

Comparación entre histopatología y PCR, para diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria

Comparison between histopathology and PCR, for the diagnosis of tegumentary Leishmaniasis

Dr. José Manuel Ríos Yuil¹, Dr. Azael Saldaña², Dr. José Calzada³, Dr. Jaime Arias³, Dr. Rosendo Díaz⁴, Lic. Kadir González⁵

¹ Dermatólogo. Caja de Seguro Social de Panamá.

² Doctor en Parasitología. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud y Universidad de Panamá.

³ Patólogo. Jefe del Servicio de Patología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid de la Caja de Seguro Social de Panamá.

⁴ Patólogo. Jefe del Servicio de Patología del Hospital Santo Tomás de Panamá.

⁵ Lic. En Tecnología Médica. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud.

Fecha de aceptación: noviembre 2011

RESUMEN

ANTECEDENTES: la leishmaniasis es causada por parásitos del género *Leishmania*. Cada año hay 2 millones de nuevos infectados en el mundo y no contamos con una prueba que sirva como estándar de oro para el diagnóstico. El objetivo de este estudio fue determinar cuál es la mejor técnica diagnóstica de leishmaniasis tegumentaria, si comparamos la histopatología con la PCR, en biopsias que fueron embebidas en parafina en los servicios de Patología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid y del Hospital Santo Tomás de Panamá, entre enero de 2007 y diciembre de 2010.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio analítico, observacional, correlacional, retrospectivo, con biopsias embebidas en parafina, con diagnóstico clínico presuntivo de leishmaniasis tegumentaria. El ADN fue extraído mediante el QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) y la PCR se realizó con un kit de Promega (Estados Unidos). Se determinó el porcentaje de positivos mediante histopatología y PCR. Se compararon ambas pruebas mediante el análisis de las proporciones y a través del índice Kappa de Cohen.

RESULTADOS: 50% de los pacientes era del sexo femenino, la edad promedio era de 40.7 años, y 50% provenía de la provincia de Panamá. La histopatología fue positiva en 38.10% de los casos, y la PCR de las biopsias embebidas en parafina fue positiva en 30.43%.

CONCLUSIONES: no hubo diferencia significativa entre los porcentajes de positividad de la histopatología y la PCR del tejido embebido en parafina, por lo que no se puede afirmar que una sea superior a la otra. No hubo correlación entre ambas pruebas.

PALABRAS CLAVE: leishmaniasis, biopsia, parafina, patología, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

BACKGROUND: Leishmaniasis is caused by parasites of the genus *Leishmania*. Two million people worldwide are newly infected every year, and unfortunately there isn't a diagnostic test that serves as a gold standard yet. The objective of this study was to determine which diagnostic technique for this entity is best. We compared the histopathology and the PCR of paraffin embedded biopsies, from the Pathology services of the Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid and the Hospital Santo Tomás of Panama, from January 2007 to December 2010.

MATERIAL AND METHOD: Analytical, observational, correlational and retrospective trial with paraffin embedded biopsies with clinical diagnosis of tegumentary leishmaniasis. The DNA was extracted with the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the PCR was performed with a Promega kit (Madison, Wisconsin, USA). The percentage of positives with histopathology and with PCR was determined. Both tests were compared taking proportions into account, and also using the Cohen's Kappa index.

RESULTS: 50% of the patients were female. The mean age of the patients was 40.7 years, and 50% of them lived in the Panama Province. The histopathology was positive in 38.10%, and the PCR in 30.43% of the paraffin embedded biopsies.

CONCLUSIONS: There was no statistical difference, between the positivity percentage of the histopathology and the PCR of the paraffin embedded tissue. Therefore, we cannot consider one technique better than the other. There was no correlation between techniques. Nevertheless, the histopathology is still a routine and a less expensive procedure.

KEYWORDS: Leishmaniasis, biopsy, paraffin, pathology, polymerase chain reaction.

CORRESPONDENCIA

José Manuel Ríos Yuil ■ jmriosyuil@hotmail.com
Tel. (00-507)503-6521

Introducción

La leishmaniasis es la enfermedad causada por los parásitos del género *Leishmania*.¹ Esta enfermedad es endémica en más de 60 países, incluidos América Central, América del Sur, India, Oriente Medio, el África del Norte, y el sur de Europa.² Se estima que aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por *Leishmania*, y cada año se reportan alrededor de 2 millones de nuevos infectados.³

Existen tres formas clínicas principales de Leishmaniasis con compromiso cutáneo: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), y la leishmaniasis mucocutánea (LMC).

