

NUEVO METODO DE EXAMEN DIRECTO PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS CUTANEA

TÉCNICA DE EXTENSION Y CONCENTRACION TISULAR

Dr. Guillermo Planas-Girón
Dr. Gustavo Rodríguez Garcilazo.

Sección Dermopatología, Instituto de Biomedicina
(Instituto Nacional de Dermatología) – Venezuela.

RESUMEN

Se describe un nuevo método para el examen directo en, la investigación del agente causal de la Leishmaniasis Cutánea, que ha sido denominado por los autores "Técnica de extensión y concentración tisular", el cual permite obtener un diagnóstico rápido de la enfermedad, mediante muestras de excelente calidad.
Se analizan las ventajas que dicha técnica presenta sobre los clásicos "frotis por aposición".

SUMMARY

A new method for the direct examination of *Leishmania* sp is described, the method termed "Spreading and cellular concentration technique" allows the rapid diagnosis of leishmaniasis with optimal quality. The results are discussed and compared with the conventional "aposition smear".

PALABRAS CLAVES: Leishmaniasis, Técnica de extensión y concentración Tisular.

En el estudio de las enfermedades tropicales, especialmente aquéllas que exhiben un compromiso cutáneo, el diagnóstico de laboratorio y otras investigaciones adicionales, permiten establecer con carácter definitivo, la etiología del proceso patológico mediante la aplicación de técnicas especiales que varían de acuerdo con la naturaleza del proceso que se investiga. El método directo, que consiste en la comprobación del agente causal o sus formas evolutivas en el organismo, mediante procedimientos que definen sus características biológicas (morfología, tamaño, estructura, caracteres tintoriales, relación biológica con las células del hospedador, etc.), nos brinda la oportunidad de lograr un diagnóstico certero en forma rápida, con el fin de

indicar el tratamiento apropiado sin mayores dilaciones.

Ejemplos de la importancia de la investigación directa en afecciones cutáneas, las tenemos en las siguientes enfermedades: micosis profundas (Paracoccidioidomicosis, Esporotricosis, Cromomicosis, Micetomas, etc.); micosis superficiales (líneas); parasitarias y bacterianas (Leishmaniasis Tegumentaria Americana, en sus formas cutánea y mucosa y difusa anérgica; Sífilis, Buba, Lepra, etc.).

Para el diagnóstico certero de la Leishmaniasis Cutánea, mediante el método directo, se ha utilizado tradicionalmente la técnica del "frotis por aposición", que consiste en adosar y frotar suavemente, en forma circular,

un fragmento de tejido sobre una lámina porta-objeto y colorearlo con el método de Giemsa. Estos frotis por aposición de material proveniente de tejido patológico (generalmente bordes úlceras), con cierta frecuencia van acompañados de detritus celular, grasas del tejido adiposo, etc. Aun en el caso que se proceda a la disección y separación de la grasa subcutánea, siempre hay presencia de fibras conjuntivas esface-ladas, sangre, fibrina, plaquetas, etc. El factor de espesor de la muestra también distorsiona y dificulta en muchas ocasiones la visualización del agente causal. La presencia de infección secundaria, complica aún más la situación, ya que al frotis se agregan otros elementos como neutrófilos, restos nucleares, bacterias, etc.

