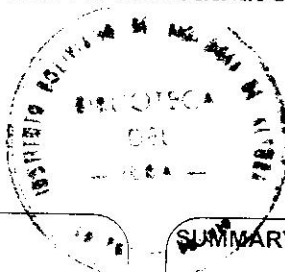


## OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE LEISHMANIA PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENO

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LEISHMANIA CLONES FOR ANTIGEN PRODUCTION

Celeste Rodriguez  
E-mail: lluna@ceibo.entelnet.bo



Celeste Rodriguez, Ph.D. \*  
Elfride Balanza, Lic. \*  
Edwin Holguin, MD. \*\*  
Washington Cuña, Ph.D. \*\*

### RESUMEN.-

#### Objetivos

Producción de leishmanina

#### Lugar

Instituto Boliviano de Biología de Altura, Facultad de Medicina, UMSA

#### Diseño

Experimental

#### Métodos

Una cepa nativa (MHOM/BO/89EQ) y una cepa de referencia de la OMS (MHOM/BR/75 2903) ambas correspondientes a *Leishmania braziliensis braziliensis*, fueron clonadas y cultivadas durante 7 días; la recolección de formas promastigotes se realizó en fase exponencial de crecimiento. Luego de fijación de parásitos el antígeno fué evaluado en un test de linfoproliferación con células de pacientes con leishmania cutánea. In vivo, se analizó en hamsters y ratones, el tamaño de la lesión, desarrollo de metástasis, toxicidad anormal y diámetro de induración.

#### Resultados

El diámetro de induración obtenido en hamsters fué de 8 mm, 7.5 mm en ratones con la leishmanina de la cepa nativa EQ, con la cepa de referencia 2903, en hamsters fue de 7.6 mm y en ratones 8.25 mm. En pacientes con leishmaniasis se ha obtenido 75.67% y 76.19% de positividad en pacientes con lesiones cutáneas y lesiones mucosas, respectivamente. La correlación con el diagnóstico parasitológico es de 97%.

**PALABRAS CLAVES:** Leishmanina, intradermoreacción, Montenegro, *Leishmania braziliensis*, diagnóstico.

### SUMMARY.-

#### Objectives

Production of leishmanin

#### Location

Intituto Boliviano de Biología de Altura, Faculty of Medicine, UMSA

#### Design

Experimental study

#### Methods

A native strain (MHOM/BO/89EQ) and a WHO reference strain (MHOM/BR/75 2903) both corresponding to *Leishmania braziliensis braziliensis*, were cloned and cultured during 7 days; promastigote forms were recovered in the exponential stage of growth. After fixation of parasites, the antigen was evaluated in a lymphoproliferation tests with cells from patients with cutaneous leishmaniasis. In vivo, the size of lesions, metastasis development, anormal toxicity, and induration diameter was analyzed in hamsters and mice.

#### KEY WORDS

Leishmanin, intradermoreaction, Montenegro, *Leishmania braziliensis*, diagnosis.

\* Instituto Boliviano de Biología de Altura  
\*\* Instituto Nacional de Laboratorios en Salud

## INTRODUCCION

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad endémica en Sud y Centro América en áreas tropicales y subtropicales con una gran variedad de formas clínicas que van desde lesiones localizadas benignas, que en ocasiones curan espontáneamente dando lugar a una protección contra la reinfección, hasta las formas diseminadas incurables. Igualmente, se observan lesiones faríngeas, laríngeas y de la mucosa nasal, destructivas en estados avanzados de la enfermedad, que pueden conducir a la mutilación facial, así como la leishmaniasis visceral potencialmente fatal, lo que se asocia al polimorfismo genético y la diversidad biológica del parásito (especies y subespecies)<sup>(1)</sup>. La enfermedad se desencadena por la inoculación de promastigotes de leishmania luego de la picadura del vector, un flebótomo del género *Lutzomyia*. Su impacto en Salud Pública en países endémicos es significativo debido al alto costo y la larga duración del tratamiento, además de los aspectos socio-económicos de la enfermedad.

