

LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS: LEISHMANIOSIS AUTÓCTONA POR *Leishmania infantum*

Montserrat Gállego y Cristina Riera

Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona.

Se conoce como leishmaniosis a un conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diversas especies del género *Leishmania*. Se considera que al menos 20 especies de *Leishmania* son responsables de las distintas formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: cutánea (localizada o difusa), mucocutánea y visceral, cada una de ellas con sus distintas peculiaridades. La identificación de las especies de *Leishmania* ha estado clásicamente basada en el cuadro clínico provocado, su distribución geográfica y en el comportamiento en el laboratorio al ser cultivado el material biológico o inoculado a animales de experimentación. En la actualidad, se utilizan otros criterios biológicos, inmunológicos, bioquímicos y moleculares, entre los que cabe destacar como método de referencia la electroforesis de isoenzimas.

La Organización Mundial de la Salud considera que las leishmaniosis se encuentran distribuidas en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia y que son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países. Su distribución geográfica está limitada por la distribución de los flebotominos, la susceptibilidad de éstos a los climas fríos, su tendencia a ingerir sangre del hombre o únicamente de los animales y por su capacidad de soportar el desarrollo interno de las especies de leishmania. Se calcula una prevalencia mundial de 12 millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5-2 millones de nuevos casos para las leishmaniosis cutáneas y 500.000 nuevos casos para la leishmaniosis visceral. Sin embargo, los datos oficiales de que se dispone subestiman la realidad de la afección humana por estos protozoos flagelados debido a varios factores limitantes: a) la distribución de las zonas de transmisión en áreas endémicas es frecuentemente discontinua, b) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, c) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, d) el número de personas infectadas, pero asintomáticas, es mucho mayor que el número de casos manifiestos de leishmaniosis visceral y, por último, la leishmaniosis es de declaración obligatoria en tan sólo 40 de los 88 países endémicos.

MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

El ciclo biológico de las leishmanias comprende esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado, y viceversa, con dos formas morfológicas principales, la intracelular o amastigota en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado y la forma extracelular o promastigota en el tracto intestinal de los flebotomos.

La forma **amastigota** (Figura 1), inmóvil, se presenta al microscopio óptico, y tras tinción con colorantes habituales, como un cuerpo oval y de una longitud y anchura que oscilan, respectivamente, entre 3-5 μm y 1,5-2,5 μm . En su citoplasma, teñido de un color azulado, se observa un núcleo voluminoso y esferoidal, generalmente excéntrico, y un kinetonúcleo próximo al núcleo de aspecto bacilar o bastoniforme. Este kinetonúcleo es la observación conjunta, al microscopio óptico, del blefaroplasto del flagelo y de una mitocondria modificada o kinetoplasto, siendo esta última estructura la que da el nombre al grupo de protozoos de los Kinetoplastida. Tanto el núcleo como el kinetonúcleo adquieren una tonalidad violácea.

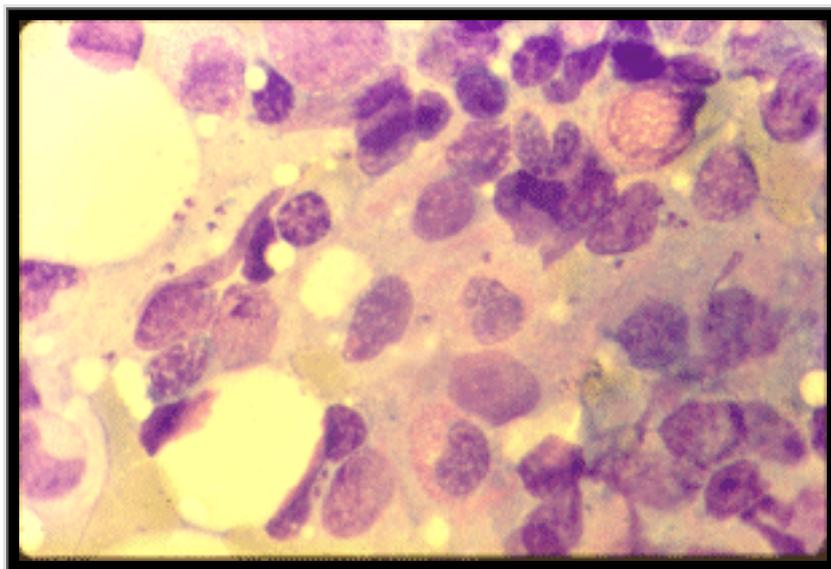


Figura 1. Amastigotes de *L. infantum* en una extensión de médula ósea

La forma **promastigota** (Figura 2), fusiforme, extracelular y móvil, presenta un tamaño superior. Su talla varía entre los 10-30 μm de largo y los 1,5-3 μm de ancho. Si bien en el examen en fresco sólo puede observarse un largo flagelo libre en su región anterior, su tinción permite observar además la presencia de un núcleo oval central y un kinetonúcleo bastoniforme claramente prenuclear. Además, en 1979 se demostró que el parásito presenta en el tubo digestivo del vector otro estadio flagelado, distinto

al promastigota, al que se denominó **paramastigota** debido a la situación lateral del kinetoplasto respecto al núcleo.

