

Utilidad de la prueba de Montenegro (IDRM) como herramienta para la vigilancia epidemiológica de Leishmaniasis cutánea en áreas de Bolivia donde coexiste la infección por *Leishmania spp* y *T. cruzi*

Utility of Montenegro skin test (IDRM) as a tool for epidemiological surveillance of cutaneous leishmaniasis in areas of Bolivia where coexist the *Leishmania spp* and *T. cruzi* infections

Ernesto Rojas Cabrera^{1,2,a}, Miguel Guzmán-Rivero^{1,3b}, Aleida Verduguez-Orellana^{1,3b}, Nair Montaña Villarroel^{1,b}

Resumen

Objetivos: evaluar la respuesta a la prueba de la Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) en áreas endémicas para leishmaniasis y enfermedad de Chagas. **Métodos:** se aplicó la IDRM a jóvenes sin antecedentes previos de leishmaniasis, en dos regiones endémicas para leishmaniasis y enfermedad de Chagas respectivamente. La prueba se aplicó en tres oportunidades con intervalo de dos meses entre aplicaciones, se evaluó la respuesta a la misma, por medición de la induración post inoculación. **Resultados:** No se encontraron reacciones positivas de IDRM en ninguna de las dos regiones. La presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* entre algunos de los participantes tampoco produjo reacciones positivas de la prueba. La inoculación de la IDRM no generó reacciones positivas al final de las tres aplicaciones. **Conclusiones:** por nuestros hallazgos nosotros concluimos que la IDRM podría ser utilizada como herramienta epidemiológica para leishmaniasis en Bolivia en situaciones en las que coexisten la leishmaniasis y el Chagas.

Palabras claves: chagas; leishmania; zonas endémicas; diagnóstico.

Abstract

Objectives: to evaluate the response to intradermal test of Montenegro in endemic areas of leishmaniasis and Chagas disease. **Methods:** the intradermal test of Montenegro was applied to young people without evidences of previous leishmaniasis in two regions endemic to leishmaniasis or Chagas disease respectively. The test was applied in three times, each one after two months. The response to it was evaluated, by measuring of induration post inoculation. **Results:** it was found no positive reactions from intradermal test of Montenegro in both regions. The presence of antibodies anti-*T. cruzi* in some participants not caused positive reactions of the test. The inoculation of intradermal test of Montenegro did not generate any positive reactions at end of the three inoculations. **Conclusions:** for our findings, we conclude that this test could be used as an epidemiological tool for leishmaniasis in Bolivian context where coexisting leishmaniasis and Chagas disease.

Keywords: chagas; leishmanin; endemic areas; diagnosis.

La leishmaniasis, está presente en casi todo el continente americano y 90 millones de personas en esta región están expuestas a la infección^{1,2}. En Bolivia, la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea están causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*^{3,4}. Según datos del ministerio de salud en promedio se presentaron 13,7% casos de leishmaniasis en el periodo 2000-2009⁵.

La enfermedad de Chagas está presente en todo el territorio boliviano, y aún cuando ésta es considerada una enfermedad rural, como consecuencia de la migración hacia los centros urbanos también la enfermedad está presente en áreas periurbanas⁶⁻⁸.

Los agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis (*Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp*) pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, por lo que son frecuentes las reacciones cruzadas entre las pruebas serológicas utili-

zadas para el diagnóstico de ambas enfermedades⁹. Estudios previos han demostrado que la Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) tiene una alta sensibilidad y especificidad en pacientes con leishmania^{9,10}, pero también ha sido reportado alrededor de un 5% de reacciones positivas de IDRM entre pacientes con enfermedad de Chagas¹¹.

La IDRM, mide la reacción de hipersensibilidad retardada a antígenos homólogos o heterólogos de promastigotes de *Leishmania spp*^{12,13}, un resultado positivo de IDRM indica una infección previa asintomática. En zonas endémicas para leishmaniasis, podemos asumir que una cierta proporción de la población residente ha sido expuesta a los flebotominos infectados^{14,15}.

