



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
UNIVERSITAT DE BARCELONA
VIICERRECTORADO**



**CENTRO PSICOPEDAGÓGICO Y DE INVESTIGACIÓN EN EDUCACIÓN
SUPERIOR**

**FACTORES ASOCIADOS CON LA PERSISTENCIA DEL
PARASITO EN LA SANGRE DESPUÉS DEL TRATAMIENTO
EN LA LEISHMANIASIS CUTANEA AMERICANA**

**TESIS PRESENTADA AL PROGRAMA DE POSGRADUACION EN
SALUD INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA EN
CONVENIO CON LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS DE LA
PAZ PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN MEDICINA
TROPICAL Y SALUD INTERNACIONAL**

MAESTRANTE: YASHIRA ALEJANDRA CERRUTO NÚÑEZ

**AUSPICIO: AGENCIA DE COOPERACIÓN
DE DESARROLLO CATALANA**



**Agència Catalana
de Cooperació
al Desenvolupament**

**LA PAZ - BOLIVIA
2010**



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
UNIVERSITAT DE BARCELONA
VICERRECTORADO**



**CENTRO PSICOPEDAGÓGICO Y DE INVESTIGACIÓN EN EDUCACIÓN
SUPERIOR**

**FACTORES ASOCIADOS CON LA PERSISTENCIA DEL
PARASITO EN LA SANGRE DESPUÉS DEL TRATAMIENTO
EN LA LEISHMANIASIS CUTANEA AMERICANA**

**TESIS PRESENTADA AL PROGRAMA DE POSGRADUACION EN
SALUD INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA EN
CONVENIO CON LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS DE LA
PAZ PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN MEDICINA
TROPICAL Y SALUD INTERNACIONAL**

MAESTRANTE : YASHIRA ALEJANDRA CERRUTO NÚÑEZ

TUTORES: Prof. Dra Simone Ladeia Andrade *Ph.D.*

FIOCRUZ (Brasil)

Dra Susana Revollo *Ph.D.* - U.M.S.A (Bolivia)

**LA PAZ - BOLIVIA
2010**

La maestrante: Yashira Alejandra Cerruto Núñez

con CI: 4313840-LP

Autoriza al Centro Psicopedagógico y de Investigación en Educación Superior de la Universidad Mayor de San Andrés y a la Universidad de Barcelona, para que se haga de esta tesis un documento público para su uso y lectura según las normas de las mismas.

Admite tener constancia que el uso del material científico de este proyecto de investigación solo se podrá usar con el permiso del autor de esta tesis y de la dirección del Master Medicina Tropical y Salud Internacional de las Bioregiones del Departamento de Salud Pública de la Universidad de Barcelona.

Concede la propiedad de la base de datos al Departamento de Salud Pública de la Universidad de Barcelona. La Universidad de Barcelona se compromete a informar al "magister" de su uso y a incluirlo en el equipo de explotación de la base de datos y/o en el equipo de investigación.

Firmado:

La Paz .a 16 de Marzo de 2011,

**POS GRADO EN MEDICINA TROPICAL Y SALUD INTERNACIONAL UNIVERSITAT
DE BARCELONA, CATALUÑA, ESPAÑA.**

Organización y liderazgo:

Prof. Tomás Pérez Porcuna

Prof. Carlos Ascazu

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo, a toda mi querida familia, especialmente mi mama Blanca Núñez que siempre ha sido y es mi gran apoyo en mi formación profesional y personal, y a mi querido hijito Johnny que es mi razón de vivir.

Gracias por todo el cariño y ayuda que siempre me brindan es posible cumplir mis metas.



El presente trabajo de Tesis fue realizado gracias al apoyo y financiamiento de la Cooperación Sueca (ASDI- SAREC) en convenio con la Universidad Mayor de San Andrés,(UMSA) y realizado en los predios del Instituto SELADIS dependiente de la UMSA. : a través del proyecto: “Enfermedades infecciosas, Nuevas estrategias terapéuticas”, .

AGRADECIMIENTOS

- + A la Cooperación Catalana por brindarme la oportunidad de formar parte de la Maestría.*
- + Al Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia y al Centro de Investigación en educación Superior por el desarrollo de la maestría*
- + A los directores de la maestría en Medicina Tropical y Salud Internacional: Dr. Carlos Ascaso, Dr. Tomas Pérez Porcuna por todo el apoyo, organización y liderazgo prestados en todo momento para llevar a cabo el presente trabajo.*
- + A la Cooperación Sueca (ASDI-SAREC) por el financiamiento brindado sin ellos no hubiera sido posible llevar a cabo el presente trabajo.*
- + A Dios y a toda mi familia que son mi razón de vivir y mi fortaleza para seguir adelante.*
- + Mis más sinceros agradecimientos a los pobladores de la localidad de Palos Blancos, que formaron parte del presente trabajo, por toda la colaboración y confianza depositada en el equipo de trabajo.*
- + A la Dra. Simona Ladeia mi más profundo agradecimiento por toda su valiosa colaboración y el asesoramiento incondicional brindado para poder llevar a cabo el presente trabajo.*
- + A la Dra. Susana Revollo por toda su colaboración y asesoramiento*
- + Al Instituto de Servicios de laboratorio e Investigación en Salud, por toda la colaboración prestada en la parte operativa laboratorial.*
- + A todo el equipo de trabajo del proyecto: Enfermedades Infecciosas, Nuevas Estrategias Terapéuticas”, tanto del Hospital de Palos Blancos como de la ciudad de La Paz, gracias por todo el apoyo brindado.*
- + A los señores miembros del tribunal de tesis, Dr. Roger Huallpara., Dra. Sara Pérez Lara y Dr. Tomás Pérez Porcuna por todas sus valiosas contribuciones en la corrección y evaluación del presente trabajo.*

RESUMEN

En la leishmaniasis cutánea, es posible que la persistencia de la *Leishmania* en el huésped humano favorezca la ocurrencia de manifestaciones mucosas o recidivas. Así, evaluar la persistencia del parásito en la sangre luego del tratamiento a través de la PCR y definir los factores personales y clínicos que llevan a esta persistencia, es de gran valor debido a la discusión generada respecto a la viabilidad del parásito detectado por la técnica, permitiendo así fortalecer la información inicial al momento de realizar el diagnóstico y tratamiento del paciente con leishmaniasis con el propósito de orientar una mejor conducción clínica de los casos y abrir la posibilidad de evaluarla *posteriormente* en un enfoque de predicción, orientado a recidivas y formas mucosas. Con este objetivo, durante la gestión 2007 y 2009 estudiamos 340 pacientes del Hospital de Palos Blancos, del Departamento de La Paz, con úlceras cutáneas sospechosas de leishmaniasis. Se realizó el diagnóstico por microscopía y PCR de la lesión, tratamiento con Glucantime y la determinación de *Leishmania* por PCR en sangre luego del tratamiento. Factores asociados a la positividad en la PCR pos tratamiento fueron evaluados.

Entre los participantes, predominó el género masculino, rango de edad laboral y actividades fuera del habitat doméstico. Las lesiones fueron únicas en 86.4% de los casos, con dimensiones pequeñas (36.6%), medianas (36.3%) y grandes (27.1%). El tiempo de evolución hasta el diagnóstico fue > 4 meses para 79% de los pacientes (> 6 meses para 31%) y asoció positivamente con el tamaño de la lesión y la presencia de co-infección bacteriana. Los diagnósticos fueron hechos por microscopía (67,4%) y/o por PCR (97,6%), siendo que la PCR detectó 1.5 veces más *Leishmania* que la microscopía. Luego del tratamiento, 24% fueron positivos en la PCR de la sangre. Existió asociación directa positiva entre la PCR pos tratamiento y número (OR=5.2 y 11.6 para respectivamente 2 y ≥ 3 lesiones, en relación a 1 lesión, $p < 0.0001$ χ^2 tend. linear), tamaño (OR=2.6 y 3.7 para mediano y grande, en relación a pequeño tamaño, $p = 0.0001$ χ^2 t.linear) y tiempo de evolución de la lesión (OR= 16.3 y 63.6 para 4-6 meses y >6 meses, en relación a ≤ 3 meses), interrupción del tratamiento (OR=4.35, IC_{95%}=3.58-5.29), recidiva de la lesión luego del tratamiento (OR=4.7, IC_{95%}=3.8-5.8) y microscopía de las lesiones recurridas (OR=180.7, IC_{95%}=42-77.4). Mayores de 60 años de edad tuvieron mayor chance de presentar PCR pos tratamiento positiva que los demás rangos de edad (OR=2.9, IC_{95%}=1.3-6.8). No se asociaron con la PCR pos tratamiento: género, microscopía y PCR diagnósticas, localización de la lesión y co-infección bacteriana en la lesión primaria.

Los resultados muestran que la leishmaniasis cutánea tiene mayor transmisión en el ambiente rural durante el trabajo, en particular en la agricultura, seguido por la transmisión peri doméstica y que es grande el retraso en el diagnóstico en el municipio de Palos Blancos, lo que puede favorecer la co-infección bacteriana, comprometer la positividad del frotis y favorecer la persistencia del parásito luego del tratamiento. Se discute la asociación positiva de la PCR pos tratamiento con edad mayor, número y tamaño de las lesiones, tiempo de evolución de la lesión, interrupción del tratamiento y recidiva de la lesión, como indicativos de su real importancia en demostrar la actividad de la enfermedad y apoyar el diagnóstico, control y seguimiento postratamiento de los pacientes y como una indicación para una adecuada evaluación longitudinal posterior de su papel como técnica de predicción de recidivas y formas mucosas.

Palabras Clave: leishmaniasis cutánea, clínica, diagnóstico, reacción en cadena de la polimerasa, tratamiento, persistencia del parásito

RESUMO

Na leishmaniose cutânea é possível que a perpetuação da *Leishmania* no hospedeiro humano favoreça a ocorrência de manifestações mucosas ou recidivas. Assim, avaliar a persistência do parasita no sangue depois do tratamento através da PCR e definir fatores pessoais e clínicos que levam a esta persistência torna-se de grande valor, por instigar a discussão sobre a viabilidade do parasita detectado pela técnica, por fornecer dados para orientar uma melhor condução clínica dos casos e por abrir a possibilidade de avaliá-la *a posteriori* num enfoque de predição, alvejando recidivas e formas mucosas. Com este objetivo, entre 2007 e 2009 estudamos 340 pacientes do Hospital de Palos Blancos, Dep. De La Paz, com úlceras suspeitas de leishmaniose. Fez-se diagnóstico por microscopia y PCR da lesão, tratamento com Glucantime e pesquisa de *Leishmania* por PCR no sangue pós-tratamento. Fatores associados à positividade na PCR pós-tratamento foram avaliados

Entre os participantes, predominou o gênero masculino, idade na faixa laboral e atividades fora de casa. As lesões foram únicas em 86.4% dos casos, com dimensões pequenas (36.6%), médias (36.3%) e grandes (27.1%). O tempo de evolução até o diagnóstico foi > 4 meses para 79% dos pacientes (> 6 meses para 31%) e se associou positivamente com o tamanho da lesão e a presença de co-infecção bacteriana. Os diagnósticos foram feitos por microscopia (67,4%) e/ou por PCR (97,6%), sendo que a PCR detectou 1.5 vezes mais *Leishmania* que a microscopia. Após o tratamento, 24% foram positivos na PCR do sangue. Houve associação direta positiva entre PCR pós-tratamento e número (OR=5.2 y 11.6 para respectivamente 2 y ≥ 3 lesões, em relação a 1 lesão, $p < 0.0001_{\chi^2}$ tend. linear), tamanho (OR=2.6 y 3.7 para médio y grande, em relação a pequeno tamanho, $p = 0.0001_{\chi^2}$ t. linear) e tempo de evolução da lesão (OR= 16.3 y 63.6 para 4-6 meses e > 6 meses, em relação a ≤ 3 meses), interrupção do tratamento (OR=4.35, IC_{95%}=3.58-5.29), recidiva da lesão após o tratamento (OR=4.7, IC_{95%}=3.8-5.8) e microscopia das lesões recidivadas (OR=180.7, IC_{95%}=42-77.4). Maiores de 60 anos de idade tiveram maior chance de apresentar PCR pós-tratamento positiva que as demais faixas etárias (OR=2.9, IC_{95%}=1.3-6.8). Não se associaram com a PCR pós-tratamento: gênero, microscopia y PCR diagnósticas, localização da lesão e co-infecção bacteriana na lesão primária.

Os resultados mostram que a leishmaniose cutânea tem maior transmissão no ambiente rural durante o trabalho, em particular na agricultura, seguido pela transmissão peridoméstica e que é grande o atraso no seu diagnóstico no município de Palos Blancos, o que pode favorecer a co-infecção bacteriana, comprometer a positividade da microscopia e favorecer a persistência do parasita após o tratamento. Se discute a associação positiva da PCR pós-tratamento com maior idade, número e tamanho das lesões, tempo de evolução da lesão, interrupção do tratamento e recidiva da lesão, como indicativos de sua real importância em demonstrar a atividade da enfermidade e apoiar o diagnóstico, controle e seguimento pós-tratamento dos

pacientes e como uma indicação para uma adequada avaliação longitudinal posterior do seu papel como preditora de recidivas e formas mucosas.

Palavras Chave: leishmaniose cutânea, clínica, diagnóstico, reação em cadeia de polimerase, tratamento, persistência do parasita.

Lista de Figuras

Figura 1:	Estratificación de casos notificados de leishmaniasis por nivel de riesgo.....	3
Figura 2:	Ciclo Biológico de la <i>Leishmania spp.</i>	7
Figura 3:	Lesión activa de leishmaniasis cutánea.....	9
Figura 4:	Lesión activa de leishmaniasis mucocutánea	9
Figura 5:	Estructuras químicas de medicamentos de primera línea utilizados en el tratamiento de leishmaniasis: (A) N-metil glucamina, (B) Anfotericina B, (C) Pentamidina	17
Figura 6:	Estructuras químicas de medicamentos de segunda línea utilizados en el tratamiento de leishmaniasis: (A) Paromicina, (B) Ketoconazol, (C) Miltefusina.....	19

Lista de Cuadros

Tabla 1:	Distribución de las especies de <i>Leishmania</i> de los países amazónicos.....	5
Tabla 2:	Clasificación de especies de <i>Leishmania</i>	6
Tabla 3:	Efectos adversos de los fármacos más usados en el tratamiento de leishmaniasis.....	18
Tabla 4:	Frecuencia de los participantes de estudio por lugar de residencia. Palos Blancos, departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	33
Tabla 5:	Distribución de pacientes según localización de lesiones cutáneas según número de lesiones, del municipio de la localidad del Palos Blancos del departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	34
Tabla 6:	Localización de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de la localidad del Palos Blancos del departamento de La Paz, según género, edad y número de lesiones. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	35
Tabla 7:	Dimensión de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de la localidad del Palos Blancos del departamento de La Paz, según tiempo de su evolución hasta el diagnóstico. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	37
Tabla 8:	Asociación entre PCR pos tratamiento y distintas variables investigadas en la población de estudio del municipio de la localidad del Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	49

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Distribución de los participantes del estudio según grupo etario. Municipio de l Palos Blancos, departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	30
Gráfico 2: Distribución de los hombres y mujeres del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz, que participaran del estudio, según grupo etáreo. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	31
Gráfico 3: Distribución de la actividad laboral de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz, según el género. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	32
Gráfico 4: Tiempo de retraso en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea según el local de residência de los pacientes del municipio Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009	36
Gráfico 5: Frecuencia de coinfección bacteriana segun localización, numero, dimensión y tiempo de evolución de las lesiones de leishmaniasis cutanea de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	38
Gráfico 6: Frecuencia de frotis positivo sugun la edad e características clínicas de las lesiones de leishmaniasis cutanea de los pacientes del municipio de . Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	40
Gráfico 7: Frecuencia de PCR positivo segun la edad e características clínicas de las lesiones de leishmaniasis cutanea de los pacientes del municipio de la localidad del Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	41
Gráfico 8: Comparacion de los resultados obtenidos por Frotis y PCR de lesiones cutáneas de pacientes provenientes del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	42

Gráfico 9: Frecuencia de PCR postratamiento positivo segun cinco (a) y dos (b) rangos de edad de pacientes tratados con Glucantime del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009..... 44