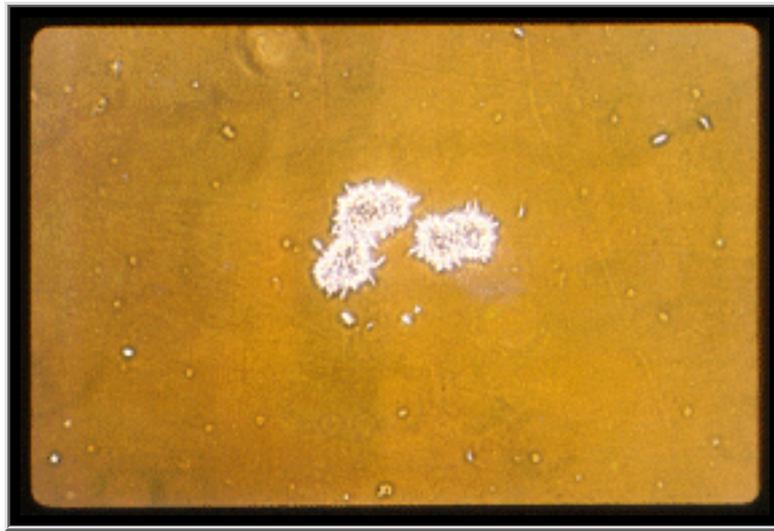


Figura 2. Promastigotes de *L. infantum* (rosetas en medio de Schneider).

CICLO BIO-EPIDEMIOLÓGICO

Las leishmanias se localizan y multiplican en las células del sistema fagocítico mononuclear de mamíferos y reptiles sauriomorfos. Su ciclo biológico incluye, además, la presencia de artrópodos vectores, los flebotominos, en cuyo tubo digestivo el parásito se multiplica extracelularmente. De las más de 700 especies descritas de flebotominos, pequeños dípteros de 2-3 mm y con alas peludas y puntiagudas, únicamente unas 70 son vectores probados o sospechosos de transmitir las leishmaniosis. En el Nuevo Mundo todas ellas pertenecen al género *Lutzomyia* y en el Viejo Mundo al género *Phlebotomus*.

La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis en las que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. En su inicio se trataría de parasitosis de animales salvajes, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-epidemiológico del parásito (ciclo enzoótico o primario). Al desaparecer el reservorio salvaje del entorno humano, la adopción de animales domésticos susceptibles es el origen de las leishmaniosis de carácter zooantropónico o secundario. Finalmente, el reservorio animal puede desaparecer y el hombre actuar como único hospedador vertebrado en un ciclo antropónico o terciario. Así, en el mantenimiento de las leishmaniosis juega un papel fundamental la existencia de mamíferos hospedadores habituales de estos parásitos que constituyen la fuente de partida para su posterior propagación al hombre a través de los flebotomos vectores. Los carnívoros, fundamentalmente los cánidos, y diferentes grupos de roedores ejercen usualmente este papel. Otras especies animales como los osos hormigueros, los perezosos, las zarigüeyas o los damanes pueden actuar también como reservorios en Sudamérica.

El inicio del **ciclo en el hospedador vertebrado** tiene lugar cuando el flebotomo le inyecta con su picadura los promastigotes infestantes o metacíclicos. Una vez llegados al hospedador vertebrado son captados por los macrófagos de la dermis y pasan a su citoplasma donde, englobados en una vacuola parasitófora, el parásito se transforma en la amastigota y se divide activamente por sucesivas divisiones binarias. La multiplicación y desarrollo en los macrófagos finaliza cuando la célula, que contiene unas decenas de parásitos, estalla. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, o bien se diseminan directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en territorios orgánicos ricos en células macrofágicas fijas (médula ósea, hígado y bazo principalmente).

El **paso del parásito al vector** tiene lugar cuando las hembras de los flebotomos se dirigen al hospedador vertebrado con objeto de ingerir sangre para alimentarse y poder desarrollar sus huevos. Las leishmanias se multiplican bajo la forma amastigota a su llegada al tubo digestivo del vector para pasar luego rápidamente a la forma promastigota que se multiplica activamente en su estómago e intestino. Finalmente, y después de pasar por el estadio de paramastigota que también sufre procesos de división binaria, los promastigotes metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado. Este ciclo general presenta distintas modalidades en las diferentes especies de leishmanias, dependiendo de la zona del intestino en que tiene lugar la presencia y multiplicación de las formas parásitas.

