

## **ANEXO 1. LEISHMANIASIS TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS EN LEISHMANIASIS**

### **Procedimientos para las pruebas diagnósticas Leishmaniasis cutánea**

Frotis directo: El examen directo puede realizarse de dos maneras: haciendo un raspado del borde interno de la úlcera o haciendo una incisión y raspando el borde activo de la lesión. La primera metodología tiene la ventaja de ser menos dolorosa, sangrar menos y ser más fácil, rápida y económica que la segunda. La sensibilidad de ambas metodologías es comparable.

Si existen dos o más lesiones debe escogerse para el examen directo la que tenga un menor tiempo de evolución.

Frotis (raspado) del borde interno de la úlcera

Materiales:

Guantes de cirugía, alcohol, algodón, solución salina, jabón quirúrgico, gasa estéril, láminas porta-objetos, lancetas u hojas de bisturí, colorante de Giemsa o Wright, microscopio óptico, aceite de inmersión.

Procedimiento:

- Con manos enguantadas realice limpieza del sitio de la lesión utilizando algodón impregnado en alcohol o solución salina y jabón quirúrgico. Si hay costra remuévala cuidadosamente.
- Sobre la cara interna del borde de la úlcera realice un raspado con el borde romo de una lanceta o de una hoja de bisturí. Hágalo de manera tal que no sangre mucho.
- El material así obtenido se extiende en forma suave sobre una lámina portaobjetos previamente limpiada, desengrasada y debidamente rotulada.
- Tome otras tres muestras de la misma manera colocando dos muestras por lámina en dos láminas portaobjetos.
- Deje secar las muestras a temperatura ambiente.
- Fije con metanol y deje secar.
- Tiña las láminas con colorante de Giemsa al 10% en solución amortiguada de fosfatos pH 7,2 durante 10 minutos, o con colorante de Wright. Para evitar la formación de precipitados de colorante es aconsejable realizar la tinción con las láminas invertidas sobre una superficie que tenga el colorante.
- Observe al microscopio de luz con un aumento de 1000 X (objetivo de inmersión), para buscar los amastigotes que pueden encontrarse intra o extracelularmente.

- Para identificar un amastigote como tal debe observarse las formas ovaladas o redondeadas características y distinguirse claramente el núcleo del cinetoplasto.

#### Interpretación:

El examen directo se interpreta como positivo cuando se encuentran uno o más amastigotes. Se considera como negativo cuando no se encuentran amastigotes después de haber recorrido un mínimo de 100 campos.

Si el primer examen directo es negativo, debe repetirse el procedimiento en la misma forma señalada. Si dos exámenes directos tomando en cada uno dos láminas con dos muestras por lámina son negativos, y persiste la sospecha clínica de leishmaniasis, debe practicarse biopsia.

#### **Incisión y raspado del borde activo de la lesión.**

##### Materiales

Xilocaína, jeringas de tuberculina, guantes de cirugía, alcohol, algodón, solución salina, jabón quirúrgico, gasa estéril, láminas porta-objetos, lancetas u hojas de bisturí, colorante de Giemsa o Wright, microscopio óptico, aceite de inmersión.

##### Procedimiento

- Con manos enguantadas realice limpieza del sitio de la lesión utilizando algodón impregnado en alcohol o solución salina y jabón quirúrgico. Si hay costra remuévala cuidadosamente.
- Previa infiltración con una pequeña cantidad de xilocaína (0.1 a 0.2 ml), sobre el borde activo de la lesión realice una pequeña incisión con la hoja de bisturí de 3 a 6 mm de longitud por 1 a 3 mm de profundidad. La hemostasia se debe lograr haciendo presión en pinza con los dedos.
- Con gasa estéril, limpie la sangre que emana de la incisión y con la misma gasa presione el borde de la lesión para hacer hemostasis y evitar el sangrado.
- Con el borde romo de la hoja del bisturí levante la piel de la parte superior de la incisión y raspe tejido del interior de la incisión desde la profundidad hacia la superficie.
- El material así obtenido se extiende en forma suave sobre una lámina portaobjetos previamente limpiada, desengrasada y debidamente rotulada.
- Tome otras tres muestras de la misma manera colocando dos muestras por lámina en dos láminas portaobjetos.
- Deje secar, fije, tiña y observe al microscopio en la misma forma que para el frotis interno del borde interno de la úlcera.

