



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGIA
INFORME MONOGRAFICO**



FROTIS E HISTOPATOLOGIA COMO METODOS DIAGNOSTICOS DE
LEISHMANIASIS CUTANEA

Autores:

Álvarez Marian
Granadillo Damelis
Sánchez Víctor

Tutor:

Prof. Castro Julio

Naguanagua, 2015



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGIA
INFORME MONOGRAFICO**



CONSTANCIA DE APROBACION

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el informe monográfico titulado:

**FROTIS E HISTOPATOLOGIA COMO METODOS DIAGNOSTICOS DE
LEISHMANIASIS CUTANEA**

Presentado por los bachilleres

Álvarez Marian	C.I: 25.049.035
Granadillo Damelis	C.I: 21.405.038
Sánchez Víctor	C.I:20.266.590

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado la misma, y que aunque no nos hacemos responsable de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha 05-05-2015

Profesora: Eliana López

Profesora : Liset Requena

Profesora: Luisel Rodríguez



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGIA
INFORME MONOGRAFICO



**FROTIS E HISTOPATOLOGIA COMO METODOS DIAGNOSTICOS DE
LEISHMANIASIS CUTANEA**

AUTORES:

Alvarez Marian
Sanchez Victor
Granadillo Damelis
AÑO: 2015

Resumen

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios del género *leishmania*, la demostración del agente etiológico es fundamental para diferenciar la Leishmaniasis de otras entidades clínicas, sin embargo por ser difícil el diagnóstico de esta afección y debido a la ausencia de un test 100% sensible se recomienda el uso de varios métodos diagnósticos que aporten elementos para la comprensión del cuadro histopatológico de la parasitosis. El objetivo general de esta investigación, es comparar la eficacia del frotis y la histopatología aplicados para el diagnóstico de la *Leishmaniasis cutánea* pretendiendo el logro del mismo mediante: la descripción del parásito, la exposición del fundamento del diagnóstico y revisar la importancia del Frotis y la Histopatología en el diagnóstico de la parasitosis. La metodología utilizada en esta investigación fue de tipo documental y bibliográfica, dicha información será un gran aporte ya que permite la comprensión y análisis sobre la eficacia del frotis e histopatología en el diagnóstico de *Leishmaniasis cutánea*. La información suministrada es relevante al caso pues cada uno de los estudios logra revelar diversos elementos que colaboran con la certeza del diagnóstico definitivo facilitando al patólogo la información mediante la observación de las pruebas.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea, histopatología, frotis por aposición



**UNIVERSITY OF CARABOBO
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF BIOMEDICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH
T.S.U. IN HISTOTECNOLOGY
MONOGRAPHIC REPORT**



**SMEAR AND HISTOPATHOLOGY AS METHODS OF DIAGNOSIS OF
CUTANEOUS LEISHMANIASIS**

**AUTHORS:
Alvarez Marian
Sanchez Victor
Granadillo Damelis
Year: 2015**

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by Protozoan parasites of the genus leishmania, the demonstration of the Etiologic Agent is essential to differentiate between Leishmaniasis for other clinical entities, however for being difficult the diagnosis of this condition and the absence of a test 100% sensitive recommends the use of various diagnostic methods that provide elements for the understanding of the histopathological picture from the parasitic disease. The overall objective of this research is to compare the efficacy of the smear and histopathology applied to the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis pretending to the achievement of the same using: description of the parasite, the exhibition of the Foundation of the diagnosis and review the importance of smears by apposition, scarification and histopathology in diagnosis of the parasitic disease, The methodology used in this research was documentary and bibliographic, such information will be a great contribution since it allows understanding and comparison on the revision of the smear and histopathology in diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. The information provided is relevant to the case each of the studies achieved reveal different elements that collaborate with the certainty of the definitive diagnosis providing the information by means observing the tests by the pathologist.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, histopathology, apposition smears.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CONSTANCIA DE APROBACIÓN.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN.....	6
RESEÑA HISTORICA.....	11
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION.....	13
DESCRIPCION DEL PARASITO	14
VECTOR Y MODO DE TRANSMISION.....	14
CICLO VITAL.....	15
FORMAS CLINICAS.....	16
PATOLOGIA.....	17
DIAGNOSTICO.....	17
FROTIS.....	18
FROTIS POR APOSICION.....	18
FROTIS POR ESCARIFICACION.....	19
EI PROCESO DE OBTENCION DE LA MUESTRA.....	19
PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	20
HISTOPATOLOGIA.....	20
CONCLUSIONES.....	23
RECOMENDACIONES.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	25

INTRODUCCION

Los parásitos son seres que viven a expensas de otros seres vivos llamados hospedadores, a este tipo de asociación se le llama parasitismo, es cuando un ser vivo (parásito) se aloja en otro de diferente especie (huésped u hospedero) del cual se alimenta. El parasitismo abarca desde los virus hasta los artrópodos, pero por costumbre se ha restringido el término parásito para aquellos organismos que pertenecen al reino animal. Algunas especies de parásitos dependen del huésped para su proceso de maduración. Se clasifican según su localización en relación al cuerpo del huésped, según la complejidad de los ciclos biológicos, según la relación temporal del parasitismo, según la obligatoriedad del parasitismo y según la especificidad del huésped.