INMUNOLOGÍA, PATOLOGÍA, MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIOSIS Y FACTORES IMPLICADOS

El establecimiento de la infección tiene lugar cuando los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* son fagocitados por los macrófagos de la zona de la picadura. La entrada de los promastigotes activa la cascada del complemento, lo que permite que la proteína sérica C3 (C3b y C3b1) del complemento se deposite en la superficie del parásito y se una a los receptores del complemento presentes en el macrófago. La unión de los promastigotes al macrófago puede realizarse también directamente, gracias a la existencia en la superficie del parásito de moléculas tales como el lipofosfoglucono (LPG) y una metaloproteína, la glucoproteína 63 (gp63) de 63 kDa. La producción de derivados oxidativos, destinados a la destrucción de las leishmanias, queda inhibida cuando los parásitos penetran en el interior de las células hospedadoras vía C3b/C3b1. El LPG forma una barrera alrededor del parásito y es capaz de captar radicales libres de oxígeno, previniendo también la unión del fagosoma con los

lisosomas. Además, la gp63, dada su actividad proteolítica, degrada los enzimas lisosomales destinados a destruir a los amastigotes.

Una vez se encuentran los parásitos en el interior de los macrófagos, los amastigotes pueden ser destruidos por los metabolitos oxigenados y por las hidrolasas lisosomales. Las proteínas liberadas de las leishmanias se asocian a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que actúan como transportadores de antígenos a la superficie del macrófago. Cuando se asocian las CMH de la clase I, los antígenos son reconocidos por las células T del tipo CD8+ (Tc o citotóxicas), mientras que cuando se asocian a las de la clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4+ (Th o cooperadoras). La activación de las células Tc permite la producción de una citotoxina que provoca la lisis del parásito, así como de citocinas que activan a los macrófagos. La activación de las células Th desempeña un papel importantísimo en la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania*, tal y como se ha observado en el modelo murino de infección con *Leishmania major*, estableciéndose dos tipos de respuesta según se expresen las subpoblaciones Th1 o Th2. Cuando se estimula la producción de las Th1 se producen linfocinas, sobre todo interferon-gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), así como factor de necrosis tumoral (TNF- α), que activan los macrófagos parasitados y, como consecuencia de ello, se activan también los mecanismos que conducen a la destrucción de las leishmanias y a la curación de la lesión. Por el contrario, cuando se estimula la producción de las Th2 se producen linfocinas que inhiben la respuesta de tipo celular (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que favorecen el desarrollo de la respuesta humoral, a la vez que falla la celular, con la consiguiente diseminación de los parásitos hacia otras zonas. Existen varios factores que determinan el tipo de respuesta inmune y, por lo tanto, de las diferentes formas clínicas de la leishmaniosis, tales como el genotipo del parásito, tamaño del inóculo, zona de inoculación, número de picaduras recibidas, saliva del flebotomino, respuesta inmune y ciertos factores genéticos ligados al hospedador, la existencia de infecciones concomitantes, etc.

Una vez los promastigotes de una especie son inoculados pueden ocurrir tres situaciones: a) la muerte de los parásitos, b) el establecimiento de una infección local, o c) la diseminación a través de la piel, de la mucosa oronasal o por vía sanguínea. La metástasis vía linfática es poco frecuente, ya que los parásitos son destruidos en los nódulos linfáticos. Cuando la invasión de las leishmanias queda limitada a los macrófagos de la zona de la picadura, como consecuencia de la respuesta de tipo celular, se presenta el cuadro clínico de la **leishmaniosis cutánea**, conocida en determinados casos como *Botón de Oriente*. Las células infectadas permanecen en la piel y quedan aisladas por un cúmulo de linfocitos, células plasmáticas y células gigantes que originan un granuloma que causa cambios en la estructura de la piel. Estos cambios pueden ser una hiperplasia y adelgazamiento de la piel, ulceración y desorganización del tejido conectivo. El granuloma puede presentar un área central necrótica. La formación del granuloma en la base de la lesión conduce, en ocasiones, a la curación espontánea, pudiendo dejar como secuela una cicatriz. En las formas autóctonas, el periodo de incubación puede exceder el año. Las lesiones, generalmente únicas y presentes en la cara, pueden no ser ulcerativas y persistir entre 1-3 años.

En ocasiones no tiene lugar el aislamiento de la lesión primaria por una barrera linfocítica y el parásito se extiende, por diseminación cutánea directa, sobre toda la superficie cutánea, originando la **leishmaniosis cutáneo difusa** en la que es característica la débil respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral. La metástasis de los parásitos, muchas veces a partir de lesiones cutáneas primitivas, hacia las mucosas es el origen de la **leishmaniosis mucocutánea o espundia**, en ocasiones altamente deformativa ya que se produce una ulceración y erosión del tejido blando y del cartílago de las zonas afectadas, principalmente en la zona nasal pero también en la faringe, laringe y labio superior. Este tipo de leishmaniosis es raro en nuestro país y se caracteriza porque se presenta una respuesta mixta, tanto humoral como celular.