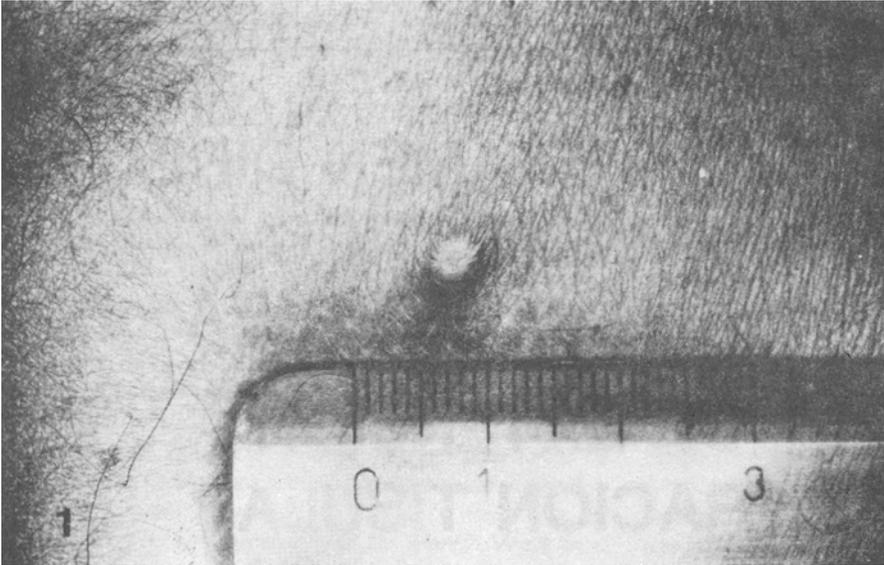


FIG. 1.- Nódulo de 4 mm. de diámetro,, localizado en la espalda de un paciente con Leishmaniasis Cutánea, variedad Dimorfa.

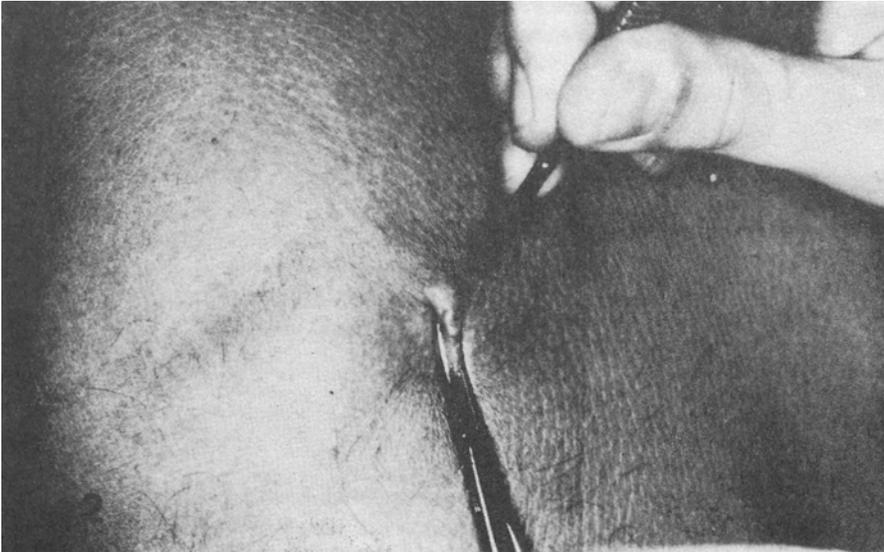


FIG. 2.- Procedimiento para la toma del examen directo. Obsérvese la isquemia producida en el nódulo de la Fig. 1, con la pinza curva y la incisión con el bisturí en el borde de la lesión.



FIG. 3.- Nódulos ulcerados en cara extrema de antebrazo en un paciente con Leishmaniasis Cutánea, variedad Dimorfa.

La observación histológica de granulomas parasitarios producidos por Leishmanias, ha demostrado que está constituido por formas amastigotes y células macrofágicas, subyacentes al epitelio (dermis superior) y en la dermis reticular, produciéndose a medida que se profundiza en la lesión, una disminución de la densidad parasitaria y un reemplazo de células histiocitarias por plasmocitos.

Basados en estas consideraciones histológicas, desde hace cierto tiempo se ha practicado, por sugerencia de uno de los autores (GRG), el método que hemos denominado "técnica de extensión y concentración tisular", que consiste en la toma de la muestra en el borde de la úlcera o en nódulos cerrados, mediante la incisión con un bisturí, sometiendo previamente al área seleccionada a una isquemia transitoria (Figs. 1, 2, 3, 4 y 5), con el objeto de eliminar el sangramiento, en forma similar al procedimiento que se utiliza para la toma de material en casos de Hansen. Esta isquemia se puede obtener mediante la aplicación de una pinza hemostática, preferiblemente curva con el fin de producir el menor daño posible al tejido y por ende al paciente, y un bisturí hoja No. 15 (Fig. 6, A y B). Se practica una incisión con la punta del bisturí (Fig. 5, sentido AB), de 5 a 8 mm. de largo y de 0,5 a 1 mm. de profundidad. Al concluir la incisión y sin perder el contacto con la dermis, se produce una rotación al bisturí, de modo que la hoja quede en un ángulo de 45° con respecto al corte y se "curetea" suavemente en sentido opuesto, hasta alcanzar el punto primario del corte (Fig. 5, sentido B-A). El material recogido en la hoja del bisturí, se coloca en una lámina portaobjeto (la hoja casi tangencial o en un ángulo agudo de aproximadamente 30° con respecto a la lámina), practicando rotaciones suaves (recuérdese la fragilidad del parásito), con el objeto de producir cierto grado de extensión, pero a su vez conservando la concentración adecuada de las células inflamatorias y de los parásitos. Se deja secar a temperatura ambiente, se fija en metano) y se colorea durante 15 minutos con Giemsa.