Lista de Tablas

Tabla 1: Frecuencia de los participantes de estudio por lugar de residencia. Palos Blancos, departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	30
Tabla 2: Distribución de pacientes según localización de lesiones cutáneas según número de lesiones, del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	30
Tabla 3: Localización de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, según genero, edad y número de lesiones. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	31
Tabla 4: Dimensión de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, según tiempo de su evolución hasta el diagnostico. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	33
Tabla 5: Asociación entre PCR pos tratamiento y distintas variables investigadas en la población de estudio del municipio de la localidad del Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.....	44

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Acido Desoxirribonucleico
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa)
LTA	Leishmaniasis Tegumentaria Americana
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	Leishmaniasis mucocutanea
χ^2	Teste chi cuadrado
gl	Grados de libertad
<i>p</i>	<i>P value</i>
OR	<i>Odds ratio</i> (razón de chances)
IC _{95%}	Intervalo de 95% de confianza

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epidemiología Mundial de la Leishmaniasis	1
1.2. Situación de la Leishmaniasis en Bolivia.....	1
1.3 Leishmaniasis- La Enfermedad.....	4
1.3.1 Agentes Etiológicos.....	5
1.3.2 Clasificación	6
1.3.3 Ciclo Biológico.....	7
1.3.4 Tipos de Leishmaniasis Tegumentaria Americana.....	8
1.3.5 Diagnóstico de Laboratorio.....	10
a. Métodos Directos.....	10
b. Metodos Indirectos.....	12
b.1. Inmunidad celular: Prueba Superficial de la Leishmanina (LST) o Reacción de Montenegro	12
b.2. Métodos Serológicos.....	12
b.2.1. ELISA (Enzimo Inmuno Ensayo Enzimático).....	12
b.2.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	12
b.2.3. Prueba de Aglutinación Directa	13
b.2.4. Western Blot.....	13
c. Identificación de especies y subespecies de <i>Leishmania</i>	13
c.1. Análisis de Isoenzimas.....	13
c.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	13
1.4. Leishmaniasis- El Tratamiento	16
1.4.1. Fármacos utilizados en el Tratamiento de Leishmaniasis.....	16
1.4.2. Fracaso Terapéutico.....	19
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	21
IV. METODOLOGÍA	23
4.1.Población de estudio.....	23
4.1.1. Criterios de inclusión.....	23
4.1.2. Criterios de Exclusión.....	23
4.2.Tipo de Estudio.....	23
4.3.Sistema de Muestreo.....	23
4.4.Tamaño de la muestra.....	23
4.5.Descripción del ambiente de investigación	24
4.5.1. Características del Municipio de Palos Blancos.....	24

4.5.2. Descripción del lugar de trabajo.....	24
4.6. Técnicas del estudio.....	24
4.6.1 Coleta de datos.....	24
4.6.2 Coleta de muestras.....	25
4.6.3 Observación microscópica de amastigotas de <i>Leishmania</i> spp	26
4.6.4 Aislamiento de DNA de <i>Leishmania</i>	26
4.6.5 Aislamiento de DNA a partir de cultivos de parásitos.....	26
4.6.6 Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
4.6.7 Electroforesis en geles de agarosa.....	28
4.7. Aspectos Éticos.....	28
V. RESULTADOS.....	30
5.1. Aspectos Generales de la Población de Estudio.....	30
5.2. Características clínicas.....	34
5.3. Presencia de Coinfección Bacteriana.....	37
5.4 Aspectos del Diagnóstico.....	39
5.4.1. Frecuencia de Infección Estimada por Microscopia.....	39
5.4.2. Frecuencia de Infección Estimada por la PCR.....	40
5.4.3. Correlación de los resultados obtenidos por Microscopia Óptica y PCR para <i>Leishmania</i> spp	41
5.5. Tratamiento.....	42
5.6. Resultados de la PCR en sangre postratamiento con Glucantime y su asociación con las variables.....	42
5.6.1. Asociación de la PCR postratamiento con género y edad.....	43
5.6.2. Asociación entre la PCR postratamiento y número de lesiones.....	44
5.6.3. Asociación entre PCR postratamiento y dimensión de las lesiones.....	45
5.6.4. Asociación entre PCR postratamiento y localización de las úlceras.....	45
5.6.5. Asociación entre PCR postratamiento y presencia de coinfección bacteriana en la lesión primaria.....	46
5.6.6. Asociación entre PCR postratamiento y retraso en el diagnóstico.....	46
6. Asociación entre resultados del PCR y del frotis para el diagnóstico inicial y el PCR postratamiento.....	47

7. Asociación entre PCR postratamiento y frotis postratamiento.....	47
8. Asociación entre PCR e interrupción del Tratamiento.....	47
9. Asociación entre PCR postratamiento y abandono del tratamiento.....	47
10. Asociación entre PCR postratamiento y presencia de úlceras postratamiento.....	48
VI. DISCUSIÓN	50
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
IX. ANEXOS: Consentimiento informado	59
X. EQUIPO DE TRABAJO	60

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad que se presenta en zonas tropicales y subtropicales, como consecuencia de la infección con más de 20 especies de protozoos del género *Leishmania* y subgéneros *Viannia* y *Leishmania* a través de la picadura de flebótomos infectados. Esta enfermedad presenta distintas formas clínicas que van desde pequeñas lesiones que se curan espontáneamente hasta grandes úlceras cutáneas y lesiones mucosas. También puede darse Infecciones inaparentes que pueden ser evidenciadas a través de la IDR (Intradermo Reacción de Montenegro) positiva o anticuerpos específicos, pero no manifestación clínica.

Las características clínicas de la leishmaniasis cutánea son determinadas por la especie de *Leishmania*, factores de virulencia del vector y por la respuesta inmune del hospedero.

1.1 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DE LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad endémica en más de 80 países entre África, Asia, sudeste europeo (viejo mundo) y Latino América (nuevo mundo), con un total de 350 millones de personas en riesgo, más de 12 millones afectadas y 1.5 y 2 millones de casos nuevos a cada año (1a, 1b, 1c). El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita, Siria y México (2).

1.2 SITUACIÓN DE LA LEISHMANIASIS EN BOLIVIA

En Bolivia la importante migración de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria del bosque tropical son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad, haciendo que cada vez tengan mayor expansión geográfica y mayor magnitud cobrando notable importancia en Salud Pública, tanto así que el área endémica llega a más de 70% del territorio boliviano (2,4,5).

Esta expansión va a la par con el aumento de número de casos, pues para 1983 se reportaron 278 casos y la mayoría de ellos en los Yungas - La Paz , con el paso de los años se reportaron casos en 5 departamentos : La Paz, Beni, Pando, Cochabamba y Santa Cruz, pero para el año de 1998 se certifica la ocurrencia de casos en el departamento de Tarija, aumentando así el sexto departamento a la zona endémica de Bolivia, el año 2004 el número de casos notificados bordean los 2800 personas y para el 2006 el SNIS reporta 3.152 casos sospechosos de Leishmaniasis en varios Municipios de Bolivia (4):

En los últimos 24 años (1983-2006), fueron registrados en el país 35.714 casos autóctonos de *leishmaniasis Tegumentaria Americana*, menos de 10 casos de leishmaniasis visceral y 4 casos de leishmaniasis cutáneo difusa. Comparando los casos reportados en 1983 (278 casos) con los del año 2003 (2452 casos), se observa que la tendencia secular de las leishmaniasis está en aumento, situación observada al comparar la tasa por 100.000 habitantes de 4.1 el año 1985, que pasa a 16,6 el año 1993 y alcanza 32,7 el año 2006.

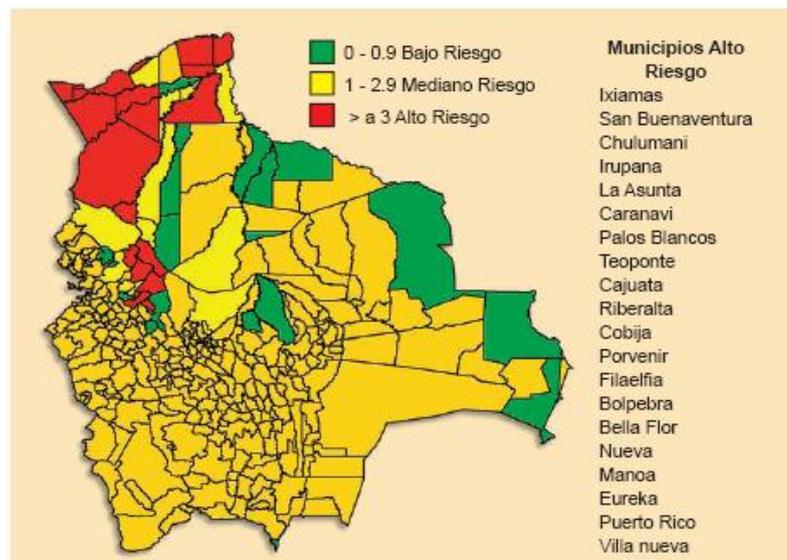
Para el año 2006, el SNIS ha reportado 3.152 casos sospechosos de leishmaniasis en 80 Municipios (1/4 del total de municipios), de los cuales por lo menos en 50 se evidencia la presencia de casos autóctonos (16% del total de municipios). Tomando en cuenta la Incidencia de leishmaniasis en todas sus formas por 1000 habitantes (h) según Municipio se han reportado:

- 20 Municipios con alta transmisión (tasa de 3,0 a 10,5 x 1000 h)
- 12 Municipios con mediana transmisión (tasa de 1,0 a 2,9 x 1000 h)
- 18 Municipios con baja transmisión (tasa de 0 a 0,9 x 1000 h)

El departamento de La Paz, notifica aproximadamente la mitad de casos reportados a nivel nacional; la gestión 2006: 1.502 (48% del total de casos), seguido por el departamento del Beni con 889 casos (28%) y Pando 416 (13%).(4) Los Municipios que mayor número de casos sospechosos reportaron en el 2006 son: Riberalta 368 casos; Caranavi 274 casos; Palos Blancos con 243 casos; (Tasa por 1000 habitantes 12.5) (representando el tercer lugar respecto a los otros municipios de riesgo.

Se han descrito 29 diferentes tipos de *Leishmania*, de estas especies 21 se han aislado en humanos y son responsables de producirles diferentes enfermedades con manifestaciones clínicas muy variadas. En las investigaciones realizadas en Bolivia se han podido aislar e identificar la circulación de diferentes especies:

- *Leishmania (Leishmania) chagasi*
- *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*



Fuente: Programa nacional de Leishmaniasis 2007

Figura 1. Estratificación de casos notificados de leishmaniasis por nivel de riesgo.

De un total de casos reportados en el país desde 1983 al 2006, se presentaron 35.714 casos autóctonos de leishmaniasis tegumentaria americana, menos de 10 casos de leishmaniasis visceral y 4 casos de leishmaniasis cutáneo difusa (4).

1.3 LEISHMANIASIS – LA ENFERMEDAD

Se conoce con el nombre de leishmaniasis a un grupo de enfermedades causadas por protozoos del género *Leishmania*.

La infección corresponde a una antropozoonosis que llega al hombre a través de la picadura de insectos infectados. Comúnmente esta infección se produce en humanos que viven o tienen actividades laborales en las áreas tropicales y subtropicales del planeta. Hoy en día se presentan cada vez más expandidas y cobran mayor importancia en la salud pública de los pueblos (2,4).

La enfermedad, que casi siempre tiene un curso crónico, es producida por diversas especies y subespecies de *Leishmania*. Se considera que al menos 20 especies son responsables de las distintas formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: cutánea (localizada o difusa), muco-cutánea y visceral, cada una de ellas con sus distintas peculiaridades (5). La leishmaniasis cutánea es de lo que trata el presente estudio.

La leishmaniasis tegumentaria es una zoonosis y el hombre es un huésped accidental que adquiere la infección cuando ingresa en las áreas enzoóticas de la selva para realizar sus diferentes tareas. Así, la enfermedad puede ser un problema importante en los asentamientos campesinos. Dentro de la selva, la colonización permanente del hombre en áreas enzoóticas produce cambios ecológicos considerables sobre todo por la deforestación, el reemplazo de animales silvestres por domésticos y el reemplazo o variación del predominio de unas especies de insectos por otras más adaptadas al nuevo medio ambiente. Estos cambios favorecen el contacto del hombre con el vector, que entonces se enferma. Los cambios ecológicos también modifican la epidemiología de la leishmaniasis en todas sus formas.

1.3.1 Agentes Etiológicos

Los protozoos causantes de la infección pertenecen al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*, que tiene numerosas especies morfológicamente semejantes pero con diferencias en cuanto a la distribución geográfica (Tabla 1), características genéticas, bioquímicas, de comportamiento inmunológico y características clínicas de la enfermedad.

Tabla 1. Distribución de las especies de *Leishmania* en los países amazónicos.

Parásitos	Bolivia	Brasil	Colombia	Ecuador	Panamá	Perú	Venezuela
<i>L. amazoniensis</i>	X	X	X	X	X	X?	X
<i>L. aristidesi</i>		X*					
<i>L. deanes</i>		X*					
<i>L. enrietti</i>		X*					
<i>L. forattinii</i>		X*					
<i>L. garnhami</i>							X*
<i>L. hertigi</i>					X*		
<i>L. mexicana</i>			X	X	X		
<i>L. pifanoi</i>							X
<i>L. venezuelensis</i>							X
<i>L. braziliensis</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. lainsoni</i>	X	X					
<i>L. naiffi</i>		X					
<i>L. shawi</i>		X					
<i>L. guyanensis</i>		X	X	X			
<i>L. peruviana</i>						X	
<i>L. panamensis</i>			X	X	X		X
<i>L. colombiensis</i>			X*		X*		
<i>L. equatoriensis</i>				X*			
<i>L. pifanoi</i>							X

X* : Todavía no se han encontrado en casos humanos actuales. Fuentes: OMS (1990, 97); Lainson & Shaw (1998); Marzochi *et al.* (1999).

1.3.2 Clasificación

Rioux y otros autores clasificaron las especies del viejo mundo con base en el análisis numérico de las enzimas, agrupando las especies en zimodemos. Kreutzery y otros investigadores basados en los mismos estudios isoenzimáticos, calcularon la distancia genética de las especies del Nuevo Mundo. En el género *Leishmania* se han separado dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. Cada subgénero comprende varios complejos separados por características bioquímicas y moleculares.

Las principales especies que afectan al ser humano se clasifican de la siguiente manera:

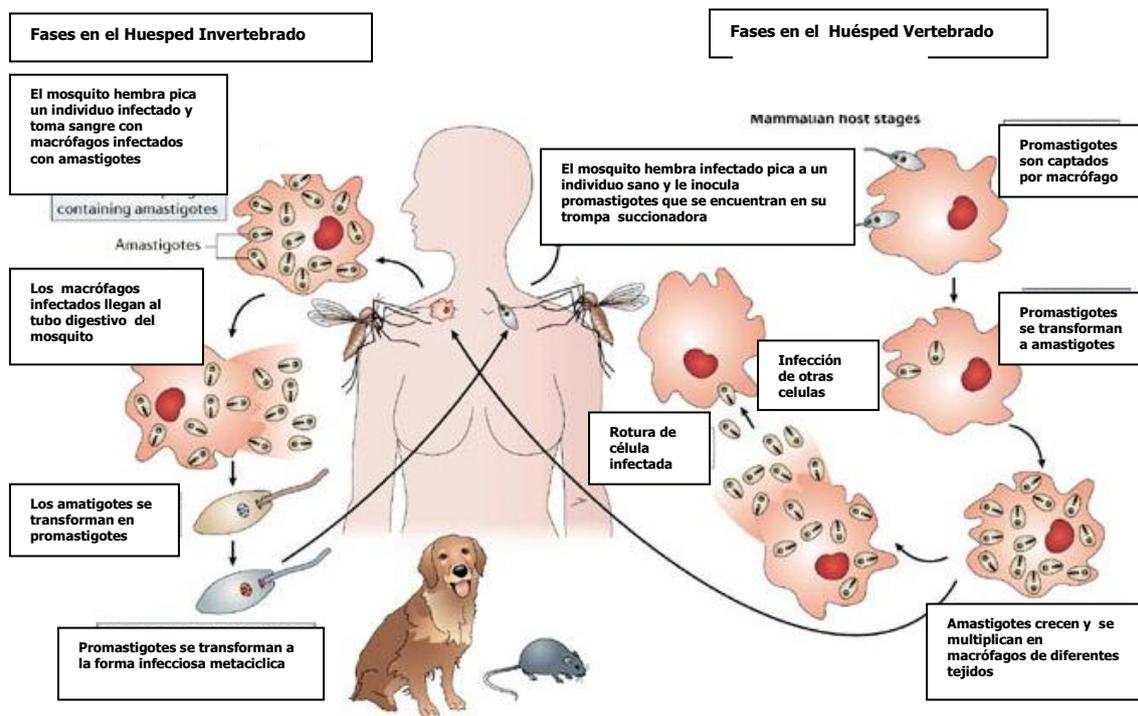
Tabla 2. Clasificación de especies de *Leishmania*

Género	Subgénero	Complejo	Especies		
<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>		
			<i>L. infantum</i>		
			<i>L. chagasi</i>		
		<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>		
			<i>L. major</i>		
			<i>L. aethiopica</i>		
			<i>L. killicki</i>		
			<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	
				<i>L. amazonensis</i>	
				<i>L. garnhami</i>	
				<i>L. pifanoi</i>	
				<i>L. venezuelensis</i>	
			<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
					<i>L. panamensis</i>
					<i>L. guyanensis</i>
					<i>L. peruviana</i>
					<i>L. colombiensis</i>
					<i>L. equatoriensis</i>
					<i>L. lainsoni</i>
					<i>L. naiffi</i>
<i>L. shawi</i>					

Fuente: David Botero "Parasitosis humanas"

1.3.3 Ciclo Biológico

El ciclo biológico del complejo de enfermedades causadas por la *Leishmania* comprende esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado y viceversa. El inicio del ciclo en el hospedador vertebrado tiene lugar cuando el flebótomo le inyecta con su picadura los promastigotes infectantes 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).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

Figura 2. Ciclo biológico del la *Leishmania* spp.

