



Diagnóstico de la Leishmaniasis Cutánea en Panamá: Evaluación de una Prueba de PCR Utilizando Muestras Colectadas en Papel Filtro



Aracelis Miranda, Azael Saldaña, Hector Paz, Franklyn Samudio, Salomón Puga, Daniel Maregocio* y José E. Calzada.
Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (IGES).
***Centro de Salud El Espino. MINSA**

Introducción:

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania* los cuales en América, son transmitidos por la picadura de dípteros hematófagos, “chitras” del género *Lutzomya*. En Panamá, se ha observado un aumento en el número de casos de leishmaniasis durante los últimos años, registrándose una incidencia anual de aproximadamente 3,000 casos. A su vez, existe un alto sub-registro debido a que muchos pacientes viven en poblaciones rurales marginadas generalmente distantes de los laboratorios de diagnóstico y/o referencia, como el ICGES. En el ICGES las pruebas de diagnóstico de la LC se realizan a partir de raspados de los bordes de las lesiones permitiendo: la visualización microscópica de los amastigotes por frotis directo, el cultivo del parásito y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De rutina, en el ICGES se emplea el buffer Tris-EDTA (TE) para el transporte de la muestra que se analizará con la técnica de PCR, sin embargo este método requiere su envío de forma rápida y en frío. Por esta razón en este estudio se evalúa el uso potencial del papel filtro (PF) Whatman FTA en la recolección, conservación y transporte a temperatura ambiente de muestras de raspados de lesiones cutáneas para posteriores análisis moleculares en el ICGES.

Objetivos:

- Evaluar el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea en Panamá mediante la técnica molecular de PCR empleando muestras de raspados de los bordes de las lesiones cutáneas colectadas y conservadas en papel filtro.
- Brindar a la población una alternativa para el diagnóstico preciso y temprano de nuevos casos de Leishmaniasis Cutánea en áreas rurales endémicas.

Métodos y Materiales:

Este estudio preliminar se realizó en tres puestos de Salud de áreas rurales endémicas del Distrito de Capiara (Claras Arriba y Ciricito Arriba) y el Distrito de La Chorrera (Las Pavas). Se estudiaron 48 pacientes con lesiones cutáneas sospechosas de leishmaniasis a los cuales se les aplicó la prueba de Intradermorreacción de Montenegro (IDM) y se les realizó raspado del borde de la lesión cutánea para frotis, cultivo y PCR. Para el frotis se empleó la tinción Giemsa. El cultivo se llevó a cabo en medio bifásico de Senekjiev's con medio M199 (Sigma, M0393). Para la PCR, la muestra se conservó en buffer TE y en papel filtro (PF) FTA (Whatman, WB120210). La extracción del ADN de la muestra en buffer TE se realizó calentándola a 100 °C por 10 mins. La extracción de ADN de la muestra conservada en PF Whatman FTA se efectuó mediante el Reactivo de Purificación FTA (Whatman, WB120204), siguiendo las instrucciones del fabricante. El diagnóstico por PCR se realizó amplificando el ADN de un minicirculo entero del kinetoplasto de *Leishmania* del subgénero *Viannia* con un tamaño esperado de 750 pb (Vergel et al, 2005).

Resultados y Discusión:

De los 48 pacientes 15 (31.2%) fueron positivos por frotis, 13 (27%) por cultivo, 39 (81%) por PCR aplicado a muestra conservada en buffer TE y 36 (75%) por PCR aplicado a muestra conservada en papel filtro (PF) (Figura 4). Estos resultados confirman la elevada sensibilidad que tiene la prueba molecular PCR en comparación con el frotis y el cultivo independientemente del tipo de medio de transporte utilizado. Por la prueba de IDM 42 pacientes (87.5%) fueron positivos. Esta prueba no puede diferenciar entre infección activa o pasada ya que está basada en la respuesta inmunológica del huésped hacia el parásito por lo que debe ser interpretada por personal experimentado. Al comparar los resultados de muestras en PF y TE, observamos una leve diferencia en la detección por PCR. Los resultados preliminares de este estudio sugieren el uso potencial del PF Whatman FTA como una herramienta útil para la toma de muestra y evaluación posterior por PCR de raspados de lesiones cutáneas. Por lo tanto, su uso es conveniente en áreas de difícil acceso o en situaciones donde se dificulta el envío rápido empleando condiciones de refrigeración adecuada de las muestras a los laboratorios especializados. Esto se traduciría en una disminución del sub-registro de casos de leishmaniasis y reducción en los gastos de movilización de los pacientes de estas áreas al ICGES para obtener un diagnóstico. En conclusión este estudio nos permite introducir una nueva herramienta para toma, transporte y conservación de la muestra aplicado al diagnóstico a distancia de la Leishmaniasis Cutánea en nuestro país.