La co-circulación simultánea de la enfermedad de Chagas y leishmaniasis en nuestro país y las evidencias sobre reacciones cruzadas entre las pruebas serológicas para ambas enfermedades, debido a que los agentes etiológicos de ambas pertenecen a la misma familia *Trypanosomatidae*, nosotros planteamos las hipótesis de que la infección por *T. cruzi* genera reacciones positivas de la IDRM y que la inoculación repetida de leishmanina genera sensibilización de las personas a este antígeno. En este sentido hemos llevado a cabo el presente estudio entre residentes sanos de áreas endémicas para leishmaniasis y enfermedad de Chagas.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBISMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

²Centro Universitario de Medicina Tropical (CUMETROP), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

³Centro de Investigación y Atención de Enfermedades Tropicales (CIAET), Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

^aMédico especialista en medicina tropical; ^bBioquímico-farmacéutico

*Correspondencia a: Ernesto Rojas Cabrera.

Correo electrónico: ernesto.rojas.cabrera@gmail.com

Recibido el 21 de agosto de 2012. Aceptado el 23 de noviembre de 2012.

Tabla 1. Número de mujeres y varones de las comunidades de Sebastián Pagador e Isinuta que ingresaron y terminaron el estudio, y edad de los participantes expresada en años.

	Sebastián Pagador		Isinuta		Total
	Mujeres	Varones	Mujeres	Varones	
Edad (rango)	16 (13-19)	16 (14-18)	14 (12-19)	16 (12-18)	
Número de Participantes al inicio del estudio	79	71	73	77	300
Número de Participantes al final del estudio	65	33	36	43	177

Materiales y métodos

El presente es un estudio descriptivo comparativo transversal no experimental. Participaron 300 jóvenes que constituían la totalidad de la población joven concentrada en los colegios de dos localidades endémicas, para enfermedad de Chagas o leishmaniasis, Sebastián Pagador (ubicado en la zona sur de la ciudad de Cochabamba) e Isinuta (Parque Isiboro-Sécure en la provincia Chapare).

Como criterios de inclusión se consideraron: la edad de los participantes (entre 12 y 19 años), sin evidencias clínicas de enfermedad de Chagas, leishmaniasis u otras enfermedades crónicas infecciosas como tuberculosis o VIH y que no estén recibiendo ningún tipo de tratamiento con medicamentos, además de contar con el permiso escrito de sus padres para participar en el estudio.

A todos ellos se les aplicó 0,1 ml de Leishmanina por vía intradérmica, una vez cada dos meses en tres oportunidades, 48 horas después de cada inoculación se midió el diámetro de la induración en el sitio de inoculación. Previo a la aplicación de la IDRM, se tomaron muestras de sangre para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*

Materiales

Jeringas de insulina y 5 cc (Nipro - corp. Japón). IDRM adquirido de IMTAvH - Universidad Peruana Cayetano Heredia. Test de CHAGAS STAT-PACK® (Chembio Diagnostic Systems). Test de ELISA Chagas III (Grupo Bios SA Santiago de Chile). ELISA para Leishmania (DRG-Germany). IFI para Leishmania *braziliensis* Gentilmente donada por Bio-Manquinhos FIOCRUZ – Brasil.

Prueba de IDRM

La prueba se la realizó siguiendo las instrucciones del manual de procedimientos técnicos de laboratorio para leishmaniasis¹⁶. Únicamente con fines para nuestro estudio, se consideró como reacción negativa la ausencia de induración a las 48 horas post inoculación, reacción indeterminada induraciones con diámetros comprendidos entre 1x1 mm y 4x4 mm y reacción positiva induraciones con diámetros iguales o mayores a 5x5 mm.

Serología para la enfermedad de Chagas

La detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* se realizó por las técnicas STAT-PACK y ELISA en ambos casos

Tabla 2. Número de casos positivos por serología para *T. cruzi* y *Leishmania sp* en individuos a los que se les aplicó la IDRM.

	Serología positiva <i>Leishmania/chagas</i>		Serología positiva <i>Leishmania/chagas</i>	
	SP	Isinuta	SP	Isinuta
Reacción IDRM negativa	2	8	14	16
Reacción IDRM indeterminada	3	2	0	0

IDRM: intradermoreacción de Montenegro; SP: Sebastián Pagador

siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró positiva para STAT-PACK una banda coloreada más el respectivo control, en ELISA se consideraron positivas las absorbancias superiores al valor del *cut off* +10% y negativas los valores inferiores al *cut off* -10%.

Serología para *Leishmania spp.*

La detección de anticuerpos anti-*leishmania spp* se realizó por ELISA e IFI, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para IFI se consideró positiva la presencia de fluorescencia verde brillante evidente de toda la superficie o de todo el contorno en al menos la mitad de los parásitos.

Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante tablas de frecuencia para indicar el número y/o porcentaje de jóvenes varones y mujeres que ingresaron al estudio, número de casos que presentaban serología positiva para *T. cruzi* o *Leishmania spp.*, y que recibieron las tres inoculaciones de IDRM. Se realizó el test de chi cuadrado para establecer la relación entre la serología positiva para *T. cruzi* y el resultado de la prueba de IDRM mediante el software SPSS 20®.

Resultados

El rango de edad de los participantes fue de 12 a 19 años, con una media de 19 años. En ambas regiones, Sebastián Pagador e Isinuta, la distribución de varones y mujeres fue casi similar en número al inicio del estudio pero no al final del mismo (tabla 1). Del total de jóvenes que iniciaron el estudio, 98 concluyeron en Sebastián Pagador y 79 en Isinuta. Los principales motivos de abandono fueron las vacaciones escolares de invierno que coincidieron con la segunda aplicación de la IDRM, razón por la cual no se pudo encontrar a los jóvenes en sus regiones y finalmente otro número variable de ellos decidieron voluntariamente no continuar con la última aplicación.

Entre los jóvenes de Isinuta, en 10 se encontró serología positiva para *T. cruzi*, de los cuales ocho mostraron también serología positiva para *Leishmania spp.* En Sebastián Pagador 14 jóvenes dieron serología positiva para *Leishmania spp* de los cuales dos presentaron también serología positiva para *T. cruzi* (tabla 2).

La aplicación de IDRM en tres momentos diferentes (Tabla 3) no produjo reacciones positivas, pero sí se presentaron reacciones indeterminadas de acuerdo a nuestra clasificación en el 3% (5 casos) del total de la población estudiada.

Tabla 3. Número de individuos que recibieron aplicaciones de IDRM en tres momentos diferentes.

	Sebastián Pagador	Isinuta
IDRM negativa		
1era inoculación	150	150
2da inoculación	115	109
3era inoculación	98	79
IDRM indeterminada		
1era inoculación	1	1
2da inoculación	0	0
3era inoculación	2	1

IDRM: intradermorreacción de Montenegro

Se realizó la prueba de Chi cuadrado con los resultados de serología para *T. cruzi* y la respuesta a la IDRM y no se encontró relación entre ambas $\chi^2 = 89,976$ por lo que asumimos que la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* no tienen influencia sobre la respuesta a la IDRM (tabla 4).

Discusión

Se evaluó posibles reacciones cruzadas entre la IDRM y la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* así como también la posible sensibilización a la leishmanina por inoculaciones repetidas de esta prueba.

Experiencia de otros autores reportaron una alta especificidad de la IDRM en pacientes con leishmaniasis y ausencia de reacciones cruzadas en pacientes con enfermedad de Chagas⁹. Nuestros hallazgos fueron similares, ya que no encontramos reacciones cruzadas aun entre los participantes que dieron resultados positivos a la serología para *T. cruzi*. Las reacciones de IDRM clasificadas como indeterminadas en el 3% de nuestra población de estudio (tabla 4), no son resultados de reacciones cruzadas con *T. cruzi*, por el contrario estas podrían ser el resultado de una sensibilización temporal al preservante químico utilizado en la preparación de la leishmanina¹⁷, ya que múltiples aplicaciones de IDRM no modulan la respuesta inmune para antígenos de Leishmania¹⁸. Los resultados positivos de serología para Leishmaniasis y enfermedad de Chagas encontrados en nuestro estudio, responden al hecho de que ambos agentes etiológicos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, razón por la

Tabla 4. Número de casos con resultados de serología para *T. cruzi* y resultados de IDRM.

Serología para <i>Trypanosoma cruzi</i>		
	Reacción positiva	Reacción negativa
IDRM negativa	10	162
IDRM indeterminada	5	0
Total	15	162

IDRM: intradermorreacción de Montenegro

cual comparten algunas proteínas antigénicas, lo que favorece las reacciones cruzadas entre ambos⁹.