El paso del parásito al vector tiene lugar cuando las hembras de los flebótomos 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 y intestino. Finalmente, 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 *Leishmania*, dependiendo de la zona del intestino en que tiene lugar la presencia y multiplicación de las formas parásitas (7).

1.3.4 Tipos de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA)

a. Leishmaniasis inaparente o subclínica:

Los pacientes infectados producen anticuerpos específicos para *leishmania* pero no desarrollan la infección, por lo tanto no tienen signos ni síntomas (4).

b. Leishmaniasis cutánea (LC):

La picadura del vector es muy dolorosa, descrita como pringadura con manteca hirviendo. Después de un periodo de incubación variable entre 2 semanas y 2 meses o más, aparece una pequeña mácula (manchas) eritematosa, pruriginosa que en días se transforma en una pápula de menos de 5 mm (pequeño grano, elevado, rojo, que escuece). La pápula secreta un exudado seroso, generalmente por el rascado hecho por el intenso prurito y leve dolor que ocasiona la picadura. Entonces, se empieza a convertir en una pequeña úlcera que no cura con el tratamiento convencional y, al pasar los días, crece en tamaño y profundidad hasta alcanzar un diámetro promedio de 4 a 6 cm. (rango de 0,5 a 30 cm.). Esta es de forma redondeada o oval, con bordes bien definidos, elevados y levemente indurados; el fondo es eritematosos, granulomatoso y retirada la costra muestra una parte central viva, húmeda (úlceras que llora), algunas veces con pequeñas granulaciones y linfadenitis leve o moderada (4,11,12). Figura 3.



Fuente: Mollinedo, "Leishmaniasis en Bolivia"

Figura 3. Lesión activa de leishmaniasis cutánea

Luego de 6 meses a 3 años las lesiones empiezan a autolimitarse, cuando la respuesta inmune del huésped evoluciona. Las lesiones entonces cicatrizan, pero esto no indica que la infección se haya resuelto, pues los parásitos pueden reactivarse luego de uno o varios años (4,12).

c. Leishmaniasis Muco-cutánea



Fuente: Mollinedo, "Leishmaniasis en Bolivia"

Figura 4. Lesión activa de leishmaniasis mucocutánea

Generalmente se presenta después de años de la cicatrización de la lesión primaria de una leishmaniasis cutánea (puerta de entrada del parásito) y más raramente después de meses o mismo en forma conjunta, cuando las lesiones primarias son muy cercanas a la mucosa se produciendo lesiones en la mucosa nasal (4,12).

Las lesiones en tabique nasal generalmente son ulcerativas y pruriginosas, con emisión de mucus con sangre. La lesión en el tabique comienza a crecer hasta perforar el mismo y toda la región se vuelve eritematosa y presenta un grado leve de edema.

A medida que la enfermedad avanza, va tomando el tabique nasal, destruye el septum, alas de la nariz, invade úvula, faringe y laringe, causando ardor, dolor y problemas en la fonación y deglución (4).

La forma granulomatosa tiene por característica de formar lesiones infiltrativas con zonas deprimidas en la unión del paladar duro y blando, dando una conformación característica: "La Cruz de EscomeI" (4).

1.3.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis se basa, generalmente, en la aplicación conjunta de métodos directos e indirectos.

a. Métodos directos

El diagnóstico directo se basa principalmente en la observación del parásito y con este fin existen varios métodos entre los que tenemos:

a.1. Microscopía: frotis de lesión

El diagnóstico por microscopia se basa en la identificación directa de amastigotes. Su sensibilidad se limita aproximadamente a 50-60% (según varios estudios) y no se obtiene un diagnóstico especie-específico. Se emplean frotis de: lesiones superficiales, biopsias del tejido o aspirados de: médula ósea, bazo o nodos linfáticos (5, 12).

El método clásico para obtener la muestra consiste en hacer una incisión en el reborde de la úlcera, para luego raspar el tejido y obtener histiocitos y macrófagos parasitados. La abundancia de sangre indica que la muestra no es ideal y se enmascara el diagnóstico.

También se puede entrar por el borde interno de la úlcera luego de una buena limpieza si está contaminado, quitar las costras y la secreción purulenta. Por este punto se puede llegar a la base del reborde y tomar las células de la parte profunda de la lesión. Para mejorar la sensibilidad de este método es recomendable realizar un corte superficial, radial a la lesión y raspar un poco de tejido con una hoja quirúrgica. Este método es mucho menos invasivo que la toma de biopsias (6, 12).

Otro procedimiento, es una aspiración profunda por punción con jeringa y aguja delgada. En este método se inyecta 0.1 ó 0.2 ml de solución salina amortiguada entrando por el borde y rotando la aguja varias veces para macerar el tejido internamente y desprender las células que luego se aspiran (12).

El material obtenido por cualquiera de los métodos se extiende en un portaobjetos para hacer uno o dos extendidos de un centímetro de diámetro, que luego de estar secos son teñidos con colorantes habitualmente empleados por hematología. La más usada es la tinción Giemsa, para su posterior observación al microscopio con el objetivo de 100X, donde se busca amastigotes típicamente redondos o ovales que se ven dentro de los macrófagos o a veces ellos también se encuentran extracelularmente, se los puede diferenciar de otros microorganismos por la presencia de núcleo y kinetoplasto (6, 12).

a.2. Cultivo

Cuando se quiera efectuar un cultivo, se obtienen muestras de las mismas fuentes que para microscopía, pero el método a elegir deberá permitir la obtención de una cantidad de muestra suficiente para luego sembrar las muestras en medios: NNN (Nicolle-Novy-McNeal) o *Drosophila* de Schneider, en condiciones estériles (6, 12).

La sensibilidad de los cultivos es inconstante y depende de varios factores como: la viabilidad de los parásitos colectados, la cepa, los medios de cultivo (diferentes requisitos entre las especies) y la experiencia del investigador (6, 12).

b. Métodos Indirectos

b.1. Inmunidad celular: Prueba Superficial de la Leishmanina (LST) o Reacción de Montenegro

Análogo a la prueba de la tuberculina, corresponde a una reacción de hipersensibilidad tardía. Consiste en aplicar intradérmicamente un antígeno de *Leishmania* (promastigotes muertos, fenolizados) y entre 48 a 72 hrs se hace la lectura. Es positivo si se observa un nódulo inflamatorio de 5 mm o más, en personas que tuvieron un contacto anterior con el antígeno y han desarrollado inmunidad celular.

La prueba no diferencia entre infecciones pasadas o presentes por lo que generalmente se la emplea para *screening* en áreas endémicas (6, 12).

b.2. Métodos Serológicos

Conveniente para estudios epidemiológicos, pero presenta muchos problemas que limitan su utilización. No discrimina infecciones pasadas o subclínicas. Así, su uso generalmente se limitaría al diagnóstico de leishmaniasis en curso, pero no es fiable en LC ya que los anticuerpos no son perceptibles a menudo. Además, las reacciones cruzadas complican a menudo la interpretación y no es fiable en pacientes inmuno-comprometidos (6, 12). Os principales métodos disponibles son:

b.2.1. ELISA (Enzimo inmuno ensayo enzimatico)

Se basa en anticuerpos específicos que compiten con anticuerpos de suero del paciente. Los títulos varían entre 1:16 y 1:1.024. La desventaja de este método son las reacciones cruzadas (6, 12).

b.2.2. Ensayo de Inmunofluorescencia (IFI):

Este método puede emplearse para descubrir cualquier anticuerpo en el suero del paciente o identificar al antígeno.

Se ha demostrado que la prueba de ELISA puede reemplazar a IFI porque tiene mayor viabilidad y permite examinar varias muestras simultáneamente (6).

b.2.3. Prueba de aglutinación directa (DAT):

Es una prueba de *screening* simple y fiable, conveniente para trabajo de campo. Se basa en la aglutinación de suero positivo con promastigotes marcados y puede realizarse en placas de microtiter (6).

b.2.4. Western Blot:

Se basa en el reconocimiento de antígenos de *Leishmania* por anticuerpos anti-*Leishmania*. Las proteínas de los parásitos (antígenos) se separan por electroforesis y se incuban con el suero del paciente. En Western Blot varios productos del antígeno pueden ser reconocidos simultáneamente por anticuerpos diferentes en un solo ensayo. Este método es comparativamente barato y se obtienen resultados dentro de minutos (6).

c. Identificación de especies y subespecies de *Leishmania*:

c.1. Análisis de Isoenzimas

Es un método de referencia para el diagnóstico especie-específico de cepas de *Leishmania*. Se examina la movilidad electroforética de enzimas solubles en almidón o en geles de acetato de celulosa. Se ven patrones de bandas únicas o múltiples.

En un perfil de patrones de isoenzimas se encuentra cepas estrechamente relacionadas que también son llamadas zymodemas. El análisis de Isoenzimas es un trabajo intensivo, para mucho tiempo y no es factible para un laboratorio regular.

Normalmente se realiza en laboratorios especializados, reconocidos internacionalmente para asignar códigos a nuevas cepas según su zymodema. (eg. LON - para la Escuela de Londres de Higiene y la Medicina Tropical, o MON - para la Universidad de Montpellier) (6).

c.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La PCR es una excelente herramienta para el diagnóstico y caracterización de varios agentes infecciosos, así como para el diagnóstico de leishmaniasis (6, 12).

La introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de parasitología supone un gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible.

Estos métodos no sustituyen, sino mas bien, son complementarios a los métodos convencionales (13). El análisis integrado de todos ellos estas llevando a resultados más fiables y eficaces. Numerosos, son los estudios realizados a nivel nacional y sobre todo internacional utilizando esta tecnología molecular con eficiente sensibilidad y especificidad (14, 15). Tal es el caso de un estudio realizado por Gustavo Sierra y colaboradores, en Brasil, donde evaluaron la sensibilidad y especificidad de la PCR utilizando biopsias de tejido impresas en papel filtro, las cuales fueron procesadas en tres diferentes laboratorios, la sensibilidad alcanzo un porcentaje de 95 a 97.9% en los tres laboratorios, lo cual demuestra que es posible obtener buenos resultados con cantidades mínimas de muestra (16).

La PCR se basa en la duplicación enzimática de secuencias específicas de ADN, que dependiendo del objetivo de estudio deben ser secuencias conservadas dentro del género o de las especies.

Para la caracterización genética de cepas individuales, se seleccionan regiones más inconstantes, que normalmente no aparece en números de copias altos y por consiguiente son blancos menos sensibles (6).

Para la obtención de múltiples copias de la secuencia específica de ADN o secuencia blanco se repiten varios ciclos y cada ciclo consiste en tres pasos:

1°. Desnaturalización por calor (93-97 °C) del ADN de la célula en la que se produce la separación física de las dos cadenas de ADN.

2°. Hibridización de Primers (0-56 °C) es cuando dos secuencias cortas (primers o cebadores) complementarias a la secuencia blanco se unen por complementariedad de bases A-T (Adenina-Timina) y C-G (Citosina-Guanina) a la misma, delimitándola.

3°. Extensión, elongación o polimerización: Este proceso lo realiza una enzima generalmente la Taq polimerasa, que va uniendo los desoxinucleotidos (que se encuentran en el medio de reacción) por complementaridad de bases.

Blancos de PCR

Para el diagnóstico y caracterización de especies de *Leishmania* existen dos tipos de blancos (6):

- ADN del Kinetoplasto (kDNA)

Los blancos con el número de la copia más alto (10,000) son los minicírculos del kDNA. Tienen un tamaño aproximado de 800 pb con diferencias específicas en tamaños entre algunas de las especies de *Leishmania*. Ellos se dividen en subclases de secuencias diferentes, pero todos ellos comparten la misma secuencia conservada de 120 pb. Este hecho se ha utilizado para un diagnóstico género-específico por PCR. La parte mayor del minicírculo consiste en secuencias inconstantes. Las diferentes subclases muestran variaciones que en alguna magnitud son compartidas entre las especies y otras incluso son diferentes entre clones de la misma cepa. En contraste, algunas clases del minicírculo están bien conservadas dentro de las especies, incluso de origen geográficamente distante.

- Blancos nucleares

Se han seleccionado dos blancos del genoma: una subunidad pequeña del ARN ribosomal (rRNA) y el gen del mini-exon. Ambos blancos están presentes en aproximadamente 200 copias.

Debido al hecho de que ambos blancos presentan secuencias conservadas y regiones inconstantes que son a menudo especie-específicas son convenientes para el desarrollo de avances para diagnósticos más específicos (6).

1.4 LEISHMANIASIS – EL TRATAMIENTO

El objetivo principal del tratamiento de la leishmaniasis es la administración oportuna y completa de tratamiento específico para prevenir la aparición de complejas secuelas deformantes, complicaciones clínicas, incapacidades funcionales reducir la falta de respuesta terapéutica a antimoniales y coadyuvar al control de la transmisión de la enfermedad (14).

1.4.1 Fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis

El establecimiento de una quimioterapia idónea contra leishmaniasis ha resultado difícil, ya que el éxito de la misma varía con la especie de *Leishmania* y la severidad de la enfermedad, el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del paciente. Se han descrito más de 20 fármacos como eficientes para el tratamiento de la leishmaniasis; sin embargo, sólo algunos son utilizados en el manejo clínico de esta patología.

Luego de la confirmación del diagnóstico y dependiendo de la especie encontrada, se inicia el tratamiento de acuerdo a lineamientos. En Bolivia la droga de elección, independientemente del parásito infectante, es el antimonio de N-metilglucamina (Glucantime®). Los medicamentos más utilizados contra la leishmaniasis, están principalmente dirigidos al estadio intracelular del parásito. El Glucantime (Figura 5A) fue descrito en 1912 y el estibogluconato sódico ha sido utilizado desde 1945.

Algunos autores proponen que el mecanismo de acción de estos fármacos está asociado al bloqueo de la glicólisis, el metabolismo de ácidos grasos y la formación de ATP (16).

Otro fármaco muy utilizado desde 1960 es la anfotericina B (Figura 5B), que es un antibiótico poliénico. Este fármaco altera la permeabilidad de la membrana celular al unirse a grupos esteroides y formar poros, aumentando la salida de K^+ .

La anfotericina B presenta una actividad selectiva contra *Leishmania* y *Tripanosoma cruzi*. Sin embargo, su uso en regiones endémicas tiene como limitaciones el costo del tratamiento, las dificultades de administración y su toxicidad.

La pentamidina (Figura 5C) es una diamidina que bloquea la síntesis de poliaminas y del ADN del kinetoplasto del parásito; tiene un espectro relativamente amplio y es eficaz en la leishmaniasis visceral y la tripanosomiasis.

