

## Artículo Original

## Validación de la prueba cutánea de Montenegro en una área endémica de Leishmaniasis cutánea

William Cevallos T, Rodrigo Armijos M &amp; Obst Nancy Castro M.

Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central y Ministerio de Salud Pública, Quito-Ecuador.

## Resumen

En el Ecuador la Leishmaniasis Cutánea constituye un grave problema de salud pública, 17 de sus 21 provincias son endémicas y en los últimos quince años se han registrado en el país un incremento notable de casos según registro del Ministerio de Salud Pública. Por sus características epidemiológicas, la Leishmaniasis es una enfermedad que afecta más a los campesinos que residen en regiones tropicales y subtropicales, a los que difícilmente llegan servicios de laboratorio y/o servicios médicos profesionales. Frecuentemente se cometen errores tanto en el diagnóstico como en el tratamiento. En una población rural del Cantón Borbón, provincia de Esmeraldas, en su mayoría de raza negra y endémica para Leishmaniasis, se aplicó la Prueba Cutánea de Montenegro (PCM) como un instrumento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad. Se diagnosticó Leishmaniasis Cutánea Activa (LCA) en 6.6% y se comprobó que el 22.7% de la población, presentó antecedentes de ésta enfermedad. Se determinó la alta sensibilidad (90%) y especificidad (98%) de la PCM, aunque al igual que en otros estudios epidemiológicos y clínicos se demuestra su positividad en pacientes que han presentado la enfermedad o en sujetos residentes en áreas endémicas que nunca han presentado formas clínicas de Leishmaniasis. De todas maneras no deja de ser una prueba útil para el diagnóstico de la enfermedad por su fácil ejecución, que puede ser realizada en zonas rurales y por personal paramédico. Se concluye que la prueba es útil para el diagnóstico tanto clínico como epidemiológico en estudios de Leishmaniasis del Nuevo Mundo.

**Palabras clave:** Leishmaniasis cutánea, Prueba Cutánea de Montenegro.

## Summary

In Ecuador, Cutaneous Leishmaniasis constitutes a great problem in public health. Seventeen out of it twenty-one provinces are endemic and in the last fifteen years a great increase of cases have been registered in the country by the Ministry of Public Health. Because of its epidemiologic characteristics, Leishmaniasis is an illness which affects more the countrymen who live in the tropical and subtropical regions, the ones that hardly count with laboratory services or professional medical services. In this sense, a lot of mistakes in the diagnostic and treatment are made. In a rural population of the Borbon county, in the province of Esmeraldas, which counts with a majority of black people and is endemic for Leishmaniasis,

**Dirección para correspondencia:** Dr. Rodrigo Armijos M, Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central, Iquique y Sodiro, Teléfonos 528810, 528690, Quito-Ecuador.

the Montenegro cutaneous test was applied (MST) as an instrument that helps in the diagnostic of the illness. Active cutaneous leishmaniasis was found (ACL) in 6.6% and it was proved that 22.7% of the population presented a background of this illness. When the MST was applied, its high sensibility and especificity was proved (95%), eventhough, as in other epidemiologic and clinical studies, it shows its positivity in patients who have shown signs of the illness or in individuals who live in endemic areas who have never shown any clinical forms of Leishmaniasis. Anyway, this test is still considered a good diagnostic test for this illness because of its facility for execution, which can be done in rural zones by paramedic personnel. In conclusion, this test is useful for the clinical and epidemiologic diagnostic of Leishmaniasis in studies in the New World.

**Key Words:** Cutaneous leishmaniasis, Montenegro skin test.

*Revista de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador 1999; 24 (1): 18-22*

## Introducción

La Leishmaniasis Cutánea (LC) constituye un problema de salud pública en varios países del mundo, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para 1990 se reportaron 12 millones de casos, en tanto que 350 millones de personas viven en riesgo de infectarse,<sup>1</sup> y sobre los 2 millones de casos nuevos ocurren cada año (OMS, 1995). Se distribuye en 88 países de los cuales 72 están en vías de desarrollo. La incidencia mundial anual de LC, que es la forma más frecuente en el Ecuador, es de 1 a 1.5 millones de afectados. En general durante las últimas décadas, la enfermedad presenta una tendencia a incrementar sus tasas de morbi-mortalidad y a una mayor expansión geográfica. Este fenómeno está asociado con el modelo de desarrollo económico de los países del llamado tercer mundo, que incluye la colonización y explotación de los bosques tropicales y subtropicales.

