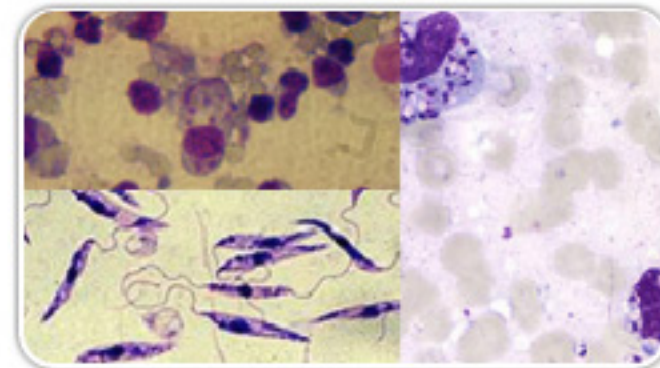


Leishmaniasis cutánea y mucosa

Diagnóstico de laboratorio



Sesión 7 - Leishmaniasis cutánea y mucosa:

Diagnostico de laboratorio

Objetivos

Conocer los principales métodos y técnicas diagnósticas de las leishmaniasis cutánea y mucosa para apoyar el diagnóstico clínico y el tratamiento.

El contenido

- ▶ Diagnóstico de laboratorio: importancia y métodos disponibles
- ▶ Métodos directos: definición y técnicas disponibles
- ▶ Métodos indirectos: definición y técnicas disponibles
- ▶ Flujogramas ante la sospecha de casos de leishmaniasis cutánea y mucosa





Es sabido que las manifestaciones clínicas de las Leishmaniasis son muy amplias y se pueden confundir con otras etiologías, entonces el diagnóstico temprano de laboratorio permite instaurar el tratamiento específico lo antes posible y así controlar la evolución de la enfermedad.

Vamos a verlo...



Importancia del diagnóstica de laboratorio en las leishmaniasis

- ▶ Son enfermedades de amplio espectro clínico
- ▶ Los hallazgos clínicos no son patognomónicos de la enfermedad
- ▶ Se requiere hacer diagnóstico diferencial con varias enfermedades con compromiso de piel y mucosas
- ▶ Los medicamentos utilizados para tratar las leishmaniasis tienen alta toxicidad

Métodos diagnósticos disponibles

- ▶ **Métodos directos:** Frotis o extendido, cultivo, biopsia y PCR
- ▶ **Métodos indirectos:** Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Elisa y Prueba de Montenegro



Métodos directos

Permiten la visualización del parásito en la muestra obtenida del paciente e incluyen:

- ▶ la visualización de amastigotes en frotis o biopsias de material obtenido a partir de piel (leishmaniasis cutánea) o de mucosas de la región oro-naso-faríngea (leishmaniasis mucosa)
- ▶ la visualización de promastigotes en cultivos del material obtenido en aspirados de lesiones en piel o mucosas
- ▶ la detección del material genético (ADN o ARN) del parásito por medio de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

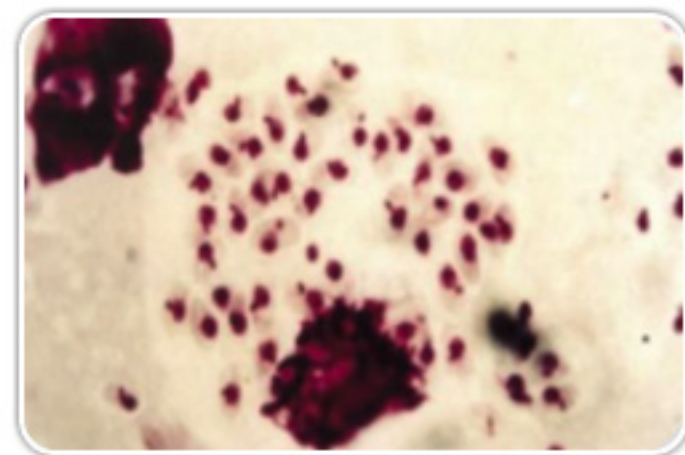


Foto: Costa, JML, CPq GM-Fiocruz, Brasil

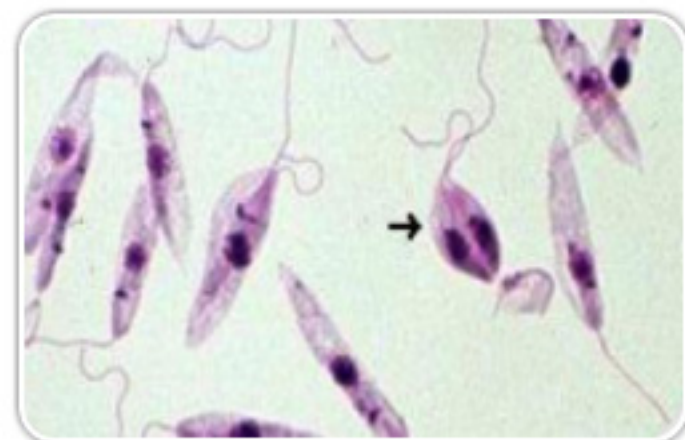


Foto: Costa, JML, CPq GM-Fiocruz, Brasil

Métodos directos

La sensibilidad es variable y depende:

- ▶ experiencia del analista
- ▶ ubicación geográfica
- ▶ especies del parásito
- ▶ tejido de donde proviene la muestra
- ▶ técnica utilizada para la toma y procesamiento de la muestra
- ▶ tiempo de evolución de la lesión y de lesiones contaminadas, una vez que reducen la sensibilidad del método
- ▶ tratamientos previos por los pacientes

Vamos ahora conocer un poco de las técnicas utilizadas:

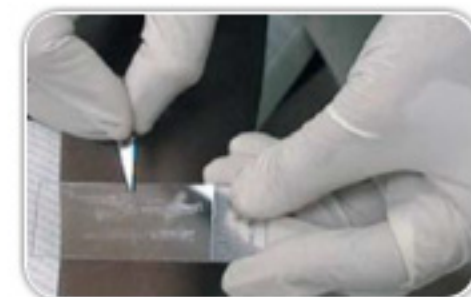
- ▶ Frotis o extendido
- ▶ Cultivo
- ▶ Biopsia y
- ▶ PCR



Métodos directos

Frotis o extendido

- Procedimiento fácil, económico y rápido de realizar
- Sensibilidad: variable – en torno de 70% a 90%
- Cuidados necesarios para mejorar la sensibilidad de la técnica:
 - hacer buena técnica de toma
 - obtener tejido del borde activo de la lesión o del centro de la úlcera
 - seleccionar la lesión con menor tiempo de evolución y sin infección
 - limpiar la lesión con jabón quirúrgico o solución salina
 - retirar la costra y el material necrótico o purulento
 - seleccionar el sitio donde se va tomar la muestra, que puede ser hecha con una hoja de bisturí y si la lesión es ulcerada se debe raspar el fondo de la úlcera
- obtener raspado o fragmento del tejido de la lesión mucosa



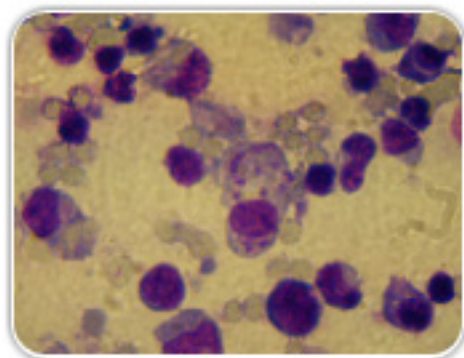
Fonte: Armando Schubach,
Fiocruz



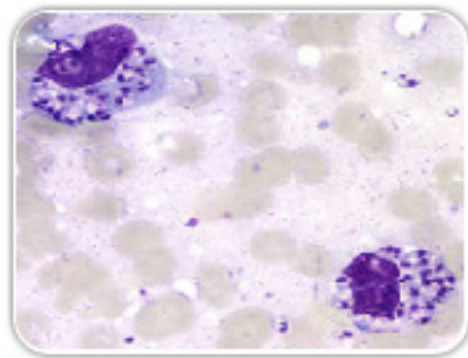
Métodos directos

Cuidados necesarios para mejorar la sensibilidad de la técnica

- ▶ extender el raspado o aspirado en forma suave sobre una lámina porta objeto nueva, limpia y desengrasada
- ▶ secar a temperatura ambiente
- ▶ fijar con metanol y procesar con la coloración adecuada
- ▶ hacer lectura al microscopio
- ▶ un mayor tiempo de lectura aumenta la sensibilidad de la técnica



amastigotas



amastigotas



Métodos directos

Cultivo: visualización de promastigotas

- ▶ Procedimiento más costoso y requiere de tiempo para el diagnóstico (cerca de 30 días)
- ▶ Sensibilidad en torno 70%

Técnica:

- ▶ Seleccionar lesión activa
- ▶ Limpiar el borde de la lesión con solución salina al 0,9% o alcohol al 70%
- ▶ Con una jeringa tipo insulina, con aguja #23-26G que contiene solución amortiguada de fosfatos (PBS) con antibióticos, hacer movimientos rotatorios durante aproximadamente dos minutos para macerar un poco de tejido
- ▶ Aspirar el material
- ▶ En condiciones asépticas se deposita la muestra en el medio de cultivo bifásico conocido como NNN y se incuba entre 24 y 26°C
- ▶ Revisar cada semana al microscopio invertido en busca de promastigotes

Métodos Directos

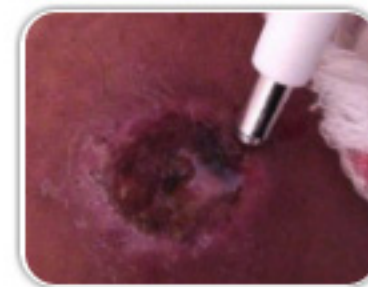


Biopsia: visualización de amastigotes

- ▶ Procedimiento más costoso y más demorado por ser un estudio histopatológico
- ▶ Sensibilidad baja para leishmaniasis, pero muy útil para diagnóstico diferencial por otras etiologías