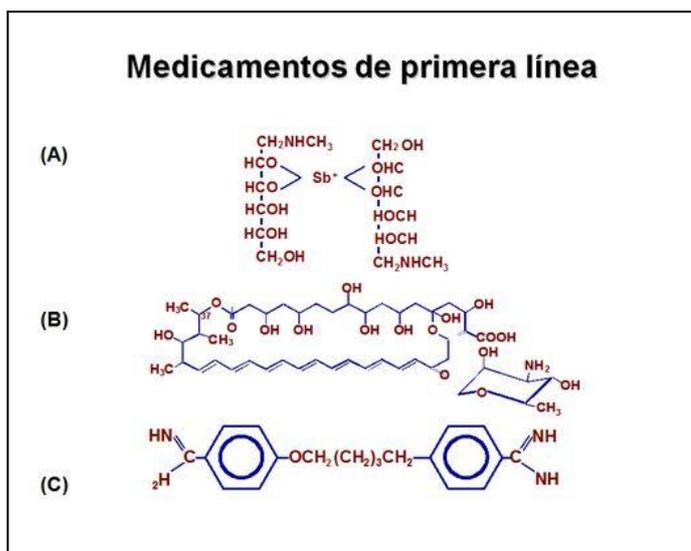


Figura 5. Estructuras químicas de medicamentos de primera línea utilizados en el tratamiento de leishmaniasis: (A) N-metil glucamina (B) Anfotericina B y (C) Pentamidina.

Los fármacos son altamente tóxicos (Tabla 3). Adicionalmente, algunos pacientes no responden al tratamiento patentado, presentan recidivas o muestran resistencia a estos medicamentos y, finalmente, los enfermos con leishmaniasis cutánea difusa no responden a ninguna forma de quimioterapia. Más aún, una de las principales causas del fracaso de los tratamientos, es la frecuencia de casos que expresan resistencia a los medicamentos (16).

Tabla 3. Efectos adversos de los fármacos más usados en el tratamiento de leishmaniasis

Efectos	Antimoniales	Pentamidina	Anfotericina B
Gastrointestinales	+	+	+
Hepatotoxicidad	+ (raro)	+	±
Hipemea	+	+	+
Cefalea	+	+	+
Anemia	+ (raro)	+	+
Trombocitopenia	+	+	+
Nefrototoxicidad	+ (raro)	+	+ (reversible)
Fiebre	+	+	+
Leucopenia leve	+	+	+
Erupción cutánea	+	-	+
Hipotensión	+	-	+
Tromboflebitis	-	+	+
Neutropenia	-	+	+
Encefalopatía	-	+	+
Mialgia	+	-	-
Rigidez muscular	+	-	-
Alteraciones en ECG	+	-	-
Edema Facial	+	-	-
Pancreatitis aguda	+ (raro)	+	-
Taquicardia	-	+	-
Síncope	-	+	-
Hipocalcemia	-	+	-
Sabor metálico	-	+	-
Broncoespasmo	-	+	-
Díabetes	-	+	-

Se resalta en azul los efectos adversos que aparecen con los tres fármacos y en rosado los efectos característicos de pentamidina (Recopilado de Rosenthal y Golsmith, 2001; Tracy y Webster, 2003).

Como alternativas de tratamiento de segunda línea se utilizan la paromicina (Fig 6A), desde 1987, el ketoconazol (Figura 6B) y la miltefosina (Figura 6C) (16).

La paromicina es un aminoglicósido que bloquea la síntesis de proteínas al disminuir la transducción de ARNm. El ketoconazol (imidazol) es un antimicótico que bloquea la C-14 desmetilasa, alterando la función de la membrana, y la dapsona es un antimetabolito. Ambos se utilizan como alternativas orales o tópicas en casos de leishmaniasis cutánea.



Figura 6. Estructuras químicas de medicamentos de segunda línea utilizados en el tratamiento de leishmaniasis: (A) Paromicina (B) ketoconazol, (C) Miltefusina.

1.4.2. Fracaso Terapéutico

El fracaso terapéutico contra la leishmaniasis tiene causas diversas. Algunas están relacionadas con los fármacos, como: las propiedades farmacocinéticas, el uso de dosis sub-óptimas, el costo del tratamiento y la toxicidad de los compuestos. Las causas relacionadas con el parásito incluyen la quimio-resistencia, la tolerancia y la especie presente al momento de hincar el tratamiento. Finalmente, las causas imputables al hospedero estarían constituidas por el estatus inmunológico del paciente, la reinfección y su interrelación con el parásito.

II. JUSTIFICACIÓN

Cómo en todas las zonas tropicales y subtropicales, en Bolivia, la leishmaniasis cutánea es un importante problema de salud pública, donde se se reportaron 3152 casos sospechosos en el año 2006, según datos del SNIS. El departamento de La Paz, la zona de los Yungas, es la más ampliamente afectada por esta enfermedad, siendo el municipio de Palos Blancos quien ocupa el tercer lugar de endemicidad.

El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea es centrado en la clínica y en el examen microscópico de la lesión. Técnicas más sofisticadas como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), son reservadas a caracterización de casos en áreas no endémicas y identificación de especies en pesquisas científicas. Sin embargo, después del tratamiento, la PCR es la única técnica que posibilita la detección del parásito en la sangre, por lo cual tornase una importante herramienta en el estudio de la enfermedad.

Es posible que en la leishmaniasis cutánea, la perpetuación de la *Leishmania* en el huésped humano favorece la ocurrencia de manifestaciones mucosas o recidivas. Así, evaluar la persistencia del parásito en la sangre luego del tratamiento y definir los factores que llevan a esta persistencia, se convierte de gran valor para instigar la discusión en respecto a viabilidad del parásito detectado por la técnica, para fornecer datos para orientar una mejor conducción clínica de los casos y para abrir la posibilidad de evaluarla *a posteriori* en un enfoque de predicción, orientado a recidivas e formas mucosas.

Con esa mirada, el presente estudio pretende brindar importantes informaciones en respecto a los factores clínicos y personales que pueden si asociar con la persistencia del parásito en sangre luego del tratamiento con glucantime, medicamento de primera línea utilizado en la leishmaniasis, a través de la prueba de la PCR.

III. OBJETIVOS e HIPOTESIS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar los factores asociados a la persistencia de una prueba de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) positiva pos tratamiento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar las características personales que pueden estar asociadas a una PCR positiva después del tratamiento con glucantime.
- Investigar la asociación entre la persistencia de la PCR positiva pos tratamiento y las características de la lesión primaria leishmaniótica.
- Investigar la asociación entre PCR positiva pos tratamiento y el tiempo de evolución de la enfermedad al momento de su diagnóstico e inicio de tratamiento.
- Investigar la asociación entre PCR positiva pos tratamiento y el número de úlceras que presenta el paciente al momento de su detección.
- Investigar la asociación entre PCR positiva y la presencia de infección bacteriana que presenta el paciente al momento de la detección de la enfermedad.
- Investigar la asociación entre PCR positiva y la localización de las úlceras que presenta el paciente al momento de la detección de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DE LAS HIPOTESIS NULAS (H_0)

- Un resultado de PCR positivo después del tratamiento independe de la edad y género de los infectados.
- El tiempo de evolución de las lesiones hasta el momento del diagnóstico no tiene relación con la probabilidad de un resultado de PCR después del tratamiento.
- Las características de la lesión primaria (localización, número y tamaño de las lesiones) no tienen influencia en el resultado de PCR después del tratamiento.
- Presencia de infección bacteriana asociada con la lesión primaria no afecta el resultado de la PCR después del tratamiento.
- La PCR pos tratamiento no tiene influencia de la realización del tratamiento ser completa o incompleta.

IV. METODOLOGIA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio comprende pacientes atendidos en el hospital de Palos Blancos del departamento de La Paz con presencia de lesiones cutáneas características de leishmaniasis tegumentaria que recibieron tratamiento con glucantime y que luego de 7 días de concluido el tratamiento, dieron positivo a la prueba de PCR para *Leishmania spp.*

4.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes de sexo masculino o femenino de diferentes edades, con presencia de lesiones activas cutáneas confirmadas de leishmaniasis, que recibieron tratamiento con glucantime y posteriormente fueron sometidos a una prueba de PCR pos tratamiento.

4.1.2 Criterios de exclusión

- Personas que no aceptaron firmar el consentimiento informado.
- Pacientes que antes de hincar el estudio recibieron algún tipo de tratamiento.

4.2 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de corte seccional.

4.3 SISTEMA DE MUESTREO

Simple, aleatorio

4.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El presente estudio comprende 340 pacientes del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, que asistieron al hospital de Palos Blancos por manifestación de úlceras cutáneas.

4.5 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN

4.5.1. Características del municipio de Palos Blancos.- EL municipio de Palos Blancos ocupa la cuarta sección de la provincia Sud Yungas del departamento de La Paz, se encuentra localizado a 239 Km. de distancia respecto de la ciudad de La Paz para su acceso desde la sede de gobierno se recorre un primer tramo hasta llegar a Sapecho (Ruta 3 de la Red Fundamental: La Paz – Trinidad), para continuar hacia el desvío que se dirige a la localidad de Covendo y que pasa por la capital del municipio la ciudad de Palos Blancos ubicado a 10 Km. de Sapecho.

La agricultura es considerada como una de las principales actividades locales, requiere de la intervención de bosques para la habilitación de espacios cultivables. La práctica del chaqueo es la forma tradicional de habilitar los terrenos para siembra y plantación de cultivos de interés.

4.5.2. Descripción del lugar de trabajo

Los frotis realizados de las muestras de lesión fueron procesados por el personal de laboratorio clínico, que forma parte del hospital de Palos Blancos.

Posteriormente las muestras de infiltrados o raspados de lesiones activas fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud “SELADIS” dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, (La Paz-Bolivia), gracias al financiamiento de la cooperación SUECA. (ASDISAREC).

4.6 TECNICAS DE ESTUDIO

4.6.1 Colecta de datos

La colecta de los datos se realizo a través de la revisión de las historias clínicas y de los datos que se fueron recabando al momento de la toma de muestras para el diagnóstico de la leishmaniasis.

Posteriormente, dicha información fue introducida al paquete estadístico SPSS versión 15.1 para el respectivo procesamiento y análisis estadístico, donde se emplearon frecuencias cuando se requirió realizar comparación de grupos y la prueba estadística de chi cuadrado para ver la relación entre variables, el Test Exacto de Fisher y el Odds Ratio (OR), para evaluar asociaciones entre variables. Se consideró un resultado estadísticamente significativo (95% de confianza) cuando $p < 0.005$.

4.6.2 Colecta de muestras

En la primera fase, que fue de diagnóstico, se colectaron muestras por raspado y en algunos casos, infiltrados de lesión con ayuda de un mondadientes previamente esterilizado de la lesión cutánea, posteriormente la muestra obtenida fue primeramente extendida en una lámina de vidrio para realizar las improntas de lesión destinadas al estudio microscópico.

Posteriormente, un segundo mondadientes fue introducido a la lesión el cual luego de la toma de muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mililitros, que contenía solución fisiológica al 0.9%, el tubo fue sellado y se conservó refrigerado hasta el momento de su procesamiento.

En los casos donde se pudo colectar muestras por infiltrado, se introdujo solución fisiológica estéril en el borde de la lesión con la ayuda de una jeringa de 1 mililitro, posteriormente esta solución se aspiró arrastrando consigo los parásitos hacia el embolo de la jeringa, la muestra obtenida se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 mililitros I y se conservó refrigerado a una temperatura de 4°C hasta el momento de su procesamiento,

En la segunda fase, de todos pacientes que ya fueron tratados con Glucantime, se colectaron las muestras de sangre total en EDTA- Guanidina obtenidas por punción venosa, la muestra fue conservada a 4°C hasta el día del procesamiento, en los casos donde se pudo evidenciar presencia de lesión cutánea también se realizó la colecta de la misma.

4.6.3 Observación microscópica de amastigotes de *Leishmania spp*

Este procedimiento fue realizado por el personal del laboratorio clínico del Hospital de Palos Blancos (Dra. Daysi Quispe). Luego de la obtención de improntas de las lesiones cutáneas, se fijó la lamina con alcohol metílico por 3 minutos, posteriormente se descartó el colorante lavando ligeramente con agua corriente, se dejó secar a temperatura ambiente y se realizó la búsqueda de amastigotes intracelulares por observación microscópica a un aumento de 100 X, con el objetivo de inmersión.

4.6.4 Aislamiento de DNA de *Leishmania*

Método Fenol-Cloroformo

Se alicuotaron 500 uL. de cada una de las muestras de sangre total y de infiltrados de lesión en un tubo eppendorf previamente identificados, se sometieron a ebullición (98 °C por 15 minutos), se añadieron volúmenes iguales de fenol cloroformo, luego de centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos se recuperó la fase acuosa y se añadió un volumen igual de cloroformo- alcohol isoamilico, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 5 minutos se adicionó etanol Absoluto (2.5 volúmenes al sobrenadante recuperado) y acetato de sodio (3 M) y se almacenó a -20°C toda una noche. Al día siguiente luego de centrifugar 10 minutos a 14000rpm se desechó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con etanol al 70 % para luego volver a centrifugar por 10 minutos a 14000rpm, después se desechó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante, finalmente se agregó 50 uL de agua para resuspender el precipitado y se almacenó a -20°C hasta el momento de realizar el proceso de amplificación por PCR.

4.6.5 Aislamiento de DNA a partir de cultivos de parásitos

Este protocolo fue realizado con la finalidad de obtener controles positivos y negativos para realizar el proceso de PCR para diagnóstico de leishmaniasis.

Se centrifugó 500 ul de cultivo de parásitos de *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi* a 3500 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 ul de agua destilada se llevó a ebullición por 15 minutos, luego de una centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos se recuperó el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se conservó a -20°C en alícuotas pequeñas hasta el momento de su uso.

4.6.6 PRUEBA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizo el siguiente protocolo:

Reactivos	[c] Inicial	[c] Final	Vol. / tubo UI
**Buffer	10 X	1 X	1.25
dNTPs	5mM	0.2Mm	0.5
Primer 13 A	10 uM	1.0 uM	1.25
Primer 13 B	10 uM	1.0 uM	1.25
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.0
Taq	5 UI / mL	0.125 UI / mL	0.0625
H ₂ Odd	-----	-----	4.5625
DTT	100 mM	1 mM	0.125
ADN muestra o control	-----	-----	2.5

**Buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.8, 500mM KCl, 0.1% Triton)

Todos los reactivos corresponden a la línea Promega, excepto los primers o cebadores que pertenecen a la línea comercial Invitrogen.

Los oligonucleótidos o primers utilizados permitieron la amplificación de una secuencia de 120 bp del minicírculo en el kinetoplasto (ADNk) y llevan por nombre: 13A (5'-GTGGGGGA GGGGCGTTCT-3 ') y 13B (5'-ATTTTCCACCAACCCCCAGTT-3'), siguiendo el protocolo de Eva Harris y colaboradores (19).

Luego de preparar la mezcla de reacción, la amplificación se llevo a cabo en un termociclador MJ Research con el siguiente ciclaje:

Nº de Ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	1º Desnaturalización	94 ° C	3 minutos
30	Desnaturalización	94 ° C	1 minuto
	Alineación	50 ° C	1 minuto
	Elongación	72 ° C	1 minuto
1	Extensión final	72 ° C	10 minutos

4.6.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para la visualización de los productos amplificados se utilizo un gel de agarosa al 1.5 %, en buffer TBE 1X (Tris- HCl pH 8, acido bórico, EDTA) y como agente intercalante y de visualización del material genético amplificado se utilizó bromuro de etidio en una concentración de 10mg/ml, previamente para el proceso de sembrado se utilizó un buffer colorante que contiene Azul de bromofenol, el tiempo de corrida electroforetica fue de 30 minutos a 100 voltios y 300 miliamperios. Al terminar la corrida, se visualizaron los productos obtenidos en un transiluminador con luz Ultravioleta. (marca SIGMA).

4.7 ASPECTOS ETICOS

El estudio cumplió con las disposiciones que reglamentan la investigación que involucra seres humanos y fue aprobado por la Comisión de Ética.

Todos los procedimientos fueron realizados con aclaraciones previas a cada paciente y se inicio después de su autorización por escrito (nota de consentimiento informado, ver anexo). Los casos de leishmaniasis diagnosticados fueron debidamente tratados y seguidos, según los protocolos establecidos por el servicio departamental de Salud de Bolivia.

V. RESULTADOS

5.1. Aspectos Generales de la Población de Estudio

Formaron parte del estudio 340 pacientes que asistieron al hospital del municipio de Palos Blancos con presencia de lesión cutánea activa inicial durante el periodo 2007-2009.

