

INTRADERMO-REACCION EN LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN EL PERU

I. Elección de antígeno

GERMÁN BATTISTINI M. & ARÍSTIDES HERRER
*Departamento de Investigaciones Médicas del Instituto
Nacional de Higiene y Salud Pública*

En vista de la dificultad que entraña el diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria por los medios de laboratorio corrientemente usados (especialmente el parasitológico), adquiere especial importancia el método de la intradermo-reacción ideada por MONTENEGRO (1926). Se trata de una reacción sencilla cuyo fundamento reside en la sensibilidad específica, frente a la inyección intradérmica de un antígeno preparado a partir de cultivos de *Leishmania brasiliensis*, que adquiere el organismo al sufrir la leishmaniosis, sensibilidad que dura muchos años en la mayoría de los casos.

Esta reacción sería de suma utilidad en el Perú, principalmente porque las zonas endémicas, tanto de la uta como de la espundia, se encuentran alejadas de ciudades o lugares donde podría llevarse a cabo otros métodos de diagnóstico, circunstancia que ya la ha remarcado WEISS (1943). Animados por esta idea hemos realizado una serie de observaciones, primeramente con el objeto de obtener un antígeno de título y especificidad apreciables, cuyos pormenores ofrecemos en la presente nota, junto con las técnicas de preparación de otros tres antígenos ensayados. Los resultados obtenidos con el nuevo antígeno en algunos animales de laboratorio previamente inoculados o inmunizados con leishmanias vivas, en la nota II; y, los obtenidos en diversos enfermos, tanto de leishmaniosis como también de otras diversas dolencias, los ofrecemos en la nota III. Reservamos para una próxima ocasión los resultados que vamos obteniendo en varias localidades donde la uta es endémica.

* Estos estudios han sido realizados bajo la dirección del Profesor Telémaco Battistini, Director del Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.

MÉTODO

Cepas usadas. En la preparación de los antígenos que luego discutimos, empleamos cuatro cepas de *Leishmania brasiliensis*, aisladas de casos de uta. Una de ellas, la Ls-10, fué recientemente obtenida en la ciudad de Matucana, no teniendo más de 6 a 8 resiembras al preparar los antígenos; las otras tres cepas han sido aisladas hace seis años, habiéndose conservado hasta la actualidad sólo en cultivos.

Hemos empleado el medio N. N. N., tamponado con fosfato bisódico ($12 \text{ H}_2\text{O}$). Los cultivos se hacían en botellas rectangulares de una capacidad total de 150 cc., cerradas con tapones de jebe, siendo incubados a 28° C .

Antígenos. Con una mezcla de cultivos de las cuatro cepas de *L. brasiliensis* ya mencionadas, preparamos los siguientes antígenos: 1. el de SENEKJI (1941); 2. el de DA CUNHA - DIAS (1939) para desviación de complemento en leishmaniosis, usado por nosotros en la intradermo-reacción; 3. el de MONTENEGRO (1926); y 4. un antígeno preparado con técnica nuestra, al que denominamos "leishmanina". La preparación de cada uno de estos es como sigue :

1. *Antígeno de Senekji (1941).* Los cultivos se recogen con suero fisiológico y se centrifuga repetidas veces a fin de lavarlos. El residuo es resuspendido en suero fisiológico formolado al 0.3 % y conservado durante una noche a la temperatura del laboratorio. Nuevamente se centrifuga y el producto es resuspendido en suero fisiológico fenolado al 0.5 % estandarizándose a una concentración de 40 millones de microorganismos por centímetro cúbico. Esta suspensión final constituye el antígeno.

2. *Antígeno de Da Cunha - Dias (1939).* Los microorganismos recogidos con suero fisiológico son lavados por centrifugaciones repetidas, mezclándose luego el producto con 10 veces su volumen de acetona, que permanece así 1 a 2 días. En seguida se centrifuga y el residuo es desecado completamente a 37° C ., después de lo cual es triturado y pesado, agregándosele alcohol etílico absoluto en la proporción de 1 cc. por cada centígramo de polvo. Se coloca a la estufa a 37° C . durante 20 días, agitando continuamente. Esta mezcla alcohólica constituye el antígeno, que es de coloración bruna.

3. *Antígeno de Montenegro (1926).* Cultivos de leishmanias de 15 - 20 días de desarrollo, son recogidos con suero fisiológico y lavados

por centrifugaciones sucesivas. Al residuo del último lavado se agrega líquido de Coca (agua destilada : 100 cc.; cloruro de sodio : 0.5 grs.; bicarbonato de sodio : 0.4 grs., esterilizado por filtración), en cantidad suficiente para formar una suspensión bien turbia. Se deja en maceración a la temperatura ambiente durante 3 días, agitando el recipiente continuamente. Al cabo de este tiempo se centrifuga. El líquido limpiado de la superficie es el antígeno. Control en medio de agar corriente y N. N. N.