Técnica:

- ▶ Seleccionar una lesión activa
- ▶ Limpiar el borde de la lesión con jabón quirúrgico o alcohol al 70%
- ▶ Aplicar anestesia local en el sitio de la muestra: inyectar 1 ml de lidocaína al 2% - vía subcutánea
- ▶ Introducir el sacabocado haciendo movimientos rotatorios para cortar la dermis.
- ▶ Levantar el tejido con una pinza, cortar la base de la biopsia con bisturí y depositar el material en un frasco con formal tamponado al 10% (Este material se puede utilizar para cultivo, pero es necesario poner el material en frasco con PBS más antibióticos. Se descarta el PBS, se macera el tejido y el triturado es depositado en medio de cultivo NNN y se sigue con los procedimientos mencionados en la diapositiva anterior).



Fotos biópsia: Costa, JML,
CPq GM-Fiocruz, Brasil

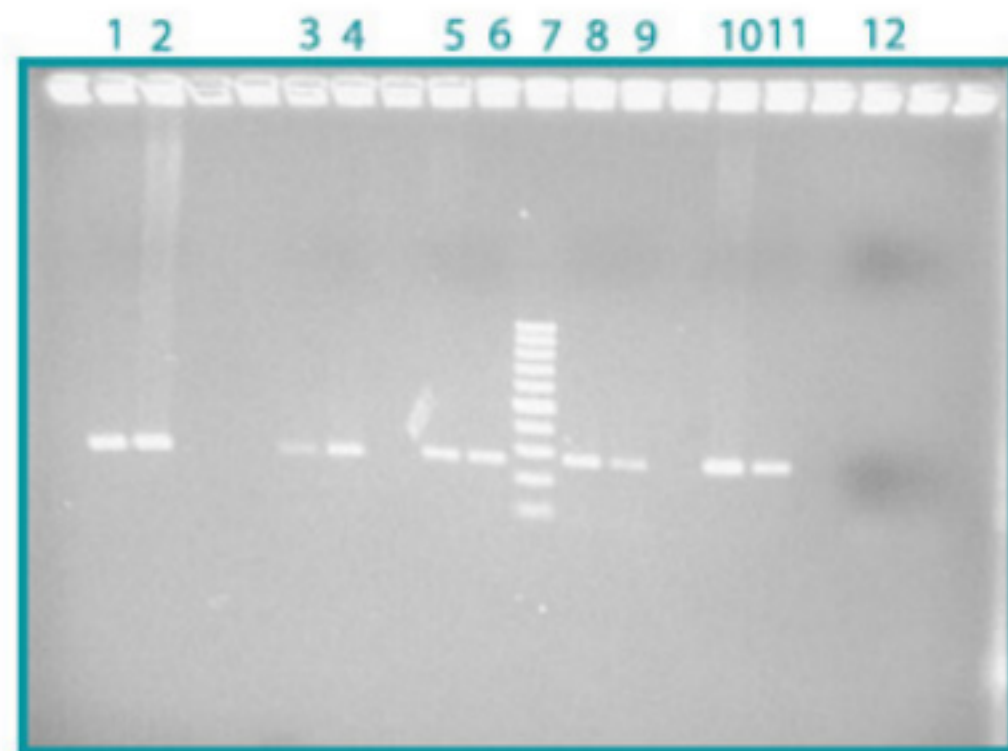


PCR: detección de material genética

- Procedimiento más costoso
- Sensibilidad y especificidad elevada, si se utilizan "primers" apropiados

Técnica:

- Seleccionar lesión activa
- El material puede ser obtenido de:
 - raspado de la lesión
 - fragmento de la biopsia preservado en alcohol puro
 - aspirado de la lesión
 - sangre total
- La técnica consiste en amplificar una región específica del ADN del parásito mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifican



PCR para la detección de ADN de Leishmania en muestras de pacientes con lesiones cutáneas y mucosas con sospecha de leishmaniasis. 1,2,3,4,5,6,, = 8,9,10,11 muestras de pacientes. 7 Peso molecular = 100 pb y 12 = control negativos

Diagnósticos de laboratorio

Métodos indirectos

- ▶ Se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *Leishmania*
- ▶ En la leishmaniasis cutánea el diagnóstico serológico es de uso limitado debido a la baja sensibilidad y especificidad variable
- ▶ Es útil en el diagnóstico de la leishmaniasis mucosa
- ▶ Cuando recomendado, las técnicas más comúnmente usadas son:
 - ▶ Inmunofluorescencia indirecta
 - ▶ ELISA
 - ▶ Prueba de Montenegro