La leishmaniasis cutánea localizada se manifiesta como una o múltiples pápulas que aumentan de tamaño y que típicamente se ulceran. Las lesiones se localizan principalmente en las extremidades inferiores, y demoran entre 3 y 18 meses para curar en más de 90% de los casos.² Las principales especies causales son miembros de los complejos *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major*.¹

En la leishmaniasis cutánea difusa ocurre diseminación de lesiones nodulares cargadas de parásitos en toda la piel. La causa con más frecuencia las especies del complejo *L. mexicana* y *L. aethiopica*.²

La leishmaniasis mucocutánea se caracteriza por la inflamación granulomatosa de la mucosa de nariz, cavidad oral y faringe, que lleva a la destrucción del tabique nasal y del paladar. Las lesiones mucosas pueden aparecer simultáneamente con un cuadro de leishmaniasis cutánea. Sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan después. Las especies asociadas con más frecuencia son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. amazonensis*.²

El tratamiento de la leishmaniasis es difícil y suele asociarse a importantes efectos adversos. Por ello es importante confirmar el diagnóstico de la enfermedad antes de iniciar la terapia. Las características clínicas mencionadas con anterioridad y la epidemiología son importantes para el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, solo permiten hacer un diagnóstico probable de la misma. Por lo tanto, son indispensables las pruebas de laboratorio para lograr un diagnóstico definitivo.⁴

Las principales pruebas diagnósticas son las parasitológicas, las inmunológicas, las histopatológicas/inmunopatológicas, y las moleculares. El diagnóstico parasitológico se hace mediante dos métodos principales: la visualización directa de los amastigotes, a través del examen microscópico directo o del aislamiento del parásito mediante el cultivo en medios axénicos; y la inoculación de animales o el xenodiagnóstico.⁵ El frotis permite la observación

directa del parásito. El material obtenido se observa en el microscopio luego de ser coloreado con la tinción de Giemsa u otra de las tinciones de tipo Romanowsky.⁶⁻⁷

El cultivo del material proveniente de las lesiones cutáneas permite la visualización directa del parásito y aumentar la cantidad de parásitos vivos disponibles para realizar pruebas adicionales. El cultivo tiene una sensibilidad de 28.6-89%.⁸ El cultivo tradicional se hace en un sistema de cultivo bifásico, constituido por agar sangre cubierto por un medio líquido.⁹⁻¹⁰ Las inoculaciones de animales experimentales se utilizan para aumentar la probabilidad de aislar el parásito con respecto a los medios de cultivo axénicos.¹¹ El xenodiagnóstico permite aislar la *Leishmania* mediante la utilización de flebotominos no infectados a los que se les permite picar al ser humano o al animal infectado. Posteriormente, al extraer el tubo digestivo del insecto, se puede observar el parásito al microscopio.¹²

Entre las pruebas inmunológicas se encuentran: la prueba de Montenegro, las pruebas serológicas, la inmunocromatografía, y el inmunoblotting. La prueba de Montenegro o leishmanina es indicadora de la respuesta inmune celular del paciente frente a la infección por *Leishmania*. Todos los pacientes con LCL y LMC tienen una prueba de Montenegro positiva; mientras que es negativa en los pacientes con LCD.¹³⁻¹⁴ Los métodos serológicos son sensibles y se aplican como métodos diagnósticos indirectos. Las principales técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la infección por *Leishmania* son: prueba de aglutinación directa (DAT), prueba de aglutinación rápida para tamizaje (FAST), prueba de anticuerpos fluorescentes o inmunofluorescencia indirecta (IIFA), inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), y ELISA en punto (dot-ELISA).¹⁵⁻¹⁸ La prueba de inmunocromatografía rápida en tira se utiliza para detectar anticuerpos circulantes contra determinantes antigénicos de distintas especies de *Leishmania*. Como esta prueba detecta anticuerpos, es mejor para el diagnóstico de leishmaniasis visceral.¹⁹ El inmunoblotting ha demostrado ser muy sensible y específico para el diagnóstico de leishmaniasis y permite detectar casos asintomáticos cuando las otras pruebas serológicas no pueden establecer resultados confiables, o bien cuando sus resultados son negativos.^{18,20}

