

## COMPARACION DE CINCO METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA

Dres. Olga Zerpa\*, Rafael Borges\*, Nahir Loyo\*, Wilmer Galindo\*, Doris Belisario\*, Noris Rodríguez\*, Alexandra Sosa\*, Jacinto Convit\*

Olga Zerpa, Rafael Borges, Nahir Loyo, Wilmer Galindo, Doris Belisario, Noris Rodríguez, Alexandra Sosa, Jacinto Convit. **Comparacion de cinco métodos para el diagnostico de Leishmaniasis Cutánea.** Dermat Venez 2002; 40:106-110

### RESUMEN

La *Leishmaniasis* cutánea es producida por parásitos del género *Leishmania*, el diagnóstico definitivo se fundamenta en la observación del agente en frotis, cortes histológicos, cultivos, y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La demostración del parásito es importante para diferenciar la *leishmaniasis* de otras entidades clínicas.

El objetivo de este trabajo fue comparar 5 métodos utilizados para el diagnóstico de *Leishmaniasis* y evaluar su sensibilidad.

Se evaluaron 42 pacientes de la consulta de *Leishmaniasis* del Instituto de Biomedicina, a los que se les hizo frotis por escarificado y biopsia de piel para estudio histológico, frotis por aposición, cultivo y PCR.

El porcentaje de positividad para cada una de las pruebas fue de: 88% para el frotis por escarificado; 71,4% para la PCR; 59,5% tanto en el frotis por aposición como la histopatología y 52,4% para el cultivo.

El frotis por escarificado resultó ser la prueba más sensible, con una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la concordancia entre el escarificado y los otros métodos. El escarificado, por ser un método sencillo es ampliamente recomendado para los programas de control de esta enfermedad en áreas endémicas.

**Palabras claves:** Escarificación. Diagnóstico. Leishmaniasis Cutánea.

**Comparison of Five Methods for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** Dermat Venez 2002; 40:106-110

### ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is produced by parasites of the genus *Leishmania*, the final diagnosis is based on direct identification on smears, histological samples, culture and PCR. Parasite demonstration is crucial to differentiate leishmaniasis from other clinical entities.

The aim of this study was to compare 5 standard methods for the diagnosis of leishmaniasis and evaluate their sensitivity.

Forty two patients from the Leishmaniasis section of the Instituto de Biomedicina were evaluated. Scarification smear, skin biopsy, apposition smear, parasite culture and PCR were performed.

The positive percentage for each of tests was 88.0% for the scarification, 71.4% for PCR, 59.5% for apposition smear and histopathology and 52.4% for parasite culture.

The scarification smear was the most sensitive test: the results were significantly different ( $p < 0.05$ ) from the other methods. The former is a simple method and is highly recommended for the control programs of this illness in endemic areas.

**Key words:** Cutaneous Leishmaniasis. Diagnosis. Scarification Smear.

### INTRODUCCION

La *Leishmaniasis* cutánea permanece como una de las enfermedades parasitarias más frecuentes a nivel mun-

dial, con una prevalencia de 12 a 14 millones de pacientes y una incidencia de 300. 000 casos nuevos por año; en Venezuela se registran casos en casi todo el territorio nacional desde el año 1958, con una tasa de incidencia para el año 2000 de 11,2 casos por 100.000 habitantes<sup>1,2</sup>

\* Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 4043, Caracas 1010-A

Se ha demostrado que las especies del parásito más comúnmente implicadas en la producción de *leishmaniasis* en Venezuela son *L. braziliensis* y *L. mexicana*, siendo la forma clínica más frecuente la *Leishmaniasis* Cutánea Localizada (LCL) con 98,3% de los casos, seguida por la *Leishmaniasis* Cutánea Mucosa (LCM) con 1.1%, la *Leishmaniasis* Cutánea Intermedia (LCI) con 0,4% y *Leishmaniasis* Cutánea Difusa (LCD) con 0,1 %<sup>2,3</sup>.

El diagnóstico definitivo de *Leishmaniasis* se fundamenta en la demostración del agente etiológico, mediante la observación del parásito en frotis obtenidos de lesiones, estudio histopatológico, cultivos, inoculación en animales de experimentación y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)<sup>4,5,6</sup>

En los casos donde no es posible demostrar la presencia del parásito, el diagnóstico debe establecerse sobre la base de criterios clínicos, epidemiológicos, inmunológicos e histopatológicos, así se evalúa la procedencia del paciente de áreas endémicas, la lesión cutánea característica, la leishmanina positiva y la presencia de granuloma por agente vivo en reportes histológicos. Otros exámenes como la detección de anticuerpos por técnicas de ELISA o de inmunofluorescencia proporcionan datos importantes pero sólo pueden realizarse en centros especializados<sup>4,7,8,9</sup>.