Figura 1
Lesiones de Leishmaniasis Cutánea



Figura 2
El papel FTA Whatman captura y estabiliza el ADN. El Reactivo de Purificación FTA Whatman es usado para la extracción de ADN.

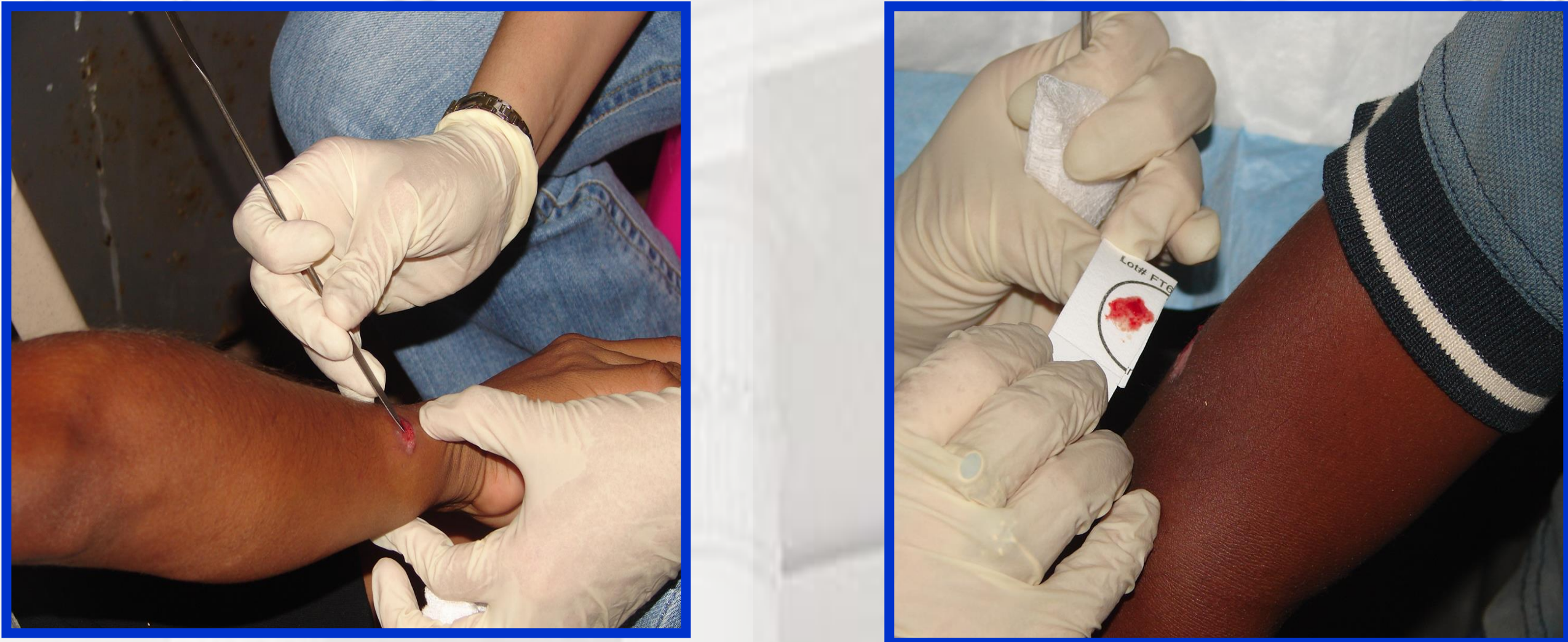