Entre las pruebas histopatológicas e inmunopatológicas se encuentran la histopatología, la inmunoperoxidasa, y la inmunofluorescencia. La histopatología de la leishmaniasis cutánea se caracteriza por una reacción inflamatoria granulomatosa con linfocitos, células plasmáticas, y macrófagos. Los amastigotes de *Leishmania* se aprecian en el citoplasma de los macrófagos como organismos redon-

deados u ovals, con un núcleo redondo, un cinetoplasto, rodeados por un halo claro.²¹⁻²⁴ El estudio histopatológico, suele ser el método con la menor sensibilidad diagnóstica para leishmaniasis cutánea. Esta sensibilidad suele ser de aproximadamente 45%.¹⁵ En otro estudio, la histopatología fue positiva solo en 30% de los casos.^{15,25-26} Los métodos de inmunohistoquímica incluyen las técnicas de inmunoperoxidasa y de inmunofluorescencia.²⁷ La inmunoperoxidasa se ha utilizado en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y ha demostrado ser una herramienta útil y sensible para el diagnóstico anatomopatológico de la leishmaniasis mediante la detección de amastigotes en el tejido.²⁶ La sensibilidad de la inmunoperoxidasa es mayor que la del estudio histológico convencional con H&E.^{4,15,25-26} La inmunofluorescencia directa también ha sido utilizada para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea localizada en biopsias de piel. La sensibilidad para la detección de antígenos de *Leishmania* suele ser mayor, alcanzando 88,5%.⁴

Los principales métodos moleculares que han sido utilizados para el diagnóstico de leishmaniasis son: el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto amplificado, mediante PCR; el análisis de la secuencia de genes con múltiples copias, y de las regiones espaciadoras intergénicas; y el estudio de las huellas del ADN y del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), entre otros.²⁸

En casi todos los estudios, la PCR demuestra ser más sensible que la histopatología para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria. En un estudio realizado en Marruecos, la PCR obtuvo una sensibilidad de 84,6% y una especificidad de 100% para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.²⁹ En otro estudio llevado a cabo en el norte de Argentina, se obtuvo una sensibilidad y una especificidad de 100% para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.³⁰ En otro estudio, realizado en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en Brasil, la PCR del ADN del cinetoplasto (kADN-PCR) fue positiva en 89,3% de los casos.³¹ Un estudio más, realizado igualmente en Brasil, en un centro de referencia para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana, reveló que la kADN-PCR tenía una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 93,3%, y un valor predictivo positivo de 99,2% para el diagnóstico de esta enfermedad.³² En cuanto a un estudio realizado en la Clínica de Referencia de Medicina Tropical del Instituto Conmemorativo Gorgas de la Ciudad de Panamá, reveló que la PCR fue positiva en 71,8% de los casos.³³

En la actualidad, la única metodología para el diagnóstico de la leishmaniasis con la que contamos en la Caja de Seguro Social es el estudio histopatológico. En el caso

de que haya un paciente asegurado con una lesión clínicamente sugestiva de leishmaniasis, pero con una histopatología negativa, el dermatólogo tendrá que solicitar pruebas diagnósticas adicionales. Como no contamos con ninguna prueba adicional en la Caja de Seguro Social, la biopsia o el paciente tienen que ser enviados al Instituto Conmemorativo Gorgas para que se les realice alguna de las pruebas diagnósticas que ellos tienen disponibles. Como consecuencia de esto, muchos dermatólogos se han visto forzados a iniciar tratamiento para leishmaniasis, sin tener un diagnóstico confirmado, en aquellos casos en los que la histopatología es negativa pero la clínica es sugestiva de leishmaniasis. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es determinar cuál es la mejor técnica diagnóstica de leishmaniasis tegumentaria, si comparamos la histopatología con la PCR, en biopsias que fueron embebidas en parafina en los servicios de Patología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid (CHDrAAM) y del Hospital Santo Tomás (HST) de Panamá, entre enero de 2007 y diciembre de 2010.

Como los casos que se estudiaron representaban la totalidad de las biopsias de lesiones de leishmaniasis tegumentaria americana que llegaron a los servicios de patología de los dos principales hospitales de referencia de nuestro país, entre 2007-2010, tendremos una idea aproximada de la situación epidemiológica de la leishmaniasis en Panamá en los últimos años. Dado que estos hospitales de referencia se encuentran en la ciudad de Panamá, estos datos son incluso más válidos para la región central del país, en la que reside más de la mitad de la población total de Panamá.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico, observacional, correlacional, retrospectivo. Se trabajó con dos grupos de biopsias, denominados A y B. El universo estuvo constituido por todos los pacientes cuyas biopsias de piel o mucosas fueron enviadas, con diagnóstico clínico de leishmaniasis tegumentaria americana, a los servicios de Patología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid (CHDrAAM) de la Caja de Seguro Social, o bien del Hospital Santo Tomás (HST) de la República de Panamá, entre los meses de enero de 2007 y diciembre de 2010.