La visceralización del parásito, como consecuencia del fallo de la respuesta inmune de tipo celular, se conoce con el nombre de **leishmaniosis visceral (LV) o Kala-azar**. Suele afectar a niños, personas en estado de malnutrición y pacientes con algún tipo de inmunodepresión. En el sudeste europeo se calcula que entre el 25-70% de los casos de LV pertenecen a enfermos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los primeros síntomas y signos clínicos aparecen después de un periodo de incubación variable. Los principales órganos afectados son el bazo, hígado, médula ósea y tejido linfático, pero puede haber afectación de otras áreas como pueden ser los pulmones y la mucosa intestinal. En los órganos afectados se forman pequeños granulomas que dañan las vísceras al causar hiperplasia e hipertrofia de los mismos, congestión de los vasos sanguíneos, necrosis de los tejidos y alteraciones de su funcionamiento normal.

Los principales síntomas de la LV son una fiebre alta, irregular y prolongada (más de dos semanas), acompañada de pérdida de peso y astenia, esplenomegalia que puede ir acompañada de hepatomegalia, que suele ser moderada, linfadenopatías y pancitopenia. La disminución en el número de plaquetas puede ser responsable de hemorragias a distintos niveles. En la LV hay una importante respuesta humoral con elevadas tasas de anticuerpos específicos junto con una hipergammaglobulinemia policlonal, con producción de IgM e IgG, por activación de los linfocitos B. El incremento de anticuerpos da como resultado la aparición de inmunocomplejos circulantes que a veces se depositan en los riñones causando una glomerulonefritis. En contraposición, y tal como se ha comentado, se presenta una importante inhibición de la respuesta celular que conduce a una multiplicación incontrolada del parásito. En enfermos con la coinfección VIH-*Leishmania* el cuadro clínico puede ser parecido, aunque suelen presentarse localizaciones atípicas debido a la anergia de los pacientes. En estos pacientes, la enfermedad puede cursar sin esplenomegalia y con lesiones nodulares o ulcerativas a nivel del tracto gastrointestinal y pulmonar; además, el número de parásitos en la médula ósea suele ser elevado.

ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEISHMANIOSIS AUTÓCTONAS

En España los casos de leishmaniosis declarados son fundamentalmente viscerales, la mayoría de ellos en enfermos infectados por el VIH. De los 1440 casos declarados de coinfección VIH-*Leishmania* entre 1990 y 1998 en la región mediterránea, 835 lo han sido en nuestro país. La aplicación de la electroforesis de isoenzimas en la caracterización de las cepas de *Leishmania* en España ha permitido incriminar a *Leishmania infantum* como agente responsable de las leishmaniosis cutánea y visceral, lo que sirvió para descartar *Leishmania tropica* y *Leishmania donovani* como agentes etiológicos de ambas formas de leishmaniosis, respectivamente, en nuestro país. *L. infantum* es una especie que se encuentra distribuida principalmente en la región mediterránea, pero también en el este de China y en Sudamérica. En el Nuevo Continente se la denomina, habitualmente,

Leishmania chagasi.

Los estudios de epidemiología molecular llevados a cabo han puesto de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo en el seno de las cepas de *L. infantum* en nuestro país, con 22 zimodemas identificados de los 33 descritos en todo el mundo, de los que 12 han sido citados únicamente en España. Algunos de ellos se encuentran mayoritariamente en los casos de leishmaniosis visceral, siendo considerados como viscerotropos, mientras que otros se consideran dermatropos al ser aislados únicamente de lesiones cutáneas en los pacientes inmunocompetentes. Éstos últimos pueden encontrarse también como responsables de leishmaniosis visceral en los inmunodeprimidos. Si bien la leishmaniosis en España se considera una zoonosis, con el perro como reservorio del parásito, tan sólo seis de los 22 zimodemas identificados han sido aislados del reservorio canino en nuestro país, lo que puede indicar la existencia de zimodemas con un ciclo de tipo antroponótico.

En España se han identificado 12 especies de flebotomos, de las que dos han podido ser incriminadas como vectores de *L. infantum*. Se trata de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, que pueden actuar de forma concomitante en la transmisión de la leishmaniosis en un foco determinado.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIOSIS

El diagnóstico de laboratorio de las leishmaniosis se basa, generalmente, en la aplicación conjunta de métodos de diagnóstico directos e indirectos, variando éstos en función del cuadro clínico que se presenta, visceral o cutáneo. El diagnóstico directo, que comporta, en la mayoría de los casos, **la observación del parásito**, es el mejor sistema para proceder al diagnóstico de la leishmaniosis. Para ello debe efectuarse en primer lugar la obtención de muestras y, posteriormente, su observación al microscopio previa tinción con los colorantes habitualmente empleados en hematología.