La intradermorreacción de Montenegro ha sido aplicada a gran escala en el Nuevo Mundo, como diagnóstico diferencial de algunas dermatomycosis, y es un método eficaz para detectar lesiones de leishmaniasis, la capacidad de reacción específica de Montenegro permanece positiva luego de la curación de la enfermedad, posibilitando un diagnóstico retrospectivo en casi el 100% de los casos<sup>(2-3)</sup>.

## MATERIALES Y METODOS

**Producción de antígeno:** Se utilizaron parásitos de la cepa de referencia de la Organización Mundial de la Salud para *Leishmania braziliensis braziliensis* designada MHOM/BR/75 2903 y una cepa nativa aislada de paciente MHOM/BO/ 89 EQ, también caracterizada como *Leishmania braziliensis braziliensis* por isoenzimas. Formas promastigotes fueron clonadas tres veces mediante la técnica de dilución límite. Cepas parentales y clones fueron cultivados a una temperatura de 29°C en medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos durante 7 días, las formas promastigotes fueron recolectadas al final de la fase exponencial de crecimiento, mediante pasajes

seriados, centrifugadas a 1800 rpm, 10 min, 4(C) en una solución de fosfato salina y fijadas en solución salina fenolada. Todos los stocks fueron comparados bioquímica y biológicamente a fin de determinar su identidad y obtener un antígeno homogéneo<sup>(4)</sup>.

### Pruebas biológicas in vitro:

El antígeno fue utilizado en un test de linfoproliferación con células de pacientes con leishmaniasis cutánea incubadas en ausencia o presencia de antígeno a una concentración de 40 µg/ml. Los cultivos fueron mantenidos durante 5 días y pulsados con <sup>3</sup>H-Timidina durante las últimas 12 hs de cultivo. Las cuentas por minuto (cpm) se leyeron en un contador beta de scintilación. De esta manera se estableció la dosis de 4 µg de nitrógeno total, concordando con otros autores<sup>(5)</sup>.

El comportamiento de la cepa fue estudiado en términos de crecimiento en medio de cultivo.

Para el control de calidad de la producción se tomó en cuenta el número de parásitos, el pH del medio, la esterilidad de la preparación y la viabilidad de los parásitos.

### Pruebas biológicas in vivo:

En hamsters y ratones, se observó: a) el tiempo de desarrollo y el tamaño de la lesión, b) desarrollo de metástasis en controles con el mismo No. de parásitos viables y c) diámetro de induración para intradermo reacción de Montenegro, para ambas cepas.

Las dos preparaciones fueron validadas por el Instituto Pasteur de Teherán, Irán, en el servicio del Profesor Ali Mohammadian, laboratorio de referencia de la Organización Mundial de la Salud, de esta forma nuestro laboratorio ha obtenido el permiso de la OMS para la producción de este reactivo biológico en el país.

### Estadística:

La significación estadística de las diferencias entre promedios fue determinada mediante el test t de Student.

## RESULTADOS

TABLA 1

CONTROL DE CALIDAD Y EVALUACION DE PREPARACIONES DE LEISHMANINA CON LAS CEPAS EQ Y 2903			
No.	PRUEBA	RESULTADOS CEPA EQ	RESULTADOS CEPA 2903
1	Recuento	16 x 106 parásitos intactos	16 x 106 parásitos intactos
2	pH	7	7
3	Control de esterilidad	axénico	axénico
4	Viabilidad de parásitos	Ninguno viable	Ninguno viable
5	Evaluación en hamsters inmunizados	Diámetro de induración hamster 1 : 6mm 2 : 7mm 3 : 10mm 4 : Neg 5 : 9mm Promedio : 8mm	Diámetro de induración hamster 1 : 8mm 2 : 5mm 3 : 6mm 4 : 7mm 5 : 12mm Promedio : 7.6mm
6	Evaluación en ratones inmunizados	Diámetro de induración a : 8mm b : 7mm c : 6mm d : 9mm Promedio : 7.5m	Diámetro de induración a : 11mm b : 8mm c : 9mm d : 5mm Promedio : 8.25mm