El grupo A del estudio estuvo constituido por la totalidad de los pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniasis tegumentaria americana a los que se les confirmó este diagnóstico mediante histopatología en alguno de los dos servicios de patología arriba mencionados. En cuanto a los pacientes del grupo B, se eligió, al azar, el mismo número de integrantes que el grupo A. Lo ante-

rior por motivos económicos. Los integrantes de este grupo se tomaron entre los pacientes cuyas biopsias habían sido enviadas al servicio de Patología del CHDrAAM, con diagnóstico clínico de leishmaniasis. La diferencia con el primer grupo fue que el diagnóstico de estos pacientes no se había podido confirmar por histopatología entre enero de 2007 y diciembre de 2010. Se excluyeron del estudio aquellas biopsias de piel cuyos bloques de parafina no aparecieron en los archivos de los servicios de patología, o bien cuyos bloques no contenían tejido.

Entre las variables estudiadas figuran el sexo, la edad y la procedencia (provincia y distrito) del paciente. También se estudió el tipo de espécimen (piel o mucosa), el origen anatómico de la muestra, la fecha de obtención de la biopsia, el resultado de la histopatología, y el resultado de la PCR.

Los datos se recolectaron mediante el registro de los resultados positivos o negativos obtenidos del estudio experimental de los bloques de parafina de las biopsias de piel, mediante las técnicas de histopatología y PCR. Además, se anotó la información obtenida de los informes histopatológicos (sexo, edad, procedencia, espécimen, origen anatómico, fecha de obtención de la biopsia). Los datos fueron capturados en una hoja de registro electrónica creada en el programa informático Epi Info versión 3.4.3, en el que aparecían todas las variables investigadas con sus respectivas categorías.

Con los informes de histopatología de los pacientes seleccionados para los grupos A y B, se procedió a buscar, manualmente, los bloques de parafina y las placas correspondientes en los archivos de ambos servicios de patología. Con las placas, se procedió a corroborar al microscopio los resultados de los informes histopatológicos (positivos o negativos). Las biopsias seleccionadas para ser estudiadas mediante PCR en este estudio (grupo A y grupo B) no representaban la totalidad de las biopsias que fueron enviadas a los servicios de patología con diagnóstico clínico de leishmaniasis y que habían sido analizadas histopatológicamente. Por esta razón, para hacer el cálculo del porcentaje real de biopsias positivas por *Leishmania* mediante histopatología y evitar los sesgos, tuvimos que considerar la totalidad de biopsias que fueron enviadas con diagnóstico clínico de leishmaniasis, excluyendo solamente aquellas en las que la histopatología logró un diagnóstico distinto (diagnóstico clínico errado). Como solo contábamos con la información de la totalidad de biopsias con diagnóstico clínico de leishmaniasis recibidas en el CHDrAAM, calculamos el porcentaje de biopsias positivas por *Leishmania* con los datos de este hospital. Es decir que, para este cálculo, se excluyeron las muestras

positivas y negativas procedentes del Hospital Santo Tomás, debido a que no teníamos certeza de tener registro de todas las muestras que habían sido recibidas en dicho hospital con diagnóstico clínico de leishmaniasis.

Los bloques de parafina de los grupos A y B fueron utilizados completamente para la prueba de PCR para *Leishmania*. Para esto, primero se extrajo el ADN de la muestra mediante el QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN de muestras embebidas en parafina mediante la utilización de xilol.³⁴ Con el ADN extraído, se procedió a realizar la PCR para la detección del subgénero *Leishmania Viannia*. La PCR se realizó haciendo una modificación al protocolo de Weigle y colaboradores.³⁵ Fue necesaria la estandarización del protocolo para ajustarlo a las muestras utilizadas. Para esto, se diluyó el ADN extraído a diluciones de 1:10 y 1:50. El ADN extraído se amplificó, utilizando los cebadores B1 y LV que específicamente amplifican el minicírculo completo de 750 pb de las especies de *Leishmania Viannia*. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 50 µL conteniendo mezcla maestra (Promega, Estados Unidos), 0,6 µmol/L de cada cebador, y 5 µL de ADN. El perfil térmico de amplificación estaba compuesto por un paso inicial caliente para desnaturalizar el ADN durante 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, y 60°C por 1 minuto. Luego, por un paso final de 95°C por 1 minuto, 60°C por 3 minutos, y 72°C por 3 minutos. Posteriormente, 10 µL del producto de amplificación y 1,5 µL de loading buffer fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa a 1.5% con bromuro de etidio durante 45 minutos (85 V, 500mA). Enseguida, fueron visualizados en un transiluminador. La prueba se consideraba positiva si estaba presente la banda de 750 pb. Se calculó el porcentaje de biopsias positivas por PCR.