La confirmación parasitológica directa es importante para diferenciar la *leishmaniasis* de otras entidades clínicas como esporotricosis, úlceras crónicas, lepra y sarcoidosis, entre otras.

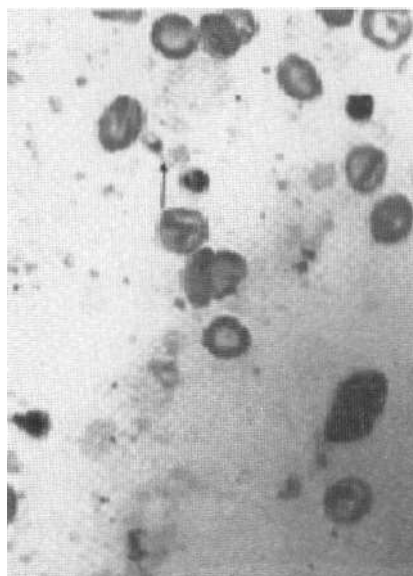
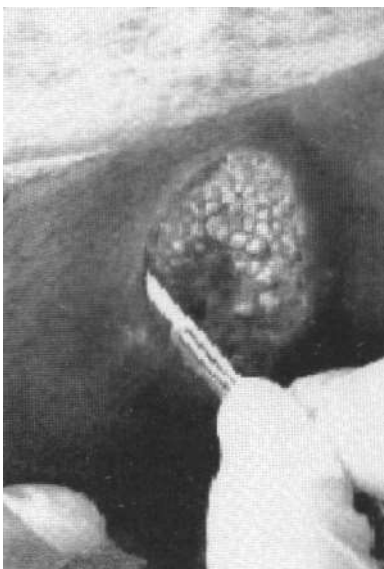
Se han publicado diferentes estudios evaluando la especificidad y sensibilidad de diferentes técnicas y aunque estos demuestran resultados muchas veces contrarios, el examen microscópico directo de frotis obtenidos de lesiones continúa siendo el método más práctico para el diagnóstico directo debido a su bajo costo, facilidad de realización en cualquier medio y rapidez en la obtención de los resultados.

La presencia de amastigotes en las lesiones varía de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad y a la forma clínica, observándose mayor cantidad de parásitos en las formas difusas y menos en las formas intermedias y localizadas. Generalmente en lesiones recientes de *Leishmaniasis* cutánea localizada (LCD) se observan mayor número de parásitos, por lo que es más fácil detección en frotis, mientras que en lesiones de evolución crónica se hace más difícil el hallazgo de los mismos.

## MATERIALES Y METODOS

### Pacientes

Se evaluaron 42 pacientes con lesiones sospechosas de *Leishmaniasis* cutánea localizada que acudieron a la consulta de *Leishmaniasis* del Instituto de Biomedicina, entre Enero a Noviembre de 2001, a los cuales se realizó historia clínica detallada que incluía: datos epidemiológicos, examen físico, descripción clínica de las lesiones cutáneas.



### Procedimientos diagnósticos

Previo limpieza de la lesión con solución jabonosa se tomó muestra escarificando el borde interno de la misma con un bisturí NY] 5, se realizó un extendido en una lámina portaobjeto ya identificada con el nombre del paciente (Figura 1).

Fig. 1. (a) Toma de frotis por escarificado. (b) Amastigote en frotis por escarificado. Tinción por Giemsa.

La biopsia fue tomada del borde infiltrado de la lesión para estudio histopatológico, frotis por aposición, cultivos sembrados en medio base agar sangre y PCR. Los frotis fueron coloreados con Giemsa y el estudio histopatológico con hematoxilina-eosina. Para la PCR la biopsia fue colocada en un tubo ependorff, el cual contenía 50ul de buffer TE (10 mM tris PH 8, 10 mM EDTA) y se calentó a 56YC durante 1 hora en presencia de 5mg/ul de proteinasa K. Después de calentar, el ADN se obtuvo por extracción con una mezcla de fenol/cloroformo. Para la PCR, se utilizaron 5 ul del ADN extraído en una mezcla de reacción que contenía 200 ng de cada primer; 5u1 2mM dNTP; 2,5 ul de buffer IOx (500mM KCL, 100 mM Tris-HCL, ph 8, 0,1% gelatina, 2mM MgC1<sub>2</sub>); 2,5 U de Taq polimerasa y 10 ul de agua.

