con lesiones causadas por esporotricosis y 9 con proceso inflamatorio crónico inespecífico. El rango del tiempo de evolución de los pacientes con otra etiología fue de 1.0 a 24.0 meses. Todos los sueros se conservaron a -20°C .

Reacción intradérmica de Montenegro — a 114 pacientes se les aplicó 0.1 ml de antígeno de Montenegro (*Leishmania*) en la cara medial del antebrazo derecho. Este antígeno, suminis-

trado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, contiene 0.5×10^7 promastigotas/ml de *L. b. panamensis* y 0.5×10^7 promastigotas/ml de *L. m. amazonensis* muertas al calor y fijadas con mertiolate. La lectura se realizó a las 40-56 horas y se consideró positivo un diámetro de induración igual o mayor a 5 mm (Weigle et al., 1987).

TABLA I

Características clínicas de los 133 pacientes estudiados

Variable	N	%
Sexo		
Femenino	39	29.3
Masculino	94	70.3
Raza		
Negra	73	54.9
Indígena	8	6.0
Mestiza	36	27.1
Blanca	8	6.0
No se informó	8	6.0
Edad (años)		
1-9	24	18.0
10-19	38	28.6
20-29	29	21.8
30-39	16	12.0
≥ 40	25	18.8
No se informó	1	0.8
Tiempo de evolución (meses)		
≤ 1.0	43	32.3
1.1-2.0	22	16.5
2.1-3.0	14	10.5
3.1-4.0	7	5.2
≥ 4.0	47	35.3
Forma clínica		
Cutánea	106	79.7
Mucocutánea	27	20.3
Cepa		
<i>L. b. braziliensis</i>	24	18.0
<i>L. b. panamensis</i>	82	61.7
<i>L. b. guyanensis</i>	3	2.3
No clasificadas	24	18.0
Cicatriz		
Si	23	17.3
No	107	80.5
No se informó	3	2.2

Preparación del antígeno para IFAT — se cultivaron promastigotas de *L. m. amazonensis* (VEC/BR/1967/PH8) en medio de Sêneca a una temperatura de 26°C . A los cinco días, se tomó 0.1 ml del cultivo en fase logarítmica y se

inoculó por vía subcutánea en la nariz de un hamster de 40 días de edad. La lesión se procesó según Shaw & Lainson (1977). Los amastigotas obtenidos se utilizaron como antígeno a una concentración de 3.5×10^7 amastigotas/ml.

Absorción de los sueros — la IgG de los sueros se removió por absorción con *S. aureus*, Cowan I (No. 8530). La preparación de las bacterias y la absorción se realizaron según Kronvall (1973). El volumen de bacterias a usar para absorber la IgG se determinó mediante inmunodifusión radial antes y después de la absorción. Los resultados obtenidos con aliquotas de 0.2 ml de sueros absorbidos con volúmenes de bacterias desde 0.1 a 0.4 ml se compararon con las aliquotas de suero no absorbido. Se escogió la relación volumen/volumen 1:1 usando 0.2 ml de bacteria con 0.2 ml de suero.

Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) — los sueros se diluyeron en serie desde 1:4 a 1:1024 veces en un amortiguador salino fosfatado (PBS), pH 7.4 (0.12 M) con microdiluidores de 50 μ l (Flow Laboratories, Virginia) y se incubaron con el antígeno a 37 °C por 3 horas para IgM y 1 hora para IgG o IgA. Después de lavar, las láminas se incubaron a 37 °C por 1 hora con un conjugado de fluoresceína con inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas humanas totales (1:20), anti-IgG (1:10), anti-IgM (1:5), y anti-IgA (1:5) (Accurate Chemical, Westbury, NY). Todos los conjugados se diluyeron en Evans Blue (Sigma, St. Louis), preparado en PBS (1:2000). Por último, las láminas se lavaron y montaron con glicerina al 90% en buffer fosfato, pH 8.0. La fluorescencia se evaluó usando un microscopio de fluorescencia (Leitz Wetzler, Dialux); en una magnificación de 400X; se fijaron como títulos positivos tanto para IgM como para IgG aquellos iguales o mayores a 1:4 con base en controles sanos y pacientes parasitológicamente comprobados. La reacción se consideró positiva cuando al menos el 50% de los organismos mostraron fluorescencia (Papas et al., 1983).