Posteriormente, se procedió a determinar cuál era la prueba superior para el diagnóstico de leishmaniasis mediante la comparación del porcentaje de positivos de cada prueba. Para determinar si la diferencia potencial observada entre los positivos de una prueba y los de la otra era estadísticamente significativa, utilizamos la comparación de proporciones con muestras independientes (prueba Z). Debemos recordar que la prueba histopatológica se aplicó a la totalidad del universo; mientras que la PCR únicamente se aplicó a la muestra seleccionada (grupos A y B). Solo se consideraría como superior a la prueba que tuviera el mayor porcentaje de positivos, si el valor de p resultara menor de 0.05 en la prueba de comparación de proporciones. Luego determinamos si existía correlación entre ambas pruebas mediante el índice Kappa de

Cohen. Para el cálculo del índice Kappa, solo se podían utilizar aquellas biopsias a las que se les había aplicado ambas pruebas (grupo A y grupo B). Es decir, las biopsias que solo fueron estudiadas por histopatología y no por PCR no podrían ser consideradas para el cálculo de este índice. El valor del Índice Kappa se interpretó con la escala de Landis y Koch. Estos cálculos los realizamos mediante Epidat 3.1. Los resultados finales fueron tabulados.

El estudio se llevó a cabo respetando las guías de ética dictadas en la declaración de Helsinki de 1975, y fue aprobado por el Comité de Bioética y el Comité Científico del CHDrAAM de la Caja de Seguro Social. También fue aprobado por la Facultad de Ciencias de la Salud Dr. William C. Gorgas, de la Universidad Latina de Panamá. Se respetó el derecho a la confidencialidad de los pacientes cuyas biopsias fueron estudiadas.

El estudio fue financiado por el investigador principal, por la Caja de Seguro Social de Panamá, y por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud. No se utilizó ninguna fuente de financiamiento externo.

Resultados

Aun cuando este sea un estudio en el que se comparan, fundamentalmente pruebas diagnósticas de leishmaniasis, también tiene un enfoque epidemiológico. Como los casos estudiados representan la totalidad de las biopsias de lesiones de leishmaniasis tegumentaria americana que llegaron a los servicios de patología de los dos principales hospitales de referencia de nuestro país, entre 2007-2010, esto nos brinda una idea aproximada de la situación epidemiológica de la leishmaniasis en Panamá en los últimos años. Por esta razón, en este estudio se analizaron las principales variables epidemiológicas: persona, tiempo, y lugar.

De los pacientes estudiados, 50% era del sexo masculino. El grupo de edad predominante fue el de 40 a 49 años. La media de edad de los pacientes fue de 40.7 años. De los pacientes estudiados, 28.26% fueron enviadas, en el año 2007; 13.04% en el año 2008; 23.91% en el año 2009; y 34.78% en el año 2010. La provincia con mayor cantidad de casos sospechosos clínicamente de leishmaniasis fue la provincia de Panamá con 50%. La Provincia de Colón fue la segunda, con 13.04% de los casos. El distrito más afectado fue el de Arraiján (véase cuadro 1).

De las biopsias estudiadas, 93.48% era de piel y 6.52% de mucosas. 45.65% de las lesiones se encontraban en las extremidades inferiores (cuadro 2).

La histopatología fue positiva en 38.10% de las biopsias enviadas con sospecha de leishmaniasis tegumentaria americana (cuadro 3). La PCR de las biopsias embebidas

Cuadro 1. Distribución por distrito y provincia de procedencia de los pacientes. Panamá, 2007-2010.

DISTRITO	PROVINCIA	FA	FR
Panamá	Panamá	6	13.04%
San Miguelito	Panamá	1	2.17%
Arraiján	Panamá	11	23.91%
Chorrera	Panamá	1	2.17%
Capira	Panamá	1	2.17%
Chepo	Panamá	2	4.35%
Colón	Colón	3	6.52%
Gatuncillo	Colón	1	2.17%
Nuevo Vigía	Colón	1	2.17%
Chepigana	Darién	1	2.17%
Penonomé	Coclé	1	2.17%
Las Minas	Herrera	1	2.17%
San Francisco	Veraguas	1	2.17%
No especificado	No especificada	15	32.61%
Total		46	100.00%

Fuente: Estudio comparativo entre histopatología y PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Panamá, 2007-2010.

Cuadro 2. Distribución por origen anatómico de la muestra. Panamá, 2007-2010.

ORIGEN ANATÓMICO	FRECUENCIAS ABSOLUTAS	PORCENTAJE
Cabeza	9	19.57%
Extremidades superiores	13	28.26%
Dorso	1	2.17%
Extremidades inferiores	21	45.65%
No especificado	2	4.35%
Total	46	100.00%

Fuente: Estudio comparativo entre histopatología y PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Panamá, 2007-2010.

