

DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA AMERICANA

María Eugenia Pinardi, B.S.*
Lic. Miguelángel Barrios**

INTRODUCCION

La leishmaniasis tegumentaria americana, es una enfermedad producida por parásitos del género **Leishmania** los cuales son transmitidos a través de la picadura de un insecto vector del género **Lutzomyia**, que afecta la piel y en algunos casos produce compromiso mucoso afectando las cavidades oro y naso faríngeas.

La Leishmaniasis es una enfermedad que clínicamente puede ser confundida con otras patologías tales como tuberculosis cutánea, cromomicosis, micosis, esporotricosis, sarcoidosis, cáncer de la piel, etc., por lo cual se hace necesario la identificación parasitológica del agente causal (diagnóstico parasitológico) antes de poder instaurar un tratamiento adecuado.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la leishmaniasis está basado en cuatro criterios fundamentales: clínico, epidemiológico, inmunológico y parasitológico.

* Coordinador Sección de Leprología.

** Investigador Asociado.

tológico. Los primeros tres dan una sospecha diagnóstica, el último representa el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

Diagnóstico Clínico:

La forma más común de la leishmaniasis cutánea es la úlcera; sin embargo, el espectro de una úlcera puede ser muy amplio. Las úlceras tienen características muy importantes que nos sirven como referencias para llegar a un diagnóstico clínico. Entre las principales podemos mencionar las siguientes: la forma es usualmente redondeada, la superficie es granulosa, secretante y recubierta por costras. Los bordes característicamente son elevados e indurados y lo que es más importante, de un color eritematovioláceo. Aunque las úlceras son la forma más común de la leishmaniasis cutánea, también se han observado formas menos frecuentes de infección como crecimientos verrugosos y nodulares, característicos de leishmaniasis cutánea intermedia y difusa respectivamente.

La principal complicación de las lesiones uicerativas es la infección secundaria, la cual al ser moderada o severa puede llegar a cambiar el aspecto de la úlcera y ocasionar la

formación de costras purulentas y la aparición de fenómenos inflamatorios más o menos importantes como induración, dolor o hipertermia de las áreas vecinas con compromiso de los ganglios linfáticos regionales. De las diversas condiciones dermatológicas que pueden confundirse con la leishmaniasis cutánea, la que comúnmente induce mayor error diagnóstico es la infección por esporotricosis. Tanto la leishmaniasis como la esporotricosis muestran úlceras de crecimiento lento que no responden a los antibióticos comunes y ambas pueden asociarse a nódulos subcutáneos que representan una diseminación linfática de la infección. Adicionalmente existen otras condiciones que, aunque menos frecuentes, pueden llegar a confundirse con la leishmaniasis cutánea, tal es el caso del micetoma, la tuberculosis cutánea en su forma verrugosa y la cromomicosis.

Diagnóstico Epidemiológico:

A través del criterio epidemiológico, se establece una relación del paciente con su permanencia en áreas de conocida endemicidad. Se evalúan familiares con cicatrices o lesiones sospechosas y animales extra o intra domiciliarios que

presenten igualmente lesiones sospechosas. De esta forma se construye un antecedente de gran ayuda para la evaluación de casos de leishmaniasis.

Diagnóstico Inmunológico:

La respuesta inmune a la leishmaniasis cutánea, está caracterizada por tres parámetros:

- 1.- Inducción de una respuesta inmune celular detectable por métodos in vivo e in vitro
- 2.- Bajos niveles séricos de anticuerpos anti **Leishmania**
- 3.- Generación de inmunidad sólida y duradera después de curación espontánea de la leishmaniasis.

La inoculación por vía intradérmica en el antebrazo, de una suspensión de promastigotes de **Leishmania** muertos por calor en una concentración de $6,25 \times 10^6$ promastigotes por ml (Prueba de Montenegro) permite evaluar la inmunidad mediada por células y sirve de ayuda en el diagnóstico diferencial de la leishmaniasis cutánea causada por las diferentes especies conocidas. La lectura de la prueba se realiza a las 48 horas utilizando la técnica del bolígrafo, considerando como positiva la reacción cuando el diámetro de la induración es de 10 o más milímetros.