De los participantes, 231 (67.9%) fueron del género masculino y 109 (32.1%) del género femenino. La edad fluctuó desde niños menores de 10 años, hasta adultos mayores a 61 años. El grupo más afectado fue de adultos comprendidos entre las edades de 21 a 40 años (42.4%). Niños y personas mayores fueron los menos afectados, cómo muestra el Gráfico 1.

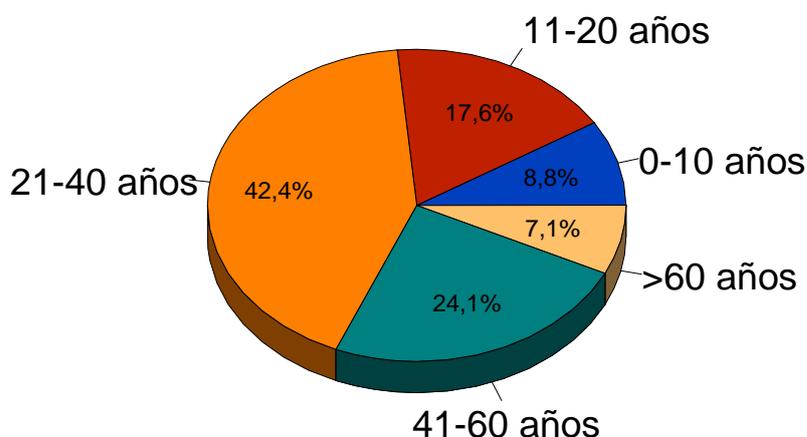


Gráfico 1. Distribución de los participantes del estudio según grupo etario. Municipio de la localidad del Palos Blancos, departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.

El género masculino fue predominante al género femenino entre los pacientes participantes.

Sin embargo, al evaluar la distribución de los géneros según da edad, se observa que el predominio de hombre ocurre en todas las edades, salvo entre los niños bajo 11 años de edad (Gráfico 2).

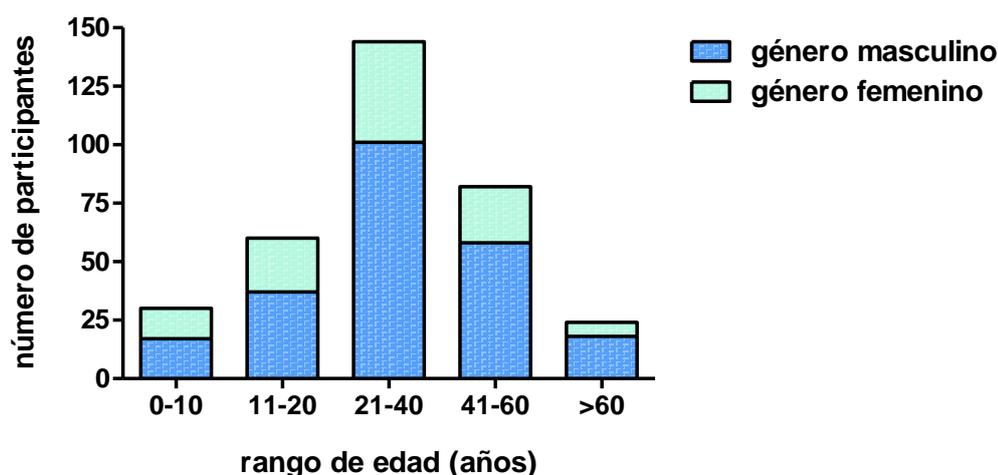


Gráfico 2. Distribución de los hombres y mujeres del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz, que participaron del estudio, según grupo etáreo. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

En realidad, la actividad laboral predominante fue la realizada fuera del hábitat doméstico humano, siendo en su mayoría la agricultura (50.3%). El resto de la población tiene actividad laboral dentro de un hábitat peridoméstico (79 individuos o 23.2%): estudiantes (15.5%), comerciantes (3.2%), conductores de movilidad (1.5%) u otras ocupaciones hechas cerca de su domicilio (2.9%) y en el hábitat doméstico: actividades comprendidas entre labores de casa (12.4%) y ninguno (4.7%). Este último porcentaje se refiere a la población infantil menor de 5 años.

Si evaluamos la actividad laboral según el género, observamos que los hombres predominan entre las actividades fuera del domicilio y las mujeres en los labores de casa (Gráfico 3). Los datos son significativos estadísticamente ($\chi^2=102.35$, $gl= 7$, $p<0,0001$).

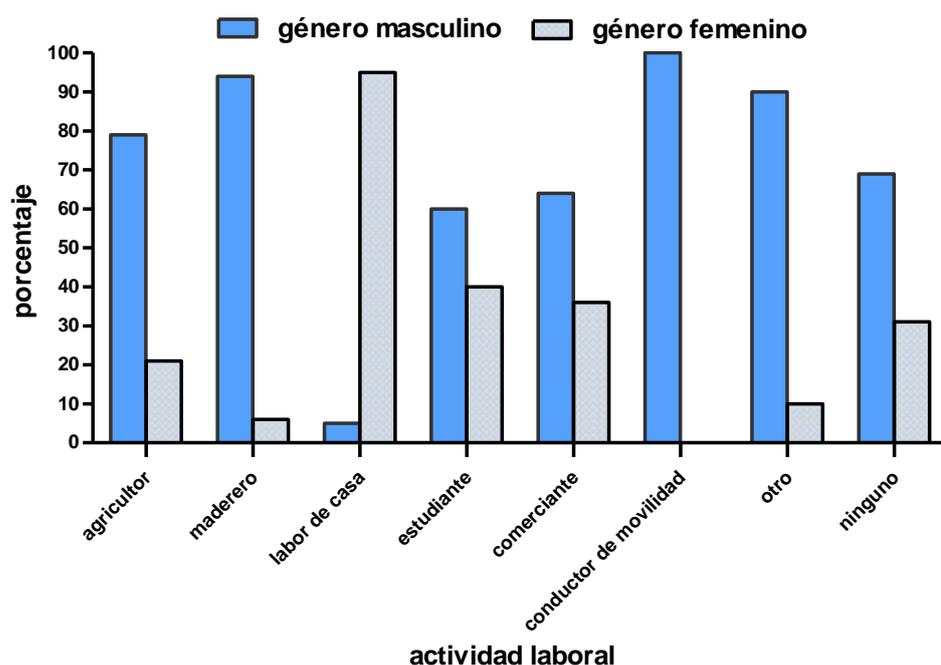


Gráfico 3. Distribución de la actividad laboral de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz, según el género. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

Estas observaciones sugieren que actividades fuera de casa hechas por hombres en edad laboral puede ser factor de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

La mayoría de los participantes residen en las Comunidades de Inicua y Progreso. El pueblo de Palos Blancos y Villa Asunción quedaron en tercero como lugar de residencia (Tabla 1). Los lugares de actividad fueron: monte (35.6%), chaco (27.1%), orilla de río (5.3%) y el propio domicilio (29.1%). Otros lugares sumaron 2.9%.

Tabla 4. Frecuencia de los participantes de estudio por lugar de residencia. Palos Blancos, departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.

Residencia actual	numero	porcentaje
Inicua	42	12,4%
Progreso	40	11,8%
Palos Blancos	33	9,7%
Villa Asunción	33	9,7%
Puerto Carmen	25	7,4%
Los Andes	24	7,1%
San Antonio	20	5,9%
San Lorenzo	16	4,7%
Sapecho	7	2,1%
Boopi	2	0,6%
Otros	98	28,8%
Total	340	100%

Evaluando el lugar de actividad según el lugar de residencia, observamos que la mayoría de los pacientes participantes tenían como lugar principal de trabajo el chaco o el monte como lugar de actividad habitual.

De los cuatro principales lugares de residencia de los participantes, los de Progreso y Villa asunción tenían el chaco como principal lugar de actividad, los pacientes del pueblo de Palos Blancos tenían el monte y el chaco, pero los de Inicua hacían sus actividades principalmente en el domicilio ($p < 0,0001$). Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de pacientes según localización de lesiones cutáneas según número de lesiones, del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, Mayo 2007 a Noviembre 2009.

Residencia actual	Lugar de actividad actual					Total
	Chaco	Monte	Orilla de río	Domicilio	Otros	
Inicua	12 (28.6%)	9 (21.4%)	1 (2.4%)	20 (47.6%)	0	42 (100%)
Progreso	16 (40.0%)	10 (25.0%)	6 (15.0%)	8 (20.0%)	0	40 (100%)
Palos Blancos	13 (39.4%)	14 (42.4%)	1 (3.0%)	5 (15.2%)	0	33 (100%)
Villa Asuncion	14 (42.4%)	9 (27.3%)	1 (3.0%)	9 (27.3%)	0	33 (100%)
Puerto Carmen	9 (36.0%)	5 (20.0%)	3 (12.0%)	8 (32.0%)	0	25 (100%)
Los Andes	10 (41.7%)	8 (33.3%)	2 (8.3%)	3 (12.5%)	1 (4.2%)	24 (100%)
San Antonio	8 (40.0%)	8 (40.0%)	1 (5.0%)	3 (15.0%)	0	20 (100%)
San Lorenzo	5 (31.3%)	7 (43.8%)	0	2 (12.5%)	2 (12.5%)	16 (100%)
Sapecho	1 (14.3%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	3 (42.9%)	0	7 (100%)
Boopi	0	1 (50.0%)	0	1 (50.0%)	0	2 (100%)
Otros	4 (4.1%)	48 (49.0%)	2 (2.0%)	37 (37.8%)	7 (7.1%)	98 (100%)
Total	92 (27.1%)	121 (35.6%)	18 (5.3%)	99 (29.1%)	10 (2.9%)	340 (100%)

5.2. Características clínicas

De los 340 pacientes estudiados, 294 (86.4%) presentaron lesiones cutáneas únicas y 46 (13.5%) presentaron múltiples lesiones. De estos últimos, 35 (10.3%) presentaron 2 lesiones y 11 (3.2%) 3 o más lesiones.

Los pacientes presentaron las lesiones predominantemente en extremidades superiores e inferiores, independiente del género, edad, número de lesiones y ocupación (Tabla 3) aún que solo el último fue significativo.

Tabla 6. Localización de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, según género, edad y número de lesiones. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

		Localización de las úlceras				teste χ^2
		Cabeza	Extremidade superior	Extremidade inferior	Tronco	
Genero	Masculino	36 (15.6%)	93 (40.3%)	95 (41.1%)	7 (3.0%)	$p=0.838$ (gl= 3)
	Femenino	13 (11.9%)	46 (42.2%)	47 (43.1%)	3 (2.8%)	
	Total	49 (100%)	139 (%)	142 (100%)	10 (100%)	
Edad	0-10	10 (33.3%)	7 (23.3%)	11 (36.7%)	2 (6.7%)	$p<0.001$ (gl= 12)
	11-20	5 (8.3%)	37 (61.7%)	17 (28.3%)	1 (1.7%)	
	21-40	14 (9.7%)	52 (36.1%)	73 (50.7%)	5 (3.5%)	
	41-60	12 (14.6%)	37 (45.1%)	31 (37.8%)	2 (2.4%)	
	> 61 años	8 (33.3%)	6 (25.0%)	10 (41.7%)	0	
	Total	49 (100%)	139 (100%)	142 (100%)	10 (100%)	
Número de lesiones	1	41 (83.7%)	123 (88.5%)	120 (84.5%)	10 (100%)	$p=0.115$ (gl=6)
	2	5 (10.2%)	16 (11.5%)	14 (9.9%)	0	
	3 o más	3 (6.1%)	0	8 (5.6%)	0	
	Total	49 (100%)	139 (100%)	142 (100%)	(100%)	
Ocupación	agricultor	28 (16.4%)	72 (42.1%)	65 (38.0%)	6 (3.5%)	$p=0.298$ (gl= 21)
	Maderero	1 (3.1%)	11 (34.4%)	20 (62.5%)	0	
	labores de casa	3 (7.1%)	14 (33.3%)	24 (54.1%)	1 (2.4%)	
	Estudiante	11 (20.8%)	26 (49.1%)	14 (26.4%)	2 (3.8%)	
	Comerciante	1 (9.1%)	4 (36.4%)	6 (54.5%)	0	
	conductor de movilidad	0	3 (60.0%)	2 (40.0%)	0	
	Otros	1 (10.0%)	4 (40.0%)	5 (50.0%)	0	
	Ninguno	4 (25.0%)	5 (31.3%)	6 (37.5%)	1 (6.3%)	
Total	49 (100%)	139 (100%)	142 (100%)	(100%)		

Los tiempos de evolución de la enfermedad al momento de su diagnóstico a través de pruebas convencionales y moleculares fueron: ≤ 3 meses (20.9%), 4 a 6 meses (48.2%) y ≥ 7 meses (30.9%). Largos períodos de retraso en el diagnóstico predominaron respecto del lugar de residencia del paciente (Gráfico 4).

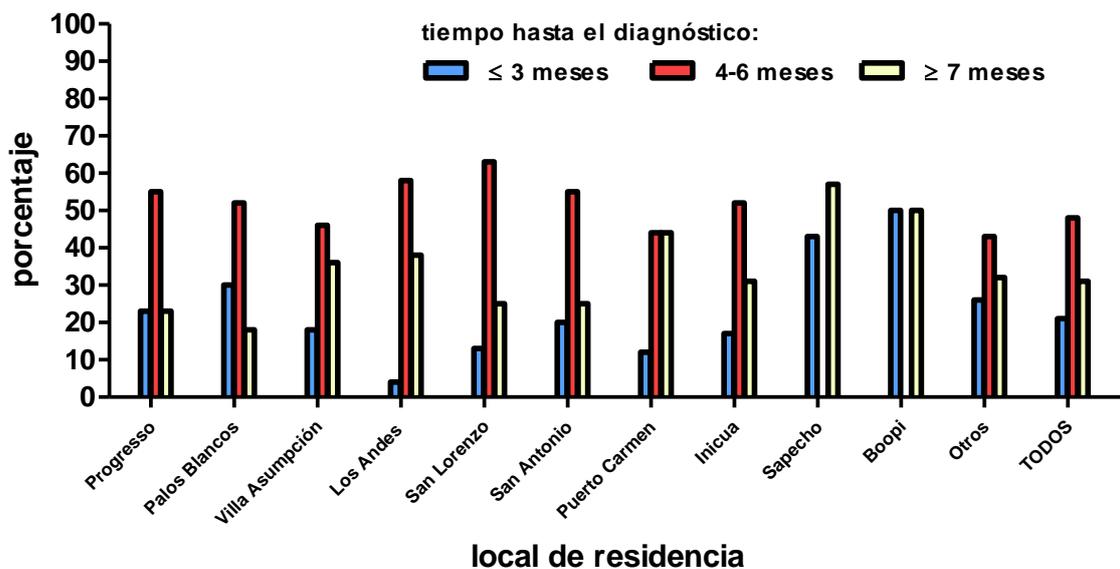


Gráfico 4. Tiempo de retraso en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea según el lugar de residencia de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

Fue determinado el tamaño de las lesiones en 339 de los 340 pacientes. De los cuales, 124 (36.6%) presentaron lesiones pequeñas, 123 (36.3%) medianas y 92 (27.1%) grandes. Existió una relación significativa entre el tiempo de evolución de la lesión y su dimensión, de manera que hubo predominio de lesiones pequeñas entre aquellas que tenían hasta 3 meses de evolución, de lesiones medianas entre las que presentaban 4 a 6 meses de evolución y de lesiones grandes con 7 o más meses de evolución ($\chi^2 = 32.129$; 4 gl; $p < 0.0001$). Tabla 7.

Tabla 7. Dimensión de las lesiones cutáneas de los pacientes del municipio de la localidad del Palos Blancos del departamento de La Paz, según tiempo de su evolución hasta el diagnóstico. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

Tiempo de evolución	Dimensión de la lesión			total
	pequeña	mediana	Grande	
≤3 meses	43 (60.6%)	20 (28.2%)	8 (11.3%)	71
4 a 6 meses	58 (35.6%)	63 (38.7%)	42 (25.8%)	163
≥ 7 meses	23 (21.9%)	40 (38.1%)	42 (40.0%)	105
total	124	123	92	339

5.3 Presencia de coinfección bacteriana

La presencia de Infección bacteriana estuvo presente en 194 (57.1%) de los pacientes con leishmaniasis y se presentó significativamente más frecuente cuando se ubicaban en extremidades superiores y inferiores respecto a la localización en cabeza y tronco (Gráfico 5a).