En el diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria la obtención de las muestras debe ser efectuada a partir de lesiones activas de la piel o mucosas, teniendo en cuenta que, en las típicas lesiones ulceradas, ésta debe realizarse en los bordes de la lesión o en el fondo de la úlcera, después de eliminar la zona superior necrosada. Esta toma de muestras puede realizarse por varios métodos: mediante un simple raspado de la lesión con un brocal odontológico, efectuando incisiones de algunos milímetros hasta alcanzar la dermis y efectuar un raspado, aspiración con aguja, biopsia con aguja o mediante biopsia de todo el espesor con un *punch*. Cuando se quiera efectuar un cultivo, indispensable para la identificación del parásito, o una inoculación experimental en animales de laboratorio, el método a elegir deberá permitir la obtención de una cantidad de muestra suficiente. Además, en el caso de realizar un cultivo, la toma de muestra y posterior siembra en el medio debe ser efectuada en condiciones estériles. La biopsia debe ser homogeneizada en una solución salina con penicilina y, posteriormente, sembrada en el medio de cultivo.

En el caso de la leishmaniosis visceral, la sensibilidad del examen directo varía en función del producto patológico escogido para efectuar el diagnóstico. Si bien la punción esplénica sería la elegida por su elevada sensibilidad (95%), dada la localización preferencial de los parásitos en el bazo, suele dejarse como último recurso por los riesgos asociados. Así, el método más utilizado, tanto por su facilidad y seguridad de ejecución como por su sensibilidad, es el aspirado de médula ósea (52-70%), realizado por punción esternal en los adultos y de cresta ilíaca en los niños. En individuos inmunodeprimidos esta prueba presenta una sensibilidad de hasta un 94% (78-94%) durante el primer episodio y menor (64%) en las recaídas. El parásito también puede buscarse en la sangre periférica o en la capa de leucocitos, hígado, tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos, líquido pleural, etc.

La presencia de leishmanias en la sangre fue ya evidenciada hace más de 50 años. La posibilidad de poder efectuar el diagnóstico a partir de sangre periférica o del concentrado de leucocitos, como un método alternativo, facilita sobre todo los controles subsiguientes. Se ha podido demostrar que, si se efectúa un simple frotis de sangre periférica, éste es positivo en un 50% de los casos y que, si se separa la capa de leucocitos por gradiente de Ficoll® y se cultiva, el rendimiento se incrementa aproximadamente hasta un 70%.

Con cualquiera de los productos patológicos obtenidos puede procederse a la observación de las formas amastigotes, tras tinción de los frotis con el colorante de Giemsa o análogos. Otras tinciones como la de la hematoxilina-eosina ofrecen un rendimiento menor (53% frente a un 62%).

El **cultivo** de las leishmanias es una técnica auxiliar para el diagnóstico directo, ya que permite el aislamiento del parásito y facilita su detección. No existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. A pesar de ello, los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios difásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN) y los medios líquidos para cultivos de células de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con suero bovino fetal desactivado (10-30%). Un hecho esencial, cuando se utilizan medios enriquecidos con suero bovino fetal, es que debe efectuarse un ensayo previo del lote para comprobar si permite el crecimiento y multiplicación de las leishmanias, ya que se ha comprobado que algunos lotes presentan una notable citotoxicidad. Se ha comprobado también que la adición de 1-2% de orina humana estéril (2-3 gotas en el caso del medio NNN) aumenta el rendimiento del cultivo, difícil para algunas cepas de *L. infantum*, y permite la disminución de la concentración del suero bovino fetal. Sea cual sea el medio de cultivo a elegir, se le deben añadir antibióticos para reducir las posibles contaminaciones. El uso de medios líquidos si bien adolece del inconveniente de su alto coste, presenta la ventaja de facilitar la observación del parásito directamente en el microscopio invertido. En cambio, cuando se efectúa el cultivo en medio NNN la observación debe realizarse, entre porta y cubreobjetos, tras la toma aséptica de una pequeña porción de la fase líquida que es donde crecen los promastigotes.

El cultivo debe mantenerse en la estufa a unos 25 °C. El máximo crecimiento y el periodo de viabilidad varía con los distintos medios y las distintas especies o cepas del parásito. Cuando se efectúa el cultivo en el medio NNN hay que realizar resiembras cada siete días, practicando al menos cuatro resiembras sucesivas antes de dar los resultados como negativos. En el caso de haber efectuado la siembra en un medio líquido, se debe proceder con una periodicidad inferior (cada 4-5 días, dependiendo de

la cepa) y debe mantenerse el cultivo durante un mínimo de un mes. Sin embargo, nuestra experiencia, juntamente con la de otros laboratorios, nos ha demostrado que es conveniente mantener los cultivos por un periodo de tiempo más largo, ya que algunas cepas se positivizan muy tarde, al cabo de tres meses o más. El crecimiento más o menos rápido de un cultivo varía también en función del inóculo. Esto es especialmente frecuente cuando se trata de muestras de médula ósea que contienen gran cantidad de sangre que, a su vez, provoca una inhibición del crecimiento del cultivo. Por eso se recomienda, en estos casos, la dilución de la muestra en suero fisiológico, adicionado de 25000U/ml de penicilina, previa a su siembra.