A pesar del consenso general de que el mecanismo inmune de protección contra infecciones por **Leishmania** es principalmente celular, la respuesta inmune humoral puede ser esencial no sólo para el estudio de la enfermedad sino también en la patogénesis de algunas de las formas más severas. Por ejemplo, en la leishmaniasis mucocutánea se ha observado una relación inversa entre los niveles séricos de anticuerpos y el grado de desarrollo de las lesiones.

Los niveles séricos de anticuerpos anti-**Leishmania** han sido determinados por diferentes métodos tales como la inmunofluorescencia indirecta (IF) que ha sido utilizada por

su alta sensibilidad y especificidad y el ensayo inmunoenzimático ELISA que ha demostrado tener una sensibilidad igual o mejor a la obtenida por la IF para el diagnóstico de las infecciones por **Leishmania**.

Diagnóstico Parasitológico:

El aislamiento e identificación de los parásitos a partir de lesiones de leishmaniasis, reviste gran importancia, tanto para la interpretación del diagnóstico clínico y epidemiológico de la enfermedad, como para la adecuada evaluación de los resultados obtenidos con el tratamiento.

La identificación de los parásitos del género **Leishmania** requiere de una serie de parámetros, los cuales evaluados conjuntamente permiten además una aproximación más firme al grupo especie y subespecie.

El diagnóstico parasitológico comprende los siguientes parámetros:

- 1.- Visualización directa de los parásitos a través de frotis por aposición y por escarificado, cultivo del parásito, e histología de las lesiones
- 2.- Identificación y taxonomía del parásito **Leishmania**,
- 3.- Diagnóstico rápido utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa.

Visualización directa de los parásitos a partir de biopsias tomadas a pacientes:

- a) frotis por aposición,
- b) por escarificado,
- c) cultivo,
- d) inoculación a hamster y
- e) estudio histopatológico

La biopsia es tomada del centro de la lesión cuando la misma está cerrada y no presenta ulceración ni signos de contaminación. Cuando la lesión está ulcerada el material se toma de los bordes cerrados de la misma pero cuando exista evidencia de

contaminación, debe realizarse frotis (coloración Gram) y cultivo de la secreción, para indicar el tratamiento antiséptico y/o antibiótico antes de tomar la biopsia. Una vez tomada la muestra, se divide en tres partes: una para frotis, una para cultivo y otra para estudio histopatológico, manteniendo en todo lo posible las condiciones de esterilidad.

- a) Frotis por aposición: Se realiza presionando suavemente el trozo más pequeño de la biopsia sobre una lámina porta objeto en varios sitios. Se deja secar a temperatura ambiente, se fija durante 10 minutos con alcohol metílico y posteriormente se colorea con Giemsa.
- b) Frotis por escarificado: Se realiza presionando con una pinza hemostática el borde de una lesión, de donde se tomará con una hoja de bisturí la linfa; esta se coloca en la lámina porta objeto y se sigue luego el mismo procedimiento de secado y tinción del frotis por aposición.

Los frotis son evaluados al microscópico de luz utilizando el objetivo de 100 x, con el objeto de determinar la presencia o no de la forma amastigote del parásito.

- c) Cultivo: El cultivo de los parásitos leishmánicos se realiza a partir de un trozo de biopsia, la cual es macerada estérilmente en 1 a 2 ml de solución tampón fosfato salino pH 7,2 usando una tijera de punta fina. Parte del macerado es sembrado en medio base agar sangre (Difco), 4% peso/volumen al cual se le agrega 10% de sangre de conejo defibrinada y 200 unidades de penicilina por ml. El cultivo es evaluado al cuarto o quinto día para detectar la presencia o no de promastigotes de **Leishmania**. Si el mismo es

positivo, se replica a medio fresco y luego se realiza mantenimiento del aislado replicando cada 7 días.