Ahora vamos a conocer un poco de cada una de esas técnicas



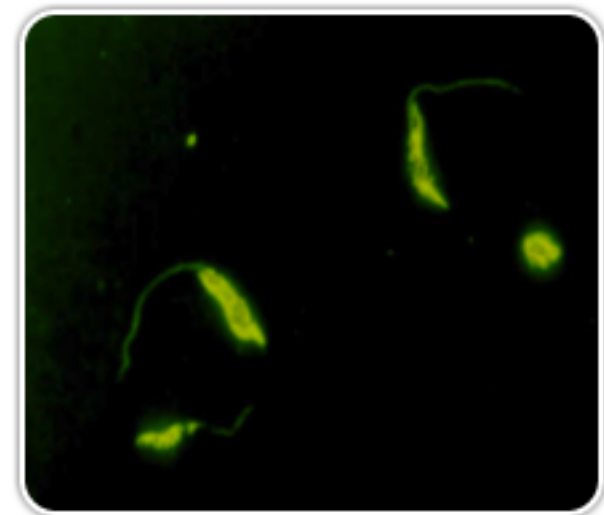
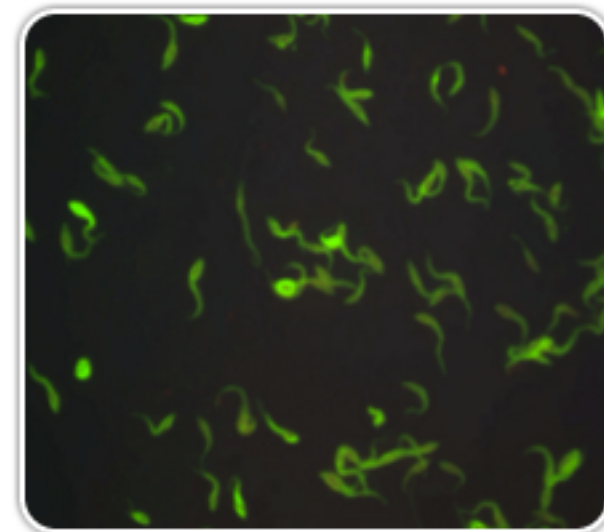
Diagnósticos de laboratorio

Métodos indirectos

- ▶ Se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *Leishmania*

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

- ▶ detecta anticuerpos específicos contra *Leishmania*
- ▶ baja sensibilidad y especificidad variable para leishmaniasis cutánea
- ▶ útil para leishmaniasis mucosa, pero se emplean como apoyo en el diagnóstico donde los títulos de anticuerpos son generalmente altos
- ▶ la toma de muestra es por medio de recolección de sangre, con posterior separación del suero

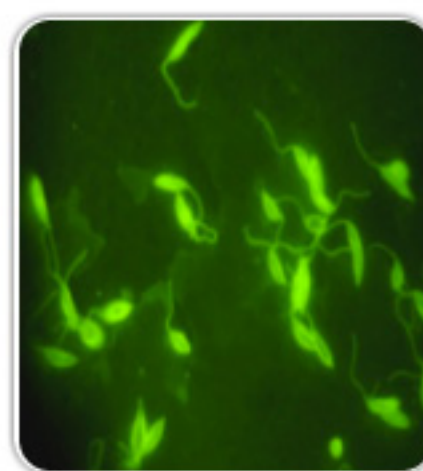


Reacción de Inmunofluorescencia indirecta (RIFI) positiva mostrando formas promastigotas de *Leishmania* marcadas por la fluoresceína. Fuente: Sucen - SP; BEPA, 2009

Diagnósticos de laboratorio

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

- ▶ procedimiento de laboratorio en el cual las láminas se leen con microscopio de fluorescencia
- ▶ La muestra se considera reactiva para anticuerpos anti-Leishmania cuando se observan los parásitos con fluorescencia de color verde intenso
- ▶ Los títulos por encima de 1:32 son significativos y por encima de 1:128 son diagnósticos



Diagnósticos de laboratorio

ELISA

- ▶ detecta anticuerpos específicos contra *Leishmania* sp
- ▶ baja especificidad
- ▶ la toma de muestra es por medio de recolección de sangre, con posterior separación del suero o plasma
- ▶ procedimiento realizado en laboratorio y la lectura de la prueba se hace en un espectrofotómetro a 492 nm.
- ▶ La muestra se considera positiva cuando la densidad óptica es igual o superior a la densidad óptica media de los sueros controles negativos más dos desviaciones estándar.