En América se presenta en la mayoría de países con excepción de Canadá, Chile y Uruguay. En Ecuador, como en el resto de la región, la enfermedad es una zoonosis, el hombre empieza a formar parte del ciclo de este parásito, cuando coloniza las extensas áreas de montaña tropical y subtropical; 17 de sus 21 provincias son endémicas para esta patología. En los últimos 15 años se ha registrado un incremento notable de casos, según el registro del Ministerio de Salud Pública, sobre todo en las provincias de la Costa y Oriente, así como la

zona subtropical de la Sierra.<sup>2,3</sup> Lamentablemente, debido a la falta de un sistema apropiado de información epidemiológico y la ausencia casi total de un sistema de vigilancia y control, no disponemos de información estadística confiable sobre la prevalencia e incidencia de leishmaniasis humana, estudios epidemiológicos en diferentes áreas endémicas demuestran la existencia de un subregistro, por lo que la enfermedad en nuestro medio representa un grave problema de salud pública.<sup>4</sup>

La Leishmaniasis se caracteriza por una variedad de manifestaciones clínicas, que van desde las formas localizadas, que en ocasiones remiten espontáneamente, hasta las diseminadas e incurables, pasando por cuadros de gravedad intermedia como son las formas mucocutáneas y viscerales, lo que se asocia con las diversas especies de parásitos descritas.<sup>5,6</sup> Las especies identificadas en tres de las cuatro regiones naturales del Ecuador (áreas tropical y subtropical de la costa y amazonía y en los andes) son: *L(V) panamensis*, *L(V) guyanensis*, *L(V) brasiliensis*, *L(L) mexicana*, *L(L) amazonensis*; y, *L(L) major-like*.<sup>7,8</sup>

En las zonas marginales del trópico y subtropico ecuatoriano, la atención de los pacientes la realiza el médico rural sin mayor experiencia en patología tropical o promotores de salud locales con entrenamiento limitado, por lo que el diagnóstico de la leishmaniasis se basa en la evaluación clínica, sin confirmación parasitológica, esto acarrea consigo la posibilidad frecuente de dar tratamiento antileishmania a pacientes falsos positivos como en el caso de: úlcera tropical, dermatomicosis, pian, tuberculosis cutánea, cáncer de piel, entre otros.

Para establecer el diagnóstico definitivo de la lesión dérmica sospechosa de leishmaniasis nos servimos de métodos de laboratorio tanto directos como indirectos.<sup>6</sup> Entre los métodos directos y aquellos en que se obtiene y se observa al parásito tenemos: el raspado, la biopsia o el aislamiento para cultivo, en los dos primeros observamos al amastigote (forma intracelular de leishmania), mientras que el tercero nos permite observar el promastigote (forma extracelular). Los métodos indirectos son aquellos que confirman el diagnóstico a través de la búsqueda en el paciente de elementos de la respuesta inmune, dirigidos al parásito o alguno de los componentes estructurales de este. Entre estas pruebas tenemos: la Prueba Cutánea de Montenegro (PCM), pruebas serológicas utilizando las técnicas de inmunofluorescencia, ELISA y DOT ELISA. Las pruebas que buscan componentes del parásito se centran fundamentalmente a la detección de antígenos de leishmania en el suero de pacientes mediante anticuerpos monoclonales, policlonales o la hibridación del DNA de leishmania en muestras obtenidas de la lesión.