En los individuos coinfectados con el VIH se ha podido observar que la sensibilidad de la técnica incrementa del 60-70%, cuando se realiza el diagnóstico por observación del frotis teñido, a un 80-85% cuando se efectúa el cultivo. El cultivo celular, habitualmente de macrófagos, ha sido utilizado muy raramente en el diagnóstico de las leishmaniosis, y se aplica más frecuentemente en estudios biológicos del parásito y en ensayos de fármacos con posible actividad leishmanicida.

La **inoculación en animales de experimentación**, realizada habitualmente en el hámster dorado y por vía intraperitoneal, puede ser de gran utilidad en el caso de cepas de difícil crecimiento o de inóculos contaminados. Esta técnica presenta, sin embargo, el grave inconveniente de su tardía positivización, ya que la investigación de los parásitos, generalmente en el bazo hipertrofiado del animal, requiere unos 2-3 meses desde la inoculación.

Se ha utilizado también el **xenodiagnóstico** para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en los pacientes inmunodeprimidos. Esta técnica consiste en dejar que flebotomos procedentes de una colonia de laboratorio piquen e ingieran sangre de un posible paciente para, al cabo de unos días, proceder a su disección y observar la posible presencia de leishmanias en su tubo digestivo. Si bien esta técnica tiene una elevada sensibilidad, presenta el inconveniente de precisar de colonias de laboratorio de especies de flebotomos susceptibles a la especie de *Leishmania* que se encuentra en la zona geográfica, colonias que son de difícil establecimiento y mantenimiento, por lo que es una técnica aplicable únicamente en centros de referencia capacitados.

La detección del parásito mediante técnicas inmunológicas en diversos productos patológicos ha sido también utilizada para efectuar un diagnóstico directo de las leishmaniosis. Así, teniendo en cuenta que en algunos casos, y debido a la escasez de parásitos o a su localización extracelular por rotura de los macrófagos, el examen directo puede resultar muy difícil, éste se realiza en ocasiones con la técnica de la inmunoperoxidasa y la inmunofluorescencia directa. Respecto a la **detección de antígenos circulantes** cabe destacar la detección, mediante *Western blotting* (WB), de las fracciones proteicas de 72-75 y 123 kDa en la orina de los enfermos coinfectados con el VIH y en pacientes inmunocompetentes.

Actualmente, la puesta a punto de técnicas de biología molecular es una interesante alternativa en el diagnóstico de la leishmaniosis. Para detectar la presencia de DNA del parásito la amplificación del material genómico del parásito por **PCR** es una de las técnicas más ensayadas. Su sensibilidad es idéntica o superior a la técnica de referencia, que es el cultivo, y superior al examen directo. Además presenta la ventaja de poder disponer de un resultado positivo o negativo con rapidez. Actualmente esta técnica no está comercializada y sólo se utiliza en laboratorios especializados.

El diagnóstico indirecto de las leishmaniosis se basa en la puesta en evidencia de la respuesta inmune del hospedador, de tipo celular en la leishmaniosis tegumentaria y humoral en la leishmaniosis visceral y muco-cutánea. La prueba más utilizada para el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea es la **intradermoreacción de Montenegro** o prueba de la **leishmanina**, basada en poner en evidencia una hipersensibilidad de tipo retardada, que se manifiesta de forma temprana (hacia la cuarta o quinta semana) y que, salvo raras ocasiones, perdura toda la vida. La prueba consiste en la inoculación intradérmica de la solución de leishmanina, una suspensión estéril de promastigotes lisados, fenicada y tamponada. La lectura, por la técnica del bolígrafo, se realiza a las 48-72 h de la inoculación y se considera positiva cuando aparece una induración de un diámetro igual o superior a los 5 mm. La interpretación de los resultados debe efectuarse teniendo en cuenta que, en una zona endémica, esta prueba resulta positiva en aquellas personas que han tenido un contacto con el parásito, resultara del mismo un cuadro clínico o una infección inaparente. Por otro lado, se han detectado reacciones falsamente positivas en casos de lepra, tuberculosis, epiteloma maligno o *larva migrans*. Esta técnica puede ser también utilizada para confirmar el éxito terapéutico en los casos de leishmaniosis visceral humana.