TABLA 2. Quality Control and Evaluation of Two Preparations of Leishmanin prepared in Bolivia

No.	TEST	RESULTS OF LEISHMANIN EQ	RESULTS OF LEISHMANIN 2903
1	Count	16.2 x 10 <sup>6</sup> /ml intact parasites	16.2 x 10 <sup>6</sup> /ml intact parasites
2	pH	6.2	6.1
3	Sterility test	Sterile	Sterile
4	Abnormal toxicity test	All mice and guinea pigs were survived and healthy after one week	All mice and guinea pigs were survived and healthy after one week
5	Viability tests (direct, culture, and inoculation to BALB/c mice	No viable parasite found	No viable parasite found
6	In vitro pyrogen test (COATEST GEL-LAL)	Undiluted Ag: Positive Diluted (1/20): Positive	Undiluted Ag: Positive Diluted (1/20): Negative
7	Evaluation in three immunized guinea pigs	Diameter of induration: Animal 1: 6 mm Animal 2: 10 mm Animal 3: 5 mm	Diameter of induration: Animal 1: 13.5 mm Animal 2: 8 mm Animal 3: Negative
8	Evaluation in recovered individuals from L. major infection	Total No. of cases: 25 Total No. of cases: 16 No. of positive cases: 25 Mean induration: 17.92±5.12 mm	No. of positive cases: 16 Mean induration: 17.78±4.43mm

TABLA 3. Test de Linfoproliferación <sup>a</sup>

MATERIAL PROBADO	CPM X 10 <sup>3</sup>	
	EXP. 1	EXP. 2
Medio solo	0.8 ± 0.15	0.7 ± 0.1
Leishmanina cepa EQ	9.0 ± 1.2b	8.2 ± 0.9b
Leishmanina cepa 2903	11.0 ± 2.6b	10.0 ± 2.0b

<sup>a</sup> Células mononucleares periféricas de 24 pacientes con leishmaniasis fueron incubadas con medio solamente o medio conteniendo antígeno. Los experimentos 1 y 2 fueron realizados separadamente.

<sup>b</sup> Estos incrementos con relación al control fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

TABLA 4. Comparación entre el examen Parasitológico y el Test de Montenegro (DIR) en pacientes con Leishmaniasis <sup>a</sup>

	LESIONES CUTÁNEAS		LESIONES MUCOSAS	
	No.	%	No.	%
Número de casos	39		19	
Resultados negativos	10	26	4	21
Frotis positivo	19	66	11	73
IDR positivo	28	97	14	93

<sup>a</sup> Resultados reportados por el Dr. Edwin Holguin, Dpto. Parasitología, INLASA

## DISCUSION

La intradermoreacción de Montenegro (IDR) es usada como una ayuda para el diagnóstico en investigaciones epidemiológicas así como en el seguimiento de programas de vacunación por su especificidad, alta sensibilidad, fácil ejecución e interpretación. La misma puede ser realizada en áreas rurales y por personal paramédico. Reportamos aquí la primera preparación de leishmanina en Bolivia. Una primera evaluación de este reactivo biológico se realizó en animales de laboratorio; los resultados se muestran en la Tabla 1. Los mismos concuerdan con la evaluación realizada en el laboratorio de referencia de la Organización Mundial de la Salud del Prof. Ali Mohammadian presentados en la Tabla 2. Cabe destacar, sin embargo, una discordancia en el pH reportado por este laboratorio debido, probablemente, al volumen de muestra reducido para la realización de las ocho pruebas reportadas.

Igualmente, se realizaron estudios de proliferación linfoblástica con células de pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucocutánea a fin de evaluar la capacidad de nuestra preparación para estimular una respuesta de tipo celular (Tabla 3). Este antígeno estimula la multiplicación de linfocitos en forma significativa en comparación con los controles.

