BOLETÍN
DE MALARIOLOGÍA
Y SALUD AMBIENTAL
Vol. LII, Nº 1, Enero-Julio, 2012

Artículos Originales

Detección de *Leishmania braziliensis* en lesión mucosa con 16 años de evolución: Registro de un caso

Detection of Leishmania braziliensis *in a mucosal lesion with 16 years of evolution: A case report*

Néstor Añez[1*], Agustina Rojas[1], Gladys Crisante[1] & Mauricio Jerez[2]

RESUMEN

Se registra, en un paciente masculino de 48 años, la detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en muestra de lesión mucosa crónica con 16 años de evolución clínica. El caso presentado cursa con perforación del tabique nasal no evidenciándose lesión cutánea primaria sugestiva de leishmaniasis. Por su ocupación el paciente ha frecuentado, por largos períodos, bosques en áreas endémicas para leishmaniasis en el occidente de Venezuela. Continuas evaluaciones clínicas, inmunológicas e histopatológicas realizadas durante varios años fallaron en establecer un diagnóstico certero incrementando la severidad del caso. Exámenes recientes realizados en nuestro laboratorio revelan la presencia de amastigotes en muestras de la lesión nasal activa en extendidos coloreados con tinción de Giemsa. La identificación del parásito como *L. braziliensis* y la verificación de la infección por este parásito en el paciente, fue lograda por ensayos de PCR y Western Blot, respectivamente. Se concluye que el caso presentado sufre una leishmaniasis mucocutánea de vieja data con una baja respuesta inmunológica, a juzgar por la frecuente negatividad en pruebas de IDR y/o la detección de anticuerpos circulantes anti-*Leishmania*. Se discute sobre la imprecisión diagnóstica en el caso presentado y se advierte sobre el riesgo epidemiológico potencial de casos similares.

Palabras claves: Leishmaniasis mucocutánea, *Leishmania braziliensis*, lesión persistente, Venezuela.

SUMMARY

The detection of Leishmania (Viannia) braziliensis *from a chronic mucosal lesion with 16 years of clinical evolution in a 48 years old male patient is reported. The patient showed destruction of the nasal septal cartilage with no evidence of primary leishmanial lesion. Due to his professional work he frequently visited areas of western Venezuela where leishmaniasis is endemic. Frequent clinical, immunologic and histopathologic evaluations carried out during several years failed to establish a right diagnosis, increasing the severity of the mucosal lesion. The finding of a sparse number of amastigotes in a sample from the mucosal lesion stained by Giemsa stain, suggested a mucosal infection by Leishmania. The identification of the parasite as* L. braziliensis *and the verification of the infection by this parasite in the reported case were carried out using a PCR assay and a Western Blot test, respectively. It is concluded that the patient was suffering a long-lasting, reluctant to heal and severe lesion with a low immunological response due to infection by* L. braziliensis *causing mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The fail in the diagnosis of this particular case of MCL and the potential epidemiological risk in similar cases are discussed.*

Key words: *Mucocutaneous leishmaniasis, long-lasting lesion,* Leishmania braziliensis*, Venezuela.*

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es una parasitosis de evolución crónica, asociada con infección causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, caracterizada por lesiones severas de larga duración, difíciles de curar, que contienen escasa cantidad de amastigotes, las cuales progresan ocasionando daño histopatológico, anatómico y funcional en las membranas mucosas orales, nasales o laríngeas (Convit *et al.*,

[1] Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela
[2] Centro de Estudios Forestales y Ambientales de Postgrado, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela

*Autor de correspondencia: nanes@ula.ve

1993; Rojas-Cabrera *et al.*, 2011). La poca cantidad de parásitos que suele detectarse en este tipo de lesiones y la presentación de raros casos con una deficiente respuesta inmune del hospedador, parecieran ser algunas de las principales dificultades que se presentan para establecer un diagnóstico certero en casos de LMC. Sin embargo, la posibilidad diagnóstica se dificulta aún más cuando los casos de LMC se presentan sin puerta de entrada evidente reflejada comúnmente como una lesión cutánea primaria (Rojas-Cabrera *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se registra la detección de *L. (V.) braziliensis* en una lesión mucosa crónica localizada en el tabique nasal de un paciente sin mostrar puerta de entrada evidente. El mismo refiere una evolución de 16 años sin haber obtenido un diagnóstico preciso ni mejoría clínica. El diagnóstico se logra establecer utilizando métodos parasitológicos clásicos, complementado con la identificación del agente causal y la detección de la respuesta del hospedador mediante ensayos de PCR y Western Blot, respectivamente.