Diagnósticos de laboratorio

Prueba de Montenegro

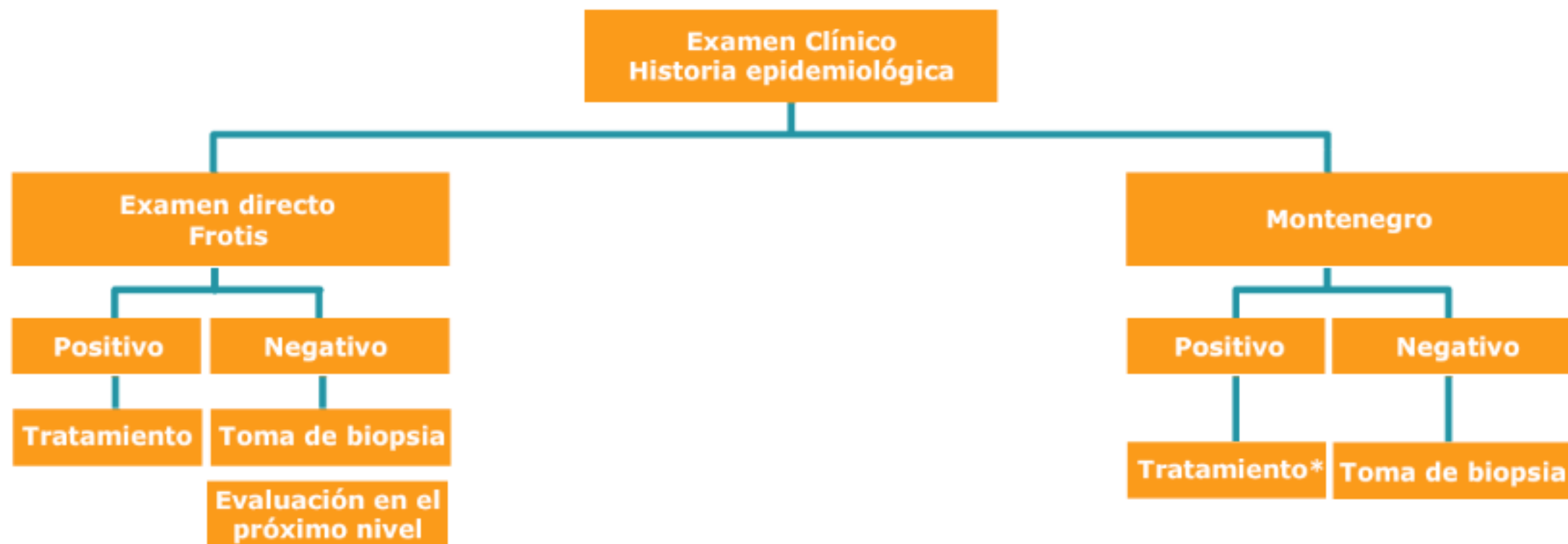
- ▶ mide la respuesta de inmunidad celular retardada
- ▶ prueba sensible y específica, pero no permite diferenciar infección previa de infección actual
- ▶ Es un apoyo en el diagnóstico, principalmente de las formas mucosas
- ▶ Técnica de aplicación y lectura:
 - ▶ Técnica de aplicación y lectura:
 - ▶ se inyecta por vía intradérmica 0,1 ml de antígeno de Montenegro (2x10 promastigotes inactivados de Leishmania)
 - ▶ la lectura se realiza a las 48 o 72 horas después de la aplicación, determinando el área de induración
 - ▶ se considera la prueba reactiva cuando el diámetro de la induración es igual o mayor a 5 milímetros

Prueba de Montenegro



Diagnóstico de laboratorio

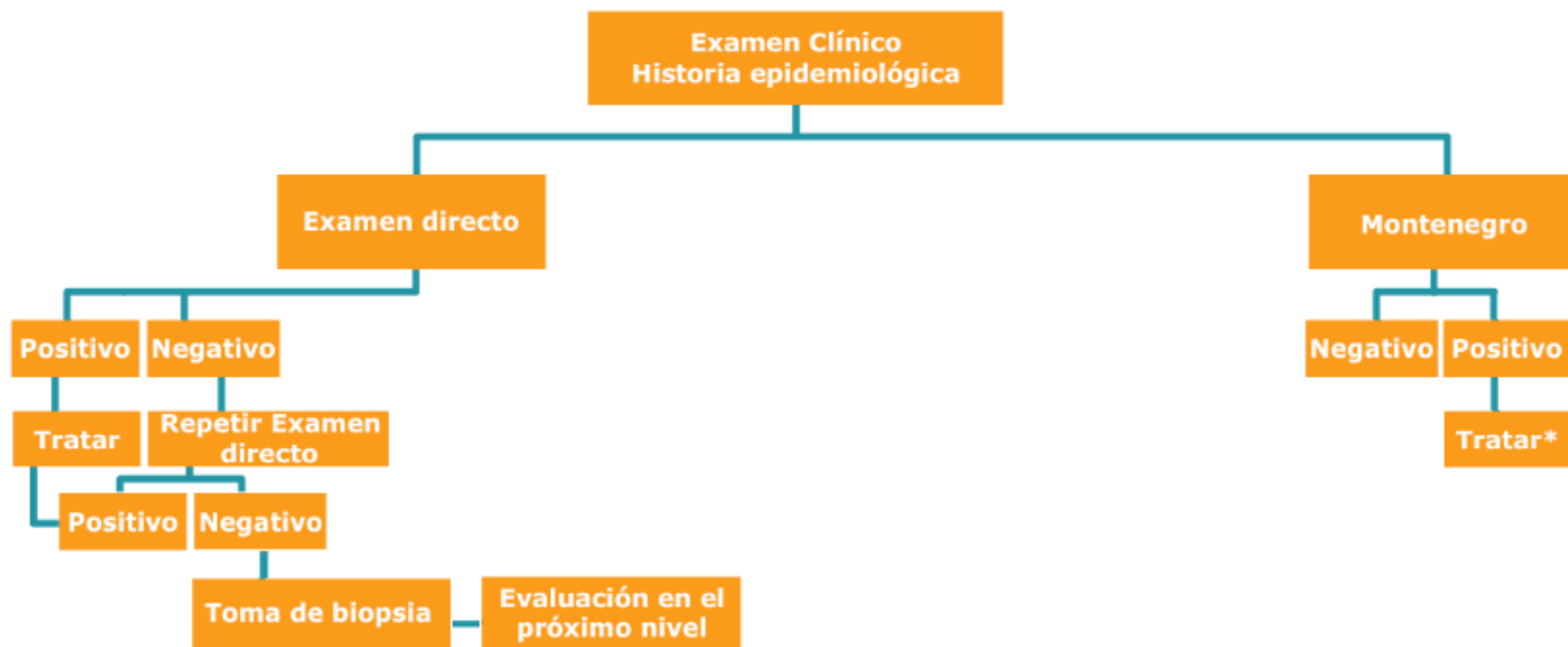
Flujograma general para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea



*El tratamiento de pacientes con examen clínico, historia epidemiológica y reacción de Montenegro positivos puede ser realizado en lugares donde no haya disponibilidad del examen directo o este no presente sensibilidad adecuada. En este caso se debe considerar la prueba terapéutica con el uso de las alternativas menos tóxicas

Diagnóstico de laboratorio

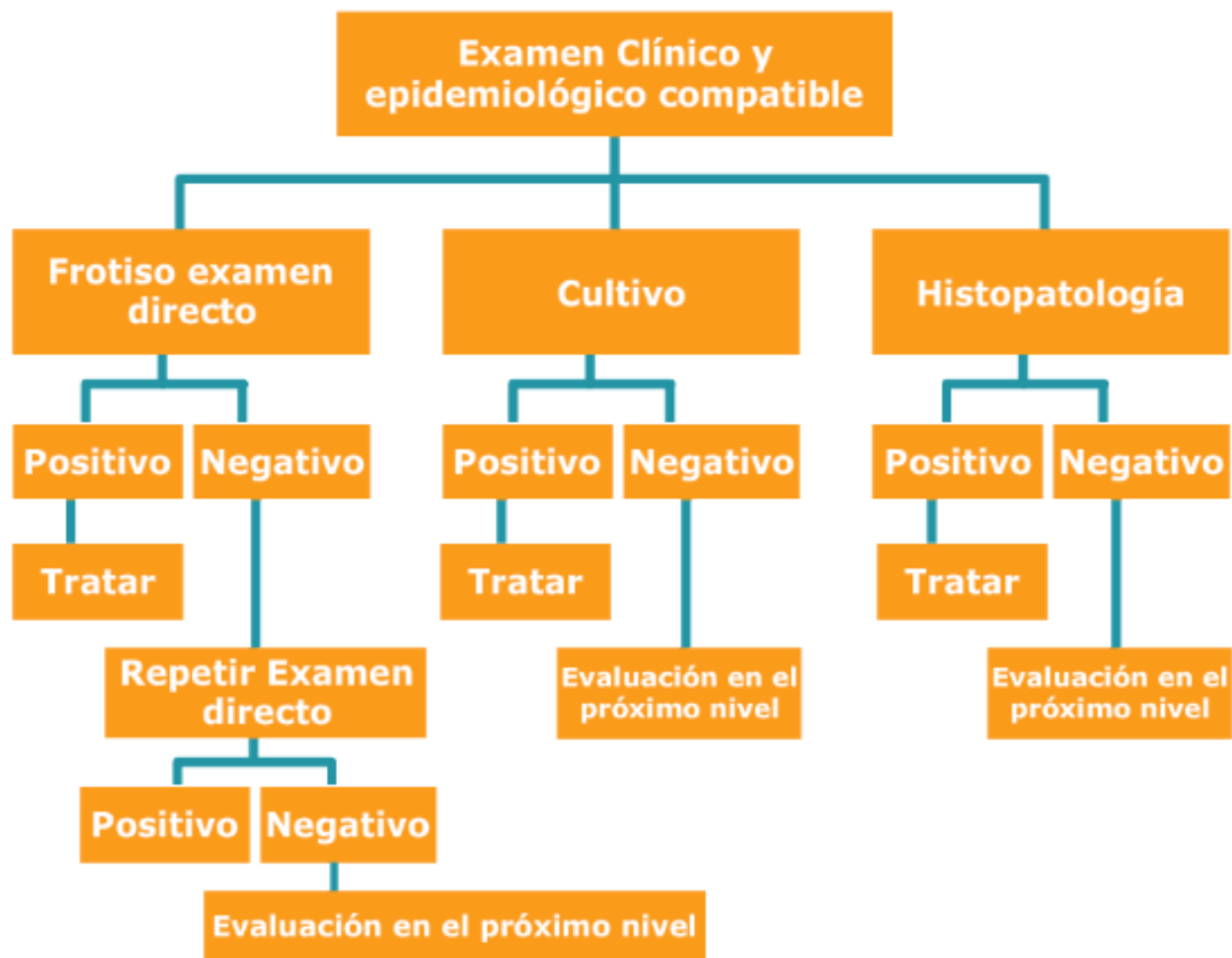
Flujograma para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en el primer nivel de atención.