#### **Prueba de Montenegro**

## **Materiales:**

Jeringa de tuberculina con aguja N° 20, leishmanina, algodón, alcohol, bolígrafo, regla milimetrada para la lectura.

## **Procedimientos**

- Aspirar con la jeringa de tuberculina 0,1 ml de leishmanina.
- Limpiar con algodón impregnado con alcohol el tercio superior de la cara flexora del antebrazo izquierdo.
- Insertar intradérmicamente solo la punta de la aguja e introducir poco a poco el líquido notándose la formación de una pequeña pápula con aspecto de “piel de naranja”.
- Lectura: A las 48-72 horas de la aplicación medir el diámetro de la induración, empleando la técnica del bolígrafo así: colocado perpendicularmente al plano de la piel, se deja deslizar el bolígrafo desde la periferia hacia el centro hasta donde se encuentra resistencia. Realizar el procedimiento en los cuatro cuadrantes para delimitar el área de induración. Con la regla milimetrada se mide la distancia que hubo entre los sitios de resistencia. Para informar el resultado se debe anotar los dos diámetros.
- Interpretación: Se considera positiva cuando uno de los dos diámetros de la induración es igual o mayor de 5 mm. La positividad indica solamente que ha habido contacto previo con el parásito pero no que hay enfermedad activa. Por lo tanto, una prueba de Montenegro positiva no es diagnóstica por sí sola.

## **Biopsia de piel**

### **Materiales.**

Guantes de cirugía, agua destilada o solución salina fisiológica estéril, jabón quirúrgico, alcohol, agujas estériles, gasas estériles, jeringas de 1c.c., xilocaína al 2% sin epinefrina, mango y hojas de bisturí Nos. 11 y 15, frasco con formol tamponado al 10 %. Si se dispone de sacabocados de 4mm se puede tomar la biopsia con él.

Procedimiento: Este procedimiento debe ser realizándolo por personal entrenado previamente.

- Con manos enguantadas, realice la limpieza de la lesión con agua destilada o con solución salina fisiológica estéril y jabón quirúrgico. Aplicar luego alcohol al 70%. Si hay costra esta se debe retirar.
- Las lesiones localizadas en la cara se les puede hacer biopsia con las precauciones necesarias para no aumentar la cicatriz.
- Infiltre el borde de la úlcera con 1 ml de xilocaína al 2% sin epinefrina.

- Sobre el borde de la úlcera practique incisión elipsoidal para obtener un bloque de tejido de 5 x 5 x 5mm que llegue hasta la hipodermis. Evite que sea muy superficial o que solamente incluya la costra en la muestra. Al tomar la muestra con punch debe cerciorarse que comprometa tejido celular subcutáneo.
- Tome el fragmento de tejido con la punta de la aguja. No use pinzas que pueden dañar el tejido por compresión.
- Introduzca la muestra en el frasco que contiene formol tamponado al 10%, tápelo y séllelo con esparadrapo. Vigile que el espécimen no quede adherido a las paredes del frasco.
- Marque debidamente el frasco con el nombre del paciente, el registro que le correspondiente, la procedencia y se envíe a al laboratorio correspondiente con la orden de histopatológica y un resumen de historia clínica.

### **Histopatología de la leishmaniasis cutánea.**

Los cambios histopatológicos que caracterizan la leishmaniasis guardan un patrón general que permite sospecharla y reflejan la relación entre la multiplicación del parásito y la respuesta inmune del paciente. Varían de acuerdo con el tiempo de evolución de la lesión, localización, tipo del parásito productor de la enfermedad, presencia de ulceración e infección sobre agregada y tratamientos previos.

La imagen histológica de las leishmaniasis, aún cuando guarda un patrón general que permite sospecharla, varía de acuerdo con múltiples factores como: forma clínica de la enfermedad, tiempo de evolución de la misma, localización, tipo de parásito productor de la enfermedad, respuesta del huésped, infección secundaria y tratamientos previos.