PRESENTACION DEL CASO

Se presenta un caso de lesión mucosa en un paciente masculino de 48 años de edad, casado, de profesión ingeniero forestal, venezolano, con residencia en la ciudad de Mérida al occidente de Venezuela. Por su ocupación refiere frecuentes visitas a bosques de localidades del piedemonte andino de los estados Mérida, Trujillo, Táchira y Barinas, además de localidades llaneras del estado Apure y otras del estado Bolívar, al sur de Venezuela, incluyendo la Gran Sabana, Imataca y el Dorado. El paciente afirma haber pernoctado largos períodos en localidades donde la leishmaniasis es considerada endémica y manifiesta reconocer los insectos incriminados como transmisores de *Leishmania*. Asimismo, refiere no haber presentado lesiones cutáneas primarias atribuidas a esta parasitosis. El historial clínico del paciente se remonta a 1996, manifestando haber sufrido molestias con sangrado por fosas nasales y formación de costras en el tabique nasal. Al año siguiente mediante examen realizado por un médico otorrinolaringólogo le fue detectada lesión en el tabique nasal. Referido a un dermatólogo le fue aplicada prueba de intradermorreacción (IDR) con aplicación de leishmanina para despistaje de leishmaniasis, arrojando resultado negativo. Posteriormente le fue aplicado un curetaje quirúrgico para eliminar una costra del tabique nasal, descubriéndose perforación de 1cm aproximadamente. El análisis de la biopsia tomada de la lesión reportó tejido necrosado e inflamación crónica. El cultivo realizado de la muestra evidenció abundancia de *Staphylococcus aureus*. Durante el período 1998 – 2008, el paciente manifiesta haber sufrido constantes recaídas del cuadro clínico con frecuente reactivación de los bordes de la perforación, formación de costras y sangrado nasal. Durante 2011, fue detectada necrosis y es nuevamente intervenido para eliminar costra, evidenciándose incremento de la perforación (Fig. 1). La biopsia indica nuevamente inflamación crónica y el cultivo arroja *S. aureus*. Despistajes para tuberculosis y citomegalovirus indicados por el parte médico arrojan resultados negativos. Posteriormente se indica toma de nueva biopsia para despistaje de leishmaniasis, sugiriendo resultados no conclusivos o negativos. Seguidamente en ambiente hospitalario se indica aplicación de leishmanina revelando resultados poco conclusivos o negativos. La repetición de prueba de IDR arroja resultado negativo. En enero 2012 llega a nuestro laboratorio portando láminas producto de extendidos realizados en la sección de otorrino del Hospital Universitario de los Andes luego de una toma de muestra de la lesión activa en la región del tabique nasal. Las láminas conteniendo material del área afectada fueron procesadas por diferentes metodologías. Asimismo, al paciente le fue extraída por punción venosa periférica una muestra de sangre para realizar ensayos de PCR y estudios serológicos por diferentes métodos.

Consideraciones éticas

Previo al muestreo el paciente fue informado de todo el procesamiento de la muestra, firmando el consentimiento previa información (CPI) y autorizando su ejecución.

Fig. 1. Fotografía de lesión mucosa crónica del paciente. La flecha indica la perforación del tabique nasal.

RESULTADOS

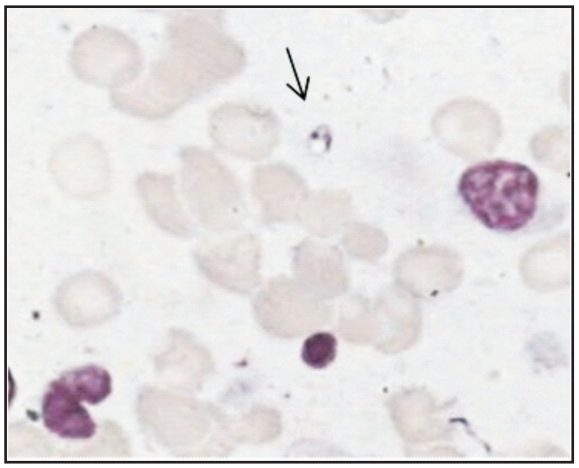
Examen parasitológico

Formas amastigotes de *Leishmania* sp. fueron detectadas en extendidos de láminas portaobjetos, coloreadas con Giemsa al 10% en buffer fosfato pH 7,2, conteniendo material tomado de la lesión del tabique nasal. En general, el número de parásitos observados fue escaso, pudiéndose en ocasiones, detectar hasta 2 amastigotes por campo microscópico de 1000X. La observación fue realizada en microscopio Axioskop-Zeiss-Germany acoplado a cámara digital Noticam 480 en interfase con Laptop HP, haciéndose el registro de cada campo microscópico positivo. La morfología de amastigotes detectados se muestra en la Fig. 2.