*El tratamiento de pacientes con examen clínico, historia epidemiológica y reacción de Montenegro positivos puede ser realizado en lugares donde no haya disponibilidad del examen directo o este no presente sensibilidad adecuada. En este caso se debe considerar la prueba terapéutica con el uso de las alternativas menos tóxicas

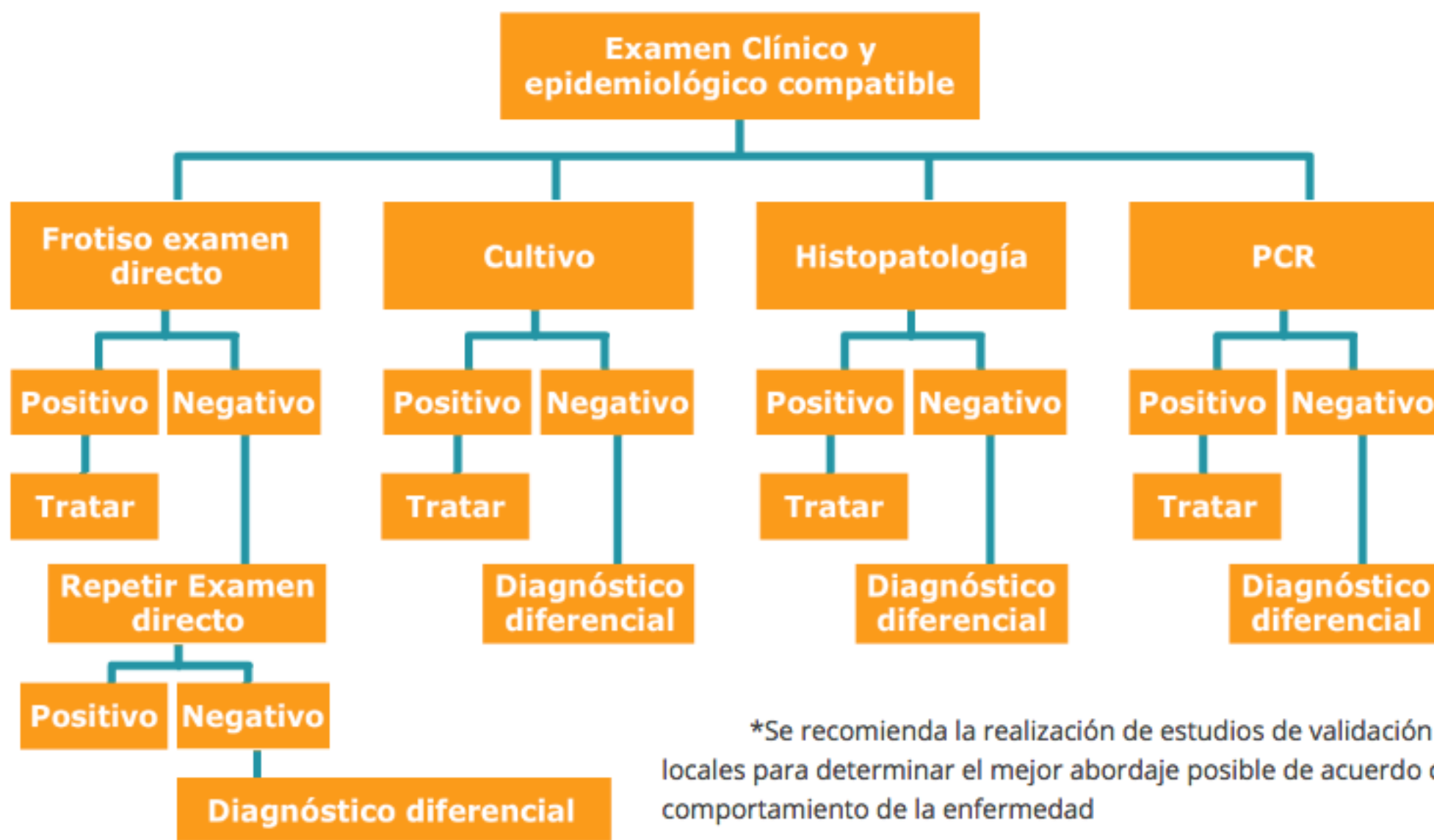
Diagnóstico de laboratorio

Flujograma para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en el segundo nivel de atención.