La mezcla de reacción fue sometida a 35 ciclos de amplificación en un termociclador (Perkin Elmer). Cada ciclo consiste de 1 minuto a 95YC para denaturar el ADN, 1 minuto a 60YC para alinear los primer y un minuto a 72YC para la extensión del fragmento específico de ADN. El producto obtenido es visualizado en un gel de agarosa al 1 % en buffer TBE (90mM Tris, 89mM ácido bórico, 2,5, M EDTA, pH 8,3)<sup>3</sup>.

### Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se introdujeron en una base de datos Excel y se utilizó el test de *Mc Nemar* para evaluar la concordancia de los métodos diagnósticos.

### RESULTADOS

De los 42 pacientes incluidos en el estudio a 38 (90%) se les confirmó parasitológicamente el diagnóstico de leishmaniasis cutánea localizada por uno o más métodos. La lesión clínica en todos los pacientes fue una o más úlceras con bordes infiltrados.

El porcentaje de positividad (visualización del parásito) para cada una de las pruebas fue de: 88% para el frotis por escarificado, 71,4% para la PCR, 59,5% tanto en el frotis por aposición como la histopatología y 52,4% para el cultivo (Tabla 1).

En 4 (9,5%) pacientes no fue demostrada la presencia del parásito por ninguno de los métodos y el diagnóstico de leishmaniasis fue establecido por clínica, *Leishmanina*

**Tabla 1. Resultados Comparativos entre cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea. Instituto de Biomedicina. Caracas 2001**

	Cultivo		Escarificado		Aposición		Histología		PCR	
	NY	%	NY	%	NY	%	NY	%	NY	%
Positivos	22	52,4	37	88	25	59,5	25	59,5	30	71,4
Negativos	20	47,6	5	12	17	40,5	17	40,5	12	28,6
Total	42	100	42	100	42	100	42	100	42	100

positiva y presencia de un granuloma por agente vivo en el estudio histológico. La detección de *Leishmania* se hizo por un solo método en 3 (7,1 %) pacientes, por dos métodos en 5 pacientes (11,9%), por tres métodos en 5 (11,9%), por 4 métodos en 14 (33,3%) y por los cinco métodos en 11 (26,2%) de los casos. El 83,3% de los pacientes fue positivo al menos por dos métodos.

De los 37 pacientes positivos por frotis por escarificado 35 fueron positivos por más de un método y dos sólo por escarificado.

De los 30 casos positivos por PCR, el 97% correspondió a *Leishmania braziliensis* y el 3% a *Leishmania mexicana*.

El frotis por escarificado fue el método más sensible para el diagnóstico directo por lo que fue utilizado para comparar las otras pruebas.

El segundo método en sensibilidad fue la PCR, seguido por la histopatología y el frotis por aposición y el cultivo, que fallaron en la detección de casos que resultaron positivos por al menos otro de los métodos. Comparando con el frotis por escarificado, la mayor concordancia fue para la PCR, seguida por el frotis por aposición, la histopatología y el cultivo (Tablas II y III).

Estos datos muestran una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del frotis por escarificado respecto a los demás métodos diagnósticos.

La mediana del tiempo de evolución de las lesiones de Leishmaniasis de los pacientes incluidos en el estudio fue de 2 meses y el promedio fue de 3,23 meses con una desviación estándar de 7,26, con variaciones entre dos semanas a cuatro meses.

Al analizar la positividad en muestras obtenidas de frotis por escarificado, se observó que ésta es mayor cuando la

**Tabla II. Comparación de diferentes métodos diagnósticos en pacientes con Leishmaniasis Cutánea de acuerdo a positividad y negatividad. Instituto de Biomedicina. Caracas 2001**

Método	Positividad			Negatividad		
	Total	Negat.	% Discordancia	Total	Posit.	Discordancia
Escarificado	37	2	5,4	5	1	20,0
Histología	25	1	4,0	17	13	76,5
Aposición	25	0	0	17	13	76,5
Cultivo	25	1	4,0	17	13	76,5
PCR	30	0	0	12	8	66,7

\* Negativos por todos los otros métodos diagnósticos: Posible error de la prueba

\*\* Positivos por otro método diagnóstico: Posible error de la prueba.