La PCM, constituye la evaluación in vivo de la respuesta inmune celular dirigida a leishmania (respuesta inmune mediada por linfocitos T), luego de la inoculación intradérmica de los promastigotes muertos de leishmania. La positividad de esta prueba, está indicada por el apareamiento de una induración mayor a 5 mm. de diámetro, la que llega a ser máxima en 48 horas, pudiendo persistir por 4 a 5 días; su presencia no es indicativo de lesión activa. La respuesta positiva se obtiene en un 95% de

casos comprobados de leishmaniasis, puede ser negativa en casos recientes (antes de las 8 semanas) o en casos tratados precozmente, pero en casos crónicos se torna en un método básico por su alta sensibilidad y especificidad.<sup>9,10</sup> Es una prueba útil para el diagnóstico clínico y epidemiológico, algunos estudios de LC en el nuevo mundo así lo demuestran.<sup>11-13</sup>

En algunos lugares la PCM es el más frecuente suplemento del diagnóstico clínico de LC, a pesar de que la prueba no discierne una infección anterior de una actual, lo cual es un problema donde la prevalencia de esta enfermedad es alta. En numerosos estudios epidemiológicos de corte, donde se utilizó la PCM, se pudo establecer la prevalencia acumulativa de infección por leishmaniasis humana, su utilidad aumenta cuando se correlaciona con estudios de factores de riesgo como; edad, sexo, ocupación y tiempo de residencia.<sup>14</sup>

Por las características epidemiológicas de la leishmaniasis, el paciente que se presenta con esta lesión, difícilmente llega a tener atención médica y peor aun cuenta con posibilidades de realizarse exámenes para diagnóstico de laboratorio confirmatorios. Surge entonces la necesidad de contar en estas áreas marginales con una prueba, no solo como auxiliar en el caso de la sospecha clínica de LC, sino también para evaluación epidemiológica y que además pueda ser utilizada por promotores y/o auxiliares de enfermería del sistema local de salud, esto de alguna forma ayudaría a un mejor manejo de los pacientes, especialmente en las zonas donde la leishmaniasis está en forma selvática, como es el caso de la zona del estudio.

El aplicar esta prueba en una área endémica para leishmaniasis, no solo permitiría contar con un instrumento de ayuda diagnóstica, sino también dar un aporte científico para saber que pasa en una zona donde aparentemente hay una sola especie de leishmania involucrada, teniendo como meta la standarización de una PCM para uso nacional.

### Materiales y Métodos

La zona de estudio se localiza en el Norte de la provincia de Esmeraldas, Cantón Eloy Alfaro, en la costa Pacífica ecuatoriana. Las comunidades seleccionadas fueron Maldonado y Concepción, poblaciones de raza negra ubicadas en las riberas del río Santiago, en la selva tropical húmeda. La temperatura anual oscila entre 28 y 30°C con una humedad relativa del 85%, la principal temporada de lluvia oscila entre Diciembre y Junio.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados al azar en forma randomizada, incluyendo a las personas en tres grupos distintos de acuerdo a su historia clínica en relación a la leishmaniasis. Los tres grupos estuvieron constituidos así: a) sin antecedentes de infección (n=200), b) con infección previa (n=61); y, c) con infección activa (n=6).

Se dio información individual y comunitaria sobre el estudio para obtener el consentimiento, el mismo que fue verbal, dado el alto índice de analfabetismo en la zona y la negativa de firmar documentos públicos. Todas las

personas procedentes de las comunidades (1500) recibieron atención médica gratuita durante la visita del equipo de trabajo.

Para cada individuo se elaboró una historia clínica básica, en la que se incluyó sus antecedentes patológicos con énfasis en leishmaniasis, terapéuticos y sus conocimientos acerca del vector. Además se elaboró una ficha de registro de casos a ser utilizada en el área de salud.

El diagnóstico clínico fue en base a un examen físico general el mismo que comprendió una inspección minuciosa de piel y membranas mucosas orofaríngeas, orientada especialmente a la detección de signos de infección previa activa o a la presencia de leishmaniasis mucocutánea.