La Leishmaniasis representa un conjunto de enfermedades producidas por diferentes especies del parásito del género *Leishmania* y pueden producir una variedad de manifestaciones clínicas y patológicas, que pueden ir de úlceras cutáneas de resolución espontánea hasta graves afecciones viscerales. Entre esos dos polos hay una gama amplia de posibilidades clínicas. Las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad son dependientes tanto de la especie de *Leishmania* infectante, como de la respuesta inmune del huésped ¹.

Las características morfológicas de los protozoos de este género corresponden a dos formas parasitarias, que adoptan según su ciclo de vida: Formas amastigota que son intracelulares y promastigotes en los vectores que pasan al vertebrado por la picadura. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos, que corresponden a diferentes especies de flebótomos y el reservorio son animales vertebrados. Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped. Las lesiones son causadas por un protozoario del género *Leishmania*, con más de 20 especies identificadas a nivel mundial; por lo menos la mitad de ellas han sido encontradas en América.

Las formas del parásito están relacionadas con el ciclo de vida, como se mencionó anteriormente son dos: promastigota, forma flagelar, que se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector del género *Lutzomyia* y en cultivos; la forma amastigota (aflagelar) se encuentra en los tejidos del hombre y de los animales susceptibles a la inoculación del parásito. Excepto en Australia, esta afección está presente en todos los continentes. En el continente americano se han reportado casos desde el norte de Argentina hasta el sur de Texas y un estudio del Centro Médico de la Universidad de Maryland, ha informado del contagio entre algunos militares que regresaron del golfo Pérsico.

En Venezuela la Leishmaniasis es un serio problema de salud pública, las manifestaciones más frecuentes son la *Leishmaniasis cutánea* y la *mucocutánea*² se han identificado casos de *Leishmaniasis cutánea* en las distintas áreas endémicas del país.

Existen una variedad de especies de mosquitos que están asociados a la *Leishmaniasis tegumentaria* y *Lutzomyia longipalpis* (Vector), los cuales están asociados específicamente con la transmisión de la *Leishmaniasis visceral*. Se ha demostrado que las especies del parásito más comúnmente implicadas en la producción de Leishmaniasis en Venezuela son *L. braziliensis*, produciendo cuadros cutáneos con tendencia a invadir las mucosas y *L. mexicana*, caracterizado por producción de una Leishmaniasis fundamentalmente de piel con raro alcance mucoso. Siendo la forma clínica más frecuente, la de la *Leishmaniasis cutánea* localizada, seguida por la *Leishmaniasis cutánea mucosa*, la *Leishmaniasis cutánea intermedia* y la *Leishmaniasis cutánea difusa*.

En Venezuela el primer caso fue diagnosticado en el estado de Trujillo por Eudoro González y Juan Iturbe³ en 1917. En 1948 Convit y Lapenta describen el primer caso de Leishmaniasis difusa en Venezuela⁴ y en 1974 Convit y Pinardi describen la variedad clínica e inmunológica de la *Leishmaniasis tegumentaria*³.

Entre los signos clínicos de la Leishmaniasis cutánea, se encuentran las afecciones de la piel y las membranas mucosas. Las llagas en la piel por lo regular comienzan en el sitio de la picadura del flebótomo. La lesión inicial puede ser una pápula o eritema papuloso muy rico en parásitos, constituyéndose una reacción inflamatoria con predominio de histiocitos, linfocitos y monocitos, existiendo gran proliferación de la capa epitelial. Estas lesiones pueden regresar constituyendo casos “abortivos” y entonces hay una mayor manifestación inflamatoria llevando a la pérdida de tejido y a la formación de ulcera.

El diagnóstico definitivo de la Leishmaniasis es difícil por lo que es necesario para ello la observación del agente; pues tiende a confundirse con múltiples enfermedades como: Esporotricosis, tuberculosis cutánea, úlceras traumáticas, úlceras venosas, úlceras falcémicas, blastomycosis, sarcoidosis, carcinoma escamoso, carcinoma basocelular, linfoma cutáneo de células B, pioderma gangrenoso, entre otras. Como los criterios clínicos y epidemiológicos sólo permiten hacer un diagnóstico probable de la enfermedad, es indispensable la utilización de pruebas de laboratorio para lograr un diagnóstico definitivo.