Análisis estadístico — para establecer la relación entre la forma clínica de la enfermedad y los niveles de IgM e IgG en los 133 sueros obtenidos antes del tratamiento se efectuó un análisis de varianza en dos vías, controlado por el tiempo de evolución de las lesiones. Para analizar la relación entre tiempo de evolución y respuesta a Montenegro y/o detección IgM especí-

fica, se efectuó un χ^2 para medidas no apareadas y sólo se tuvieron en cuenta los pacientes estudiados por ambos métodos. La relación entre ausencia de cicatriz previa y respuesta de IgM específica se determinó por la prueba de χ^2 no apareada. La influencia de la subespecie en los niveles de IgM e IgG específica se examinó mediante la prueba de t' Student.

RESULTADOS

Con la relación volumen.volumen (1:1) de 0.2 ml de bacterias con 0.2 ml de suero escogida para absorber IgG, se removió más del 84% de la IgG con pérdida del 50% de IgA y del 44% de IgM total según cuantificación por difusión radial. (% ABS IgG: $\bar{X} > 83.9$; SD: 5.1; % pérdida IgA total; \bar{X} : 50.6; SD: 29.9; % pérdida IgM total: \bar{X} : 44.0; SD: 25.7). La remoción de la IgG competitiva incrementó la detección de la IgM específica a *Leishmania*. En los sueros correspondientes a la muestra obtenida en el momento de presentación y diagnóstico, se encontró IgM en 54 de los sueros absorbidos y en 5 de los sueros no absorbidos. Los niveles de IgM en los sueros no absorbidos fueron 1 ó 2 títulos más bajos que en los sueros absorbidos.

La relación entre inmunoglobulinas M y G específica a *Leishmania* y el tiempo de evolución de las lesiones activas se presenta en la Tabla II. Sólo se encontró IgM en los sueros de pacientes cuyas lesiones tuvieron tiempo de evolución menor de 2 meses, en su mayoría menor de 1 mes (Anova: $F = 95.8$; $P < 0.001$). La IgG se detectó en todos los sueros no absorbidos. Los títulos de IgG fueron significativamente más altos en pacientes cuyas lesiones tenían más de un mes de evolución. (Anova; $F: 8.6$, $P < 0.001$) (Tabla II). En los sueros de los 6 pacientes recurrentes tomados en el momento de la recurrencia y en los obtenidos a los 3, 6, y 12 meses post-tratamiento solo se encontró IgG.

La cinética de las inmunoglobulinas M y G en las muestras pre- y post-tratamiento de 6 pacientes cutáneos y 4 mucocutáneos entre los que se incluyeron 2 recurrentes se presenta en la Figura. El título de IgG específica disminuyó pero sin hacerse negativo en seis pacientes, en 3 fue prácticamente invariable y en uno aumentó. No se observaron diferencias significativas entre los títulos de los isotipos estudiados y la forma clínica de la enfermedad (Tabla III). El análisis de tiempo de evolución se basó en la longevidad

TABLA II

Niveles de IgM e IgG en los sueros de pacientes con leishmaniasis tegumentaria según el tiempo de evolución de las lesiones

Tiempo de evolución (meses)	N	Títulos de IgM post-absorción ^e				Títulos de IgG pre-absorción ^f			
		\bar{X}^c	SD	Anova ^d		\bar{X}^c	SD	Anova ^d	
				F	P			F	P
≤ 1.0	43	4.13 ^a	1.35	95.8	0.001	17.9	2.2	8.6	0.001
1.1-2.0	22	3.01	1.41			56.4	2.5		
2.1-3.0	14	2.00 ^b	1			33.6	1.8		
≥ 3.1	54	2.00	1			28.1	2.6		

a: título ≥ 1:4 considerado positivo.

b: título < 1:4 considerado negativo; para efectos de análisis estadísticos se asignó como título negativo 1:2.

c: media geométrica.

d: análisis de varianza en 2 vías, controlado por forma clínica.

e: después de remover IgG del suero por absorción con *S. aureus* Cowan I.

f: antes de remoción de IgG del suero.

