**APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE *LEISHMANIA SPP* EN ÁREAS ENDÉMICAS DE CHACO, ARGENTINA: A PROPÓSITO DE UN CASO.**

Marcelo Gabriel Medina1, Horacio Lucero1.

1. Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Resistencia, Chaco, Argentina.

CP3500. Las Heras 725. drmarcelomedina@gmail.com

**RESUMEN**

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria zoonótica causadas por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, que afecta la piel, las mucosas y los órganos internos. Se calcula que existen 12 millones de personas infectadas en el mundo y 2 millones de casos nuevos por año. La forma cutánea pura es la más frecuente en nuestro país, siendo la provincia del Chaco, una de las zonas endémicas. En este artículo se comunica el caso clínico de un paciente de sexo masculino de 74 años de edad, sin antecedentes personales de interés que acude a la consulta al área de dermatoinfectología del Instituto de Medicina Regional, Chaco, debido a la aparición de tres lesiones cutáneas vegetantes-verrugosas, de ocho meses de evolución, asintomáticas localizadas en miembro superior izquierdo y en ambos flancos abdominales, de seis centímetro de diámetro e inflamatorias. El estudio histopatológico reveló presencia de amastigotes de *Leishmania* y se realizó la tipificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Leishmania*, confirmando diagnóstico de *Leishmania brasiliensis*. Se instauró tratamiento con antimoniato de meglumina y en dos semanas se observó la resolución completa de las lesiones dejando cicatriz residual.

**INTRODUCCIÓN**

Las leishmaniosis constituyen un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas causadas por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, presentes en el citoplasma de los macrófagos de humanos y otros vertebrados en la forma de amastigotes, y como promastigotes en el intestino de los dípteros vectores1.Se calcula que existen 12 millones de personas infectadas en el mundo y 2 millones de casos nuevos por año2. El ciclo biológico de *Leishmania sp*. ocurre en dos hospederos: uno vertebrado (el ser humano y otros mamíferos) y en vectores como los artrópodos de los géneros *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) o *Phlebotominae* (Viejo Mundo)1. Las manifestaciones clínicas son variables y dependen de una compleja interacción entre la estructura antigénica, las características patogénicas del parásito y el sistema inmune del huésped3,4. En América, esta antropozoonosis, abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, y la especie más frecuente en Argentina y agente etiológico de la leishmaniosis cutánea o mucocutánea, es la *Leishmania braziliensis*1,2. En el diagnóstico de certeza se consideran tres criterios que deben ser abordados en el siguiente orden: 1) antecedentes epidemiológicos; 2) cuadro clínico sugestivo de leishmaniosis; y 3) exámenes de laboratorio métodos directos parasitológicos e indirectos o inmunológicos5. La PCR y sus variantes, en combinación con otras técnicas moleculares, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico, como la leishmaniosis. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, aunado a la alta especificidad y sensibilidad, están siendo aplicadas a una gran cantidad de patologías6.El objetivo de la presentación es valorar la importancia de la detección y tipificación de *Leishmania* a través de biología molecular la cual proporciona un método de mayor sensibilidad y especificidad, sobre todo en áreas endémicas.

**DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO**

Hombre de 74 años de edad, de Quitilipi, Chaco, Argentina, sin antecedentes personales de interés que acude a la consulta al área de Dermatoinfectología, del Instituto de Medicina Regional, Chaco, por la aparición tres lesiones cutáneas vegetantes-verrugosas, asintomáticas localizadas en miembro superior izquierdo y en ambos flancos abdominales (fig.1 y 2), de seis centímetro de diámetro, bordes y límites bien definidos, inflamatorias de ocho meses de evolución. El paciente no lo relacionaba con nada en concreto. No presentó fiebre ni ninguna otra manifestación clínica. Refiere antecedentes de picaduras de mosquitos. Su médico le había indicado tratamiento antibiótico sistémico y curaciones planas locales, sin observarse mejoría, por lo que es derivado, para diagnóstico y tratamiento.

**PRUEBAS DIAGNÓSTICAS**

A la exploración física presentaba una úlcera en región anterolateral de brazo izquierdo y dos úlceras en ambos flancos abdominales de bordes elevados y eritematosos con centro vegetante-verrugoso, limpio. No se constataron adenopatías ni otras lesiones.

**ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS**

Se realizaron estudios microbiológicos e histopatológicos de muestras del borde y fondo de una de las lesiones. Confirmándose con tinciones especiales, Giemsa, la presencia de amastigotes de *Leishmania*. El cultivo para hongos y bacterias resultó negativo. Se solicita estudio de tipificación por PCR para *Leishmania*, tomando muestra por cepillado de lesión, confirmando diagnóstico de *Leishmania brasiliensis,* según técnicas específicas, antes reportadas (fig.3)6. Los estudios de laboratorio (hemograma, hepatograma, amilasemia, uremia y creatininemia) y el electrocardiograma estuvieron dentro de límites normales.

**CONDUCTA TERAPEUTICA**

Se instauró tratamiento con antimoniato de meglumina, a dosis de 1,5 g/día en ampollas intramuscular, durante diez días consecutivos. En dos semanas se observó la resolución completa de las lesiones dejando cicatriz residual. No se evidenciaron efectos adversos.

**DISCUSIÓN**

La leishmaniosis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes, según la Organización Mundial de la Salud, y representa un verdadero problema de salud pública en todo el mundo. En Argentina, se registran entre 150 a 370 casos anuales de leishmaniosis cutánea7. La dispersión geográfica de la leishmaniosis se debe entre otros factores, a la deforestación y la adaptación de vectores selváticos al ambiente modificado, las migraciones humanas y la urbanización desordenada. El área endémica de esta antropozoonosis, abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, una de la Provincias endémica de la leishmaniosis tegumentaria (cutánea y mucocutánea), es Chaco. La *leishmania braziliensis* es la especie más frecuente en Argentina y agente etiológico de la leishmaniosis cutánea o mucocutánea8.