Una extensión y concentración aproximada de la muestra hecha con el bisturí, permitirá una excelente visuali-

zación de histiocitos, histiocitos en plena actividad macrofágica (Figs. 7, y 9), otras células como monocitos, linfocitos, plasmocitos y ocasionalmente eosinófilos, parásitos en su fase amastigote con sus características morfológicas y tintoriales: núcleo, blefaroplasto y membrana, (Fig. 8, inserto) y ocasionalmente el rizoplasto o rizoneuma, en forma de un filamento fino, coloreado de rojo con el Giemsa, el cual corresponde a la porción intracitoplasmática del flagelo. Esta estructura, observada por primera vez en Leishmaniasis Tegumentaria Americana por Vianna (1911), está colocada entre el blefaroplasto y la membrana. Los amastigotes pueden observarse en situación intracelular (en macrófagos Fig. 8 y ocasionalmente en neutrófi-

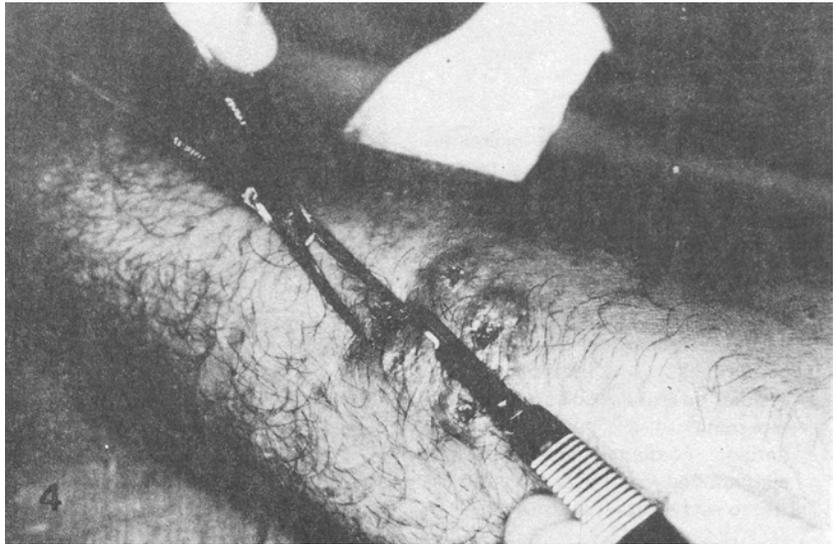
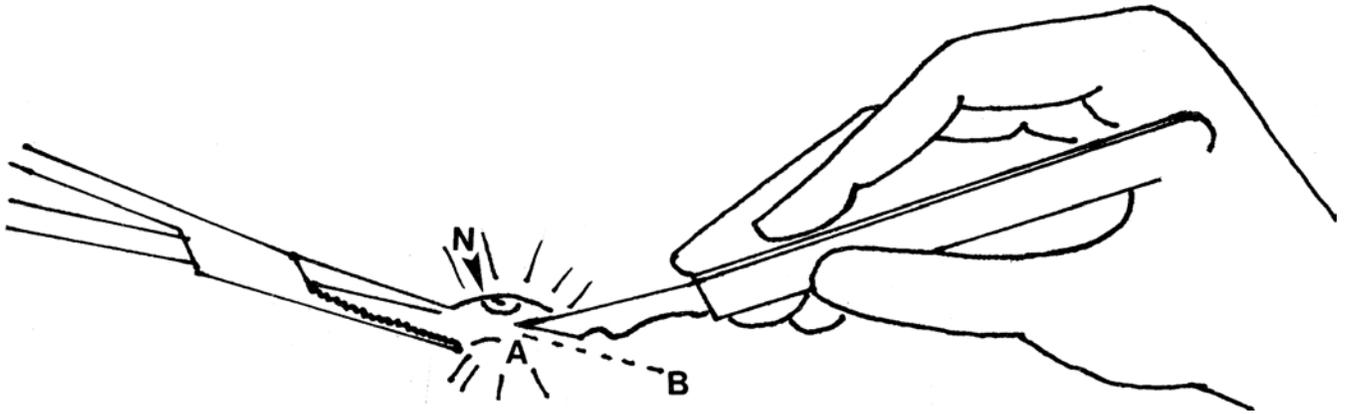


FIG. 4.- Procedimiento para la toma del examen directo en las lesiones que muestra la Fig. 3. La técnica utilizada es similar a la empleada en la Fig. 2.