de las lesiones activas al tiempo de presentación y diagnóstico, pero anteriores lesiones por *Leishmania* podrían influir en la respuesta inmune; por lo tanto, la leishmaniasis anterior también fue estimada por la presencia de cicatrices típicas y la relación de tales cicatrices con el ensayo de IgM específica (Tabla IV). Se observó una relación altamente significativa entre los niveles detectables de IgM específica para *Leishmania* en el suero y la ausencia de cicatriz típica previa a las lesiones activas presentes en el momento de ingresar al estudio (Chi cuadrado: 13.6; $P < 0.001$, grados de libertad = 1).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los isotipos estudiados con respecto a subespecies del complejo *braziliensis*. El título promedio de IgM específica para los pacientes infectados con *L. b. braziliensis* fue 2.4 y para los infectados con *L. b. panamensis* fue 2.8 (t Student's = 1.1, g.l. = 104, $p = 0.279$). En el caso de IgG específica el título promedio fue 32.0 para *L. b. braziliensis* y 25.3 para *L. b. panamensis* para ambas subespecies (t Student's = 1.5; g.l. = 104; $P = 0.135$).

A diferencia de los resultados obtenidos por IgM anti-*Leishmania* con relación al tiempo de evolución, el porcentaje de pacientes positivos a la prueba intradérmica de Montenegro fue mayor para el grupo de pacientes con lesiones crónicas (Tabla V). El uso combinado de los resultados de la prueba de Montenegro con los resultados de IgM anti-*Leishmania* por IFAT,