Identificación de la especie de Leishmania *por ensayos de PCR*

Con la finalidad de identificar la especie a la que pertenecen los amastigotes de *Leishmania* detectados en el examen parasitológico antes descrito, fue realizado un aislamiento de ADN a partir del material obtenido de la lesión del tabique nasal. La muestra examinada llegó al laboratorio extendido en láminas portaobjetos. La extracción de ADN fue realizado utilizando el método clásico fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN obtenido fue procesado por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la metodología multiplex previamente desarrollada para especies de Leishmania neotropicales (Harris *et al.* 1998). El ensayo de PCR multiplex arrojó resultados positivos a *Leishmania braziliensis* demostrado por la amplificación de una fuerte banda de 148 pb de la muestra de la lesión del tabique nasal como se describió anteriormente. Asimismo, señales similares, aunque de banda más tenue fue detectada en muestra de sangre periférica del paciente, procesada con el mismo ensayo de PCR multiplex. La Fig. 3 muestra los resultados del ensayo de PCR en material del tabique nasal y de sangre periférica del paciente.

Fig. 2. Detección de amastigote (flecha) en muestra tomada de lesión mucosa nasal. Coloración Giemsa. 1000X



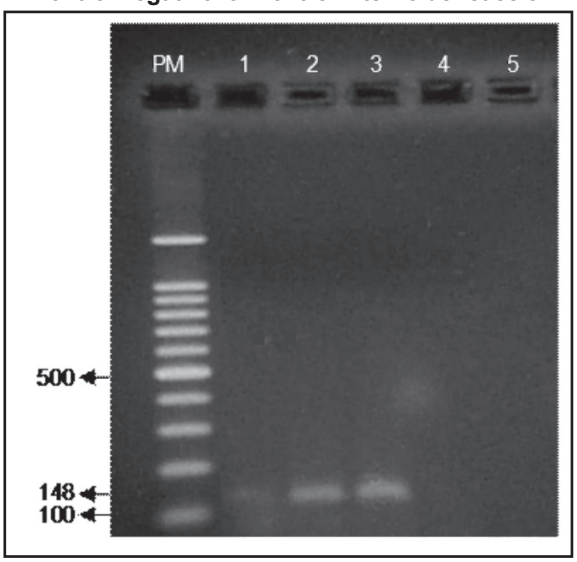
Examen serológico

Una alícuota de suero del paciente fue tomada para realizar exámenes serológicos convencionales que detectan anticuerpos (Ac) anti-*Leishmania*, utilizando antígeno de *L. braziliensis*. Los mismos incluyeron un test de aglutinación directa (TAD) y una prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) siguiendo procedimientos previamente estandarizados y adaptados en nuestro laboratorio para tal fin (Añez *et al.*, 2007). Todas las pruebas realizadas resultaron negativas.

Aplicación de prueba diagnóstica alternativa para corroborar infección por Leishmania braziliensis

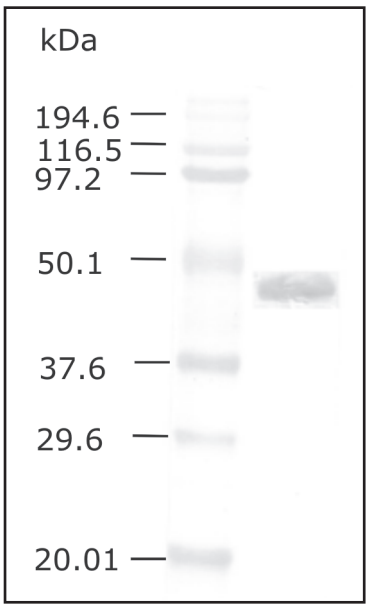
Para llevar a cabo la confirmación de *L. braziliensis* como agente causal de la lesión del caso

Fig. 3. Producto del ensayo de PCR multiplex identificando *Leishmania braziliensis* en muestras tomadas del paciente. PM: Marcador de peso molecular. 1: Muestra de sangre periférica del paciente con lesión mucosa. 2: Muestra tomada de la lesión. 3: Control positivo (ADN de *L. braziliensis*). 4: Control negativo. 5: Control interno de reacción.



registrado, fue aplicada una prueba serológica alternativa en formato Western Blot, utilizando como antígeno proteínas ancladas por GPI (Glycosil-Phosphatydil-Inositol) a la membrana de promastigotes de *L. braziliensis*. Estas proteínas han sido exitosamente ensayadas en nuestro laboratorio como marcadores bioquímicos específicos para identificar y diferenciar leishmaniasis causada por *L. (V.) braziliensis*, siguiendo metodología previamente descrita (Rojas *et al.,* 2008). La aplicación del test reveló una banda de aproximadamente 50kDa específica para *L. braziliensis*, la cual no es detectada en sueros de individuos infectados por *L. (L.) mexicana* o *L. (L.) amazonensis*, confirmando la identidad revelada con el ensayo de PCR (Fig. 4). Asimismo, esta reacción permite aseverar que la lesión que presenta el caso estudiado es parasitológica e inmunológicamente activa, ya que en casos tratados o curados la reacción es negativa.