**Tabla III. Comparación de la concordancia de los métodos diagnósticos de Leishmaniasis cutánea comparados con el frotis por escarificado. Instituto de Biomedicina, Caracas 2001**

	Cultivo <sup>1</sup>		Aposición <sup>2</sup>		Histología <sup>3</sup>		PCR <sup>4</sup>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Escarificado								
+	21	16	25	12	24	13	30	7
-	0	5	0	5	1	4	0	5

1 : Mc Nemar: 14 p =0,00018 Sensibilidad: 56.8 (\*) Especificidad: 100.0(\*)

2: Mc Nemar: 11 p =0,00091 Sensibilidad: 67.6 (\*) Especificidad: 100.0(\*)

3: Mc Nemar: 9,3p=0,0023 Sensibilidad: 64.9 (\*) Especificidad: 80.0(\*)

4: Mc Nemar: 6 p =0,0143 Sensibilidad: 81.1 (\*) Especificidad: 100.0 (\*)

\* Comparado al escarificado

lesión tiene menos de tres meses de evolución (94%) y disminuye notablemente después de los cuatro meses (57%) (Tabla IV).

## DISCUSION

Las úlceras representan más del 90% de las manifestaciones clínicas de *leishmaniasis* cutánea, sin embargo, en nuestro medio existe una alta prevalencia de infecciones microbianas y/o micóticas que pueden simular las manifestaciones clínicas de la infección por parásitos de genero *Leishmania*.

En este estudio se evaluaron distintos métodos de diagnóstico directo para *leishmaniasis*: frotis por

**Tabla IV. Comparación entre tiempo de evolución y sensibilidad del frotis por escarificado. Instituto de Biomedicina, Caracas 2001**

NYde Meses	Escarificado	
	Positivo	Negativo
Menos de 3	3	2
4 y más	4	3
Total	37	5

escarificado, frotis por aposición, PCR, cultivo e histopatología. Nuestros resultados evidencian que el frotis por escarificado es el método de diagnóstico directo más sensible para *leishmaniasis* cutánea localizada, con una mayor positividad respecto a los otros métodos. Los rangos de sensibilidad reportados hasta ahora para detección de *Leishmanias* en frotis oscila entre 32,7% y 90,4%<sup>4</sup>, con incrementos en la misma al aumentar el número de muestras estudiadas por lesión de 1 hasta 4; y cuando el frotis es tomado del centro de la lesión tal como fue demostrado por los trabajos de Ramírez y colaboradores que observaron que la sensibilidad (90,4%) del frotis por escarificado es mayor si se toma del centro de la lesión que del borde de la misma (78,3%), sin embargo en nuestro estudio, la positividad del frotis por escarificado tomado del borde fue mayor que lo reportado en otras series<sup>14,15</sup>

En los pacientes con LCL la resistencia al parásito está asociada al desarrollo de una respuesta de inmunidad celular específica. La densidad de linfocitos T en el granuloma de LCL indican que mecanismos efectores, tales como activación macrofágica y lisis de células infectadas, están asociados con eliminación de parásitos y control de la enfermedad. Una vez que el parásito es eliminado, o cuando no es reconocido por el sistema inmunitario del hospedador gracias a sus mecanismos de evasión, las señales accesorias epidérmicas disminuyen, proceso que induce la cura de la alteración inmunológica causante de la lesión cutánea. Cuando estos mecanismos se cronifican, se encuentran muy escasos parásitos en las lesiones lo que dificulta su visualización por métodos directos

El PCR resultó ser el segundo método en sensibilidad (71.4%) para demostrar la presencia de *Leishmania*. En esto coincidimos con otros estudios. A pesar que este método es altamente sensible y específico (ya que nos permite identificar directamente la especie del parásito), requiere sin embargo de extremas medidas para el transporte, almacenamiento y procesamiento de la muestra, ya que el

ADN del parásito puede desnaturalizarse y dar falsos negativos<sup>6,7</sup>

El frotis por aposición no resultó ser un método altamente sensible y esto es quizás debido al manejo de muestra durante el proceso de aposición hecho que ha sido reportado en otras series.

Es bien sabida la sensibilidad limitada de la histopatología en la identificación de las *Leishmanias*, debido a la distorsión de la morfología de los amastigotes durante el proceso de fijación de las muestras con formol. Los hallazgos histológicos en esta patología corresponden con la formación de un granuloma indistinguible del que causan otros agentes vivos<sup>4</sup>.

La contaminación de los cultivos obtenidos de biopsias es un problema frecuente para el crecimiento del parásito, debido a sobre infección bacteriana de la lesión y a la flora normal de la piel; sin embargo algunos trabajos como el de Navin y col. demuestran que la sensibilidad del cultivo aumenta cuando éste es realizado utilizando una aspiración con aguja del borde de la lesión, este procedimiento parece disminuir notablemente la contaminación secundaria de los cultivos<sup>11,14</sup>. En nuestro estudio los falsos negativos fueron elevados y no se reportó una contaminación importante de los mismos.

Todos estos métodos ameritan personal capacitado en reconocimiento e identificación del parásito. El frotis por escarificado es la técnica más sencilla, que puede ser realizada en cualquier medio y no necesita de complejas infraestructuras para efectuarlo.