La presencia de serología positiva para *T. cruzi* entre los residentes de la zona tropical de Isinuta, en nuestro criterio responde a la presencia de la enfermedad en todo el territorio, ya sea por transmisión congénita en áreas no endémicas⁶, ó por la intensa migración desde zonas endémicas para Chagas hacia la zona tropical, y por la presencia de gran diversidad de reservorios silvestres (marsupiales) para *Trypanosoma cruzi*¹⁹ que son habitualmente consumidos por los residentes en la zona, lo cual podría constituir otra posibilidad de infección por la vía oral²⁰.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la aplicación repetida de IDRM no genera sensibilización a la leishmanina así como también la ausencia de reacciones cruzadas con *T. cruzi*, por lo que consideramos que la IDRM puede ser utilizada en la vigilancia epidemiológica de leishmaniasis en áreas donde coexisten la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas.

Agradecimientos: los autores expresan sus agradecimientos a Bio-Manguinhos FIOCRUZ – Brasil por la gentil donación de un kit para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea por Inmunofluorescencia y al Prof. Françoise Noireau† por gestionar la donación del producto.

Fuentes de financiamiento: el presente trabajo fue financiado por el convenio Universidad Mayor de San Simón (UMSS) – Agencia Sueca de Cooperación para el Desarrollo Internacional (ASDI).

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés relacionados a este artículo.

Referencias bibliográficas

- Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; 14(5): 417-23.
- Ashford R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30(12): 1269-81.
- Rojas E, Parrado R, Delgado R, Reithinger R, García AL. Leishmaniasis in Chapare, Bolivia. Emerg Infect Dis 2009; 15(4): 678-80.
- Bermudez H, Rojas E, García L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. Ann Trop Med Parasitol 2006; 100(7): 591-600.
- Bolivia. Ministerio de Salud y Deportes. Anuario estadístico en Salud 2009; Ministerio de Salud y Deportes. 23ª Ed. La Paz, N° 192, 2010
- Briceño-León R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. Cad Saúde Pública 2009; 25 Suppl 1: S71-82.
- Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butron V, Uber-Busek S, Guerra HL, Araujo-Jorge TC, et al. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(5): 423-30.
- Albarracin-Veizaga H, Carvalho ME, Nascimento EMM, Rodrigues VLCC, Casanova C, Barata JMS. Chagas disease in an area of recent occupation in Cochabamba, Bolivia. Rev Saúde Pública 1999; 33(3): 230-6.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* Clin Vaccine Immunol 2007; 14(8): 1045-9.
- Apaza S., Monteza Y., Purisaca E, Delgado F; Evaluación de la especificidad de la leishmanina (prueba intradérmica de Montenegro) en pacientes con la enfermedad de Chagas; Ministerio de Salud – Perú, Instituto Nacional de Salud - Centro de Información y documentación Científica. 2005. Disponible en: <http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/informestecnicos/35.pdf>

11. Minaya G, Arroyo E, Vargas J, Gonzáles A. La prueba intradérmica de montenegro (IDR) en pacientes con enfermedad de chagas: observación preliminar. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2002; 19(3): 146-48
12. Furuya M, Mimori T, Gómez EAL, De Coronel VV, Kawabata M, Hashiguchi Y. Epidemiological survey of leishmaniasis using skin test and ELISA in Ecuador. *Jpn J Trop Med Hyg* 1989, 17: 331-8.
13. Schaefer KU, Kurtzhals JA, PA Kager, GS Gachihi, M Gramiccia, JM Kagai, JA Sherwood, Müller. Studies on the prevalence of leishmanin skin test in the Baringo District Rift Valley, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(1): 78-84.
14. Peters NC, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL. Vector transmission of leishmania abrogates vaccine-induced protective immunity. *PloS Pathog* 2009; 5(6):e1000484
15. Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaïem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI; Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(22):7845-50
16. Zubieta Durán MF, Torrico Rojas MC; Manual de normas y procedimientos técnicos de laboratorio (para Leishmaniasis); Ministerio de Salud y Deportes Bolivia, 2010-06-07 ISBN: 978-99954-50-13-7
17. Fagundes A, Marzochi MCA, Perez M, Schubach A, Ferreira A, Silva J P, Schubach T, Feldman-Marzochi KB; Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil; *Acta Tropica* 2007; 101(1): 25-30
18. Satti I, el Hassan A, Khalil el TA, Akuffo H., The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune response to Leishmania antigen in healthy volunteers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(5):565-7
19. Aguilar HM, Abad-Franch F, Pinto-Diaz JC, Veríssimo-Junqueira AC, Rodriguez-Coura J. Chagas disease in the amazons region; *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (Suppl 1): 31.
20. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991; 33(5): 351-7.