Las manifestaciones clínicas son variables y dependen de una compleja interacción entre la estructura antigénica, las características patogénicas del parásito y el sistema inmune del huésped4. Las lesiones cutáneas de la leishmaniosis pueden ser únicas o múltiples y se presentan, en general, como úlceras de bordes elevados, indoloras, de fondo granuloso que pueden o no estar cubiertas por un exudado. Pueden cicatrizar espontáneamente en el término de semanas o meses, o persistir durante un año o más. También se pueden presentar formas vegetantes, verrugosas, o en placas4.

El paciente descripto, refirió antecedentes de picadura de mosquitos, luego presentó lesiones papulosas, eritematosas, que se ulceraron, con fondo granuloso y verrugoso, localizadas en áreas expuestas. Las cuales siguieron un curso crónico y persistente sin mejoría a pesar de múltiples tratamientos antibióticos. La historia y la evolución de este cuadro clínico y la falta de respuesta a los tratamientos convencionales, hizo consultar a nuestro servicio, donde se realiza la evaluación del caso y estudios complementarios.

El diagnóstico de sospecha de leishmaniosis se logra con el antecedente epidemiológico del paciente y el cuadro clínico característico. Se debe corroborar mediante exámenes de laboratorio, métodos directos parasitológicos e indirectos o inmunológicos9.

Otros métodos diagnósticos, ELISA, fijación de complemento, inmunofluoresencia directa y la PCR, con una sensibilidad y especificidad mucho más elevada para la tipificación de los parásitos y el enfoque del tratamiento9.

Los resultados de los estudios de laboratorio y serología que se le realizaron al paciente fueron negativos. En el caso que se describió, fue mediante el estudio histopatológico que se llegó al diagnóstico, al observar los granulomas y los amastigotes de *Leishmania*, aunque el estudio de biología molecular, permitió dar al diagnóstico definitivo *Leishmania* y su especie, *brasiliensis.*

La forma cutánea, puede curar en forma espontánea. Los principales tratamientos son antimoniales trivalentes o pentavalentes por vía parenteral o intralesional. Nuestro paciente realizó, tratamiento con antimoniato de meglumina, a dosis de 1,5 g/día en ampollas intramuscular, durante diez días consecutivos. En dos semanas se observó la resolución completa de las lesiones dejando cicatriz residual. No se evidenciaron efectos adversos9.

El diagnóstico certero del parásito *Leishmania* es crucial para el tratamiento oportuno de la leishmaniosis. El examen directo es de bajo costo y no requiere de equipamiento sofisticado, es la segunda prueba más sensible para detectar el parásito en las lesiones, la sensibilidad de la prueba depende de la calidad de la muestra extraída de las lesiones y el raspado simple no es el apropiado para la detección del parásito10. En cambio, la detección de Leishmaniosis, por PCR constituye una técnica, altamente sensible y específica, que permite identificar diferentes especies de *Leishmania* a partir de muestras de pacientes, reservorios y vectores10.Otra ventaja de la técnica es la reducción de tiempo y esfuerzo cuando se compara con otras técnicas10, pues, no requiere del cultivo de parásitos y puede ser empleada directamente en muestras clínicas10. Por ese motivo la técnica de PCR, adquiere importancia en la detección de leishmaniosis, en áreas endémicas.

**CONCLUSIÓN**

El interés de la presentación fue la presunción clínica del cuadro de leishmaniosis cutánea, la cual constituye una patología regional endémica de extensas regiones de Argentina, entre ellas la Provincia del Chaco. Además mostrar la importancia de la aplicación de la biología molecular en la detección y caracterización de *Leishmania*, un método de mayor sensibilidad y especificidad, constituyendo una valiosa herramienta diagnóstica para el diseño de estrategias de vigilancia y control de la enfermedad en sus diversas formas en todas las áreas consideradas como endémicas.

**PALABRAS CLAVE:** *Leishmania brasiliensis*, biología molecular, Argentina.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1.Lorenz A., Molina S., Liatto de Nógalo A., Garlatti M. et ál. Consenso sobre leishmaniasis, Sociedad Argentina de Dermatología, 2008.

2.Leishmaniasis: Actualización 2007, boletín OPS/OMS, 2007.

3.Saredi G. Manual Práctico de Parasitología Médica, 1º edición, Buenos Aires, Argentina, 2002, 51-54.

4.Salomón D., Mocarbel N., Pedroni E., Colombo J. et ál. *Phlebotominae*: vectores de leishmaniasis en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, Argentina; Medicina, Buenos Aires, 2006, 66: 220-224.

5.Sánchez L, Sáenz E, Pancorbo J, y col. Leishmaniasis. Dermatol Peru 2004;14:82-98.

6.Lucero RH, Brusés BL, Sobrado SV, Szelag EA, Rosa JR. “Detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectado”. Enf Emerg 2008; 10(3): 134-137.

7.Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7:e35671.

8.Leishmaniasis: Actualización 2007, boletín OPS/OMS, 2007.

9.Arenas R. Atlas de dermatología: diagnóstico y tratamiento. México: Interamericana-McGraw Hill, 2005.

10. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck H, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46(2): 115-24.

 

1 2

**Figura 2: Lesión de Leishmaniosis en brazo**

**Figura 1: Lesión de Leishmaniosis en Abdomen**



Figura 3. Electroferograma en Agarosa 3%.

Calle 1: Marcador de Peso Molecular 100bp

Calle 2: muestra positiva con amplicón a 126bp