

Diagnóstico

LEISHMANIASIS

Experiencias diagnósticas y terapéuticas de la leishmaniasis tegumentaria americana en el Instituto de Medicina Tropical de Caracas, Venezuela, 2004-2009

Alfonso J. Rodríguez-Morales, Pedro Navarro, Olinda M. Delgado, Virginia Coraspe, Sylvia Silva, Luis A. Colmenares, Mariselys Miquireno, Amando Martín
Instituto de Medicina Tropical Félix Pifano, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Introducción. La leishmaniasis tegumentaria americana continúa siendo una de las enfermedades tropicales endémicas de mayor relevancia en Venezuela que, dado el creciente fenómeno de globalización, afecta no sólo población de zonas endémicas sino también a los viajeros.

Materiales y métodos. En el presente trabajo se evaluaron 108 pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana, haciendo evaluación clínica, epidemiológica y diagnóstico con la prueba de intradermorreacción, demostración de amastigotes en frotis con tinción de Giemsa y la prueba de inmunofluorescencia. Los pacientes se trataron con series de antimonio de meglumina (3 y 4,5 g/día por 10 días), con seguimiento durante seis meses.

Resultados. Del total, 50,9 % era del sexo masculino y 49,1 % del femenino; 72,2 %, adultos; 76,9 %, residentes de zonas endémicas cercanas al IMT (estado Miranda); 8,3 %, residentes de otras zonas endémicas de Venezuela, y 14,8 %, viajeros que habían estado en zonas endémicas. Todos los pacientes presentaron lesiones localizadas en miembros inferiores, 64,8 % con una sola úlcera. La evolución fue satisfactoria en todos los casos, alcanzando la curación clínica al final del seguimiento.

Conclusiones. El diagnóstico y tratamiento oportunos de la leishmaniasis tegumentaria americana, así como un buen diagnóstico diferencial, permiten lograr altas tasas de curación clínica de la enfermedad. Sin embargo, sigue siendo necesario mejorar la disponibilidad de herramientas diagnósticas y alternativas terapéuticas, aún limitadas, dado el poco interés existente en investigación y desarrollo de nuevos antiparasitarios para esta importante enfermedad tropical.

Confirmación parasitológica de infección asintomática en tejidos extralesionales de individuos de áreas endémicas para leishmaniasis cutánea mediante PCR

Mariana Rosales, María Adelaida Gómez, Liliana Valderrama, Luisa Rubiano, Nancy Gore Saravia
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

Introducción. La información epidemiológica y clínica sugiere que la infección con *Leishmania* persiste indefinidamente después de la infección asintomática y de la sintomática. No obstante, la presencia de parásitos en individuos con infección asintomática en áreas endémicas para leishmaniasis cutánea, no se ha demostrado.

El objetivo de este estudio fue proveer confirmación parasitológica de sujetos con prueba inmunológica de infección asintomática.

Métodos. La población de estudio (n=30) incluyó cinco grupos familiares, cada uno con un caso histórico de leishmaniasis cutánea. Además del caso histórico, se incluyeron cuatro convivientes (sanos o asintomáticos). Cinco individuos sanos de área no endémica sirvieron de controles. Se tomaron muestras de 10 ml de sangre periférica y dos hisopados de mucosa nasal, conjuntiva y amígdala. La detección de *Leishmania Viannia* se hizo mediante PCR del ADNk.

Resultados. Se amplificó ADNk de *Leishmania* en 4/5 (80 %) participantes con leishmaniasis cutánea histórica y en 6/15 (40 %) individuos asintomáticos, en una o más de las muestras de conjuntiva, sangre, amígdala y mucosa nasal; esta última fue la muestra con más casos positivos. No se amplificó ADNk en los participantes sanos de área endémica o no endémica. A partir del ARN de las muestras que fueron positivas para el ADNk, se confirmó la presencia y viabilidad del parásito mediante qRT-PCR de la molécula 7SL ARN.

Conclusiones. Mediante PCR del ADNk y qRT-PCR del 7SLRNA, se demostró la presencia y viabilidad de *L. Viannia* en tejidos aparentemente sanos en individuos asintomáticos y en pacientes que tuvieron leishmaniasis hace más de cinco años. Estos resultados muestran que *L. Viannia* persiste

en la población asintomática y en individuos que presentaron cura clínica, y establece bases metodológicas para comprender el papel de esta población en la transmisión de la leishmaniasis cutánea en Colombia.