Las especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* son parásitos de los macrófagos. De esta relación leishmania-macrófago, con los subsiguientes intentos de supervivencia o de destrucción, se desencadenan eventos inflamatorios e inmunológicos que originan una lesión tisular conjuntiva y una reacción epitelial secundaria, las cuales, a su vez, dan lugar a un cuadro histológico característico.

El estudio histológico de las biopsias de leishmaniasis tegumentaria podría dividirse así:

- a. Lesiones clínicas papulosas o nodulares no ulceradas.
- b. Lesiones ulceradas activas.
- c. Lesiones ulceradas en regresión.
- d. Lesiones cutáneas ulceradas de recidiva.

### **Pápulas y Nódulos**

Corresponden a enfermedad incipiente de 2 a 3 semanas de evolución, o ha casos de leishmaniasis anérgica tegumentaria difusa.

En el primer caso, no hay mayor modificación epitelial y en toda la dermis existe un infiltrado importante, masivo, histoplamositario, sin cambios en los vasos. Los macrófagos superficiales de las papilas dérmicas de aspecto claro y vacuolado, contienen gran número de amastigotes fagocitados. No hay dificultad diagnóstica ni es frecuente encontrar en esta fase de la enfermedad.

En la leishmaniasis difusa la biopsia juega un papel decisivo en el diagnóstico porque usualmente la enfermedad no se ha sospechado clínicamente. Puede además tratarse de una enfermedad incipiente, con una lesión única, nodular, no ulcerada de pocos meses de evolución, en la cual el diagnóstico preciso, que implica un pronóstico serio, es de gran importancia en el manejo del paciente. La lesión muestra un infiltrado masivo que llega hasta la hipodermis y esta compuesto por grandes macrófagos de citoplasma univacuolado repleto de gran número de amastigotes dispuestos sobre la periferia de la membrana del fagosoma. Hay algún componente linfoplasmocitario y no se ven granulomas epitelioides. La imagen panorámica sugiere el cuadro visto en la lepra lepromatosa polar.

### **Úlceras activas.**

Cuando el espécimen es adecuado y toma el borde de la úlcera, la imagen general es característica por que muestra una úlcera ocupada por detritus celulares y tejido de granulación, bordeada por diversos grados de hiperplasia epitelial.

La dermis está enteramente ocupada por la inflamación, que no deja resquicios y que engloba los anexos presentes. Es pues una dermatitis difusa que puede penetrar a la hipodermis. La hiperplasia epitelial puede ser severa y confundirse con un carcinoma escamocelular.

El estudio del infiltrado revela que las células predominantes son histiocitos y plasmocitos. Los primeros pueden ser vacuolados en las papilas dérmicas y alojar los parásitos que en general son escasos; con frecuencia no se ve más de un parásito por vacuola. No es común ver los protozoarios en los macrófagos profundos. La disposición de los histiocitos en nódulos circunscritos bien definidos de aspecto granulomatoso epiteliode es poco usual.

El granuloma epiteliode se correlaciona claramente con la ausencia de amastigotes y las células gigantes en general son escasas y son tanto de tipo Langhans como de cuerpo extraño. Es importante tener en cuenta que es excepcional una biopsia de una lesión leishmaniásica en la que los plasmocitos no sean muy abundante. La escasez de plasmocitos debe hacer pensar en una lesión

de otra naturaleza. Por otra parte, su abundancia en las lesiones tratadas indica actividad leishmaniásica persistente.

Los cambios vasculíticos francos con necrosis fibrinoide y trombosis de los vasos son de ocurrencia común, especialmente en las lesiones de las piernas.

Algunos granulomas pueden mostrar necrosis fibrinoide o caseosa central, a veces extensa, que semeja enteramente una tuberculosis.

Los PMN ocurren en el área de la úlcera y del tejido de granulación. Su presencia en las zonas profundas del proceso y sobre todo si forman microabscesos frecuentes, debe poner en duda el diagnóstico histológico de leishmaniasis y sugerir en cambio, el de esporotricosis.

### **Úlceras en regresión.**

Ocurren con cicatrización espontánea o por tratamiento. Hay fibrosis importante, tejido de granulación, abundante siderófagos, plasmocitos en grupos y a veces, células gigante numerosas que fagocitan detritus. No se ven los parásitos y la imagen es inespecífica.

Úlceras cutáneas de recidiva.