- d) Inoculación en hamster: Otro de los criterios utilizados en el diagnóstico de la leishmaniasis es la inducción de la enfermedad en animales de experimentación. Parte de la suspensión preparada para el cultivo se inocula a razón de 0,1 ml en la almohadilla plantar de las patas traseras de hamsters. Cada 15 días se examinan los hamster para observar el desarrollo de lesiones en el sitio de la inoculación. Si después de 1 año no se ha producido lesión, se suspende la observación y se considera el caso como negativo. Si bien este procedimiento, no constituye un criterio de diagnóstico práctico, es muy valioso como apoyo a otros criterios utilizados de rutina, y además, lo que es muy importante, resulta muy útil en algunos casos donde las infecciones secundarias asociadas con la leishmaniasis son difíciles de controlar especialmente en los casos mucosos. En estos casos por lo general el hamster controla una posible infección producida por hongos o bacterias que estén como contaminantes del material biológico sin llegar a superar la infección producida intracelularmente por las leishmanias.
- e) Estudio histopatológico: Los estudios histopatológicos constituyen otro criterio diagnóstico en la leishmaniasis. La tercera parte de la biopsia se fija en formol al 10%, y después de un tratamiento apropiado se realizan cortes histológicos los cuales son coloreados con la tinción hematoxilina-eosina que permitirá evaluar las condicio-

nes histopatológicas y la presencia o no de parásitos en el tejido. Sin embargo, se ha determinado que los procesos granulomatosos producidos por la leishmaniasis no son distinguibles de otros procesos del mismo orden tales como los que ocurren en la esporotricosis ya que el infiltrado celular no parece ser diferente, por lo que el diagnóstico se restringe a la identificación del parásito.

2.- Identificación y taxonomía de la Leishmania:

Tradicionalmente, la clasificación de estos parásitos se ha basado en una serie de criterios, alguno de ellos subjetivos entre los cuales están: las manifestaciones clínicas producidas por la infección parasitaria en el huésped vertebrado, distribución geográfica, comportamiento en medios de cultivo y en animales de experimentación.

Esto demuestra lo difícil que es realizar una taxonomía basada en estos criterios, si tomamos en cuenta que la leishmaniasis es una enfermedad con un amplio intervalo de respuesta del hospedador lo que podría enmascarar las características del parásito.

Recientemente, criterios clínicos, biológicos, bioquímicos e inmunológicos han permitido realizar esquemas de identificación taxonómica más detallados entre los que se destacan: tipo de lesión en el humano, lugar o región geográfica donde ocurre la enfermedad, densidad de flotación del ADN nuclear y del kinetoplasto, patrones de ADN del kinetoplasto generados por digestión con enzimas de restricción (análisis de esquizodemos), patrones de isoenzimas, hibridación de ADN nuclear y de kinetoplasto con sondas específicas y ensayo inmunoenzimático ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales inmuoabsorbidos.

3.- Diagnóstico rápido utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de polimerasa es un método in vitro de amplificación de ADN, a partir de un ADN de cualquier origen: bacteria, virus, de planta o animal. La PCR es un procedimiento enzimático que se lleva a cabo en ciclos discretos de amplificación cada uno de los cuales puede duplicar la cantidad de ADN blanco en la muestra, esto es, N ciclos, pueden producir 2 veces tanto ADN como estuviere presente en la muestra original.

La PCR ha tenido un gran impacto en diversas áreas: biología molecular, genética humana, diagnóstico de enfermedades humanas infecciosas y biología evolutiva. Las razones son básicamente las siguientes:

- Reduce la dificultad de aislamiento y manipulación de un ADN específico.
- La simplificación en el aislamiento de secuencias de ADN por métodos in vitro usando PCR ha hecho posible el análisis de genes en forma más sencilla.
- La PCR ha hecho posible estudiar problemas biológicos sin necesidad de grandes cantidades de material biológico. A su vez, la velocidad y sensibilidad de la técnica la hacen ideal para su aplicación en una gran variedad de problemas.

La reacción comienza por denaturar la doble cadena de ADN, seguida por la alineación de los primers (uno a cada cadena), para acompañar la secuencia blanco. La adición de la ADN polimerasa y deoxi-nucleótidos trifosfatos, genera una nueva cadena de ADN, comenzando en el primer y extendiéndose a través de la secuencia blanco, para hacer una copia de la secuencia.

BIBLIOGRAFIA

Si el ADN blanco, se duplica en cada ciclo, en 20 ciclos podríamos tener aproximadamente un millón más de ADN que en la muestra original, y este proceso se lleva a cabo en tan sólo una hora.