Diagnóstico de laboratorio

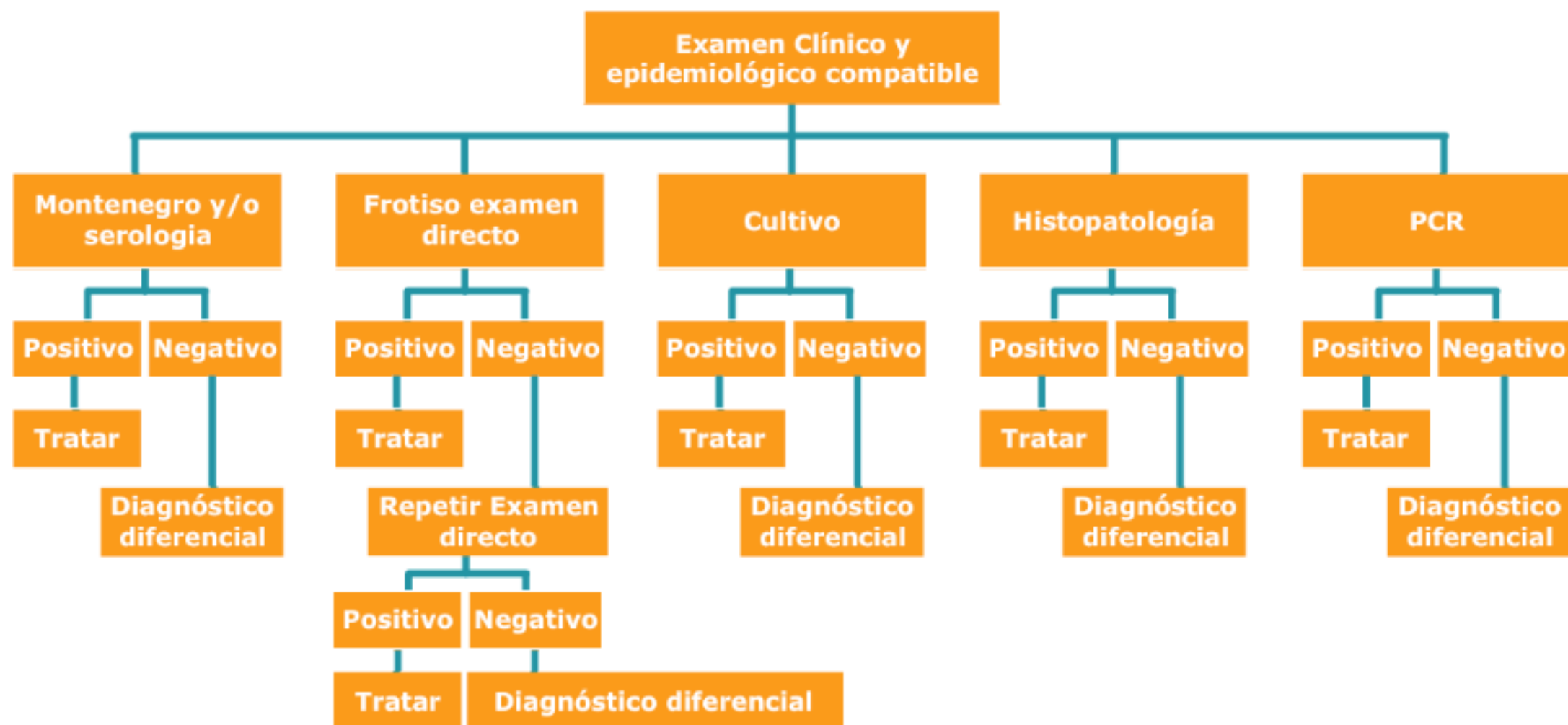
Flujograma para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en el tercer nivel de atención.



*Se recomienda la realización de estudios de validación locales para determinar el mejor abordaje posible de acuerdo con el comportamiento de la enfermedad

Diagnóstico de laboratorio

Flujograma para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en el tercer nivel de atención.



Síntesis

Importancia del diagnóstico de laboratorio en las leishmaniasis: cutánea y mucosa:

Enfermedades de amplio espectro clínico; hallazgos clínicos no son patognomónicos de la enfermedad; se requiere hacer diagnóstico diferencial con varias enfermedades con compromiso de piel y mucosas; los medicamentos utilizados en el tratamiento específico tienen elevada toxicidad

- Métodos diagnósticos disponibles:
 - **Métodos directos:** Frotis o extendido, cultivo, biopsia y PCR
 - **Métodos indirectos:** Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Elisa y Prueba de Montenegro
- Método de elevada especificidad en la leishmaniasis cutánea que puede ser hecho en el primer nivel de atención
 - Método directo con visualización del parásito: frotis o extendido.
- Cuando hacer uso de los métodos indirectos en la leishmaniasis cutánea y mucosa.
 - los métodos indirectos en la leishmaniasis cutánea tienen baja sensibilidad, pero en la leishmaniasis mucosa apoyan el diagnóstico, principalmente cuando los títulos son elevados



Actividad de integración final

Ejercicios:

Completadas la lectura y estudio en esta Unidad, le invitamos a que recupere sus anotaciones y ponga en practica el aprendizaje ejecutando los ejercicios propuestos.

- ▶ Escogencia multiple
- ▶ Verdadero o falso
- ▶ Correlaciones - Enumeración
- ▶ Esquemáticos

Esperamos que este estudio haya resultado significativo para sus prácticas... y esperamos pueda continuar profundizando su aprendizaje en las temáticas de este campo de acción.