Los signos clínicos son variables, como hemos descrito anteriormente; la histopatología es similar a otras enfermedades inmunomediadas y no existe un test diagnóstico 100% específico disponible. En el diagnóstico final se deben tener en cuenta varios métodos; fundamentándose en la demostración del agente etiológico mediante la observación del parásito en los frotis obtenidos de lesiones y estudios histopatológicos. En las Leishmaniasis superficiales, el agente etiológico debe ser buscado en las lesiones. Es bastante útil en lesiones recientes, cuando aún no existe ulceración y sin infección secundaria. En las úlceras el material será retirado preferiblemente de sus bordes. Con el material se hace un frotis y se colorea con Giemsa. La búsqueda de parásitos en las lesiones es más difícil, porque habitualmente son pobres en ellos, por lo que hay que realizar de dos a tres laminas para aumentar la sensibilidad del método. Si se practica una biopsia, el tejido puede examinarse histológicamente, lo cual va a permitir el estudio anatomopatológico; pues como ya se ha comentado más extensamente, el

polimorfismo clínico es extraordinario, lo que obliga a plantear diagnósticos diferenciales a veces complejos.

No obstante, en las zonas endémicas, particularmente, puede existir, en las formas típicas, una certeza diagnóstica muy razonable, a pesar de lo cual suele ser recomendable hacer una confirmación con uno o más de los otros métodos pudiendo ser estos el frotis y la histopatología, teniendo el primero respaldo en este último tomando en cuenta que la observación del parásito se dificulta por los pocos amastigotas presentes en el frotis, requiriendo así un complemento dado por el estudio histológico de muestras de lesiones, ya que en los casos donde no es posible demostrar la presencia del parásito, el diagnóstico debe establecerse sobre la base de criterios clínicos, epidemiológicos, inmunológicos e histopatológicos. De la misma forma, es importante resaltar que el diagnóstico puede ser parasitológico e inmunológico.

El diagnóstico parasitológico se realiza tomando muestra del borde de la lesión, ya sea por raspado o aspirado o por sección de un pequeño fragmento de piel para practicar frotis por aposición, por escarificación y coloración con Giemsa para buscar las formas amastigotas. La biopsia nos permite estudiar el tipo de reacción histológica, sembrar en medio de cultivo e inocular animales susceptibles para iniciar la caracterización del parásito.

En este sentido, la siguiente investigación, tiene como objetivo general comparar la eficacia del Frotis y la histopatología aplicados para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, pretendiendo el logro del mismo mediante: la descripción del parásito, la exposición del fundamento del diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea y revisar la importancia del Frotis y la Histopatología en el diagnóstico de la parasitosis.

La metodología utilizada en esta investigación fue de tipo documental y bibliográfica, que consiste en un proceso basado en la búsqueda, recuperación, análisis e interpretación de datos secundarios donde investigaciones previas y fuentes de información, impresas, electrónicas y datos audiovisuales tienen el

propósito de ampliar y profundizar los conocimientos sobre el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea mediante el uso del frotis e histopatología.

Reseña histórica

La Leishmaniasis ha causado alta morbilidad y mortalidad desde hace miles de años, habiéndose encontrado representaciones de lesiones cutáneas y mutilaciones de labios y nariz, característica de espundia, hoy conocida como *Leishmaniasis cutáneo mucosa* que datan de 400 a 900 años después de cristo, hechas por los incas en Perú. A través de estudios paleontológicos, fueron descubiertas momias con lesiones en piel y mucosas características de Leishmaniasis. La Leishmaniasis es conocida por varios nombres: úlcera oriental, botón de Biskra, furúnculo de Aleppo, Furúnculo de Jericó. En Arabia Saudita es conocida como la hermana menor (Al OKTH) por estar presente en todas las familias. En América Central y Sudamérica es conocida como botón doloroso, úlcera del chiclero, úlcera de la playa, tubérculo de los bosques, tubérculo de los arbustos, buba y uta.

Se piensa que la enfermedad se originó en Asia central en reservorios zoonóticos, alrededor del siglo XIV pasó a la india, el mediterráneo y eventualmente al oeste de África. En el continente americano, representaciones de lesiones en piel y deformidades faciales han sido encontradas en piezas pre-colombinas en el Perú y Ecuador, que datan del primer siglo antes de Cristo. Ello es evidencia de que las formas cutáneas y mucocutánea de Leishmaniasis prevalecieron en el nuevo mundo antiguamente.