5 FIG. 5.- Gráfico demostrativo del examen directo. N: nódulo parcialmente ulcerado. Una vez obtenida la isquemia con la pinza, se produce una incisión con el bisturí en sentido (A-B) y luego se "curetea" en sentido (B-A).

los) y/o extracelular (aisladas, agrupadas y en proceso de división binaria. Fig. 9,A)

VENTAJAS DEL METODO

1) Generalmente no se utiliza anestesia local, ya que la isquemia obtenida con la pinza curva, produce una disminución de la sensibilidad local, tal vez sustituyendo un tipo de sensibilidad (dolor) por otro (presión) o produciendo un proceso de "embotamiento" de la sensibilidad dolorosa. En nuestra experiencia, las molestias causadas al paciente son mínimas, sobre todo si se toma en cuenta que en aproximadamente 10 minutos, se cubre esta etapa de la toma del material. No obstante, si se piensa realizar la investigación completa (biopsia, cultivo, inoculación al hámster, estudio inmunocitoquímico, etc.), se puede infiltrar con anestesia local el área seleccio-

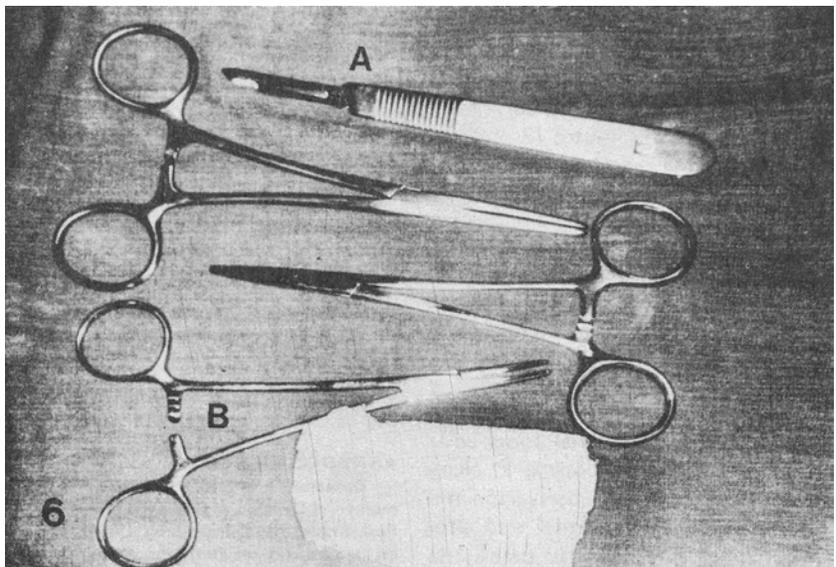


FIG. 6.- Material requerido para la toma del examen directo. A: bisturí con hoja No. 15. B: pinza curva.

nada y practicar ambos exámenes (biopsia y el examen directo propuesto), procediendo luego a suturar el sitio de la biopsia o eventualmente, si el tejido es muy frágil, taponarlo con Gelfoam.

- 2) Cicatrización rápida de la línea de incisión (recuérdese el largo, y la profundidad de la incisión), sin necesidad de utilizar sutura. El escaso sangramiento que pueda ocurrir, se detiene mediante la compresión ejercida con una pinza, en cuyo extremo está sujeta una torunda.
- 3) Excelente calidad del material, ya que se eliminan una serie de factores perturbadores de la observación microscópica: detritus celular, eritrocitos hemolizados post-fijación, restos nucleares, grasas, fibrina, etc.

- 4) La técnica propuesta tiene la ventaja de no utilizar el mismo material obtenido para biopsia y otras investigaciones adicionales (cultivo, inoculación, estudio inmunocitoquímico, etc.). Este material por lo regular resulta alterado parcial o totalmente en su arquitectura histológica al practicar el frotis por oposición.