Cuadro 3. Distribución de las biopsias según el resultado de la prueba histopatológica. Panamá, 2007-2010.

RESULTADO DE HISTOPATOLOGÍA	FRECUENCIAS ABSOLUTAS	PORCENTAJE
Positiva	16	38.10%
Negativa/No concluyente	26	61.90%
Total	42	100.00%

Fuente: Estudio comparativo entre histopatología y PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Panamá, 2007-2010.

en parafina fue positiva en 30.43% de los casos (véase cuadro 4).

Para determinar el grado de correlación entre la histopatología y la PCR se utilizó el índice Kappa de Cohen (cuadro 5). La correlación entre las dos variables fue pobre, pero no significativa (Kappa= 0.0595; $Z = 0.4462$; $p = 0.6554$).

Discusión

De los pacientes estudiados, 50% eran del sexo masculino. Esto contrasta con las estadísticas de la Sección de Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud (ICGES). En esta sección, entre los años de 2008 y 2010, 72% de los pacientes estudiados eran de sexo masculino, y solo 28% eran de sexo femenino.

En cuanto a la edad, el promedio de los pacientes atendidos en nuestro estudio fue de 40.7 años. Este valor fue discretamente superior a la edad promedio de 31 años de los pacientes estudiados en el ICGES entre 2008 y 2010.³⁶

La provincia con mayor cantidad de casos sospechosos clínicamente de leishmaniasis fue la provincia de Panamá, con 50%. La Provincia de Colón fue la segunda con 13.04% de los casos. Estos hallazgos son muy similares a los de la Sección de Parasitología del ICGES. En la Sección de Parasitología, entre los años de 2008 y 2010, 49% de los casos provenían de la provincia de Panamá, y 16% de los casos de la provincia de Colón.³⁶ El distrito más afectado fue el distrito de Arraiján, una zona con grandes extensiones cubiertas de bosque tropical lluvioso y que pertenece a la provincia de Panamá.

La mayoría de las lesiones se encontraban en áreas expuestas, especialmente en las extremidades (73.91%): 45.65% en las inferiores, y 28.26% en las superiores. Esto coincide con lo escrito por Awasthi y colaboradores (2004), quienes señalaron que la mayoría de los pacientes con leishmaniasis cutánea presentaban las lesiones en las extremidades inferiores. También coincide con los datos de la Sección de Parasitología del ICGES. En este centro, entre los años de 2008 y 2010, 69% de los casos ocurrieron en las extremidades: 45% en los brazos, y 24% en las piernas.³⁶

La histopatología fue positiva en 38.10% de las biopsias enviadas con sospecha de leishmaniasis tegumentaria americana. Esto coincide con lo expuesto por el estudio de Silveira y colaboradores (2004), en el que se señalaba que la histopatología era un buen método para la descripción del infiltrado inflamatorio asociado a la leishmaniasis. Sin embargo, era un método poco sensible para la observación del parásito.³⁷ El porcentaje de pruebas positivas detectadas por la histopatología en nuestro estudio fue incluso inferior al detectado en otros estudios.

Cuadro 4. Distribución de las biopsias según el resultado de la prueba de PCR. Panamá, 2007-2010.

RESULTADO DE PCR	FRECUENCIAS ABSOLUTAS	PORCENTAJE
Positiva	14	30.43%
Negativa	32	69.57%
Total	46	100.00%

Fuente: Estudio comparativo entre histopatología y PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Panamá, 2007-2010.

Cuadro 5. Concordancia entre la histopatología y la PCR para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana. Panamá, 2007-2010.

HISTOPATOLOGÍA \ PCR			
	POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
Positiva	8	16	24
Negativa	6	16	22
Total	14	32	46

Fuente: Estudio comparativo entre histopatología y PCR para el diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Panamá, 2007-2010.

En la investigación de Robinson y colaboradores (2000), se encontró que la sensibilidad de la histopatología fue de 64.3%.¹⁵ En el estudio de Quintella y colaboradores (2009), se halló una sensibilidad de 53.3%.⁵ En ambos estudios, a pesar de que la prueba histopatológica fue poco sensible, tuvo un porcentaje de positividad mayor que el obtenido en nuestro trabajo.