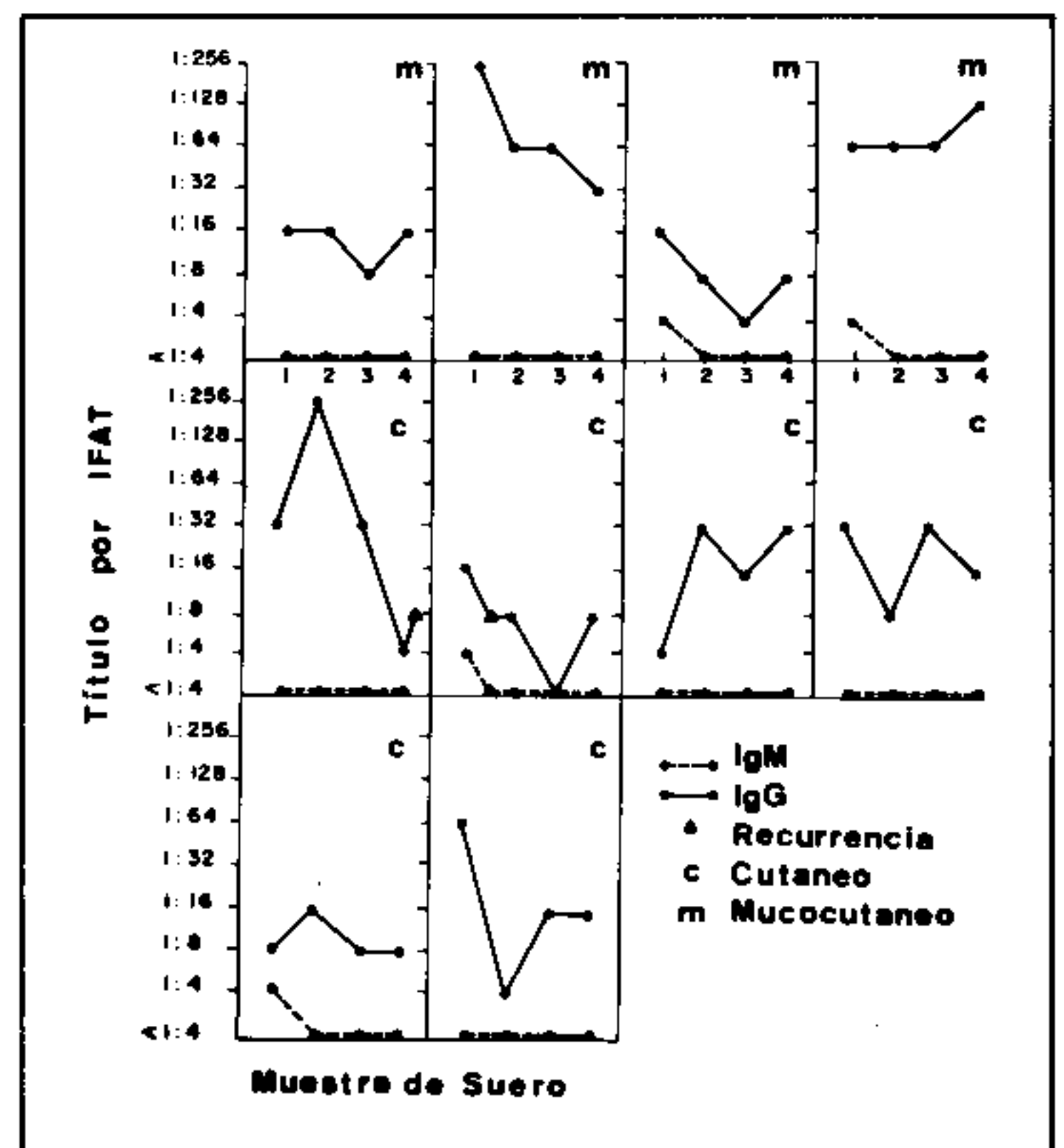


Fig.: Niveles de inmunoglobulinas M y G en las cuatro muestras de seguimiento de infección con *Leishmania* (antes de tratamiento, y 3, 6 y 12 meses después de tratamiento) en 10 pacientes cutáneos y mucocutáneos.

aumentó el porcentaje de pacientes inmunológicamente positivos cuando los casos tenían un tiempo de evolución de las lesiones menor de 2 meses y su especificidad fue mayor (100%) en relación con la combinación de los resultados de la prueba de Montenegro y/o IgG anti-*Leishmania*, cuya especificidad fue del (81.25%) (Tabla V).

TABLA III

Niveles de IgM e IgG en los sueros de pacientes con leishmaniasis tegumentaria según la forma clínica de las lesiones

Forma clínica	N	Títulos de IgM				Títulos de IgG			
		\bar{X}^a	SD	Anova ^b		\bar{X}^a	SD	Anova ^b	
				F	P			F	P
Cutánea	106	2.8 ^c	1.5	.1	.725	27.5 ^d	2.5	0.0	.995
Mucocutánea	27	2.2	1.3			28.9	2.8		

a: media geométrica.

b: análisis de varianza en 2 vías, controlado por el tiempo de evolución de las lesiones.

c: título < 1:4 considerado negativo; para efectos de análisis estadísticos se asignó como título negativo 1:2.

d: título ≥ 1:4 considerado positivo.

TABLA IV

Niveles de IgM específica a *Leishmania* en los sueros de los pacientes con leishmaniasis tegumentaria con respecto a cicatriz típica previa al ingreso del estudio

IgM específica	Cicatriz típica			
	Ausente		Presente	
	N	%	N	%
< 1:4	55	51.4	22	95.7
≥ 1:4	52	48.6	1	4.3
Total	107	100.0	23	100.0

Chi² = 13.6; grados de libertad = 1; P < 0.001.

En los sueros de los 10 voluntarios sanos usados como controles, no se detectó ningún isotipo de inmunoglobulina específica a *Leishmania* y ninguno presentó reacción positiva a la prueba de Montenegro.

Entre los 16 pacientes con una etiología diferente a leishmaniasis, 3 con esporotricosis mostraron IgG reactiva con *Leishmania*, pero ninguno, incluidos 2 con tiempo de evolución menor de 2 meses, presentó en su suero IgM anti-*Leishmania*.

DISCUSION

Este estudio demuestra que la presencia de anticuerpos IgM e IgG específicos a *Leishmania* del complejo *braziliensis* está relacionada con el tiempo de evolución de las lesiones y el estado primario o recurrente de la infección.

La presencia de IgM en el suero generalmente indica una infección reciente (Chantler et al.,