Ocurren como reactivación de la lesión previa tratada insuficientemente. Las biopsias muestran procesos granulomatosos epitelioides, ricos en linfocitos, mucho más que la lesión inicial y en la que es difícil de demostrar la presencia de amastigotes.

### **Presencia de amastigotes en las biopsias:**

En el 70-80% de las biopsias de leishmaniasis cutánea y en el 51% de las de lesiones mucosas estudiados en el INS, se demuestran los amastigotes. Deben buscarse en: a). Macrófagos vacuolados de las papilas dérmicas; b). En las papilas dérmicas que comienzan a necrosarse; c). En las áreas subyacentes a la hiperplasia pseudoepiteliomatosa.

La coloración de hematoxilina eosina (H.E.) es suficiente para demostrarlos. Su identificación exige reconocer claramente sus componentes, sobre todo el cinetoplasto. En caso de duda debe usarse el objetivo de inmersión. En los pacientes que hayan recibido tratamiento previo con Glucantime los amastigotes desaparecen rápidamente, así persistan los componentes inflamatorios.

La poca sensibilidad del microscopio de luz para identificar los parásitos puede explicarse por la escasez de los mismos que, no obstante perpetúan el proceso inflamatorio hipersensible y destructivo. Es posible que la acción de las enzimas del macrófago sobre el parásito les produzca cambios que alteren su morfología de tal forma que no se reconozcan bien al microscopio de luz, pero que al

microscopio electrónico no dejan duda de su identidad por que se reconocen componentes microtubulares y del cinetoplasto.

Es posible demostrar la transformación gradual del parásito en un conjunto laminar concéntrico. Algunos “cuerpos citoides” pueden pues corresponder a leishmanias degeneradas, en vía de lisis o parcialmente digeridas por los lisosomas del macrófago.

Las técnicas inmunoenzimáticas disponibles no son más sensibles que la H.E., acortan el tiempo de búsqueda y ayudan a aclarar algunos casos.

### **Adenopatía leishmaniásica**

En el ganglio linfático se observan dos formas de presentación:

Una con muy escasos amastigotes, aumento en el número de células plasmáticas y presencia de granulomas epitelioides bien definidos. En la otra el ganglio satélite presenta acúmulos corticales y paracorticales de macrófagos vacuolados que fagocitan abundantes amastigotes.

Interpretación:

La biopsia debe ser leída por un patólogo. Si por alguna razón ello no es posible, el espécimen puede ser remitido al laboratorio de patología de referencia respectivo.

El resultado puede: a.) Demostrar los amastigotes lo cual establece el diagnóstico definitivo. b.) Revelar uno o varios de los patrones histopatológicos de las leishmaniasis sin demostración de los parásitos.

Este resultado también es de gran valor porque:

- Excluye otras enfermedades
- Sugiere gran probabilidad de que el diagnóstico real es de leishmaniasis. Unido a la clínica y a la leishmanina positiva, tiene valor diagnóstico.
- Demuestra una entidad diferente como úlceras piógenas, esporotricosis, etc.
- Con frecuencia se usa la expresión biopsia de piel “compatible” con leishmaniasis. Indica duda o probabilidad. No debe tomarse como un diagnóstico concluyente.

### **Leishmaniasis mucosa**

Biopsia de mucosa nasal:

## Histopatología de la leishmaniasis mucosa

El cuadro histológico es semejante al de las úlceras cutáneas: dermatitis difusa, rica en plasmocitos, con granulomas mal definidos. La hiperplasia epitelial es leve o ausente.

Es frecuente que los PMN sean más numerosos y que aún se dispongan en el centro de pequeños granulomas histiocitarios no epitelioides, semejando el granuloma supurado de la micosis. No hay granuloma epitelioides o está pobremente definido y las células gigantes son escasas. En los estudios realizados en el INS se han encontrado amastigotes en el 51% de los casos.

## Leishmaniasis visceral

Examen parasitológico directo de médula ósea:

Procedimiento:

Debe realizarse únicamente por personal médico debidamente entrenado, bajo condiciones de rigurosa asepsia.