## BIBLIOGRAFIA

- Desjeux Philippe MD. "*Leishmaniasis* Public Health Aspects and Control". (*Leishmaniasis, Aspectos de salud pública y control*) Clinics in Dermatology. 1996;14:417-423.
- Estadísticas del Departamento de Informática del Instituto de Biomedicina.
- Rodríguez N; Guzmán B; Rodas A; et al. "Diagnosis of Cutaneous *Leishmaniasis* and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization" (Diagnóstico de *Leishmaniasis* cutánea, Discriminación de especies de parásitos por PCR e hibridación). Journal of Clinical Microbiology 1994;32:2246-2252.
- Weigle KA; De Davalos M; Heredia P; et al. "Diagnosis of Cutaneous and Mucocutaneous *Leishmaniasis* in Colombia: A Comparison of Seven Methods" (Diagnóstico de *leishmaniasis* cutánea en Colombia: Una comparación de siete métodos). Am J Trop Med. Hyg. 1987;36(3):489-496.
- Reed SG. "Diagnosis of *Leishmaniasis*" (Diagnóstico de *Leishmaniasis*). Clinics in Dermatology 1996;14:471-478.
- Furtado T. Criterios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. (Criterios para el diagnóstico de *Leishmaniasis* tegumentaria americana) An Bras Dermatol. 1980;55:81-86.
- Cuba CA; Marsden P; Barreto AC, et al. "Diagnóstico Parasitológico e Inmunológico de *Leishmaniasis* Tegumentaria Americana" (Diagnóstico parasitológico e inmunológico *Leishmaniasis* Tegumentaria Americana) Bol. Of Sanit Panam 1980;89:195-206.
- López M; Inga R; Cangalaya M; et al. "Diagnosis of Leishmanina Using The Polymerase Chain Reaction: A Simplified Procedure for Field Work" (Diagnóstico de *leishmaniasis* usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa: Un procedimiento simplificado para el trabajo de campo) Am J Trop Med. Hyg. 1993;49:34-42.
- Bray RS and Lainson R. "The Immunology and Serology of *Leishmaniasis* the Fluorescent Antibody Staining Technique". (Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene). 1965;59:535-544.
- Lynch NR, Malavé C, Infante RB et al. In situ detection of amastigotes in American cutaneous *leishmaniasis*, using monoclonal antibodies. (Detección de amastigotes *in situ* en *leishmaniasis* cutánea americana usando anticuerpos monoclonales). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1986;80:6-9.
- Al-Jitawi SA, Farraj SE, Ramahi SA. Conventional scraping versus fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous *leishmaniasis*. (Escarificado convencional vs citología por aspirado con aguja fina en el diagnóstico de *Leishmaniasis* cutánea) Acta Cytol 1995;39:82-84.
- World Health Organization. Report of a who Expert Committee. Control of *Leishmaniasis*. Technical report series N° 793, 1990. pp. 21-23, 48-49, 140.
- Zeledón R, Ponce C. Parasitological and immunological diagnosis of cutaneous *Leishmaniasis* in the New World. (Diagnóstico parasitológico e inmunológico de *leishmaniasis* cutánea en el Nuevo Mundo). Proceedings of the 3'd International Congress on Parasitology. Munich 1974;1:239-240.
- Navin T, Arana F, de Mérida A, et al. Cutaneous *Leishmaniasis* in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. Am J Trop Med Hyg 1990;42:36-42.
- Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, et al. Diagnosis of cutaneous *leishmaniasis* in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. (Diagnóstico de *leishmaniasis* en Colombia: el sitio de toma de muestra en la lesión influye en la sensibilidad del diagnóstico parasitológico). J Clin Microbioj. 2000;38:3768-3773.
- Convit J; Ulrich M; Fernández CT; et al. "The Clinical and Immunological Spectrum of American Cutaneous *Leishmaniasis*". (Espectro clínico e inmunológico de la *leishmaniasis* cutánea Americana). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1993;87:444-448.
- Castés M y Tapia FJ. "Inmunopatología de la *Leishmaniasis* Tegumentaria Americana". Acta Científica Venezolana. 1998;49:4256.
- Tapia FJ; Cáceres-Dittmar G; Sánchez MA; et al "Adhesion Molecules in Lesions of American Cutaneous *Leishmaniasis*". (Moléculas de adhesión en lesiones de *leishmaniasis* cutánea americana). Exp. Dermatol 1994;3:17-22.
- Ulrich M. "La Respuesta Humoral en *Leishmaniasis* Americana". Dermatología Venezolana .1993, Vol 31, Supl No 2:31-33.