- 5) Con una incisión, es posible obtener hasta 4 muestras del material, suficientes para una lectura apropiada.

- 6) Tiempo mínimo en obtener un diagnóstico: Se estimó que se puede alcanzar un diagnóstico en aproximadamente 30 minutos (2 minutos para la toma del material, 3 minutos para el secado a temperatura ambiente, 5 minutos para la fijación en metanol, 15 minutos de coloración con Giemsa -dos gotas del colorante x 1 cc. de agua- y 5 minutos para la observación microscópica). Este tiempo puede ser aún más breve, según la habilidad y práctica que tenga el médico, tanto en la toma del material como en la observación microscópica. El tiempo invertido en la observación microscópica, lógicamente será proporcional a la densidad parasitaria en la lesión. En este sentido en los casos de Leishmaniasis Difusa Anérgica, donde existe una ausencia de inmunidad protectora con presencia

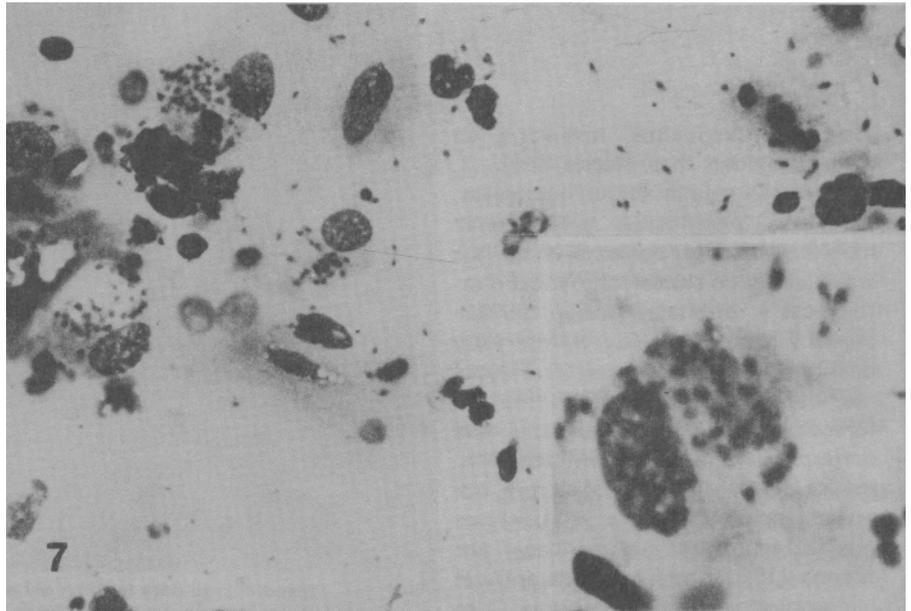


FIG. 7.-- Examen directo mediante técnica de extensión y concentración tisular. Obsérvese formas amastigotes intra y extra-celular. Inserto: Macrófago con abundantes parásitos. Coloración con Giemsa. 400 X y 630 X respectivamente.

de abundantes parásitos, el diagnóstico se puede hacer de inmediato, al igual que en las formas dimorfas caracterizadas por un granuloma mejor estructurado y una densidad parasitaria aún significativa (Figs. 10 y 11). En los casos incipientes de Leishmaniasis Cutánea Localizada, es posible identificar una densidad de amastigotes relativamente importante, sobre todo si la lesión no está ulcerada. En aquellos casos más crónicos, cuya expresión clínica es una úlcera tórpida, donde se ha estructurado un cuadro granulomatoso más intenso, con una densidad parasitaria disminuida, se requerirá una observación más cuidadosa y prolongada.

CONCLUSION

Que conozcamos, este método no ha sido descrito previamente en la investigación del agente causal de la Leishmaniasis. Por las ventajas señaladas anteriormente, se recomienda ampliamente, especialmente por considerarlo un método rápido, práctico y que ofrece muestras de alta calidad.

AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Daniel Beniamini, cursante del Post-Grado de Dermatología, actualmente en la pasantía de Dermatopatología, quien gentilmente colaboró con las tomas de algunas muestras y fotografías. Al Dr. Félix J. Tapia por sus importantes sugerencias. A la Sra. Alexa Beatriz de Planas, quien elaboró el gráfico correspondiente a la Fig. 5. A las

técnicas del laboratorio de Dermatología: Sra. Gledys Cedeño de García y Srtas. Belinda Carvallo e Iraida Sánchez quienes practicaron las coloraciones con Giemsa.