Una vez validada la leishmanina, se procedió a su aplicación a pacientes en el país. Los datos suministrados por el Dr. Edwin Holguín se muestran en la Tabla 4. Estos resultados revelan una alta eficacia, tanto en pacientes con lesiones cutáneas (97%) como en pacientes con lesiones mucosas (93%). El diámetro de induración es de 18 mm  $\pm$  3 lo cual indica una intensa respuesta inmune a mediación celular y son similares a los resultados obtenidos en pacientes con Leishmania mayor mostrados en la Tabla 2.

Estudios anteriores con preparaciones de leishmanina provenientes de Perú y Brasil donde se analizaron 146 pacientes de Bolivia y Perú reportan una IDR positiva en 82.1% de los casos cutáneos e IDR positiva en 75% en pacientes con leishmaniasis mucosa (7, 8, 9). Igualmente, en Bahía, Brasil, 93% de las lesiones cutáneas estuvieron asociadas con reacciones positivas al test de Montenegro, algunos pacientes con

lesiones de menos de un mes fueron negativos a la prueba, al igual que los pacientes con leishmaniasis mucosa (3-13). En Colombia, se reporta una comparación entre 7 métodos diagnósticos en las localidades de Cali y Tumaco con resultados positivos para IDR de 75% sobre 165 casos cutáneos y 12 casos mucosos estudiados (14).

Estos resultados nos permiten concluir que nuestra preparación de leishmanina presenta una alta sensibilidad para la detección de casos de leishmaniasis cutánea y mucosa y será de gran utilidad en zonas endémicas de nuestro territorio donde no existe mayor infraestructura de laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Gabriel Grimaldi Jr. (1995) Meetings on Vaccine Studies towards the Control of Leishmaniasis Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Vol. 90(4): 553-556
2. W. Mayrink, M. N. Melo, C. A. da Costa (1976) Intradermoreacao de Montenegro na Leishmaniose Tegumentaria Americana Apos Terapeutica Antimonial. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 18(3): 182-185
3. Cesar C. Cuba, Elmer A Llanos Cuentas, Air C. Barreto et al. (1984) Human Mucocutaneous Leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia, Brazil an area of Leishmania braziliensis braziliensis transmission. I. Laboratory diagnosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 17: 161-167
4. Carlos Alberto Da Costa, Vicente de Paulo Coelho, Peixoto de Toledo et al. (1996) Montenegro skin test- Evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro Vol 91 : 193-194
5. Melo M et al (1977) Padronizacao do antígeno de Montenegro. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 19: 461-464
6. Nascimento MD, Alcantara-Neves NM, Muniz ME (1993) Induction and modulation

- of the immune response to Leishmania by Montenegro's Skin Test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:91-3
7. Laure Dimier- David, Christophe David, Pierre Ravise et al. (1991) Parasitological Diagnosis of mucocutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Bolivia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24: 231-224
8. L. Dimier-David, C. David, M. Muñoz et al. (1993) Particularites Epidemiologiques, Cliniques et Biologiques de la Leishmaniose Cutaneo-Muqueuse en Bolivie D'apres un Echantillon de 221 Malades. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 86: 106-111
9. David C, L. Dimier-David, F. Vargas (1993) Fifteen Years of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 7-9
10. H. Bermúdez, F. Torrico, E. Rojas (1993) Leishmaniasis in the Lowlands of Bolivia, Prevalence of the Disease in Two Groups of Localities with Different Settlement Ages in Carrasco Tropical, Cochabamba. *Archs. Inst. Pasteur Tunis* 70: 443-453
11. Eddy Martinez, Francois le Pont, Miguel Torrez (1999) *Lutzomia Nuñez Tovar* Anglesi as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean leishmaniasis focus of Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (5) 846-849
12. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ (1992) Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:735-738
13. Souza WJ, Sabroza PC, Santos CS (1992) Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop* 52: 111-119.
14. Weigle KA, de Dávalos M, Heredia P (1987). Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:489-496