1976). El Amin et al. (1986), con un ensayo inmunoenzimático (ELISA) no detectaron IgM anti-*Leishmania* en sueros de pacientes sudaneses y lo atribuyeron al hecho de que estos fueron admitidos al estudio, largo tiempo después de iniciada la infección. Nuestros resultados concuerdan con lo anterior ya que sólo detectamos IgM específica en los sueros de pacientes con infección reciente y con tiempo de evolución de las lesiones ≤ 2 meses. La cicatriz típica específica, previa a las lesiones activas presentes en el momento de consultar para el diagnóstico, indica una posibilidad de una leishmaniasis anterior. El hecho de no detectar IgM anti-*Leishmania* en 22 (96%) de los 23 pacientes con cicatriz típica previa y en ninguno de los pacientes recurrentes sugiere que la IgM específica además de estar presente en infección de corto tiempo de evolución está presente sólo en infecciones primarias. Solo uno de los 23 pacientes con cicatriz típica presentó IgM anti-*Leishmania*; si bien se dijo que tal cicatriz sugiere una leishmaniasis anterior esto no se puede asegurar. Por tanto la detección de la IgM anti-*Leishmania* ayudaría a establecer la cronología del proceso infeccioso-patológico en leishmaniasis tegumentaria.

Se encontró IgM en 54 de los sueros absorbidos y en 5 de los no absorbidos. Similares resultados obtuvieron Guimarães et al. (1983), quienes trabajando con 172 casos de leishmaniasis cutánea encontraron IgM específica en 59.3% de los casos después de absorción con gammaglobulina agregada. Esto se debe posiblemente, a que la IgG presente en el suero no absorbido enmascara la IgM como resultado de inhibición competitiva por los mismos sitios antigénicos (Chantler et al., 1976).

TABLA V

Porcentaje de positividad de pacientes con leishmaniasis tegumentaria al combinar respuesta a la reacción de Montenegro con niveles de IgM anti-*Leishmania* en relación con el tiempo de evolución de las lesiones

Tiempo de evolución (meses)	Montenegro (MN) ^a		IgM ^b		MN y/o IgM ^c		MN y/o IgG ^d	
	N	% Positivos	N	% Positivos	N	% Positivos	N	% Positivos
≤ 1	26	72.2	33	91.7	34	94.4	36	100.0
1.1-2.0	14	77.8	11	61.1	15	83.3	18	100.0
2.1-3.0	11	78.6	0	0	11	78.6	14	100.0
≥ 3.1	43	93.5	0	0	43	93.5	46	100.0

a: $\chi^2 = 6.8$; g.l. = 3; $P = 0.076$.

b: $\chi^2 = 84.3$; g.l. = 3; $P < 0.001$.

c: $\chi^2 = 4.5$; g.l. = 3; $P = 0.217$.

d: esta combinación mostró menor especificidad (81.25%) en relación a la combinación Mn y/o IgM cuya especificidad fue del 100%.

Los niveles IgG anti-*Leishmania* fueron más altos en los pacientes cuyas lesiones tenían más de un mes de evolución. En este estudio, los 10 pacientes a los cuales se les determinó la cinética de isotipos de inmunoglobulina usando las 3 muestras de seguimiento post-tratamiento, presentaron títulos detectables de IgG específica aún 12 meses después de haber cicatrizado las lesiones. El título disminuyó en 6 de estos pacientes, en 3 fue invariable y en 1 aumentó. Estos pacientes, exceptuando 3 de los que mostraron disminución de título, residen en un área endémica. Esta persistencia del anticuerpo se puede interpretar como una evidencia de exposición contra el estímulo antigénico exógeno (Weigle et al., 1985).

Utilizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) Guimarães et al. (1984), detectaron IgA específica en 33 sueros de 65 pacientes con leishmaniasis mucocutánea de corto tiempo de evolución. Por el contrario, El Amin et al. (1986), usando también la prueba de ELISA no detectaron IgA en sueros de pacientes con lesiones mucosas de largo tiempo de evolución. Estos resultados sugieren que la respuesta de IgA es detectable en sueros de pacientes con lesiones mucocutáneas con tiempo de evolución corto. Sin embargo, en el presente estudio no se detectó IgA, aunque habían 5 pacientes mucocutáneos con tiempo de evolución corto. Evidentemente, la limitación de sensibilidad de la prueba de IFAT incidió en la no detección de IgA.

Saravia et al. (1989), estudiando 441 pacientes con leishmaniasis tegumentaria, encon-

traron diferencias significativas en los títulos de inmunoglobulinas totales reactivas a *Leishmania* por IFAT, con relación a la forma clínica de la enfermedad y a las subespecies del complejo *braziliensis*. Los 133 pacientes incluidos en este estudio eran un subgrupo del estudio anterior; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre títulos de isotipos específicos con respecto a la forma clínica y cepa infectante posiblemente por el tamaño de la muestra.