BIBLIOGRAFIA

1. Pessóá, S.B., Martins, A.V. Pessóá Parasitología Médica. 10a. edición, Editora Guanabara Koogan, S.A., Rio de Janeiro, pp 77-142, 1978.
2. Pifano, C.F.: Aspectos de Medicina Tropical en Venezuela. Temas de Cátedra. Introducción General al Diagnóstico de las Enfermedades Tropicales. El Diagnóstico Epidemiológico, Clínico y de Laboratorio. (O.B.E.), pp. 109,113, 1964.
3. Kerdel-Vegas, F.: American Leishmaniasis. Int. J. Dermatol. 21: 291-303, 1982.
4. Convit, J., Pinardi, M.E.: Cutaneous Leishmaniasis. The Clinical and Immunopathological Spectrum in South America. CIBA Foundation Symposium, 1974.
5. Rondón Lugo, A.J., Reyes, O., Ulrich, M., Tapia, F.: Leishmaniasis Cutáneo Mucosa. Dermatología Venezolana, Vol. 23, (No. 3-4): 11-24, 1985.
6. Gózszy, B., Kátó, L.: Balancing mechanisms in acute inflammation. Monograph No. 5. Institute of Microbiology and Hygiene of Montreal University. Thérien Frères (1960), Limité e. Montreal, October 1970.
7. Faust, E.C., Russell, P.F., Lincicome, D. R.: Parasitología Clínica de Craig y Faust, 2a. Ed. Española, Uteha, México, pp. 104-132, 1961.
8. Manson-Bhar, P.H. Manson's Tropical Diseases, Fifteenth Ed. Cassell & Comp-LTD, London, pp. 131-169. 1961.