La Leishmaniasis era conocida hace cientos de años, la primera y más importante descripción clínica fue descrita en 1.756 por Alexander Russell al examinar a un paciente Turco. Es la primera descripción en inglés, era conocida por los nativos como "Habbet El Sene", que significaba ulcera de medio año. Sin embargo, es hasta 1903 que Leishman⁴ en Londres descubrió los corpúsculos ovoides causantes del Kala azar, e identificado como miembro de la familia Trypanosotomidae, esto fue confirmado por Donovan en la India. Ross, ese mismo año, nombró el parásito *Leishmania donovani*. Ese mismo año Charles Donovan repite el hallazgo de Leishman en muestras de bazo de autopsias de tres

pacientes hindúes. También en 1903 Ross propone el género *Leishmania* para estos organismos, y James Wright da la primera descripción detallada del protozoo causante de *Leishmaniasis cutánea* y logra la coloración adecuada⁵. En 1904 Meinsil destaca la semejanza entre los parásitos presentes en úlceras cutáneas y los observados en pacientes con botón de oriente. En 1911 Vianna propone el nombre de *L. braziliensis* para los agentes causales de lesiones cutáneas en Minas Gerais (Brasil). En 1911 Wenyon sugirió que el mosquito era el vector y en 1921 los hermanos Sergent confirmaron esto con voluntarios que fueron picados por los mosquitos y desarrollaron la enfermedad

En Venezuela el primer caso fue diagnosticado en el estado de Trujillo por Eudoro González y Juan Iturbe en 1917. En Venezuela el primer caso clínicamente descrito fue en 1.917 y en 1.919 clínica y parasitológicamente. En la década de los cuarenta se hace el primer reporte de *Leishmaniasis Cutánea Difusa* (LCD). El primer caso de *Leishmaniasis Visceral* descrito en Venezuela, fue reportado procedente del área rural de las Mercedes del Llano en el estado Guárico en la década de los cuarenta. El Dr. José María Bengoa, primer médico rural del Municipio Andrés Eloy Blanco, Sanare, entre los años 1938 -1940 recién graduado y llegado de España le llamó la atención la presencia de unas lesiones ulcerosas en la piel en pacientes de la localidad. Posteriormente, le envía una comunicación al Dr. Sánchez Scoviza, dermatólogo, quien le responde que esta es probablemente una patología tropical conocida como Leishmaniasis.

Para confirmar el diagnóstico le sugirió que le tomara una biopsia del borde de la lesión, en una lámina tomara un frotis por aposición y el resto la colocara en un frasco con formol para realizarle estudio histopatológico y se la enviara para realizar el diagnóstico. En 1948 se describe el primer caso de Leishmaniasis difusa en Venezuela⁶.

Antecedentes de la Investigación

Según Giganti, E (2009)⁷ quien presento su Trabajo de Grado para optar al título de Magister Scientiarum en Administración del Sector Salud. Mención Epidemiología, en la Universidad del Zulia. Titulado “Comportamiento de la *Leishmaniasis Tegumentaria Americana* en el estado Zulia”. El objetivo general de este estudio fue determinar el comportamiento de *la Leishmaniasis Tegumentaria Americana* en el estado Zulia. Desde el punto de vista metodológico, se realizó una investigación descriptiva, no experimental, longitudinal y retrospectiva. El estudio estuvo constituido por 685 pacientes de ambos sexos cuyas edades estaban comprendidas entre los 0-50 años y más años con diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana, que acudieron a la Coordinación de Dermatología Sanitaria del estado Zulia.

La *Leishmaniasis Tegumentaria Americana* es una enfermedad que tiene varias formas clínicas: Leishmaniasis cutánea localizada, Leishmaniasis cutánea difusa (la más difícil de tratar) y Leishmaniasis mucocutánea, que es la forma más grave porque produce lesiones que desfiguran y mutilan la cara. El predominio de la patología fue en el sexo masculino con un 81.61%; en edades comprendidas entre 21-30 años con 22.63%, dedicados a la actividad agrícola 44.67%; la mayoría de las lesiones que se presentaron fueron tipo úlceras en el 94.60%; localizadas en miembros inferiores 49.34%; el diámetro de la úlcera varió entre 1-20 mm el 57.66%; con un tiempo de evolución de 15 semanas 72.10%; el municipio más afectado fue Machiques de Perijá 28.47%; el frotis por escarificación resultó ser la prueba más sensible con el 74.90%; tipo de tratamiento utilizado, la Inmunoterapia 62.48%. Se administró tres dosis al 52.99% de los pacientes.

Esta tesis es un gran aporte a la investigación ya que ambas tratan aspectos clínicos, debido a que se utilizó como diagnóstico un método directo, el frotis por escarificación, el cual resultó ser la prueba más sensible y por ser un método sencillo el cual es ampliamente recomendado para los programas de control de esta enfermedad en áreas endémicas.

Descripción del Parásito

Leishmania spp. Incluye un conjunto de parásitos protozoarios pertenecientes al filo Sarcomastigóforos, familia Trypanosomatidae. Se trata de organismos esféricos u ovals, con un solo núcleo en el citoplasma (cinetoplasto) y un tamaño aproximado de 1,5-2,5 x 3-6 micras. Son parásitos intracelulares obligados de muchos mamíferos, se alimentan por difusión del contenido del citoplasma de la célula hospedadora y se reproducen por fisión binaria⁸ tienen una forma flagelada o promastigota que se multiplica en el tubo digestivo del insecto vector y en medios de cultivos, y una forma no flagelada o amastigote, redondeada u ovalada que se reproduce en los tejidos del hospedador vertebrado desarrollándose en los fagolisomas de los macrófagos y proliferándose a pesar de la presencia de las enzimas lisosomales.