Para el **diagnóstico serológico de la leishmaniosis visceral** se dispone de una amplia gama de técnicas en las que el antígeno utilizado procede casi siempre de promastigotes de *Leishmania* obtenidos de cultivos. Debe tenerse en cuenta que las leishmanias presentan fracciones antigénicas compartidas con otros parásitos kinetoplásticos, pudiendo existir reacciones cruzadas entre ambos. Este hecho no representa un problema grave en nuestro entorno, por cuanto *L. infantum* es, prácticamente, el único representante de este grupo en España. En menor escala, la existencia de reacciones cruzadas se ha descrito también en enfermos de amebosis, paludismo, tuberculosis, toxoplasmosis, lepra y otras enfermedades infecciosas. Por otro lado, la tasa de anticuerpos varía con el estado inmunológico del paciente y con la edad. Así, si bien en los adultos inmunocompetentes los títulos de anticuerpos que se detectan son generalmente altos en una leishmaniosis visceral en fase aguda, no sucede lo mismo en los pacientes inmunocomprometidos (VIH, sometidos a tratamientos inmunosupresores, etc.), o en los niños de corta edad, en los que los títulos pueden incluso ser negativos. La seronegatividad al antígeno de *Leishmania* en los pacientes coinfectados con el VIH alcanza un 43% frente a una sensibilidad de las técnicas serológicas del 87-93% en los casos de leishmaniosis visceral en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, existen diferencias según la prueba empleada o el laboratorio donde se realiza. La OMS recomienda la utilización conjunta de dos o más pruebas para incrementar la sensibilidad.

La sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas depende de la calidad del antígeno utilizado y de factores intrínsecos a la técnica empleada. La utilización de promastigotes enteros, en técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación directa o inmunoenzimáticas (ELISA, Dot-ELISA) aporta una notable estabilidad al antígeno en cuanto a su composición y, por lo tanto, homogeneidad de resultados. Es por ello que la IFI ha constituido durante largo tiempo el método de referencia para la leishmaniosis, al igual que para otros protozoarios. Por el contrario, el principal inconveniente de la utilización de extractos solubles, obtenidos a partir del parásito (sonicación, homogeneización, congelación-descongelación, etc.) está en la heterogénea composición del antígeno obtenido, que puede variar en gran medida de unos laboratorios a otros, e incluso entre distintos lotes obtenidos en un mismo laboratorio. Su utilización en técnicas de ELISA o de inmunocromatografía es compartida o substituida

por la de antígenos purificados y recombinantes (tal como el rk-39). El antígeno recombinante rk-39, obtenido a partir de una librería de ADNc de *Leishmania chagasi*, presenta una elevada sensibilidad y especificidad y evita las reacciones cruzadas que se dan con la enfermedad de Chagas.

La técnica de WB es la que presenta una mayor sensibilidad y especificidad. Permite detectar anticuerpos altamente específicos frente a las fracciones antigénicas de 14 y 16 kDa. En enfermos con la coinfección VIH-*Leishmania* pone en evidencia anticuerpos específicos incluso cuando las demás técnicas, IFI o ELISA, son negativas y permite, además, detectar fases iniciales de la infección. Las inmunoglobulinas habitualmente detectadas suelen ser inmunoglobulinas totales o de la clase IgG. La determinación de IgM, tanto mediante IFI como con la técnica ELISA, puede permitir la detección de un proceso activo subclínico si bien no suele utilizarse. La detección de IgE específicas se ha señalado también como un buen indicador de leishmaniosis visceral activa.

La detección de anticuerpos en el caso de las leishmaniosis cutáneas del Viejo Mundo, como es el caso de nuestro país, es poco sensible. En cambio, puede ser útil para diagnosticar las infecciones causadas por el subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo.

TRATAMIENTO

Se recomienda que, antes de efectuar, cualquier tratamiento se disponga de la confirmación parasitológica. Los derivados antimoniales pentavalentes [estibogluconato sódico (Pentostam®) y antimoniato de meglumina (Glucantime®)] son la primera línea de fármacos en el tratamiento de las leishmaniosis y se caracterizan por ser efectivos frente a las distintas formas clínicas. En el caso de la leishmaniosis visceral se aconseja su administración por vía sistémica, en régimen de hospitalización. Las dosis terapéuticas son de 20 mg de Sb^v/kg/día durante 28 días. Otros fármacos utilizados son la anfotericina B liposomal, diamidinas aromáticas (Pentamidina®), alopurinol e IFN-γ recombinante.

CASO CLÍNICO

En este control, se envió un portaobjetos con una extensión de una muestra de médula ósea teñida con tinción de Giemsa. Se trataba de una mujer de 45 años natural y residente en el área mediterránea de nuestro país, sometida a un trasplante autólogo de médula ósea hacía nueve meses por un carcinoma de mama, que acudió a la policlínica de Oncología antes de la fecha de revisión por presentar desde hace quince días un cuadro de mal estado general, fiebre, sudoración y escalofríos de predominio nocturno con pérdida de peso y astenia.