- Anestesiarse el lugar de la punción con xilocaína simple al 2%.
- Llevar a cabo la punción con jeringa heparinizada ajustada con aguja de grueso calibre o trocar.
- Aspirar cerca de 0.5 ml de material.
- Extender 0.2 ml del material en varias láminas porta-objeto y dejar secar a temperatura ambiente.
- Colorear con Giemsa o Wright.
- Leer al microscopio.

Interpretación:

Se considera una muestra positiva cuando se observan uno o más amastigotes de leishmania intra o extra celulares.

## Examen parasitológico directo de aspirado de bazo

Procedimiento: Debe realizarse únicamente por personal médico debidamente entrenado y en un medio hospitalario bajo condiciones de rigurosa asepsia. El paciente debe tener una esplenomegalia que llegue como mínimo a la porción inferior del hipocondrio izquierdo. Palpar el bazo y localizar la punta de éste; la punción nunca debe hacerse cerca de la punta por peligro de causar desgarros y hemorragias.



- Localizar la línea media clavicular. El punto de referencia para hacer la punción es la intersección de esta línea y la línea inferior del hipocondrio izquierdo o un poco por encima.
- Limpiar muy bien el área con alcohol yodado.
- Se introduce verticalmente en la piel una aguja calibre 25 en una jeringa desechable. Hacer vacío de 1ml.
- Una vez hecho el vacío, se empuja rápidamente la aguja hacia el bazo con un ángulo de 45 grados (hacia arriba) y se retira inmediatamente. El émbolo de la jeringa no se debe tocar. El vacío se encarga de realizar el aspirado del material necesario.
- Al extraer la aguja, hacer compresión firme en el sitio en el cual se realice el aspirado durante por lo menos 20 minutos. El paciente debe permanecer en observación en el hospital durante las doce horas siguientes.
- El material aspirado se extiende en varias láminas porta-objetos y se puede sembrar una muestra en medios de cultivo apropiados.
- Fijar las muestras con metanol y colorearlas con Giemsa o Wright.
- Interpretación:

Consultar lo anotado en médula ósea.

Histopatología de la leishmaniasis visceral.

En general el extendido del aspirado de médula ósea o de bazo son suficientes para confirmar el diagnóstico. Por ello, no es necesario realizar estudio histopatológico. La patología en la leishmaniasis se caracteriza por que el hígado presenta hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer, y granulomas en los espacios porta, constituidos por macrófagos que contienen amastigotes y por abundantes plasmocitos. En el bazo se observa hiperplasia de los folículos linfoides, congestión severa de los sinusoides y frecuentes macrófagos con amastigotes.

#### Pruebas serológicas:

- Detección de anticuerpos por ELISA o IFI
- Procedimiento para toma y remisión de muestras:
- Por punción tomar 10 ml de sangre sin heparinizar.
- Dejar retraer el coágulo a temperatura ambiente por una hora.
- Centrifugar esta muestra a 1.500 revoluciones durante 5 minutos.
- Separar el suero en el tubo estéril con tapa de caucho.
- Marcar y rotular el tubo con los datos del paciente.
- Enviar las muestras de suero debidamente rotuladas, empacadas y refrigeradas a 4°C al laboratorio de referencia respectivo junto con un resumen de la historia clínica en el que se incluyan los principales datos clínicos, paraclínicos y epidemiológicos.

Interpretación:

Se considera positiva con títulos mayores o iguales a 1:32.

### **Prueba de Napier**

Procedimiento:

Se toma 1 ml de suero y se le agrega 1 ó 2 gotas de formol comercial (35-40%) se agita y se observa durante una hora.

Lectura:

Según Torrealba, puede hacerse de la siguiente manera:

++++: Coagulación y opacificación completas. +++ : Coagulación y opacificación acentuadas. ++ : Coagulación y opacificación moderadas + : Coagulación y opacificación leves.
---

Negativa = Ausencia de coagulación y opacificación.

A cada resultado sigue el tiempo en minutos en el cual fue alcanzado.

Interpretación:

Una prueba positiva indica inversión de la relación albúmina/globulina y es por lo tanto compatible con el diagnóstico de leishmaniasis visceral. Sin embargo, la prueba no es específica pues puede ser positiva en cualquier otra entidad en que haya inversión de esta relación. Además su sensibilidad tampoco es buena y un resultado negativo no descarta el diagnóstico.