Se agrupan en complejos que causan diferentes formas clínicas pero morfológicamente son iguales. De su morfología se distinguen los siguientes elementos celulares: una membrana celular, citoplasmas con diferentes organelas, un núcleo, un kinetoplasto y un flagelo interno, este último sólo visible al microscopio electrónico. El núcleo generalmente se encuentra adosado al margen de la célula o hacia uno de los polos. El kinetoplasto tiene forma baciliforme o de bastoncito corto próximo al núcleo.

Vector y modo de transmisión

La Leishmaniasis es transmitida por distintas especies de dípteros de la familia Psychodidae, correspondientes al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.⁹ Los flebótomos realizan su ciclo vital completo en áreas tropicales. Su hábitat varía desde la selva húmeda hasta regiones muy áridas, siendo de preferencia lugares húmedos, oscuros y donde se encuentra bastante vegetación. La mayor parte de las especies del Nuevo Mundo viven más en selvas que en zonas arenosas. El ser humano cuando vive en zonas

donde existe el vector, o ingresa a estas áreas por causa de trabajo, corre el riesgo de ser picado por el vector y enfermarse de Leishmaniasis. Más de 350 especies de mosquitos de las Américas son conocidas, pero sólo 32 de ellos han sido implicados como vectores confirmados o sospechosos de transmitir Leishmaniasis humana ¹⁰

La *Lutzomyia* es un mosquito de 1,5 – 2 mm de tamaño que, su cuerpo está cubierto de bastantes pelos (puede ser mejor observado con una lupa) y tiene las alas erectas en forma de “V”. Tiene una forma de volar muy característica en forma de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso. Puede volar hasta 200 metros de donde se cría, sin embargo el viento lo puede transportar a distancias mayores. La picadura del vector es muy dolorosa, dejando una mancha roja y circular. El modo de transmisión se lleva a cabo a través de vectores infectados con leishmania que pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos caso de los perros o equinos; el periodo de incubación varía de pocos días hasta varias semanas, aunque generalmente las lesiones se manifiestan al mes del contacto con el vector ¹¹

Ciclo vital

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse, e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal del mosquito o vector invertebrado.

La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie de vector y de leishmania. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe. En el tubo digestivo de la hembra del vector, los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño

que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el cinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del cinetoplasto y se continúa con el flagelo libre. Cuando el vector infectado pica a un huésped le inocula entre 10 y 100 promastigotes que penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados

Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial, permanecen en estadio estacionario por aproximadamente 36 horas y luego comienzan a reproducirse ¹²

Formas clínicas

Se han descrito varias formas de Leishmaniasis de acuerdo a la localización de las lesiones. *Leishmaniasis cutánea* (LC) que produce ulceraciones en la piel expuesta, usualmente es autolimitante y confiere inmunidad. La *Leishmaniasis cutánea difusa* (LCD) es rara, pero puede ser grave cuando el sistema inmune no reacciona a la infección. La *Leishmaniasis mucocutánea* (LM) o (Espundia en Perú) se caracteriza por úlceras en piel que se extienden a las mucosas de la nariz, boca y faringe, destruyendo el tejido. Es incapacitante y desfigurante, limita el habla. Finalmente, la *Leishmaniasis visceral* (LV) o kala-azar es la más severa, produce fiebre, pérdida de peso, hepatomegalia y esplenomegalia. Debido a la inmunosupresión que produce favorece la aparición de tuberculosis, neumonía y diarrea. Tiene alta mortalidad incluso con tratamiento

La *Leishmaniasis cutánea* (LC) se clasifica en 2 tipos, uno benigno la *Leishmaniasis localizada* (LCL) y uno maligno, la *Leishmaniasis cutánea difusa* (LCD); además de una forma intermedia (LCI) en la que se encuentran las formas cutáneas crónicas (LCC) y la forma cutánea mucosa (LCM). Como se conoce en otras enfermedades infecciosas granulomatosas, cada infectado presenta una

respuesta con sus propias características de *Leishmania*, se evidencian más por la respuesta inmunológica que por el parásito; esto explica el polimorfismo de las lesiones tanto desde el punto de vista clínico como anatomopatológico ¹³