Aplicación de la PCR:

- a) En biología molecular, la PCR ha sido utilizada para simplificar un número de técnicas que incluyen: clonamiento molecular, secuenciación y modificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos,
- b) En el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas hace posible a los padres estar informados sobre algún problema hereditario que pueda afectar al feto.

La PCR, juega un papel importante en el diagnóstico de enfermedades donde la naturaleza molecular del defecto genético es conocido. En tales casos, pueden ser sintetizados primers para PCR con la idea de amplificar la forma mutada del gen que causa la enfermedad genética.

El diagnóstico por PCR dura un día comparado con varias semanas que tarda un diagnóstico utilizando procedimientos convencionales.

En el caso específico de leishmaniasis, y particularmente en la de tipo mucoso, la PCR ha jugado un papel principal, ya que por ser la región mucosa una zona de alta contaminación se hace casi imposible el aislamiento y crecimiento de los parásitos leishmánicos a partir de biopsias de dicha zona, y por ende no es fácil precisar el diagnóstico. La PCR aporta en estos casos un método confiable para confirmar el diagnóstico clínico indicado, ya que no precisa el aislamiento y crecimiento del parásito si no tan sólo de su presencia como tal.

- 1.- Arena B, Castillo L, Velásquez V, Silva LE. Evaluación de la prueba de Montenegro en pacientes con leishmaniasis cutánea en Guatemala. En Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso Guatemalteco de Parasitología y Medicina Tropical. 1987; 284.
- 2.- Arena FE. Diagnóstico de leishmaniasis cutánea por el método directo de cultivo. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1987.
- 3.- Arnot DE, Barker DC. Biochemical characterization of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. II Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. Mol Biochem Parasitol. 1981; 3: 47-56.
- 4.- Aston DL, Thorley AP. Leishmaniasis in Central Brazil results of a Montenegro skin test survey among amerindians in Xingu Nacional Park. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1970; 63: 671-8.
- 5.- Barker DC. DNA diagnosis of hwnau leishmaniasis. Parasitology Today. 1987; 3 6.
- 6.- Castés M, Agnelli A, Verde O, Rondón A. Characterization of the cellular immune response in american cutaneous leishmaniasis. Clin Immunol Immunophatol. 1983; 27: 176.
- 7.- Convit J, Pinaridi M. Cutaneous leishmaniasis, the clinical and immunophatological spectrum in South America Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to chagas disease. (Ciba) Fundation Symposium 20 (New serie) Publishers. Elseviers. Excerpta Medica North Holland. Amsterdam. 1974, pp, 160.
- 8.- Convit J. Leprosy and leishmaniasis. Similar clinical immunological pathological models. Ethiop Med. 1974; 12: 187.
- 9.- Desjeux P, Mollinedo S, Le Pont F, Paredes A, Ugarte G. Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department). Isolation and isoenzyme characterization of 26 strains of leishmania braziliensis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81: 742-6.
- 10.- Evans DA, Lanham SM, Baldwin CI, Peters W. The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* sub sp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1984; 78: 35.
- 11.- Giannini SH, Schittini M, Keithly JS, Warburton PW, Cantor CR, Lex HT Van der Ploeg. Karyotype analysis of *Leishmania sp* and its use in classification and clinical diagnosis. Science. 1986; 232762-5.
- 12.- Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. Nature. 1978; 273: 595.
- 13.- Morel CM. Problems and significance of parasite classification molecular tools in classification and diagnosis: Workshop report. Molecular Biology of Host Parasite Interactions. 1984; 337-40.
- 14.- Ulrich M. Inmunología de la leishmaniasis. Immunol Clin. 1979; 2: 125.
- 15.- Ulrich M, Centeno M, Mattout Z, Convit J. Serological patterns and specificity in american cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1988; 39: 179-84.
- 16.- Voller A, de Savigny D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. Journal of Immunological Methods. 46: 1-29.
- 17.- Wirth DF, McMahon Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc Nat Acad Sci USA. 1982; 79: 6999-7003.
- 18.- Scorza IV. Cambios epidemiológicos de la leishmaniasis en Venezuela. Boletín de la Dirección de Malaria y Saneamiento Ambiental. 1985; Vol XXV, N° 1 y 2.