Aunque las cepas aisladas de los pacientes incluidos en este estudio pertenecieron al complejo *braziliensis*, los sueros se titularon con amastigotas de *L. m. amazonensis*. En una evaluación previa a este análisis, observamos que la sensibilidad de la prueba (IFAT) fue significativamente mayor ($P < 0.01$) con amastigotas de *L. m. amazonensis* que con promastigotas de *L. b. panamensis*. Así mismo, los títulos obtenidos por IFAT usando amastigotas de *L. m. amazonensis* no fueron significativamente diferentes de los observados con amastigotas de *L. b. panamensis* ($P > 0.5$). Por lo tanto y por que las amastigotas de *L. m. amazonensis* se obtienen fácilmente de tejido de hamster, consideramos conveniente usarlas como antígeno.

Ni la hipersensibilidad cutánea retardada ni la respuesta humoral son medidas altamente sensibles de infección con *Leishmania*, particularmente en los casos tempranos. Si embargo, si se usan ambos parámetros inmunológicos, diagnostican tempranamente casi todos los casos parasitológicamente positivos. En este trabajo al combinar los resultados de la prueba de Montenegro con los resultados de IgM anti-

Leishmania por IFAT, el porcentaje de pacientes inmunológicamente positivos aumentó cuando éstos tenían un tiempo de evolución de las lesiones menores de 2 meses y su especificidad fue mayor (100%) en relación con la combinación de los resultados de la prueba de Montenegro y los resultados de IgG anti-*Leishmania* cuya especificidad fue del 81.25%. La detección de IgM anti-*Leishmania* combinada con la respuesta de Montenegro, es pues de potencial utilidad en el diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis tegumentaria temprana.

En este estudio, 3 de los 16 pacientes con otra etiología, mostraron en su suero IgG reactiva con *Leishmania* y sin embargo, ninguno incluyendo los que tenían menos de 2 meses de evolución de las lesiones presentó IgM específica. Se considera importante estudiar una mayor diversidad de enfermedades que se confundan clínicamente con leishmaniasis, teniendo en cuenta el tiempo de evolución de las lesiones, con el fin de evaluar la posible utilidad de la detección de IgM específica en el diagnóstico inmunológico diferencial de la leishmaniasis tegumentaria americana.

Creemos que este trabajo ha proporcionado información básica sobre la cinética de IgM e IgG específica a leishmaniasis humana causada por *L. braziliensis* y además ha demostrado mediante el uso combinado de la prueba de Montenegro y la detección de IgM anti-*Leishmania* una alternativa útil en el diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis tegumentaria temprana. Falta por esclarecer la cinética de IgA y conocer la relación de clases y subclases de Igs específicas con la expresión clínica de la enfermedad y la adquisición de resistencia a la infección.

El papel que juegan los anticuerpos en la inmunidad protectora de la leishmaniasis ha sido controvertido. No obstante, investigaciones al respecto sugieren que la cooperación humoral del anticuerpo podría incidir en el desarrollo de la resistencia a la *Leishmania* (Handman & Hocking, 1982; Ridley, 1979; Ridley et al., 1980; Anderson et al., 1983). Determinar la cinética de las clases y subclases de anticuerpo relacionados con características clínicas y la recurrencia de la enfermedad, y establecer su utilidad en la epidemiología y el diagnóstico clínico e inmunológico de la leishmaniasis es de importancia relevante para futuros estudios.