4. *Antígeno "leishmanina"*. En realidad este es una modificación del antígeno de MONTENEGRO, en la que se ha usado además, parte de la técnica de preparación del antígeno de DA CUNHA - DIAS, modificación que lo hace más sensible según nuestra experiencia, pudiéndose usar por consiguiente cantidades menores. Se prepara de la siguiente manera : los microorganismos recogidos con suero fisiológico a los 7 días de desarrollo, son pasados a través de gasa estéril a fin de eliminar las partículas del medio de cultivo. Después de lavados por centrifugaciones sucesivas, el producto de la centrifugación final es desecado al vacío durante 48 horas, en un desecador con ácido sulfúrico. Se tritura y pesa, resuspendiéndose el polvo en solución de Coca en la proporción de 1 cc. de la solución por cada centígramo de polvo. Se agrega un volumen de éter sulfúrico igual al de la mezcla y se cierra herméticamente el frasco continente. Colócase a la estufa de 37° C. durante 2 días, agitando continuamente, reemplazándose entonces el tapón de jebes por otro de algodón. La mezcla continúa a 37° C. hasta la evaporación de la columna de éter. Finalmente se centrifuga y se obtiene un sobrenadante límpido, de aspecto opalino, lo que constituye el antígeno. A partir de este producto se hace las diluciones convenientes, usando como diluyente el líquido de Coca.

Prueba de los antígenos. Para determinar la acción de cada uno de estos antígenos, usamos conejos inmunizados con leishmanias vivas según técnica que exponemos en la nota II. Los antígenos fueron inoculados tanto sin dilución como también diluidos al $\frac{1}{2.5}$, $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{10}$, intradérmicamente en el dorso de los conejos a la dosis de 0.1 cc.; simultáneamente se inyectó el líquido de Coca a manera de control.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

1. El *antígeno de Senekji*, dió, a las 24 horas reacciones caracterizadas por edema y eritema en el punto de inoculación, alcanzando en

el caso de la dosis de mayor concentración (antígeno sin diluir), dimensiones de 1.5 a 3 centímetros de diámetro, comenzando a decrecer a partir de este tiempo; a las 48 horas ya habían desaparecido. El animal de control (conejo no inmunizado) mostró reacciones semejantes.

2. El *antígeno de Da Cunha - Dias*, se mostró ineficaz en todas las dosis.

3. El *antígeno de Montenegro*, en el caso de la dosis más concentrada (antígeno sin dilución) ofreció a las 24 horas, edema y eritema que fluctuaron entre 1.5 y 3 centímetros de diámetro; con la dilución $\frac{1}{2.5}$ la extensión de las reacciones fluctuó entre 1 y 1.5 centímetros. A las 48 horas casi habían desaparecido. Con diluciones de $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{10}$ no se observó reacción alguna. El animal de control (conejo no inmunizado) se mostró negativo.

4. Con el *antígeno "leishmanina"*, de manera general, ya desde las 3 horas de su inoculación, se notaba edema y eritema, reacciones que se hacían mucho más manifiestas a las 6 horas. A las 24 horas, en el caso del antígeno sin dilución, las citadas reacciones alcanzaron un diámetro de 3 a 4 centímetros. Con el antígeno diluido las reacciones decrecían de intensidad proporcionalmente con la dilución. A partir de las 48 horas comenzaban a decrecer, desapareciendo a las 72 horas. El animal no inmunizado que sirvió de testigo o control, siempre se mostró negativo.

En un período de 5 meses hemos preparado tres lotes sucesivos de "leishmanina", según la técnica que hemos descrito. El primero de ellos fué empleado únicamente en animales, mientras que los dos últimos fueron usados en seres humanos. No hemos podido observar diferencia alguna entre uno y otro lote.

RESUMEN

Se ha preparado un nuevo antígeno al que los autores denominan "leishmanina", con intención de usarlo para la intradermo-reacción en la leishmaniosis tegumentaria del Perú. Comparado experimentalmente con los antígenos de SENEKJI (1941), de DA CUNHA - DIAS (1939) y el de MONTENEGRO (1926), resulta notablemente más sensible. Estas comparaciones han sido realizadas en conejos inmunizados con inyecciones sucesivas de cultivos de *Leishmania brasiliensis*, procedentes de casos de uta.

SUMMARY

A new antigen called by the authors "leishmanina" has been produced in order to use it in the intradermal skin test of cutaneous leishmaniasis. Experimentally the accuracy of "leishmanina" is best and far sensible than those antigens of SENEKJI (1941), DA CUNHA - DIAS (1939) and MONTENEGRO (1926). Immunization of rabbits through continuous inoculations with *L. brasiliensis* cultures isolated from cases of "uta", has been the material used in order to find the accuracy of "leishmanina".

REFERENCIAS

- J. MONTENEGRO, *Ann. da Fac. de Med.*, Sao Paulo, v. 1, p. 323, 1926.
P. WEISS, *Revista de Medicina Experimental*, Lima, v. 2, p. 209, 1943.
H. A. SENEKJI, *Am. Jour. Hyg.*, v. 24, Sec. C, p. 63, 1941.
A. DA CUNHA MARQUES y EMMANUEL DIAS, *Brasil-Médico*, v. 53, p. 89, 1939 (Resumen de : *Trop. Dis. Bull.*, v. 36, p. 53, 1939).