Patología

El proceso patogénico va a ser fundamentado en la destrucción celular provocada por la ruptura de los nidos de amastigote en presencia de reacción celular inflamatoria muy intensa. En la *Leishmaniasis cutánea* la lesión inicial es una pápula o eritema papuloso muy rico en parásito, constituyéndose en reacción inflamatoria con predominio de histiocitos, linfocitos y monocitos, existiendo gran proliferación en la capa epitelial. En estas úlceras la dermis está muy inflamada y existe además una acantosis exagerada que la invade. Los bordes de la lesión están muy delimitados, hiperémicos y el fondo de la lesión es granuloso, recubierto por una capa de material necrótico de apariencia muy limpia en las úlceras sin contaminación secundaria. Hay una infiltración basal de polimorfonucleares neutrófilos y por debajo un cúmulo de linfocitos y plasmocitos que en algunos tipos de lesiones, pueden llegar a formar verdaderos nódulos histiocitarios ¹⁴

Diagnostico

Para llegar al diagnóstico de *Leishmaniasis cutánea*, primero se debe considerar los antecedentes epidemiológicos. Es importante conocer el lugar de procedencia del paciente, residencias anteriores considerando la permanencia o la visita a áreas endémicas de *Leishmaniasis cutánea*, antecedentes ocupacionales relacionados con el trabajo. Dentro de los antecedentes también se deben considerar la presencia de lesiones cutáneas anteriores que pueden haber sido catalogadas como *Leishmaniasis* o no, que demoraron en cicatrizar teniendo el antecedente de haber estado en un área endémica de *Leishmaniasis*.

Después de considerar los antecedentes, el otro diagnóstico es clínico, que de acuerdo a las características mencionadas nos inclinarán a definir si se puede tratar de una *Leishmaniasis cutánea* o *mucocutánea*. Finalmente, para confirmar

si se trata de *Leishmaniasis cutánea* se procederá al diagnóstico de laboratorio, los cuales se agrupan en métodos directos (métodos parasitológicos) y los métodos de diagnóstico indirecto que son los métodos inmunológicos. El diagnóstico definitivo de Leishmaniasis requiere la demostración del parásito, que puede ser observado en forma de Amastigota, en aquellas muestras procedentes de las lesiones, o en su forma de promastigota cuando son aislados de los cultivos. El parásito puede ser demostrado a través del frotis, cultivo, histopatología y a través de la inoculación en animales. Sin embargo este diagnóstico parasitológico muchas veces puede ser difícil de establecer, especialmente en las lesiones muy crónicas.

Los métodos indirectos se basan en la detección de la enfermedad a través de la respuesta inmune celular o de la respuesta inmune humoral, a través de anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad: estos incluyen la intradermoreacción de Montenegro (leishmanina), el método de ELISA/ DOT-ELISA y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) ^{15 - 16}

Frotis

El diagnóstico definitivo de la *L. cutánea* se fundamenta en la visualización del parásito con algún método directo y el examen más utilizado actualmente para el diagnóstico de la *Leishmaniasis cutánea* es un frotis de la lesión, el cual existen dos tipos:

Frotis por aposición

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 portaobjeto 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, sangre, fibrina,

plaquetas, etc. El factor de espesor de la muestra también distorsiona y dificulta en muchas ocasiones la visualización del agente causal. ¹⁷

Asimismo a partir de la muestra para biopsia y después de retirar el exudado en una superficie absorbente (papel filtro), se realiza varias compresiones del fragmento de tejido sobre la superficie de la lámina (impresión por aposición). Tanto el frotis como la impresión por aposición deben ser realizados en láminas porta objetos limpios, desengrasados y secos.

Frotis por Escarificación

En las lesiones iniciales sin contaminación bacteriana, es posible obtener una buena muestra y encontrar las formas amastigotes intracelulares o fuera de las células cuando éstas se rompen, por acción mecánica de la toma de muestra. La muestra para el frotis se puede obtener a través de la escarificación de la superficie o del borde de la lesión (surco dérmico), utilizando un bisturí; también algunos utilizan un palito de madera con una de sus extremidades en bisel o con un escarificador, todos previamente esterilizados. La compresión de la lesión lleva a una isquemia y aumento de la linfa dérmica, lo que puede mejorar el rendimiento de la prueba.

El proceso de obtención de la muestra se basa en:

1. Lavar la lesión con agua y jabón
2. Desinfectar con alcohol al 70% los bordes de la lesión.
3. Presionar con firmeza los bordes de la lesión hasta que empalidezca; en el borde interno, hacer una pequeña incisión con hoja de bisturí tratando de levantar la piel, secar la sangre con gasa y raspar el tejido.
4. Con el material obtenido en la hoja de bisturí, hacer el frotis en una lámina, procurando que este sea delgado y evitando pasar dos veces por el mismo sitio.
5. Rotular la lámina y dejar secar al medio ambiente.