Además del diagnóstico clínico, en los casos de infección activa, se emplearon varias técnicas para confirmar la presencia de amastigotes de leishmania. Estos métodos incluyeron:

- 1.- Frotis de las lesiones: previa asepsia y antisepsia de la lesión más reciente, se procede a anestesiarse y presionar entre el dedo índice y pulgar el borde de la lesión de donde se tomara la muestra. Con el borde no cortante del bisturí se procede a raspar debajo del borde de la lesión, tomando tejido el cual se lo extiende en una placa porta-objetos. Una nueva muestra es tomada, esta vez con una incisión a manera de biopsia.
- 2.- Aspirado y cultivo: continuando con el procedimiento anterior, esta vez con la ayuda de un mechero manteniendo un halo de protección y esterilidad, se carga en una jeringuilla de 3 ml. 0.5 ml. de PBS (solución buffer) y se procede a puncionar y mediante movimientos circulares se aspira una muestra del borde de la lesión, que se coloca en un medio de cultivo fabricado en el Laboratorio de Inmunología, el mismo que será procesado, analizado y reportado.
- 3.- Elaboración de la PCM: En el laboratorio de Inmunología se elaboró para el estudio de estandarización de la concentración, la prueba triple con promastigotes muertos de tres especies de parásito: *L(L) amazonensis*, *L(V) braziliensis* y *L(V) guyanensis-panamensis*, a concentraciones de  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$  y  $12.5 \times 10^6$ . Para el segundo protocolo, en el que se determinaría la estandarización de la especie de parásito, se elaboró la prueba con cada especie por separado y a una concentración estandarizada en el primer protocolo de  $6 \times 10^6$ .

*Estandarización de la concentración del parásito:* en una muestra randomizada de 138 personas se aplicó la PCM triple, en concentraciones iguales de: *L(V) braziliensis* y *L(V) guyanensis-panamensis*; y, *L(L) amazonensis*. Las concentraciones usadas fueron:  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $12.5 \times 10^6$  promastigotes muertos de leishmania. Las 3 aplicaciones se las realizó intradérmicas y en el brazo izquierdo, marcando con un bolígrafo el sitio de la punción para su posterior lectura a las 48 horas.

*Estandarización de la especie de parásito:* en otra muestra randomizada de 138 personas se aplica esta vez el parásito por separado: *L(V) braziliensis*, *L(V) guyanen-*

*sis-panamensis*, y *L(L) amazonensis*, a una concentración estandarizada en el primer protocolo de  $6 \times 10^6$  promastigotes muertos de leishmania.

Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico EpiInfo 5.0, los métodos de estadística descriptiva y el análisis de varianza (ANOVA).

## Resultados

La edad de las 276 personas incluidas en el estudio oscila entre 1 y 75 años, la mayoría de los sujetos están sobre los 20 años de edad. Los varones constituyeron el 58% de la muestra, integrada principalmente por gente de raza negra (97%), casi todas las personas habían nacido en la zona de estudio.

La mayoría de hombres dedican su tiempo a la agricultura de subsistencia y a la pesca, mientras que las mujeres realizan su trabajo doméstico y la crianza de los niños. En esta zona el nombre común de la leishmaniasis cutánea es "guaray", nombre de un árbol que según la creencia de los habitantes de la zona, aplicando las hojas maceradas en el sitio de las lesiones dérmicas, produce su curación.

La mayoría de las personas incluidas en el estudio manifestaron conocer la enfermedad, ya sea por experiencia personal o por la educación recibida de los trabajadores de atención primaria. La mayoría, salvo un 20%, dijeron conocer la "manta blanca", nombre común del flebotomo vector del género *Lutzomyia*, pese a esta familiaridad muy pocos sabían que era el agente transmisor de la leishmaniasis cutánea.

Se diagnosticó LC aguda en 6 personas (2.2%) y se comprobó que 60 (22.7%) habrían sufrido la enfermedad anteriormente; 210 sujetos (75.1%) resultaron sanos. Luego de realizadas las pruebas se obtuvieron los resultados que se indican en las tablas 1-2- y 3.

Como se puede ver en el protocolo 1, únicamente 2 personas tenían lesión activa y 26 tenían antecedentes de infección, en éste grupo, usando diferentes concentraciones del antígeno, se estandarizó en la concentración de  $6 \times 10^6$  promastigotes muertos de leishmania, usada en el segundo protocolo, por ser la que menos falsos negativos tenía. En la población con enfermedad activa o con antecedentes de infección ( $n=28$ ) la prueba resultó ser positiva en 96.5%, en tanto que en la población sana ( $n=110$ ), resultó ser negativa en el 98.2%.