RESUMEN

Evaluación de la respuesta de isotipos de inmunoglobulina específica a *Leishmania* en leishmaniasis tegumentaria Americana — Con el fin de determinar las clases de anticuerpo producido contra el parásito y la cinética de los mismos en relación a la evolución de la infección, se estudiaron los sueros de 133 pacientes infectados con *Leishmania* del complejo *braziliensis*. Se utilizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta y amastigotas de *L. mexicana amazonensis* como antígeno. En los sueros obtenidos al momento de consultar para el diagnóstico se encontró IgM en 54 de los sueros absorbidos con *Staphylococcus aureus* Cowan I y en 5 de los no absorbidos. La IgM sólo se encontró en los sueros de pacientes con tiempo de evolución de las lesiones \leq de 2 meses. La IgG se detectó en todos los sueros no absorbidos. Los sueros tomados durante recurrencia y después de cicatrización sólo presentaron IgG. El uso combinado de la prueba de Montenegro y/o título de IgM específica, aumentó el porcentaje de pacientes con un diagnóstico inmunológico positivo en aquéllos cuyas lesiones tenían un tiempo de evolución menor de 2 meses. En los sueros de los 10 individuos sanos no se detectó inmunoglobulina específica a *Leishmania* y ninguno presentó reacción positiva a la prueba de Montenegro. Entre los 16 pacientes con otra etiología, 3 con esporotricosis, mostraron en su suero IgG reactiva con *Leishmania* pero ninguno incluyendo 2 con menos de dos meses de evolución de las lesiones presentó IgM. Concluimos que en pacientes infectados con *L. braziliensis* la presencia de IgM e IgG específica a *Leishmania* está asociado con el tiempo de evolución de las lesiones y el estado primario o recurrente de la infección; además la detección de IgM anti-*Leishmania* combinada con la respuesta de Mn sería de potencial utilidad en el diagnóstico clínico de la leishmaniasis tegumentaria temprana.

Palabras claves: inmunofluorescencia indirecta — *Leishmania braziliensis* — amastigotas — leishmaniasis tegumentaria — isotipos

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz Davis en la preparación del manuscrito; al Personal del Hospital Regional "San Andrés" y Plan Padrinos Internacional en Tumaco, Nariño, y personal médico del Hospital Universitario del Valle por su generosa colaboración.

REFERENCIAS

- ANDERSON, S.; DAVID, J. R. & McMAHON-PRATT, D., 1983. *In vivo* protection against *Leishmania mexicana* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, *131*: 1616-1618.
- BADARÓ, R.; REED, S. G. & CARVALHO, E. M., 1983. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: Sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *32*: 480-484.
- CHANTLER, S.; DEVRIES, E.; ALLEN, P. R. & HURN, B. A. A., 1976. A rapid immunofluorescent procedure for the detection of specific IgG and IgM antibody in sera using *Staphylococcus aureus* and latex-IgG as absorbents. *J. Immunol. Methods*, *13*: 367-380.
- EL AMIN, E. M.; WRIGHT, E. P. & VLUG, A., 1986. Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: Specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. *Clin. Exp. Immunol.*, *64*: 14-19.
- GUIMARÃES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; CAMARGO, M. E. & DINIZ, J. M. P., 1983. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley, IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, *25*: 108-112.
- GUIMARÃES, M. C. S.; FERREIRA, A. W.; CARVALHO, M. B.; CELESTE, B. J.; CUEE, L. C. & BELDA JR., W., 1984. Anti-*Leishmania* IgA immunoenzymatic assay in mucocutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, *26*: 353-356.
- HANDMAN, E. & HOCKING, R. E., 1982. Stage-specific strain-specific, and cross-reactive antigens of *Leishmania* species identified by monoclonal antibodies. *Infect. Immunol.*, *37*: 28.
- KRONVALL, G., 1973. A rapid slide agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to protein A containing staphylococci. *Med. Microbiol.*, *6*: 187-190.
- PAPPAS, M. G.; MCGREEVY, P. B.; HAJKOWSKI, R.; HENDRICKS, L. D.; OSTER, CH. N. & HOCKMEYER, W. T., 1983. Evaluation of promastigote and amastigote antigens in the indirect fluorescent antibody test for American cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *32*: 1260-1267.
- PEARSON, R. D.; WHELLER, D. A.; HARRISON, L. H. & KAY, H. D., 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.*, *5*: 907.
- RIDLEY, D. S., 1979. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *73*: 151.
- RIDLEY, D. S.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C. & BARRETO, A. C., 1980. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *74*: 508.
- SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A. F.; NAVAS, C. & WEIGLE, K. A., 1989. Relationship of immune response and *Leishmania braziliensis* subspecies to disease expression in human tegumentary *Leishmania*. *J. Inf. Dis.*, *159*: 725-735.
- SHAW, J. J. & LAINSON, R., 1977. A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in the indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. *J. Parasitol.*, *63*: 384-385.
- WEIGLE, K. A.; VALDERRAMA, L.; SANTRICH, C. & SARAVIA, N. G., 1985. Recurrences of tegumentary leishmaniasis. *Lancet*, *2*: 557-558.
- 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.