La PCR de las biopsias embebidas en parafina fue positiva únicamente en 30.43% de los casos enviados con sospecha de leishmaniasis tegumentaria americana. Esta sensibilidad fue mucho menor que la obtenida en múltiples estudios en los que se trabajó con PCR sobre tejido fresco. Lemrani y colaboradores (2009) obtuvieron una sensibilidad de 84.6% al utilizar la PCR para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.²⁹ Barrio y colaboradores (2007) obtuvieron una sensibilidad y una especificidad de 100%.³⁰ En el estudio de Ampusio y colaboradores (2010), se utilizó PCR de la secuencia específica de 120 pb del kADN para hacer el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. La kADN-PCR fue positiva en 89.3% de los casos.³¹ Fagundes y colaboradores (2010) obtuvieron una sensibilidad de 92.3% y una especificidad de 93.3% al aplicar kADN-PCR para el diagnóstico de la enfermedad.³² Miranda y colaboradores (2009), con un PCR que amplificaba específicamente la secuencia completa de 750 pb del minicírculo de las especies de *Leishmania Viannia*, encontraron que esta

prueba fue positiva en 71.8% de los casos.³³ Según las estadísticas de la Sección de Parasitología del ICGES, entre los años 2008 y 2010, 67% de las muestras estudiadas resultaron positivas por PCR del tejido fresco.³⁶

En nuestro estudio también se obtuvo un porcentaje de positividad inferior al de otros estudios en los que se ha realizado PCR de muestras embebidas en parafina. En el trabajo de Xavier y colaboradores (2006), se realizó PCR a biopsias de piel de perro embebidas en parafina y se obtuvo una sensibilidad de 82.8%.¹⁵

En esta investigación se utilizó la prueba de comparación de proporciones para determinar si alguna de las dos pruebas estudiadas era superior a la otra ($z = 0.5321$ y $p = 0.5947$). No hubo diferencia significativa entre el porcentaje de positividad de ambas pruebas. Tampoco hubo correlación entre las mismas ($Kappa = 0.0595$; $z = 0.4462$; $p = 0.6554$). Esto contrasta con los resultados de los estudios expuestos anteriormente, en los que se revelan altas sensibilidades para la PCR y bajas para el estudio histopatológico.^{5,15,29-33,36-37}

Como sabemos, la mayoría de los estudios en los que se ha utilizado la PCR para el diagnóstico de leishmaniasis han sido realizados con muestras de tejido fresco o congelado. La principal virtud de nuestro estudio es ser uno de los pocos en los que se ha ajustado la PCR convencional para hacer el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria en biopsias de tejido humano embebido en parafina. Aparentemente, esta prueba es menos eficaz que la PCR del tejido fresco para la detección de leishmaniasis. Sin embargo, representa una opción útil para tratar de confirmar el diagnóstico de leishmaniasis cuando solo se cuenta con la muestra de tejido que ya ha sido previamente procesada para estudio histopatológico. La principal limitación de este estudio es el número relativamente pequeño de muestras con las que se pudo trabajar. Recomendamos realizar un estudio similar, pero buscando activamente a los pacientes en las zonas de mayor endemicidad del país. También se pueden realizar estudios adicionales en los que se utilicen otras combinaciones de cebadores para la PCR, con el fin de perfeccionar la estandarización y determinar si la sensibilidad de la prueba aumenta. Igualmente, recomendamos la realización de investigaciones adicionales en las que se comparen otras pruebas diagnósticas de leishmaniasis, como la inmunohistoquímica, con la histopatología o con la PCR del bloque de parafina, buscando una alternativa con mayor sensibilidad.

Conclusión

El análisis histopatológico de las biopsias de piel y la PCR del tejido embebido en parafina resultó positivo en un

bajo porcentaje de los casos clínicamente sospechosos de leishmaniasis. No hubo diferencia significativa entre los porcentajes de positividad de la histopatología y la PCR, por lo que no se puede afirmar que una sea superior a la otra. Tampoco hubo correlación entre ambas pruebas.

Agradecimientos

A las siguientes personas por sus aportes para la realización de este estudio: Dr. Azael Saldaña, Dra. María Fernanda Alves, Dr. Jorge Medrano, Dr. Alex Martínez, Dr. Manuel Escala, Dr. Jaime Arias, Dr. Rosendo Díaz, Dr. Manuel Ríos Castro, Dra. Emma Yuil de Ríos, Arq. Diana Ríos Yuil, Pbro. Manuel Ríos Yuil, Dr. José Calzada, Lic. Kadir González, Dra. Gloriela Archbold, Dra. Gabriela Martínez, Dr. Freddy Díaz, Dra. Ildania Atencio, Lic. Víctor, Lic. Leida, Tec. Ana, y a la Tec. Natalia.