Figura 3
Toma de muestra con papel filtro Whatman FTA

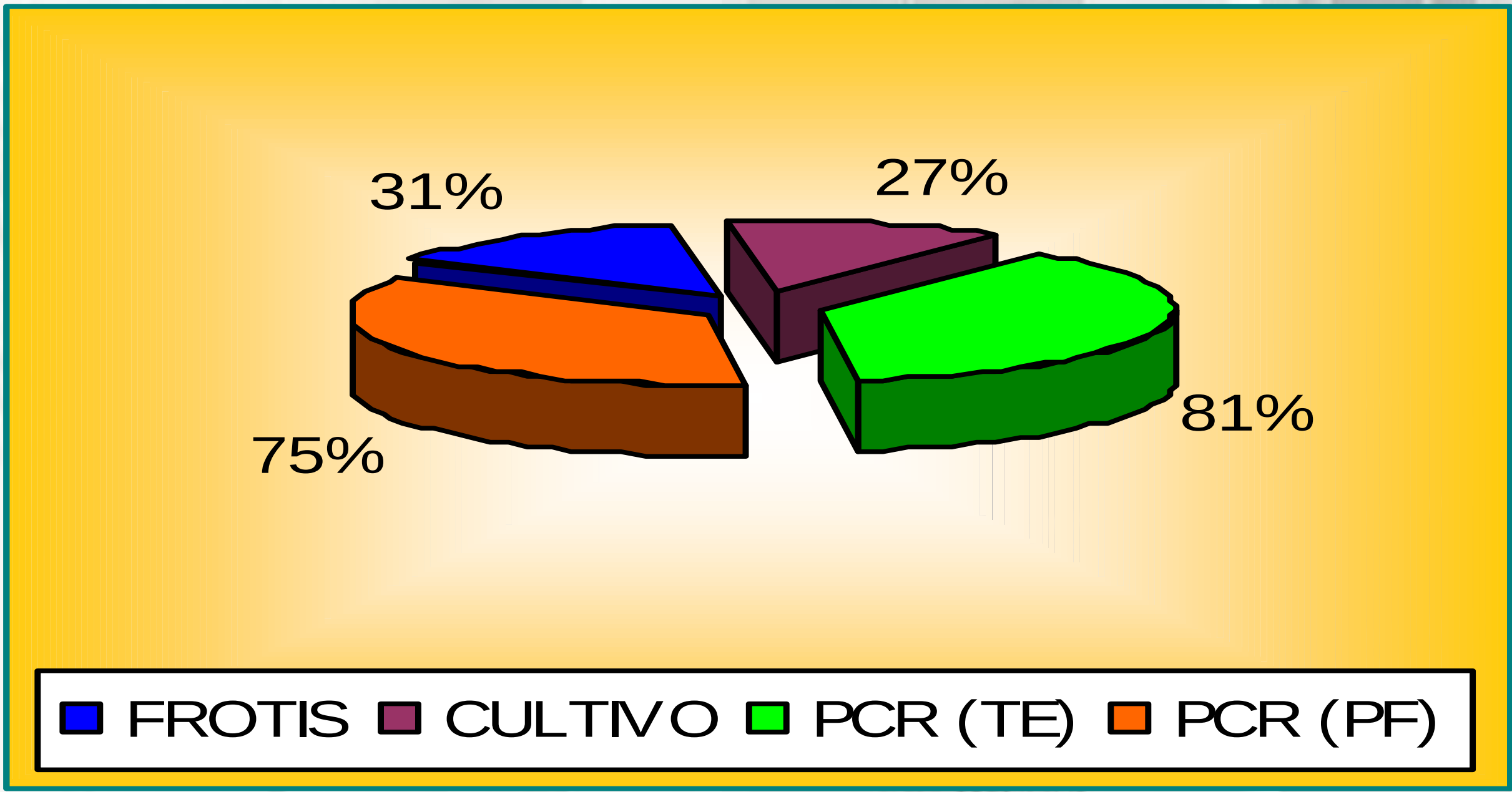


Figura 4
Casos positivos por diferentes metodologías para detección de *Leishmania* sp.