Procesamiento de la muestra:

1. Fijar la lámina que contiene el frotis con alcohol metílico durante 3 minutos. Descartar el alcohol y dejar secar a temperatura ambiente.
2. Cubrir la lámina con solución de trabajo Giemsa (una gota de solución Giemsa stock por cada mL de solución buffer pH 7,2 – 7,4) por 30 minutos.
3. Descartar el colorante y lavar ligeramente con agua corriente.
4. Secar al medio ambiente y hacer la lectura con lente de inmersión ¹⁸⁻¹⁹

Este método no es realizado por un Histotecnólogo sin embargo el material obtenido de biopsias de piel destinado a un estudio histopatológico el cual si corresponde al campo de la Histotecnología, puede ser usado también para este estudio, y en el caso de complementarse la histopatología con el uso del frotis para llegar al diagnóstico definitivo de la *Leishmaniasis cutánea* la información suministrada es relevante al caso pues cada uno de los estudios logra revelar diversos elementos que colaboran con la certeza del diagnóstico definitivo facilitando al patólogo la información mediante la observación de las pruebas.

Histopatología

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.

Por lo que, el estudio histopatológico de una muestra tomada por biopsia permite hacer el diagnóstico en muchos casos, al observar la presencia de amastigotas intracelulares. La importancia de la histopatología como complemento del frotis en el diagnóstico de *Leishmaniasis cutánea*, radica básicamente en que de manera general hay pocos amastigotas en el frotis, por lo cual al dificultarse la observación

del parásito se requieren de otros patrones para asegurar o descartar la presencia de la enfermedad, siendo *la Leishmaniasis cutánea* una enfermedad que afecta los tejidos, un estudio histopatológico podría evidenciar cambios tisulares característicos y/o demostrar el parásito corroborando así la sospecha de la enfermedad. Por lo que, en las formas crónicas no siempre se logra demostrar los parásitos, Pero el cuadro histopatológico hace sospechar la enfermedad y cuando se forman granulomas se observan células epiteloides y células gigantes de Langerhans

En la histopatología se encuentra tanto para las formas cutáneas y mucocutáneas una inflamación crónica, frecuentemente granulomatosa, comprometiendo la dermis o el corión de la mucosa. En las lesiones más recientes se encuentran con mayor frecuencia los parásitos que en aquellas lesiones antiguas. En la piel son más abundantes en las papilas dérmicas o en las proximidades de las áreas de necrosis donde el infiltrado se presenta más denso. Los parásitos se localizan en el intersticio o en el interior de los macrófagos.²⁰ En las 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.

En las úlceras cutáneas de recidiva, ocurren como reactivación de la lesión previa tratada insuficientemente. Las biopsias muestran procesos granulomatosos epiteloides, ricos en linfocitos, mucho más que la lesión inicial y en la que es difícil de demostrar la presencia de amastigotes. 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 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 epiteloides bien definidos. En la

otra el ganglio satélite presenta acúmulos corticales y paracorticales de macrófagos vacuolados que fagocitan abundantes amastigotes.

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.

CONCLUSIONES

Expuestos en las páginas precedentes los resultados de las investigaciones, es el momento ahora de recoger, a modo de síntesis las conclusiones extraídas del proceso de análisis. Estas permiten responder a las preguntas que se plantean al comienzo de este trabajo. Así mismo, se ha podido validar la importancia de la aplicación de estudios histopatológicos y frotis en el diagnóstico de *Leishmaniasis cutánea*, siendo esta la forma de la infección con mayor distribución a nivel mundial; Un tercio de los casos ocurre en cada una de las siguientes regiones epidemiológicas: Las Américas, el Mediterráneo, y en Asia.

La *Leishmaniasis cutánea* es una enfermedad endémica en Venezuela, con una tasa de incidencia media anual de 10,06 casos/100.000 hab, sin variaciones significativas de 1995 a 2004, pero con gran variación entre los diferentes Estados del país²¹⁻²², siendo las regiones andina y nororiental las de mayor incidencia. La presentación clínica de la enfermedad comienza con una lesión principal en forma de pápula rodeada de halo eritematoso con una ulceración central y cubierta con una escama. Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: *Leishmaniasis cutánea localizada* (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular protectora, y *Leishmaniasis cutánea difusa* (LCD) caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel.

Para llegar al diagnóstico de *Leishmaniasis cutánea*, primero se debe considerar los antecedentes epidemiológicos, después de considerar los antecedentes, el otro diagnóstico es clínico, que de acuerdo a las características mencionadas nos inclinaran a definir si se puede tratar de una *Leishmaniasis cutánea* o *mucocutánea*. Finalmente, para confirmar si se trata de *Leishmaniasis cutánea* se procederá al diagnóstico de laboratorio, los cuales se agrupan en métodos directos (métodos parasitológicos), donde el diagnóstico definitivo de *Leishmaniasis* se fundamenta en la visualización del parásito con algún método directo y el examen más utilizado actualmente para el diagnóstico de la

Leishmaniasis cutánea, es un frotis de la lesión, el cual existen dos tipos: Frotis por aposición y Frotis por Escarificación y se puede complementar la histopatología con el uso del frotis para llegar al diagnóstico definitivo de la *Leishmaniasis cutánea*, ya que la información suministrada es relevante al caso, pues cada uno de los estudios logra revelar diversos elementos que colaboran con la certeza del diagnóstico definitivo facilitando al patólogo la información mediante la observación de las pruebas.