Hubo una significativa asociación directa entre la dimensión de la lesión y el tiempo de su evolución con la presencia de infección bacteriana. Así, en las úlceras de mayor tamaño fue mayor la frecuencia de infección, así como en aquellas con mayor tiempo de existencia (Gráfico 5c y d). Sin embargo, no hubo relación significativa entre presencia de infección bacteriana y número de úlceras (Gráfico 5b).

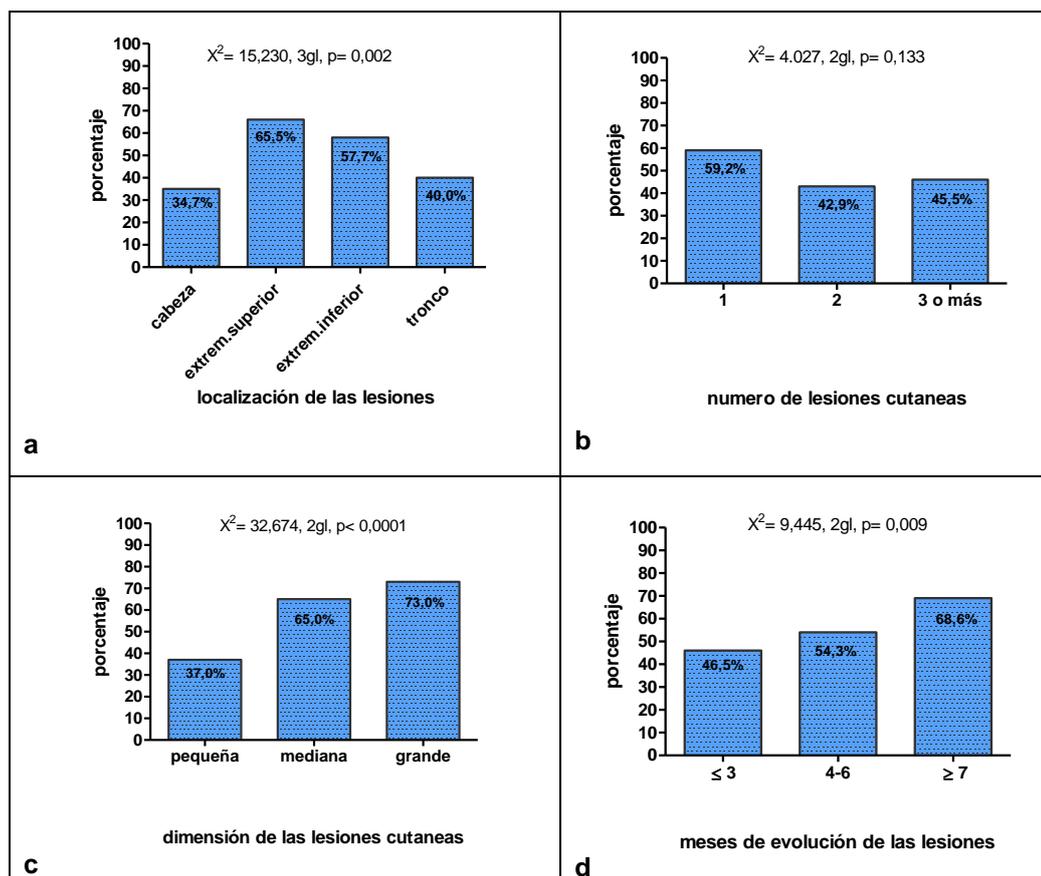


Gráfico 5. Frecuencia de coinfección bacteriana según la localización, el número, la dimensión y el tiempo de evolución de las lesiones de leishmaniasis cutánea de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

El tiempo de evolución de la lesión mostró una tendencia lineal respecto a la posibilidad de tener infección bacteriana, de manera que la odds ratio (OR) fue progresivamente mayor, cuanto más tiempo de evolución tenía la ulcera. Estos datos pudieron ser evidenciados a través del “chi cuadrado de tendencia lineal”:

Tiempo de evolución de la lesión	OR en relación a ≤ 3 meses de evolución	χ^2 tendencia lineal= 9.057 ($p= 0.002$)
≤ 3 meses	1	
4-6 meses	1.37	
≥ 7 meses	2.51	

5.4. Aspectos del Diagnóstico

5.4.1. Frecuencia de infección estimada por Microscopia Óptica

La microscopia óptica (frotis de lesión) detectó amastigotes de *Leishmania spp* en 229 de los 340 participantes del estudio (67.4%).

La frecuencia de frotis positivos entre los hombres (153 en 231; 66.2%) fue semejante a la frecuencia entre las mujeres (76 en 109; 69.7%) ($\chi^2_{\gamma} = 0.267$; 1 gl; $p = 0.605$).

Respecto a la edad, la infección por *Leishmania spp* detectada por frotis fue menos frecuente entre niños hasta 10 años y mayores de 61 años, es decir, la frecuencia de positivos creció con el aumento del rango de edad pero solo hasta los 60 años ($p = 0.046$). Gráfico 6 (a).

Lesiones de extremidades superiores e inferiores tuvieron positividad significativamente más frecuente en el frotis que las de cabeza y tronco ($p < 0.0001$). También fue significativa la mayor frecuencia de frotis positivos cuando el paciente presentó 3 o más lesiones ($p = 0.03$). Gráfico 6 (b y c).

Aunque se haya encontrado una relación estadísticamente significativa entre un frotis positivo y presencia de infección bacteriana ($p = 0.001$), la observación fue distinto de lo esperado, una vez que los frotis fueron más positivos cuando hubo asociación de infección bacteriana (Gráfico 6 d).

No hubo asociación estadísticamente significativa entre frotis positivo y tiempo de evolución de las lesiones (Gráfico 6 e).

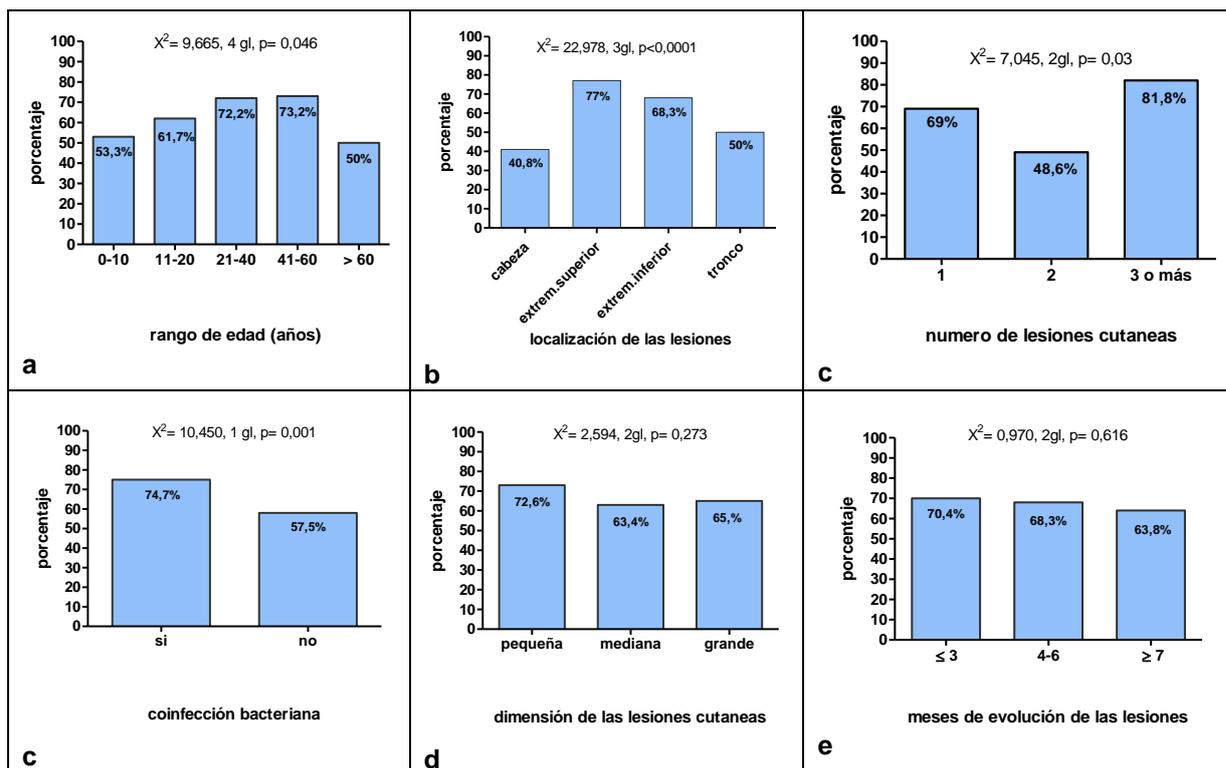


Gráfico 6. Frecuencia de frotis positivo según la edad e características clínicas de las lesiones de leishmaniasis cutánea de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

5.4.2. Frecuencia de infección estimada por la prueba de PCR

La PCR detectó DNA de *Leishmania spp* en 331 de los 340 participantes del estudio (97.4%).

La frecuencia de PCR positiva entre los hombres (225 de 231; 97.4%) fue semejante a la frecuencia entre las mujeres (106 de 109; 97.2%) ($\chi^2_{Y} = 0.007$; 1 gl; $p = 0.934$). La frecuencia fue elevada respecto al rango de edad, presencia de coinfección bacteriana, número, localización, tamaño y tiempo de evolución de las lesiones (Gráfico 7).

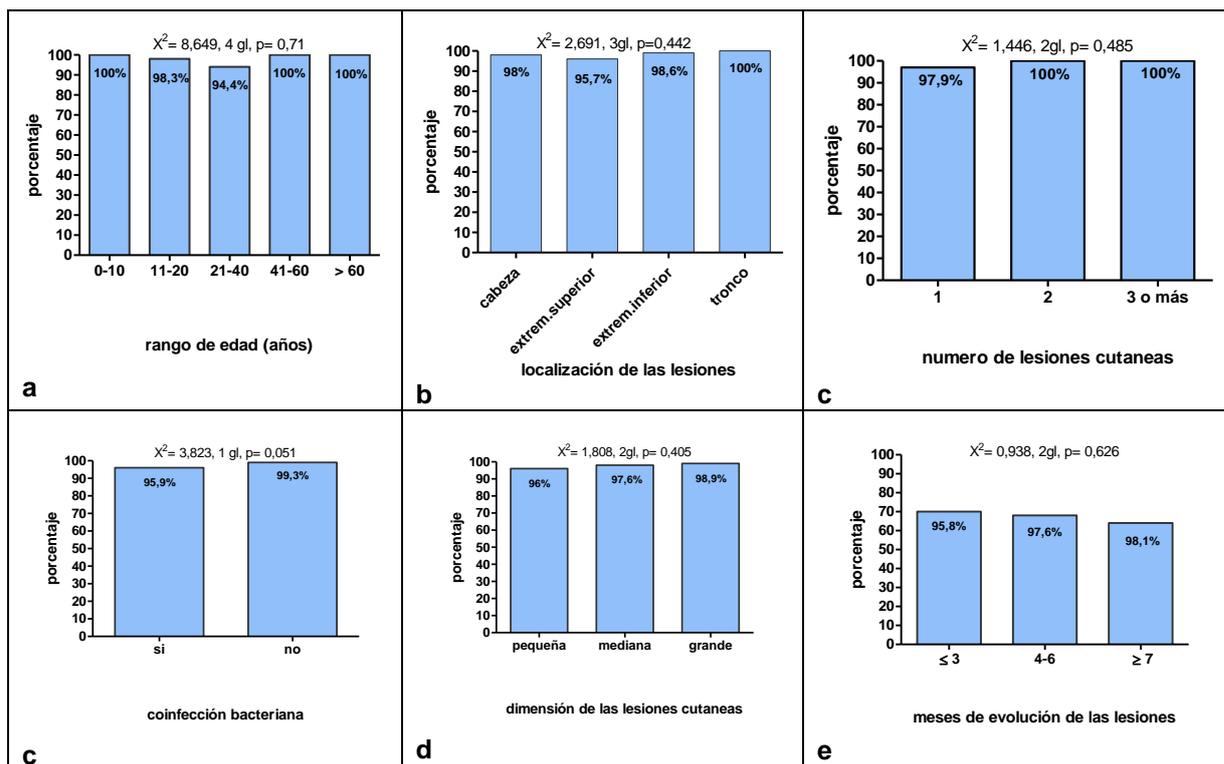


Gráfico 7. Frecuencia de PCR positivo según la edad y características clínicas de las lesiones de leishmaniasis cutánea de los pacientes del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

5.4.3. Correlación de los resultados obtenidos por microscopia óptica y PCR para diagnóstico de *Leishmania spp.*

Los 340 participantes tuvieron un diagnóstico leishmaniasis confirmado, al menos por uno de los métodos diagnósticos, de los cuales, 222 fueron positivos en ambas pruebas.

A través de la microscopia óptica (frotis de lesión) se pudo encontrar amastigotes de *Leishmania spp* en el 67,4% (229 pacientes) de la población estudiada y por la prueba de PCR, 97,4% (331 pacientes) presentaron DNA del parásito (Gráfico 8).

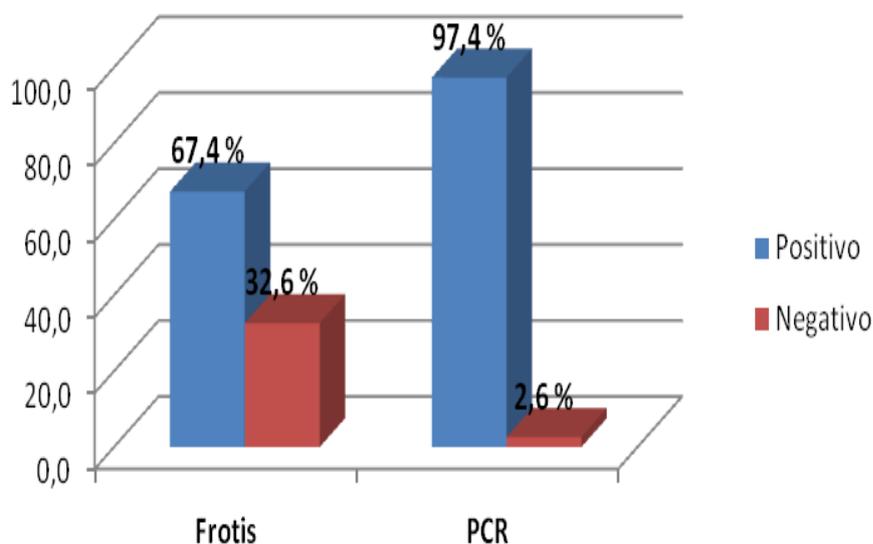


Gráfico 8. Comparación de los resultados obtenidos por Frotis y PCR de lesiones cutáneas de pacientes provenientes del municipio Palos Blancos del departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

De las 331 infecciones por *Leishmania spp* detectadas por PCR, 111 fueron diagnosticadas solo por este método (frotis negativo) y de las 229 detectadas por frotis, nueve fueron diagnosticadas apenas por este método (PCR negativo). Así, la detección de infección por *Leishmania spp* fue significativamente más elevada cuando el método diagnóstico fue la PCR ($\chi^2= 4.481$, $gl=1$, $p=0.034$).

La concordancia entre el frotis y la PCR fue clasificada como “débil” ($\kappa=0.051$). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que κ no puede ser un buen coeficiente para evaluar una concordancia en este caso, ya que los eventos no son independientes, debido a que el diagnóstico de la infección debe ser establecido a partir de la combinación de resultados entre frotis y PCR.

5.5. El tratamiento

Todos los pacientes recibieron Glucantime para el tratamiento de leishmaniasis. Dos pacientes presentaron efectos colaterales, 6 interrumpieron el tratamiento y 7 abandonaron el mismo.

Luego del tratamiento, 50 pacientes (14.7%) todavía tenían frotis positivo y 13 aun presentaron ulcera cutánea.