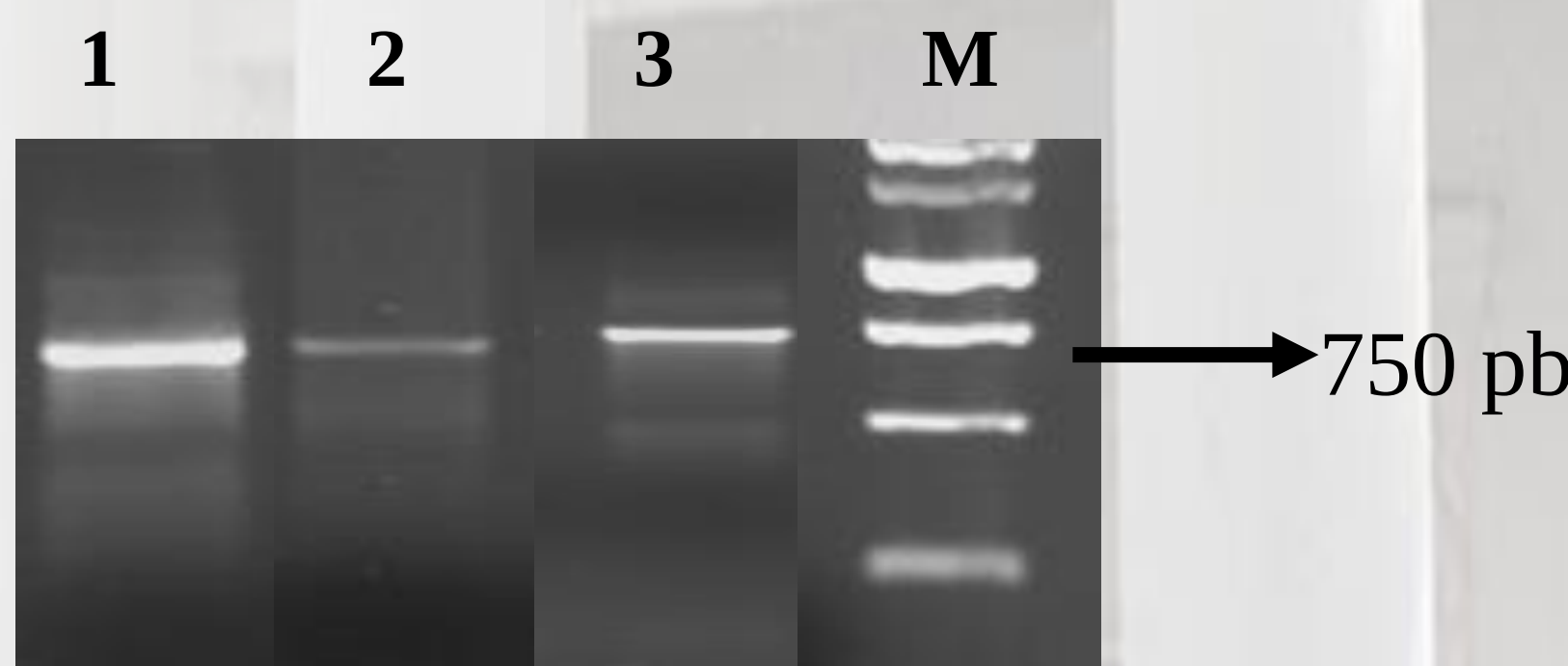


Figura 5
PCR de *Leishmania* subgénero *Viannia*.
1: Cepa de referencia *L.(V) panamensis* CIDEP 002
2: Muestra de ADN extraído de Papel Filtro
3: Muestra de ADN extraído de buffer TE
M: Marcador molecular de 100 pb.