REFERENCIAS

- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. "Immune response to *Leishmania* infection". *Indian J Med Res* 2004 Jun; 119(6): 238-258.
- Pisopo TV, Mallia AC. "Leishmaniasis". *Postgrad Méd J* 2006; 82: 649-657.
- von Stebut E. "Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy". *Exp Dermatol* 2007 Apr; 16(4): 340-346.
- Goto H, Lauletta Lindoso JA. "Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis". *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(4): 419-433.
- Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. "Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of Parasitologic Diagnosis". *J Clin Microbiol* 2000 Oct; 38(10): 3768-3773.
- Bari AU, Rahman Sb. "Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis". *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006; 72: 28-32.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years". *Clin Microbiol Rev* 2008 Apr; 21(2): 334-359.
- Luz ZM, Silva AR, Silva Fde O, Caligiorme RB, Oliveira E, Rabello A. "Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Feb; 104(1): 62-66.
- Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adaui V, Tulliano G, et al. "Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru". *J Clin Microbiol* 2007 Nov; 45(11): 3680-3684.
- Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, et al. "Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru". *Am J Trop Med Hyg* 2008 Dec; 79(6): 847-852.
- Oliveira MA, Pires Ada S, de Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, Pereira LI, et al. "Leishmania spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010 Apr; 52(2): 83-88.
- Hernández D, Rojas E, Scorza JV, Jorquera A. "Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela". *Biomédica* 2006; 26 (Supl. 1): 242-248.

13. Nogueira MF, Sotto MN, Cuccé LC. "American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008 Sep-Oct; 50(5): 283-286.
14. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. "Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Aug; 100(5): 525-534.
15. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS. "Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods." *BMC Vet Res* 2006 Jun 8; 2: 17.
16. Ready PD. "Leishmaniasis emergence in Europe". *Euro Surveill* 2010 Mar 11; 15(10): 19505.
17. Silvestre R, Santarém N, Teixeira L, Cunha J, Schallig H, Cordeiro-da-Silva A. "Evaluation of *Leishmania* Species Reactivity in Human Serologic Diagnosis of Leishmaniasis". *Am J Trop Med Hyg* 2009 Aug; 81(2): 202-208.
18. Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. "Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil". *Braz J Infect Dis* 2009 Feb; 13(1): 47-52.
19. Sharma NL, Mahajan VK, Negi AK, Verma GK. "The rK39 immunochromatic dipstick testing: A study for K39 seroprevalence in dogs and human leishmaniasis patients for possible animal reservoir of cutaneous and visceral leishmaniasis in endemic focus of Satluj river valley of Himachal Pradesh (India)". *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75: 52-55.
20. Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. "Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American cutaneous leishmaniasis". *J Clin Microbiol* 1997 Dec; 35(12): 3043-3047.
21. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. "Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis". *Eur J Dermatol* 2002 Sep-Oct; 12(5): 449-451.
22. Mendes-Aguar C de O, Gomes-Silva A, Nunes E Jr, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto Mde P, et al. "The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis". *Clin Exp Immunol* 2009 Sep; 157(3): 377-384.
23. Amaral V, Pirmez C, Gonçalves A, Ferreira V, Grimaldi G Jr. "Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000 Mar-Apr; 95(2): 209-216.
24. Brachelente C, Müller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M. "Cutaneous Leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response." *Vet Pathol* 2005 Mar; 42(2): 166-175.
25. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, et al. "Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary Leishmaniasis patients". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 Oct; 96(7): 987-996.
26. Quintella LP, Cuzzi T, Madeira Mde F, Okamoto T, Schubach Ade O. "Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009 Mar-Apr; 51(2): 83-86.
27. Idikio HA. "Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains". *Int J Clin Exp Pathol* 2009 Nov 25; 3(2): 169-176.
28. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schöniat G, Töz SO, Jaffe CL, et al. "Detection and identification of old world *Leishmania* by High resolution Melt Analysis". *PLoS Negl Trop Dis* 2010 Jan 12; 4(1): e581.
29. Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. "PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies". *J Infect Dev Ctries* 2009 Sep 15; 3(2): 115-122.
30. Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrio MA. "Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina". *Am J Trop Med Hyg* 2007 Oct; 77(4): 636-639.
31. Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA. "Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Nov; 104(7): 992-997.
32. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, et al. "Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010 Feb; 105(1): 109-112.
33. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, et al. "Molecular epidemiology of American tegumentary Leishmaniasis in Panama". *Am J Trop Med Hyg* 2009 Oct; 81(4): 565-571.
34. *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*. 3ª Ed, abril de 2010. Consultado el 4 de enero de 2011. Disponible en URL: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t2>
35. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. "PCR-Based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*". *J Clin Microbiol* 2002 February; 40(2): 601-606.
36. Sección de Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud. "Análisis de los casos de Leishmaniasis de enero de 2008 a diciembre de 2010". Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios en Salud, 2010.
37. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. "Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil –A review". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 May; 99(3): 239-251.