Financiación. Colciencias convenio 797-2009, NIH/Fogarty contrato D-43TW006859 y NIH/NAID contrato U19AI065866

• • •

Identificación de especies de *Leishmania* en Colombia por PCR-RFLP del gen *Hsp70*

Rafael Villarreal, Carlos Muskus, Marcel Marín
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La leishmaniasis afecta más de 12 millones de personas en 88 países del mundo, de los cuales 72 son subdesarrollados. En Colombia se presentan una gran variabilidad de especies, entre las que se encuentran *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*.

La vigilancia clínica y epidemiológica de la leishmaniasis en Colombia demanda la utilización de herramientas sensibles y específicas, no sólo para el diagnóstico sino para la identificación de las especies de parásito. Para esto se deben hacer estudios que conduzcan a la validación clínica y epidemiológica de blancos moleculares, por lo cual en el presente trabajo utilizamos la técnica de PCR-RFLP basada en la amplificación y digestión del gen de la proteína de choque térmico de 70 kDa (*Hsp70*), el cual se conserva en la mayoría de las especies de *Leishmania*.

Materiales. Se estandarizó una PCR-RFLP del gen *Hsp70* siguiendo condiciones previamente descritas en la literatura científica. Se extrajo ADN de parásitos en cultivo empleando un kit comercial, y se amplificó una región de 1.300 pb del gen *Hsp70*. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con la enzima *HaeIII* para diferenciar todas las especies; para lograr una diferenciación más específica entre *L. panamensis* y *L. guyanensis*, se empleó la enzima *BccI*, debido a que presentan algunas similitudes en el perfil de bandas generado con *HaeIII* y, con base en un mapeo *in silico*, se pudo obtener un perfil específico de especies.

Resultados. Se amplificó un producto único y del tamaño esperado en todas las especies de *Leishmania* evaluadas. Los amplificados fueron digeridos y produjeron un patrón específico de

bandas para cada especie, los cuales brindan la posibilidad de diferenciar las especies de *Leishmania* presentes en nuestro país.

Conclusión. Este estudio amplía más el uso de nuevos marcadores para la tipificación de cepas de *Leishmania* de cultivo.

• • •

El PCR-miniexón es una prueba útil para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en pacientes colombianos

Yira Rosalba Díaz-Toro, Sandra Muvdi, Clemencia Ovalle

Grupo de Dermatología Tropical, Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta E.S.E., Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. En Colombia no se cuenta con una prueba molecular validada para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. El examen directo permite un diagnóstico oportuno aunque poco sensible en lesiones crónicas y la biopsia confirma el diagnóstico si el directo es negativo; sin embargo, los resultados de estas pruebas dependen de la experiencia del microscopista.

El objetivo del estudio fue validar el PCR-miniexón para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.

Materiales y métodos. Se incluyeron 228 láminas de examen directo de pacientes colombianos con sospecha clínica de leishmaniasis cutánea. Ciento quince (115) de las láminas correspondían a casos y 113 a no casos clasificados de acuerdo con un estándar de referencia conformado por parámetros clínicos, histopatológicos, epidemiológicos y de laboratorio. La clasificación de la muestra como caso o no caso y la aplicación de prueba, fueron procesos independientes. El ADN se extrajo a partir de las láminas empleando DNeasy Blood & Tissue kit®(QIAGEN). La amplificación del gen miniexón se hizo con los iniciadores Fme/Rme y el fragmento amplificado presentó los siguientes tamaños: 226-230 pb para el subgénero *Viannia*, 308 pb para *Leishmania amazonensis*, 340 pb para *L. mexicana* y 418 pb para *L. infantum chagasi*. Finalmente, se compararon los resultados de PCR con el estándar de referencia y se calcularon las características operativas de la prueba.

Resultados. El PCR-miniexón fue positivo en 124 muestras y negativo en 102. Dos muestras de casos fueron excluidas del análisis por la presencia de inhibidores de la PCR. Todas las muestras positivas pertenecían al subgénero *Viannia*. Con la aplicación del PCR-miniexón se obtuvo una sensibilidad de 89,4 % (IC_{95%}: 82,4-93,8), especificidad de 79,6 % (IC_{95%}: 71,3-86),

cociente de probabilidad positivo de 4,391 (IC_{95%}: 3,03-6,36) y cociente de probabilidad negativo de 0,133 (IC_{95%}: 0,077-0,229). El área bajo la curva ROC fue en 0,845 (IC_{95%}: 0,791-0,890; p<0,0001).

Conclusiones. El PCR-miniexón es una prueba útil para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea a partir del examen directo.