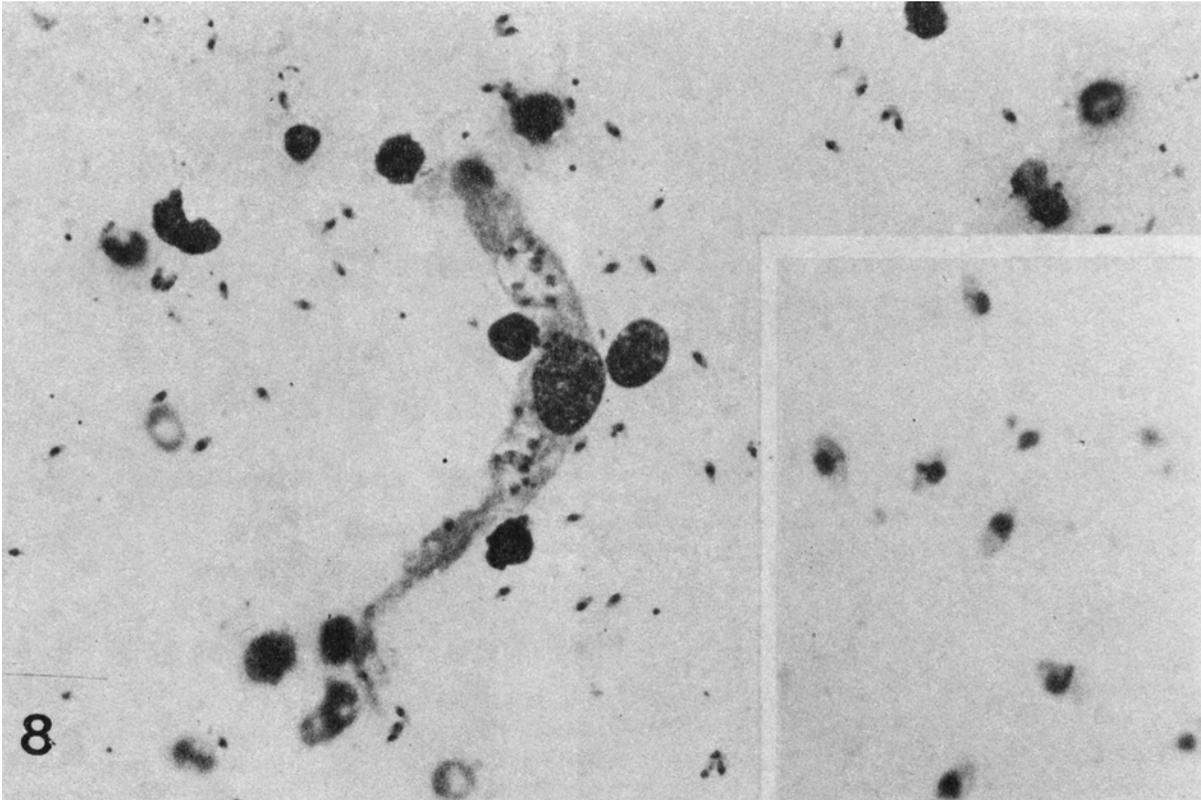


FIG. 8.- Examen directo mediante técnica de extensión y concentración tisular. Macrófago emitiendo prolongaciones citoplasmáticas y fagocitando numerosas formas amastigotes. Inserto: Parásitos bien definidos. Giemsa. 400 X y 1000 X respectivamente.

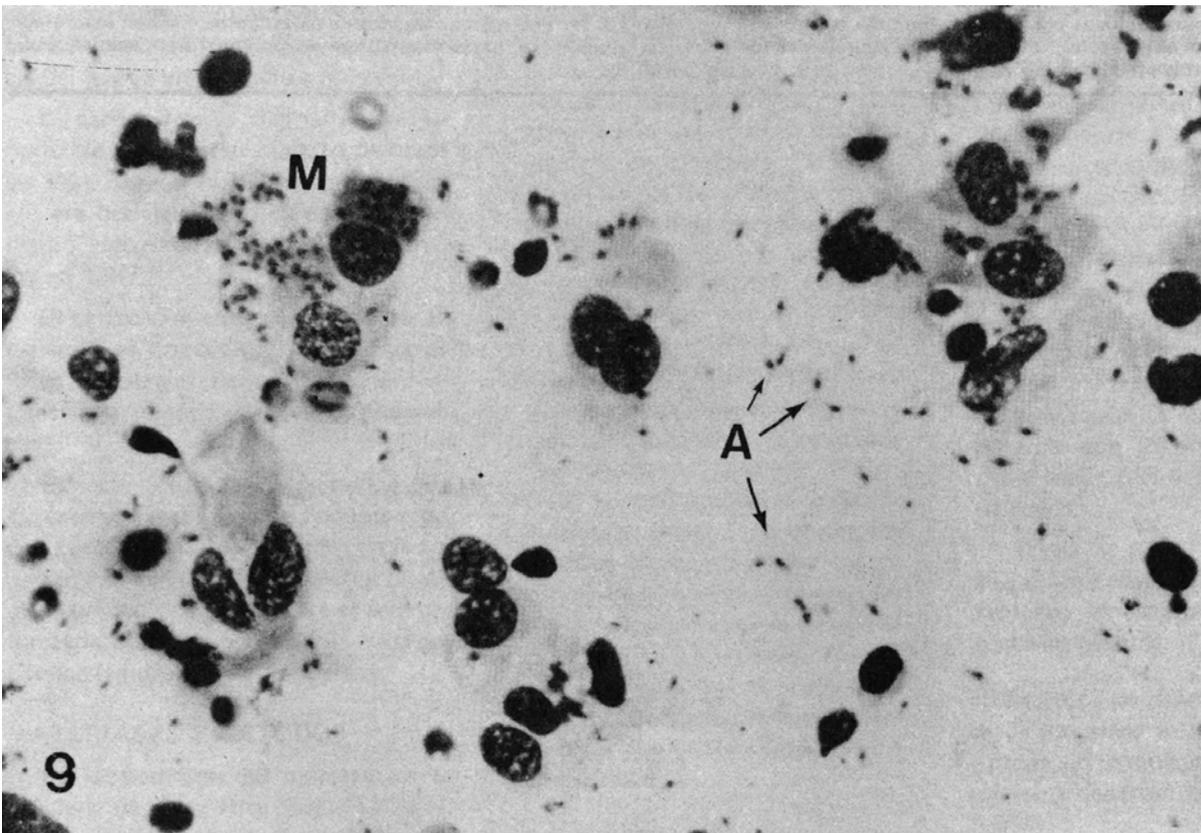


FIG. 9.- Examen directo mediante técnica de extensión y concentración tisular. M: Macrófago activado, emitiendo pseudópodo y fagocitando más de 40 parásitos. Obsérvese numerosas formas amastigotes en situación extracelular (A). Giemsa, 400 X.