Recomendaciones

1. Por representar esta parasitosis un grave problema de salud se recomienda Asegurar un buen diagnóstico.
2. aplicar pruebas diagnostico en combinación para complementar los datos clínicos en caso de baja carga parasitaria en el paciente siendo relevantes y accesibles el uso de estudios histopatológicos y frotis.
3. Tomar la muestra de manera cuidadosa debido a que este factor influye mucho en la sensibilidad de las pruebas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Ortega J, Lossada M, Naranjo H, de Colmenares H. Epidemiología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana en el Municipio Vargas 1991-1994 Dermatología Venezolana 1996; 34(2):67-73.
- 2) Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis Humanas. Quinta edición Medellín Colombia. Editorial CIB (Corporación para investigaciones Biológicas) 2012
- 3) Convit J, Lapenta P. Sobre un Caso de Leishmaniasis Tegumentaria de Forma Diseminada. Rev Policlínica Caracas. 1948; 17:153-158.
- 4) Leishman WB. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. BMJ. 1903; 1:1252-54
- 5) Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). J Med Res. 1903; 10:472-482. En: Kean B, Mott K, Russell A. Tropical Medicine and Parasitology. Classic Investigations. New York: Cornell University Press; 1978.
- 6) Convit J, Lapenta P. Sobre un Caso de Leishmaniasis Tegumentaria de Forma Diseminada. Rev Policlínica Caracas. 1948; 17:153-158.
- 7) Giganti, E Tesis "Comportamiento de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana en el Estado Zulia" 2009. Ed. Zulia Disponible en: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/161/TDE-2011-11-09T08:50:17Z-2171/Publico/giganti_elizabeth.pdf
- 8) leishmania. Spp disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Parasitos/Ficha%20Leishmania%20spp.pdf>
- 9) González, F. Zerpa, O. Artículo "Leishmaniasis cutánea en la infancia "UCV. 2004)). Dermatol Pediatr Lat 2004; 2(2): 97-108
- 10) Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis Humanas. Quinta edición Medellín Colombia. Editorial CIB (Corporación para investigaciones Biológicas) 2012 Pag: 330

- 11)** González, F. Zerpa, O. Artículo "Leishmaniasis cutánea en la infancia "UCV. 2004)). Dermatol Pediatr Lat 2004; 2(2): 97-108
- 12)** Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis Humanas. Quinta edición Medellín Colombia. Editorial CIB (Corporación para investigaciones Biológicas) 2012 Pag: 317 y 318
- 13)** González, F. Zerpa, O. Artículo "Leishmaniasis cutánea en la infancia "UCV. 2004)). Dermatol Pediatr Lat 2004; 2(2): 97-108
- 14)** Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis Humanas. Quinta edición Medellín Colombia. Editorial CIB (Corporación para investigaciones Biológicas) 2012 Pag: 319
- 15)** González, F. Zerpa, O. Artículo "Leishmaniasis cutánea en la infancia "UCV. 2004)). Dermatol Pediatr Lat 2004; 2(2): 97-108
- 16)** Zerpa, O Borges, R. Loyo, N. Convit, J. Artículo Comparación de cinco métodos. Dermatología Venezolana 2002; 40:106-110 Disponible en:
revista.svderma.org/index.php/ojs/article/download/405/400
- 17)** Planas, G. Rodríguez, G. Nuevo método de examen directo para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea Técnica de extensión y concentración tisular Dermatología Venezolana. , Vol. 25-Nov. 1-2,1987 Disponible en:
<http://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/viewFile/909/884>
- 18)** Planas, G. Rodríguez, G. Nuevo método de examen directo para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea Técnica de extensión y concentración tisular Dermatología Venezolana. , Vol. 25-Nov. 1-2,1987 Disponible en:
<http://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/viewFile/909/884>
- 19)** Zerpa, O Borges, R. Loyo, N. Convit, J. Artículo COMPARACION DE CINCO METODOS DERMATOLOGIA VENEZOLANA 2002; 40:106-110 Disponible en:
- 20)** Ampuero, J Leishmaniasis. Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos N°8 Lima 2000. Disponible en
<http://www.bio-nica.info/biblioteca/ampuero2000leishmaniasis.pdf>

21) Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by scarification smear with negative biopsy of the lesion Y. Pascual-González. Disponible en

<http://www.medcutan-ila.org/images%5Cpdf%5Carticulos/2012/6/pdf/diagnostico.pdf>

22) Rodríguez-Morales AJ, Pascual-González Y, Benítez JA, López-Zambrano MA, Harter-Griep R, Vilca-Yengle LM, et al. Asociación entre la incidencia de leishmaniosis cutánea y el índice de desarrollo humano y sus componentes en cuatro estados endémicos de Venezuela. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2010; 27: 22-30.