Fig. 4. Western Blot revelando en el suero del paciente reacción anti-proteínas ancladas por GPI a la membrana de *Leishmania braziliensis*. Obsérvese banda de 50 kDa.



DISCUSIÓN

La detección de formas de amastigotes de *L. braziliensis* mediante la utilización de metodología clásica y de parte del genoma del parásito cuando se aplicó un ensayo de PCR para detectar ADN específico, aunado a la reactividad demostrada en el suero del paciente al utilizar como antígeno una proteína anclada por GPI a la membrana de ese organismo, parecieran ser elementos suficientes para constatar la presencia de este agente causal de LMC en el caso registrado. El análisis del historial clínico del paciente, a la luz de los presentes resultados, sugiere que la aparición de la lesión mucosa primaria, y su complicación ulterior, pudiera ser atribuida a la acción patógena de *L. braziliensis*. Asimismo, el presente caso pareciera corresponder al de un hospedador que desarrolló una deficiente respuesta inmunológica a juzgar por la reiterada negatividad observada durante la aplicación de pruebas de IDR, lo cual lo ubica en el 2,7% de los casos con LMC registrados con IDR negativo en Venezuela (De Lima *et al.*, 2010). Lo antes indicado parece corroborarse con la no detección de respuesta humoral anti-*L. braziliensis* con los métodos serológicos utilizados. Este hecho aunado a la presentación de un cuadro mucoso sin evidencias de lesiones cutáneas primarias, con abundancia de S.aureus, pudo haber contribuido a la confusión de los encargados de realizar previos diagnósticos durante los 16 años de evolución clínica.

El registro del presente caso es una demostración de la persistencia de larga data de la infección por *L. braziliensis*. Asimismo, la imprecisión diagnóstica observada durante un largo período pareciera demandar la necesidad de una revisión profunda sobre los métodos diagnósticos utilizados en centros clínicos para la detección de leishmaniasis en Venezuela. Sin duda, casos como el aquí presentado pudiera generar preocupación epidemiológica. Por una parte, por el desconocimiento que se tiene sobre la cuantía de casos similares en el territorio venezolano, y por la otra, por el riesgo potencial que representan éstos de convertirse en reservorios intradomiciliares de *Leishmania* al sufrir cuadros de inmunocompromisos en lugares donde coincidan los insectos vectores, pudiendo, asimismo, contribuir a la transmisión de *Leishmania* en áreas no-endémicas.

Finalmente, una vez que el paciente fue sometido a terapia con un compuesto antimonial pentavalente (Glucantime®), recibiendo dos series de 20 dosis cada una de 1,5g/5mL/día, (equivalente a 20mg del compuesto antimonial/Kg de peso/día, para los 75 kg de su peso corporal) se observó una ostensible mejoría con desaparición del sangrado nasal y cicatrización de una lesión aledaña a la perforación del tabique.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que en la realización del presente trabajo no se presentó ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo dedicado a aquellos pacientes que deambulan, durante años, por centros de atención hospitalaria buscando solución a sus dolencias a través de diagnósticos certeros, tratamientos efectivos y… alguna comprensión que mitigue su angustia. Los autores agradecen al Sr. Sócrates Pérez su diligente ayuda en el trabajo fotográfico.

REFERENCIAS

Añez N., Rojas A. & Crisante G. (2007). Evaluation of conventional serological tests for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47:** 13-20.

Convit J., Ulrich M., Fernández C. T., Tapia F. J., Cáceres-Dittmar G., Castés M. & Rondón A. J. (1993). The clinical and inmmunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87:** 444-448.

De Lima H., Borges R. H., Escobar J. & Convit J. (2010). Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50:** 283-299.

Harris E., Kropp G., Belli A., Rodriguez B. & Agabian N. (1998). Single-step multiplex PCR for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.* **36:** 1989-1995.

Rojas-Cabrera E., Guzman-Rivero J. M. & Verduguez-Orellana A. (2011). Leishmaniasis mucosa laríngea sin puerta de entrada evidente: presentación de un caso clínico. *Gac. Med. Bol.* **34:** 91-93.

Rojas A., García-Lugo P., Crisante G., Añez-Rojas N. & Añez, N. (2008). Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica.* **105:** 139-144.

Recibido el 20/04/2012
Aceptado el 14/07/2012