5.6. Resultados de la PCR en sangre postratamiento con Glucantime y su asociación con las distintas variables

Luego del tratamiento, la PCR en sangre fue positiva en 82 de los 340 pacientes (24.1%). Su asociación con las distintas variables fueron:

5.6.1. Asociación de la PCR pos tratamiento con genero y edad

Los resultados obtenidos por la prueba de PCR no tuvieron relación con el género, ya que la positividad fue semejante entre hombres (54 de 231; 23,4%) y mujeres (28 de 109; 25,7%) tratados ($\chi^2= 0.216$, $gl=1$, $p=0.642$; $OR=0.883$, $IC_{95\%}= 0.52-1.49$).

La PCR pos tratamiento también fue semejante entre los rangos de edad ($\chi^2= 8.129$, $gl=4$, $p=0.09$), con frecuencias de positivos que van de 19.4% a 26.7% en los grupos, salvo entre mayores a 60 años, donde hubo 45.8% de positivos (Gráfico 9a).

Dividiendo la edad en sólo dos grupos, “hasta 60” *versus* “mayor a 60 años”, el análisis reveló una mayor positividad en el grupo >60 años (11 de 24; 45.8%) que en el grupo ≤ 60 años (71 de 316; 22.5%), con significancia estadística ($\chi^2= 6.654$, $gl=1$, $p=0.01$).

A través del análisis de razón de factores de riesgo (*odds ratio-OR*) se demostró que la población mayor a 60 años tuvieron casi 3 veces más posibilidad de presentar la PCR postratamiento positiva que los pacientes con hasta 60 años de edad ($OR= 2.92$, $IC_{95\%}= 1.25-6.80$). Gráfico 9 (b).

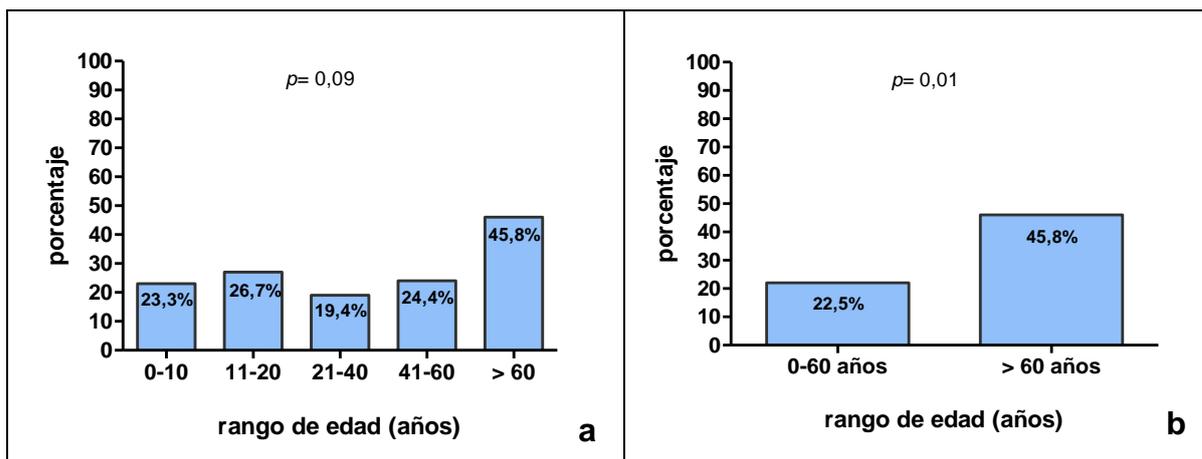


Gráfico 9. Frecuencia de PCR postratamiento positivo según cinco (a) y dos (b) rangos de edad de los pacientes tratados con Glucantime del municipio de Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

5.6.2. Asociación entre PCR pos tratamiento y número de lesiones

La frecuencia de PCR pos tratamiento en los pacientes que tenían 1, 2 y ≥ 3 úlceras en el momento del diagnóstico fue respectivamente 18.7% (55 de 295), 54.3% (19 de 35) y 72.7% (8 de 11). Así, la PCR pos tratamiento mostró una asociación directa positiva estadísticamente significativa con el número de lesiones primarias ($\chi^2=36.10$, $gl=2$, $p<0.,0001$), así mismo este número de lesiones primarias mostró una tendencia lineal respecto a la posibilidad de tener PCR pos tratamiento positiva, de manera que la *odds ratio* (OR) fue progresivamente mayor, cuanto más lesiones presentaba el paciente. Eso es demostrado por el análisis del “chi cuadrado de tendencia lineal”:

PCR pos tratamiento según el número de lesiones primarias	OR en relación a 1 lesión	
1	1	χ^2 tendencia lineal= 35.436 ($p<0,0001$)
2	5.16	
≥ 3	11.59	

Los datos muestran que los pacientes con 2 lesiones primarias tenían 5 veces más chance de presentar PCR pos tratamiento positivo que aquellos con sólo 1 lesión y que pacientes con 3 o más lesiones tenían casi 12 veces más riesgo de presentar PCR positivo pos tratamiento que aquellos con 1 lesión ($p<0.0001$).

5.6.3. Asociación entre PCR pos tratamiento y dimensión de las lesiones

De los 340 participantes, la ulcera de sólo uno de ellos no fue dimensionada. De los 339 restantes, se observó asociación directa entre la PCR positiva pos tratamiento y el tamaño de la ulcera primaria. La frecuencia de positividad fue de 10.5% (13 de 124) en aquellos que tenían lesiones pequeñas, de 26.8% (33 de 123) en aquellos que tenían lesiones medianas y de 39.1% (36 de 92) en aquellos que tenían lesiones grandes ($\chi^2 = 24.369$, $gl=2$, $p < 0.0001$). En el análisis del chi cuadrado de tendencia lineal se demostró que pacientes con lesiones primarias medianas presentaron 2.6 veces más riesgo de tener una PCR pos tratamiento positiva que aquellos con lesiones pequeñas y que para los pacientes con lesiones grandes la posibilidad aumentó 4 veces mas ($p = 0.0001$).

PCR pos tratamiento según la dimensión de la lesión primaria	OR en relación a dimensión pequeña	
pequeña	1	χ^2 tendencia lineal= 14.718 ($p = 0,0001$)
mediana	2.56	
grande	3.73	

5.6.4. Asociación entre PCR pos tratamiento y localización de la ulcera

Para el análisis de la localización de la lesión, tomamos en cuenta solo los pacientes que tenían lesiones con solo una localización. Así, 321 pacientes presentaban úlceras solo en cabeza o solo en extremidad superior o solo en extremidad inferior o solo en tronco.

El análisis de los mismos mostró una mayor positividad en la PCR pos tratamiento entre los pacientes con úlceras localizadas en cabeza (31.8%) y tronco (40%), respecto a los que tenían lesiones cutáneas localizadas en las extremidades inferior (22.4%) y superior (18.0%), pero sin significancia estadística ($\chi^2 = 5.473$, 3 gl, $p = 0.140$).

5.6.5. Asociación entre PCR pos tratamiento y presencia de coinfección bacteriana en la lesión primaria

La frecuencia PCR pos tratamiento positivo entre los pacientes con y sin coinfección bacteriana en la lesión primaria fue respectivamente de 25.8% y 21.9%. No se observó relación entre estas dos variables estadísticamente significativa ($\chi^2=0.677$, 1 gl, $p=0.411$; OR= 1.24, IC_{95%}= 0.75-2.05).

5.6.6. Asociación entre PCR pos tratamiento y retraso en el diagnóstico

El análisis estadístico mostró que también hubo asociación directa positiva entre el tiempo de evolución de la ulcera al momento de inicio del tratamiento y un resultado de PCR positivo pos tratamiento, de manera que cuanto mayor es el retraso en el diagnóstico, mayor la frecuencia de positividad en la PCR pos tratamiento.

Las frecuencias de positivos fueron de 1.4% entre los pacientes con un tiempo de evolución de hasta 3 meses, de 18.9% con 4 a 6 meses y de 47.6% entre 7 o más meses de evolución ($\chi^2=54.133$, 2 gl, $p<0.0001$).

El chi cuadrado de tendencia lineal mostró que los pacientes con diagnóstico realizado, de 4 a 6 meses de evolución de las lesiones presentaron 16 veces más chance de tener PCR pos tratamiento positiva que aquellos diagnosticados hasta 3 meses de evolución y que aquellos con 7 meses o más de retraso en el diagnóstico la chance fue de casi 64 veces en relación a los diagnosticados hasta 3 meses ($p<0.0001$):

PCR pos tratamiento según tiempo de evolución de la lesión primaria	OR en relación a ≤ 3 meses de evolución	
≤ 3 meses	1	χ^2 tendencia lineal= 52.544 ($p<0,0001$)
4-6 meses	16.32	
≥ 7 meses	63.64	

6. Asociación entre resultados del PCR y del frotis para el diagnóstico inicial y el PCR pos tratamiento

No hubo relación entre frotis diagnóstico y PCR pos tratamiento (test exacto de Fisher= 0.121). Sin embargo, aquellos que tenían frotis negativo en el momento del diagnóstico tenían 3 veces más riesgo de tener el PCR pos tratamiento positivo. (OR= 3.30; IC_{95%}=1.97-5.52).

7. Asociación entre PCR pos tratamiento y frotis pos tratamiento

Fue clara la asociación entre PCR pos tratamiento y frotis pos tratamiento ($\chi^2=165.508$, 1 gl, $p < 0.0001$), de manera que los pacientes con frotis positivo después del tratamiento tenían 181 veces más riesgo de tener también la PCR positiva que aquellos con frotis negativo (OR=180.71; IC_{95%}= 42.01-77.35).

8. Asociación entre PCR pos tratamiento e interrupción del tratamiento

Cinco participantes interrumpieron el tratamiento y todos ellos tuvieron la PCR pos tratamiento positiva. De los demás 335 que hicieron el tratamiento sin interrupción, 77% fueron negativos en la PCR. Así, la asociación muestra que hay 4 veces más riesgo de presentar PCR positiva pos tratamiento cuando se interrumpe la medicación (T.E. Fisher= 0.001; OR= 4.35, IC_{95%}= 3.58-5.29).

9. Asociación entre PCR pos tratamiento y abandono del tratamiento

De los pacientes que abandonaron el tratamiento, 57% tuvieron PCR pos tratamiento positiva, mientras 23% de los que hicieron todo el tratamiento fueron PCR positivos. El teste de *chi* cuadrado mostró significancia estadística en esta diferencia ($\chi^2= 4.259$, 1gl, $p= 0.039$), sin embargo, el Test E. de Fisher, que es más adecuado por el pequeño número de casos en uno de los grupos, no mostró significancia estadística (Fisher= 0.061), así como la *odds ratio* (OR= 4.36; IC_{95%}= 0.96-19.89).

10. Asociación entre PCR pos tratamiento y presencia de ulcera pos tratamiento

Trece participantes presentaron ulcera después del tratamiento y todos ellos tuvieron la PCR pos tratamiento positiva. De los demás 327 que ya no presentaron úlceras, 78.9% fueron negativos en la PCR. Estos datos nos muestran que aquellos pacientes que tienen lesiones después del tratamiento tienen casi 5 veces más riesgo de presentar PCR positivo pos tratamiento (T.E. Fisher <0.0001 ; OR= 4.74, IC_{95%}= 3.84-5.84).

La Tabla 8 resume los valores encontrados en las asociaciones entre PCR pos tratamiento y las distintas variables estudiadas.

Tabla 8. Asociación entre PCR pos tratamiento y variables investigadas en la población de estudio. Palos Blancos, departamento de La Paz. Mayo 2007 a Noviembre 2009.

VARIABLE	N*	POSITIVO EN EL PCR POS TRATAMIENTO		OR (IC _{95%})	χ^2	p	
		N ^o	%				
EDAD							
0-10 años	30	7	23.3	-	8.129 (4 gl)	0.09	
11-20 años	60	16	26.7				
21-40 años	144	28	19.4				
41-60 años	82	20	24.4				
>60 años	24	11	45.8				
EDAD EN DOS CATEGORIAS							
≤ 60 años	316	71	22.5	1	6.654	0.01	
> 60 años	24	11	45.8	2.92 (1.25-6.80)			
GÉNERO							
Mujeres	109	28	25.7	1	0.216	0.642	
Hombres	231	54	23.4	0.88 (0.52-1.49)			
NÚMERO DE ÚLCERAS							
1	295	55	18.7	1	χ^2 tend:	<0.0001	
2	35	19	54.3	5.16			35.44
≥ 3	11	8	72.7	11.69			
DIMENSION DE LA ULCERA							
Pequeña	124	13	10.5	1	χ^2 tend:	<0.0001	
Mediana	123	33	26.8	2.56			14.718
grande	92	36	39.1	3.73			
LOCALIZACIÓN DE LA ULCERA							
Cabeza	44	14	31.8	-	5.473 (3 gl)	0.140*	
Extremidad superior	133	24	18				
Extremidad inferior	134	30	22.4				
Tronco	10	4	40.0				
PRESENCIA DE INFECC. BACTERIANA							
No	146	32	21.9	1	0.677	0.411	
Si	194	50	25.8	1.24 (0.72-2.05)			(1 gl)
TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ULCERA							
≤ 3 meses	71	1	1.4	1	χ^2 tend:	<0.0001	
4-6 meses	164	31	18.9	16.32			52.544
> 7 meses	105	50	47.6	63.64			
PCR DIAGNÓSTICO							
Si	331	82	24.8			T.E.Fisher= 0.121	
No	9	0	0				
FROTIS DIAGNÓSTICO							
Positivo	229	38	16.6	1	21.696	< 0.0001	
Negativo	111	44	39.6	3.30 (1.97-5.52)			(1 gl)
FROTIS POS TRATAMIENTO							
Negativo	290	34	11.7	1	165.508	< 0.0001	
Positivo	50	48	90.6	180.71(42.01-77.35)			(1 gl)
ABANDONO DEL TRATAMIENTO							
Si	7	4	57.1	4.36 (0.96-19.90)		T.E.Fisher= 0.061*	
No	333	78	23.4				
INTERRUPCIÓN DEL TRATAMIENTO							
Si	5	5	100.0%	4.35 (3.58-5.29)		T.E.Fisher= 0.001*	
No	335	77	23.0%	1			
PRESENCIA DE ULCERA POS TRATAM.							
Si	13	13	100.0%	4.74 (3.84-5.84)		T.E.Fisher <0.001*	
NO	327	69	21.1%	1			

OR (IC_{95%})= odds ratio (interval de confianza de 95%)
 χ^2 tend: teste de χ^2 de tendencia linear

χ^2 = test de chi cuadrado

p= valor de p

T.E.Fisher: Teste exato de Fisher

* =some cells have expected count less than 5 (análisis estadística no confiable)

VI. DISCUSION

De acuerdo a las características epidemiológicas descritas de la enfermedad de leishmaniasis en relación al grupo etáreo, sexo, actividad laboral, ubicación de las lesiones, el ciclo de transmisión en su mayoría seguiría estando asociado a una dinámica extradomiciliar, puesto que la actividad laboral predominante de la población de estudio es realizada fuera del hábitat y el grupo de edad más afectado fue aquel con posibilidad de mayor producción de trabajo.

La edad y el sexo constituyen, así, factores de riesgo para enfermar de leishmaniasis, pues las personas jóvenes, principalmente varones, incursionan mayormente en áreas endémicas, exponiéndose al vector transmisor. En el presente estudio el sexo masculino aportó el mayor número de casos, aunque las mujeres cada vez se incorporan más a las labores agrícolas, para contribuir a la economía familiar. Otros estudios también coinciden con los resultados obtenidos (19).

La localización preferencial de lesiones cutáneas en extremidades inferiores y superiores, se explica por la actividad laboral que realiza la población de estudio, puesto que durante el día los trabajadores realizan su actividad laboral en el monte y debido al clima caliente, húmedo y la carga de trabajo, se encuentran ligeramente vestidos.

El tiempo de evolución de la enfermedad al momento de su detección por pruebas convencionales y moleculares en el presente estudio, fue en 79.1% por encima de los 4 meses (48.2% entre 4 a 6 meses, 30.9% encima de los 6 meses e solo 20.9% hasta los 3 meses) de enfermedad. Estos resultados indican cuan grande es el retraso en el diagnóstico de la leishmaniasis en los pacientes del Departamento de La Paz, independientemente del lugar de residencia, esta situación da lugar a que las autoridades deben ser alertadas para incrementar la atención en salud local.