En el segundo protocolo, 4 personas tuvieron infección activa; en tanto que, 35 tenían antecedentes de infección, el resto de la muestra no reportó ni antecedentes ni enfermedad actual, en la población con antecedentes o con infección actual, la prueba fue positiva en 84.73%, en la población sana fue negativa en 97.8%. Las reacciones indeseables locales provocadas por el antígeno de la PCM en personas sanas fueron raras, consistieron en eritema y rara vez prurito.

En los casos de leishmaniasis, frecuentemente se reportaron eritema, calor y prurito en cada una de las aplicaciones de la prueba, se observaron con mayor intensidad cuanto mayor era la concentración del antígeno. En los casos de LC aguda, se pudo observar

además la presencia de vesículas. No se observaron reacciones sistémicas en ningún grupo del estudio, hecho

muy favorable en la aceptación de las personas para aplicarse la prueba de Montenegro.

**Tabla 1. Primer protocolo de investigación: estandarización de la concentración del antígeno:**

Concentración/clínica	Sanos		Cicatriz		Úlcera		Valor-p
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
Mn1 ( $3 \times 10^6$ )	110 (100%)	0 (0%)	6 (23.1%)	20 (76.9%)	0 (0%)	2 (100%)	-0.0000
Mn2 ( $6 \times 10^6$ )	108 (98.2%)	2 (1.8%)	2 (7.7%)	24 (92.3%)	0 (0%)	2 (100%)	-0.0000
Mn3 ( $12.5 \times 10^6$ )	107 (97.3%)	3 (2.7%)	2 (7.7%)	24 (92.3%)	0 (0%)	2 (100%)	-0.0000

**Tabla 2. Segundo protocolo de investigación: estandarización de la especie del antígeno a la concentración de  $6 \times 10^6$ :**

Concentración/clínica	Sanos		Cicatriz		Úlcera		Valor-p
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
L (v) <i>braziliensis</i>	98 (97.8%)	2 (2.2%)	5 (14.7%)	29 (85.3%)	1 (25%)	3 (75%)	-0.0000
L (v) <i>panamensis</i> <i>guyanenses</i>	86 (98.2%)	4 (1.8%)	3 (7.7%)	32 (92.3%)	1 (25%)	3 (75%)	-0.0000
L (l) <i>amazonensis</i>	107 (97.3%)	3 (2.7%)	2 (7.7%)	24 (92.3%)	1 (25%)	3 (75%)	-0.0000
Mn triple $6 \times 10^6$	88 (96.7%)	3 (3.3%)	3 (8.6%)	32 (91.4%)	1 (25%)	3 (75%)	-0.0000

**Tabla 3. Mediciones promedio en los diferentes grupos clínicos y en los dos protocolos**

Protocolo	Sanos (n=10)	Cicatriz (n=26)	Úlcera (n=2)	F-ratio	Valor-p
<b>GRUPO CLÍNICO N° 1</b>					
Mn1 ( $3 \times 10^6$ )	0.61±0.20	8.54±0.43	11.96±1.5	151.5	-0.0000
Mn2 ( $6 \times 10^6$ )	0.25±0.16	8.90±0.34	9.70±0.12	151.5	-0.0000
Mn3 ( $12.5 \times 10^6$ )	0.36±0.20	8.90±0.40	9.80±0.13	206.9	-0.0000
<b>GRUPO CLÍNICO N° 2</b>					
Protocolo	Sanos (n=91)	Cicatriz (n=35)	Úlcera (n=4)	F-ratio	Valor-p
L (v) <i>braziliensis</i>	1.39±1.29	11.43±6.0	9.40±6.5	82.6	-0.0000
L (v) <i>panamensis</i> <i>guyanenses</i>	1.72±1.60	10.30±4.9	13.75±9.4	143.2	-0.0000
L (l) <i>amazonensis</i>	1.72±1.10	8.55±4.23	7.50±6.24	69.7	-0.0000
Mn triple $6 \times 10^6$	2.02±1.43	11.71±4.6	10.0±6.2	102.81	-0.0000