La temperatura era de 38 °C y se palpaba una adenopatía laterocervical derecha no dolorosa y poco desplazable. Existía una pancitopenia, con una hemoglobina de 8,6 y una velocidad de sedimentación globular a la primera hora de 136. Los valores de las pruebas de coagulación eran normales y las pruebas funcionales hepáticas ligeramente alteradas. Existía una hipoalbuminemia, con hipergammaglobulinemia. La detección de anticuerpos de *Toxoplasma gondii*, CMV, hepatitis B y C y VIH fue negativa en todos ellos. El diagnóstico se realiza por examen del material patológico obtenido mediante una aspiración medular.

Comentarios al caso clínico

Se trata de una paciente neoplásica. En el examen clínico destaca el síndrome febril acompañado de síndrome tóxico (astenia, pérdida de peso, temblores, escalofríos) y el hallazgo de una tumoración laterocervical no dolorosa y poco desplazable. Los síntomas clínicos de una leishmaniosis pueden ser confundidos con los de otros procesos patológicos, tales como la malaria, fiebre tifoidea, tuberculosis, esquistosomosis, histoplasmosis, síndrome de esplenomegalia tropical, tripanosomosis africana, brucelosis, leucemia y malnutrición, entre otros. Por ello se solicitaron pruebas analíticas convencionales para descartar procesos infecciosos de diversa etiología, y presentes en nuestro país, como la toxoplasmosis, infección por el CMV, hepatitis B y C e infección por el VIH.

Los resultados negativos aconsejaron realizar, con buen criterio, la punción de aspirado medular para descartar otras patologías y una posible recaída de su enfermedad hematológica. Entre las otras patologías a incluir en el diagnóstico diferencial, habría que destacar la leishmaniosis, ya que la paciente vivía en el área mediterránea, zona endémica de la enfermedad, en donde los inmunodeprimidos son los que más frecuentemente presentan esta infección. Por otro lado, tanto los datos clínicos como los bioquímicos inducen a pensar en esta enfermedad como la causante de la sintomatología.

Resolución y discusión

El examen microscópico del frotis de aspirado medular, teñido por el colorante de Giemsa permite observar abundantes estructuras de cuerpo oval, intra e extramacrofágicas, de longitud y anchura que oscilan entre 3-5 μm x 3-5 μm y 1,5-2,5 μm. El citoplasma se tiñe de color azulado y, en su interior, se observan un núcleo voluminoso excéntrico y una estructura de aspecto bacilar próxima al núcleo que corresponde al kinetonúcleo. Estos datos permiten la identificación de estas estructuras como correspondientes a las formas amastigota de *Leishmania*.

En este caso, y teniendo en cuenta la inespecificidad inicial de los síntomas clínicos que presentaba la enferma, podemos considerar que el diagnóstico final ha estado basado principalmente en la observación del parásito en el frotis de aspirado medular. Tal y como se ha comentado, hubiera sido aconsejable efectuar también un cultivo de la muestra, así como llevar a cabo determinaciones serológicas de leishmaniosis. Una intradermoreacción positiva después de finalizar el tratamiento sería un resultado de buen pronóstico para la paciente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvar Ezquerro J, Moretti ML, Corachán Cuyás M. Infecciones causadas por protozoos flagelados hemotísulares. En: Farreras P, Rozman C (eds.). Medicina Interna, 14ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt, 2000; pp 2749-2757.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10:298-319.
- Anónimo. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS/WHO). Lucha contra las leishmaniasis. Informe de un Comité de Expertos de la OMS, Serie de Informes Técnicos n. 793, Ginebra: World Health Organization, 1990.
- Anónimo. World Health Organization. *Leishmania*-HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases. WHO/LEIS/2000.42, 2000.
- Atta AM, d'Oliveira A Jr, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:426-430.
- de Colmenares M, Portús M, Riera C, Gállego M, Aisa MJ, Torras S, Muñoz C. Detection of a 73-75 kDa and 123 kDa fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:247-248.
- Gállego Berenguer J. Aspectos bioecológicos de las leishmaniasis, con especial referencia a las formas autóctonas. Jornadas Técnicas sobre Pequeños Animales, Expoáviga 87, Barcelona: Fira de Barcelona, 1987; pp 17-28.
- Gállego Berenguer J. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona: Universitat de Barcelona, 1998; pp 149-157.
- Gállego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, Portús M. The life cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (South of Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (en prensa).
- Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1991; 85:477-479.
- Kalter DC. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatologic Clinics* 1994; 12:37-50.
- Peters W, Killick-Kendrick R. The leishmaniasis in biology and medicine (vol 1 y 2). Londres: Academic Press, 1987.
- Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS* 1994; 8:277-229.
- Portús M. Diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis autóctonas. *Lab2000* 1987; 12:21-28.