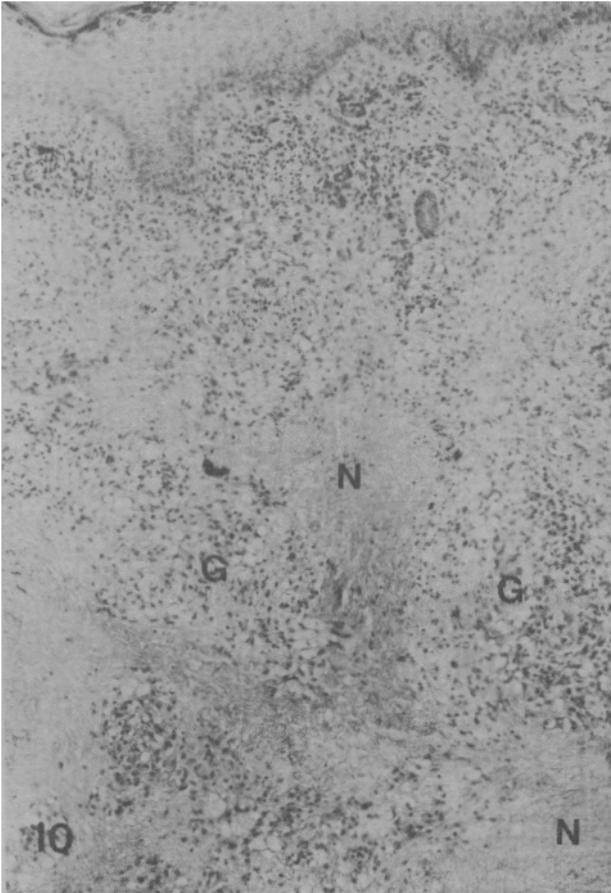


FIG. 10.- Histopatología correspondiente al caso de la Fig. 3. G: numerosos focos granulomatosos con aspecto dimorfo conteniendo abundantes formas amastigotes, alternando con abundantes focos de necrosis conjuntiva (N). H-E, 63 X.

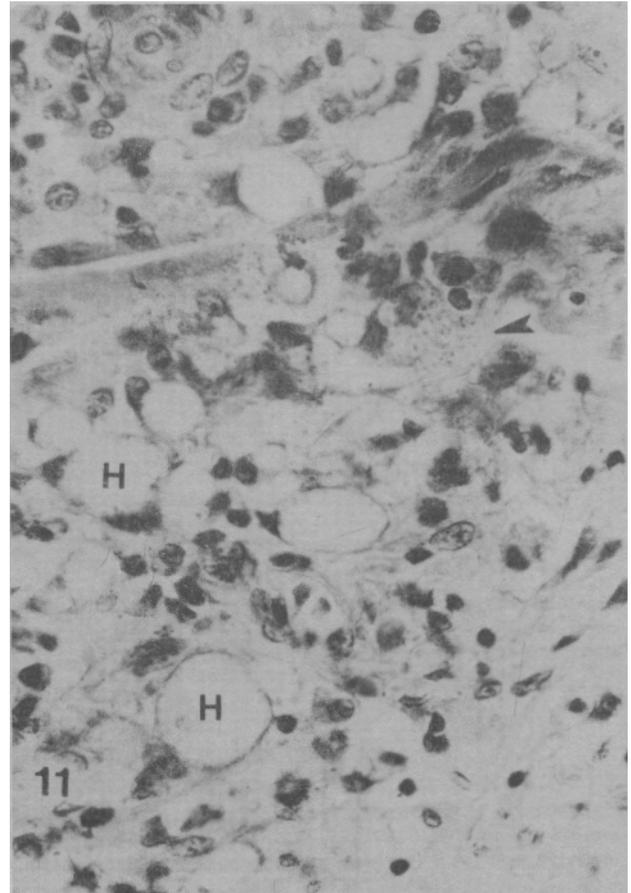


FIG. 11.- Detalle de un foco granulomatoso, correspondiente a la Fig. 10. H: histiocitos cargados de amastigotes. Flecha: macrófago con numerosos parásitos. Nótese el polimorfismo celular. H-E, 400 X.