## Conclusiones

- 1.- La PCM presenta una alta sensibilidad (90%) y especificidad (98%), aunque, al igual que en otros estudios epidemiológicos y clínicos, se demuestra su positividad en pacientes que han presentado la enfermedad o en sujetos residentes en zonas endémicas que nunca han presentado formas clínicas de LC. De todas maneras no deja de ser una prueba útil por su fácil ejecución y porque puede ser realizada en zonas rurales por personal paramédico, especialmente en áreas como la zona Norte de la Provincia de Esmeraldas donde la transmisión de la LC es selvática, y donde existen patologías que pueden confundir el diagnóstico clínico como: úlceras tropicales, pian, micosis superficiales entre otras.
- 2.- El grado de reactividad semejante en los grupos estudiados, frente a las tres especies de leishmania, puede

explicarse por una reacción cruzada o porque en esta zona también está presente *L(V) braziliensis* y *L(L) amazonensis*, a más de *L(L) panamensis* ya descrita en esta zona. Futuros estudios de tipificación de las especies de leishmania esclarecerán este hallazgo.

- 3.- La leishmaniasis es una enfermedad de los pobres del campo, a los que difícilmente llegan servicios de salud y de laboratorio, en este sentido es valioso contar con un instrumento de ayuda en el diagnóstico clínico.
- 4.- La descentralización en el diagnóstico de laboratorio, capacitando al personal básico de salud local en el diagnóstico y tratamiento oportuno de casos, fortalece los llamados sistemas integrales de salud.
- 5.- Este estudio debe complementarse con estudios de aislamiento y tipificación de las especies de leishmanias, reservorios y mayores datos epidemiológicos.

**Bibliografía**

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Geneva: WHO, 1990. /Serie de Informes Técnicos 793)
2. Ecuador: Ministerio de Salud Pública: "Guía de Procedimientos para el Control de la Leishmaniasis Cutánea en el Ecuador". Informe del Comité de Expertos. Quito. 1995.
3. Ecuador: Ministerio de Salud Pública. La Leishmaniasis en el Ecuador. Boletín Epidemiológico, 1985; 7: 13
4. Hashiguchi Y, Gómez EA: A review of leishmaniasis in Ecuador. Bull Pan Am. Health Org. 1991; 25: 64-76.
5. León L: Formas clínicas de la leishmaniasis tegumentaria americana. Prend Med. Argentina. 1975; 62-73.
6. Rey L: Parasitología, De. Guanabará. Río de Janeiro-Brasil. "2da. Edición pp: 205-217.
7. Armijos RX, Chico ME, Cruz ME, Guderian Rh, Kreutzer RD, Rogers MD, Grogl M: Human Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador: identification of parasites by enzyme electrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 42: 424-428.
8. Hashiguchi Y, et al: Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with leishmania mexicana and leishmania major-like parasites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991; 44(2): 205-217.
9. Armijos RX, Racines J, Izurieta R: Evaluación de la sensibilidad de cinco métodos diagnósticos de la leishmaniasis cutánea. Estudio de Post-grado, Escuela de Medicina. Quito-Ecuador: 1993.
10. Kristen A, et al: Leishmanin skin test standarization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. School of Public Health University of California and Cedeim Colombia. 1991.
11. Zurita C, Aviles H, Racines J, Izurieta R, Armijos RX: Epidemiología de la leishmaniasis cutánea en Ecuador características de la enfermedad. IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. Guayaquil, 1993.
12. Mattos Ms, et al: Características clínicas -epidemiológicas da leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), no Río de Janeiro-Brasil. HEC/FIO CRUZ . IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. Guayaquil, 1993 .
13. Kroeger A, Mancheno M, Cruz W, Estrella E: Malaria y Leishmaniasis en Ecuador. De Abya Yala. Quito-Ecuador: 1991; 307-310.
14. Avilés H, et al: Epidemiología de la leishmaniasis cutánea en Ecuador. Factores de riesgo. IV Congreso Latinoamericano de Medicina tropical. Guayaquil, 1993.