A través del examen microscópico, el 67,4 % de la población en estudio tuvo un resultado positivo. Estos resultados se aproximan a los reportados por otros investigadores, sin embargo, en un estudio realizado por Zerpa et al., 2002 (21) los resultados llegaron a un 80% de positividad, lo que podría deberse a que la población estudiada tenía lesiones activas en su mayoría de tres meses de evolución (94%). Si bien el procedimiento para la realización de un frotis de la lesión es fácil y rápido, es de mayor ayuda cuando existe un número abundante de amastigotes. La sensibilidad del test aumenta en casos de reciente infección, donde es posible hallar gran cantidad de amastigotes en lesiones activas. Por otro lado, en las lesiones crónicas la cantidad de parásitos es baja y la sensibilidad del frotis disminuye. El tiempo de enfermedad es un indicador importante para el diagnóstico al momento de su detección también por histopatología, el parásito es más frecuentemente observado cuando la enfermedad tiene un periodo de evolución de 1 a 3 meses.

La frecuencia de positivos en el frotis aumentó con el aumento del rango de edad, pero solo hasta los 60 años, después de que, hubo queda en la frecuencia de positivos, tornando los mayores comparables a los niños. Si bien el número de pacientes con más de 60 años fue pequeño (24 pacientes) pudiendo presentar este número una limitante para la valoración estadística correspondiente, esta observación llama la atención para la necesidad de mayor atención a los grupos extremos de edad en el momento diagnóstico.

En el presente estudio, no hubo asociación entre el diagnóstico microscópico (frotis) y el tiempo de evolución de la lesión, sin embargo, el prolongado tiempo de evolución de las úlceras al momento de la detección de la enfermedad, puede contribuir para ayudar a explicar los 111 casos de frotis negativos entre los enfermos (67.4% de detección por frotis). El predominio de lesiones únicas entre los pacientes, redujo el número de posibilidades diagnósticas a una úlcera aislada y fue significativamente mayor la frecuencia de frotis positivos cuando el paciente presentó 3 o más lesiones.

Se considera que el examen directo debe ser realizado después de un pre-tratamiento para eliminar infecciones bacterianas de las lesiones que hacen difícil la visualización del parásito.

En nuestros resultados observamos que la presencia de coinfección fue favorecida por el aumento del tiempo de evolución de las lesiones, sin embargo, no hubo asociación entre presencia de coinfección y menor positividad en el frotis.

La prueba de PCR fue positiva en el 97,6% de los casos, lo que evidencia su mayor sensibilidad respecto al frotis. La frecuencia fue elevada respecto al rango de edad, presencia de coinfección bacteriana, número, localización, tamaño y tiempo de evolución de las lesiones, no habiendo asociación con ninguna de estas variables. Diferentes estudios respaldan los resultados obtenidos, inclusive con cantidades pequeñas de muestra, como demostró Sierra G. et al., 2009 (16) en un estudio que determinó el grado de sensibilidad y reproducibilidad de un ensayo de PCR para la detección de *Leishmania* utilizando muestra de biopsia de tejido impresa en papel filtro. La sensibilidad obtenida al procesar la muestra en tres diferentes laboratorios fue de 95.8 a 97,9 %. En otro estudio publicado por Miranda H. et al en 2003, la positividad del PCR alcanzó el 93%, el examen directo 85% y el cultivo 72% y la existencia de más de una especie además de *L. peruviana* también fue determinada por el PCR-Multiplex (23).

Demostramos que un 24% de la población estudiada resultó positiva a la prueba de PCR al ser realizada pos tratamiento con Glucantime, 13 pacientes tenían ulcera y 14.7% frotis positivo. Además, la presencia de lesión cutánea de leishmaniasis después del tratamiento se relacionó con una positividad en la PCR pos tratamiento.

La PCR pos tratamiento realizada en la sangre permitió evaluar su asociación con las distintas variables estudiadas. No existió asociación entre género y el resultado de la prueba, pero respecto a la edad de la población de estudio, se observó que mayores a 60 años fueron más susceptibles a mantener el parásito aun detectable en la sangre por la PCR después del tratamiento. Este hecho fue distinto a lo observado en las pruebas para diagnóstico, cuando el frotis fue menos frecuente en mayores y la PCR diagnóstica no cambió con la edad. Es posible pensar que después del tratamiento, personas mayores a 60 años puedan tener una mayor dificultad para eliminar los parásitos, favorecida por la persistencia del mismo en su sistema inmune, pero estudios más profundos son necesarios.

En el presente estudio, por asociación directa, la frecuencia de positividad en la PCR pos tratamiento se relacionó con el tamaño y con el número de las lesiones primarias presentadas por el paciente. Cuanto mayor la úlcera, mayor la posibilidad de ser positivo la PCR y aquellos que tenían 3 lesiones, tenían 12 veces más chance de presentar la prueba positiva después del tratamiento que los pacientes que presentaba una sola lesión. Según Marsden, la diseminación desde las lesiones cutáneas primarias se realizaría por vía hematogena aunque no existen datos de aislamientos de *Leishmania (Viania) braziliensis* en sangre periférica humana. Solamente en animales de experimentación se demostró diseminación y visceralización de esta especie de *Leishmania*.

Existió una muy fuerte asociación directa entre positividad en la PCR pos tratamiento y el tiempo de evolución de la lesión al momento del diagnóstico de la enfermedad. Así, cuanto mayor el retraso en el diagnóstico, mayor la posibilidad de persistencia del parásito en sangre después del tratamiento. Un dato interesante es que estudios realizados por otros autores han demostrado que lesiones de larga duración están más frecuentemente asociadas a posibles impactos mucosos que las primoinfecciones de corta duración (24). Con estas observaciones, podemos pensar en la PCR pos tratamiento como posibilidad de predecir la forma mucosa, lo que es posible confirmar por estudios longitudinales prospectivos posteriores.

La Interrupción y abandono del tratamiento también aumentaron el riesgo de mantener la positividad en la PCR realizada al finalizar el mismo. Esa observación demuestra que la persistencia parasitaria puede favorecer recidivas y formas mucosas posteriores, sin embargo estos resultados deben ser evaluados con estudios más completos para su confirmación.

Estudios recientes en otros países con alta endemicidad de leishmaniasis mostraron la utilidad de las nuevas técnicas moleculares para evaluar el comportamiento de la enfermedad, tal es el caso de Wortmann et al (25), que utilizaron una variante de PCR (Real time PCR) para la identificación rápida de los complejos *L. viannia*, *L. mexicana*, *L. donovani* y *L. major* utilizando la detección del gen de la glucosa fosfato isomerasa que tiene regiones que marcan la diferencia entre estas especies.

La introducción de métodos de biología molecular, supone un gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los ya usados métodos microbiológicos tradicionales y actualmente el análisis integrado de todos ellos está llevando a resultados más fiables y eficaces. Así, entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa, ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez.

La presencia del parásito en sangre detectado a través del PCR en el presente estudio, nos muestra la utilidad de la técnica en pacientes que recibieron algún tratamiento para la enfermedad, sin embargo es necesario poder realizar la caracterización de las especies y la carga parasitaria, que pueden ser herramientas muy útiles al momento de diseñar mayores estrategias de control de la enfermedad.

Las asociaciones encontradas con la PCR pos tratamiento en el presente estudio nos llevan a pensar en la importancia del diagnóstico rápido, la realización del tratamiento inmediato y la no interrupción de la medicación.

Además, es importante destacar que la evaluación realizada en el presente estudio, respecto a los factores de riesgo que pueden llevar a un resultado PCR positivo postratamiento, pueden brindar una alternativa de mejor control y seguimiento del tratamiento.

La posibilidad de utilizarla la PCR como herramienta para control y seguimiento del tratamiento, se hace evidente en el presente estudio, sin embargo es importante considerar desarrollar estudios longitudinales que confirmen esta situación.

VII. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, concluimos que:

1. El significativo predominio de género masculino, edad laboral y actividades fuera del hábitat doméstico entre los pacientes que participaron del estudio indica que la leishmaniasis está siendo más transmitida en ambientes rurales durante el trabajo, en particular en la agricultura, seguido por la transmisión peri doméstica.
2. Es grande el retraso en el diagnóstico de la leishmaniasis en los pacientes de Palos Blancos.
3. La coinfección bacteriana de la leishmaniasis cutánea es favorecida por el aumento del tiempo de evolución de las lesiones.
4. La PCR fue una técnica de diagnóstico de la leishmaniasis más sensible, detectando 1.5 veces más infección que la frotis.
5. Mayores a 60 años son más susceptibles a mantener el parásito después del tratamiento aun detectable por la PCR.
6. La frecuencia de positividad en la PCR tiene asociación directa con el número de las lesiones primarias presentadas por el paciente.
7. La frecuencia de positividad en la PCR se relaciona directamente con el tamaño de las lesiones primarias presentadas por el paciente.
8. La presencia de coinfección bacteriana en la úlcera primaria de leishmaniasis no influye en el resultado de la PCR pos tratamiento.
9. La PCR pos tratamiento se asocia fuertemente y de manera directa con el retraso en el diagnóstico de la leishmaniasis. La chance de positividad es 16 y 64 veces mayor entre aquellos con 4-6 y >6 meses de evolución respectivamente, que aquellos con diagnóstico hecho con hasta 3 meses de enfermedad.
10. La Interrupción y abandono del tratamiento aumentaron la posibilidad de mantener la positividad en la PCR realizada posteriormente.
11. Presentar lesión cutánea de leishmaniasis después del tratamiento se relacionó con una positividad en la PCR.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1a. World Health Organization, 2010. Leishmaniasis. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (acceso el 18 de octubre 2010).
- 1b. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305–18.
- 1c. Barbara L. Herwaldt, Alan J. Magill, 2010. Leishmaniasis Cutaneous (CL). Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/cutaneous-leishmaniasis.aspx>.
2. Mollinedo, Sergio y col., 2000. “Leishmaniasis en Bolivia”, en *Revista Medica*. Vol. 7 N° 1 de Oct-Dic. Disponible en www.revistaciencias.com/publicaciones/EEFyulppV/ocOLwwHJ.php
3. OPS/OMS, “Sistema Regional De Datos Básicos En Salud - Perfil De País Resumen Del Análisis De Situación Y Tendencias De Salud – Bolivia”., Versión actualizada al 9 de noviembre de 2004, La Paz Bolivia. Disponible en www.bvsp.org.bo/ass/analisis-situación/bolivia/perfil-bolivia-2004pdf
4. La Paz, Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis; Comité de Identidad Institucional - Ministerio de Salud y Deportes 2007. Disponible en smollinedo@sns.gov.bo.
5. OPS.”Epidemiología y control de la Leishmaniasis en las Américas, por País y Territorio, en Cuaderno Técnico N° 47 1996
6. Dudenhausen, J., “PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies”. Disponible en <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/anders-gerlind-2003-02-05/HTML/front.html#front>

7. Gallego, Montserrat, "Las Leishmaniasis Humanas: Leishmaniasis Autóctona Por *Leishmania Infantum*", en CEIMS, Barcelona-España; Biblioteca virtual de salud. Disponible en www.seimc.org/control/revi-Para/leish.htm-25k
8. Murphy, N.R. y Hellwig, R.J. *BioTechniques* 1996 21 (5): 934-939.
9. Brusés, Bettina. "Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Leishmania spp* mediante la técnica de PCR"; Disponible en jbgbruses@lared.com.ar.
10. Cáceres, Omar. "Diseño y Evaluación de Tres Oligonucleótidos para la Detección de *Leishmania* por PCR". *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2002. 19 (3)
11. Arevalo, Jorge, "Diagnostico". *Revista Medica*, 2000. 39 (6), Nov-Dic.
12. Botero, David;"Parasitosis Humanas";4ª Edición;Medellín-Colombia;2003.
13. Méndez S., Pérez E.. "La PCR múltiple en microbiología clínica". Puesta al día en métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico. 2005; 10: 72-80
14. Orue A., De Abreu N., Martínez C., Mendoza-León A.. "Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2008; 28: 6-13
15. Quispe S., Revollo S., López Ronald., Bellido T.. "Diagnóstico de la Leishmaniasis mediante PCR en el departamento de La Paz, Bolivia. *Revista BIOFARBO*. 2002; 10: 9-
16. Sierra G., Ferreira N., Claude P., Santo Silva P., Fernandez O., Nédia N., Cupolillo E., Firozmand Lilia., Volpini a., Lopez S., Romanha A.. *Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for Leishmania detection using skin biopsy imprints on filter paper*". *Acta Tropica*, 2009. 109(1): 4-7.

- 17 Belli A., Rodríguez B., Aviles H., Harris E., Simplified Polymerase Chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998. 58(1):102-109.
- 18 Oruéa A, De Abreu N., Martínez C., Mendoza A.; Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2008; 28:6-13.
19. Risco G., Fuentes O., Núñez F.. *Leishmaniosis cutánea en la región sanitaria nº 3, República de Honduras, Enero 1998 a Septiembre 2002*. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 2009, 47 (2). Disponible en: <http://scielo.sld.cu>.
21. Zerpa O., Borges R., Loyo N., Galindo W., Belisario D., Rodríguez D., Sosa A., Convit J.. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana*. 2002. 40 (4): 106-110.
23. Miranda H., Alfaro A., Lora C., Rodríguez L.. *Estudio Comparado de métodos de diagnóstico de la leishmaniasis y caracterización molecular de los agentes etiológicos en la Libertad*. *Folia Dermatológica Peruana*, 2003, 14 (2): 18 – 23.
24. Ripoli C.. Reporte Técnico No 5. Leishmaniasis. Area Epidemiología. Departamento Control de Vectores. San Salvador de Jujuy. 2005. (6):1 -19.
25. Wortmann G., Hochberg L., Houg H., Sweeney C., Zapor M., Aronson N., Weina P., Ockenouse C.. Rapid Identification of *Leishmania* complexes by a real time PCR assay. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005. 73 (6): 999-1004.
26. Pérez V., Barron D., Gastanys S., Gamarro F., Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Current Drug Targets*. 2002 (3): 311 – 333.

IX. ANEXOS

9.1. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo de años de edad, con CI: Expedido en Manifiesto que he sido informado (a) sobre los objetivos del Proyecto de investigación: “Enfermedades Infecciosas, Nuevas terapias alternativas” que tiene como fin encontrar un tratamiento alternativo para la leishmaniasis cutánea, he sido informado sobre los riesgos y beneficios del tratamiento, que el tratamiento incluye la extracción de un volumen total de 10 ml de sangre venosa durante los 15 meses que estaré involucrado en este proyecto, y que las tomas de muestras serán en tiempos establecidos.

He sido informado sobre los perjuicios que el tratamiento y la extracción de muestras de sangre a diferentes tiempos puedan tener sobre mi bienestar y salud, así mismo se me harán conocer los resultados obtenidos de las pruebas realizadas con mis muestras y sobre el seguimiento clínico de mi enfermedad.

He sido también informado de que mis datos personales serán manejados confidencialmente y protegidos según las normas vigentes de Bioética. Que mi participación en el proyecto es **VOLUNTARIA** y que en cualquier momento puedo retirar mi consentimiento a seguir participando del mismo, sin que mi tratamiento médico posterior se vea afectado

Por lo tanto, **OTORGO** mi **CONSENTIMIENTO** a participar en este proyecto.

Palos Blancos,de del 20.....

Firma Paciente.....

Nombre Paciente.....

CI:

9.2. EQUIPO DE TRABAJO

1. Dra. Simone Ladeia Andrade PhD (Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Brasil): Asesora trabajo de tesis.
2. Susana Revollo Ph.D: autora del proyecto: “Enfermedades Infecciosas, Nuevas Estrategias Terapéuticas”, bajo el cual se llevo a cabo el presente trabajo y asesora del mismo, de profesión Bioquímica, Instituto SELADIS, Docente Investigador de la Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés. La Paz - Bolivia
3. Walter Magariños MSc: Medico Dermatólogo, coordinador general del proyecto y responsable del seguimiento clínico de los pacientes. Docente Investigador de la Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés. La Paz - Bolivia
5. Jacqueline Calla de Magariños MSc, de profesion Bioquímica, Instituto SELADIS , Docente Investigador de la Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímicas Universidad Mayor de San Andrés, Responsable del desarrollo de toda la parte inmunológica del Proyecto.
4. Dr. Luís Fernando Sosa, de profesión Bioquímico, Investigador Asociado y responsable del seguimiento inmunológico de los pacientes, Instituto SELADIS , Docente Investigador de la Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímicas Universidad Mayor de San Andres.
5. Dr. Rolando Parra Bautista: de profesión Odontólogo, Investigador Asociado, proyecto: “Enfermedades Infecciosas, Nuevas estrategias terapéuticas” y Coordinador de salud del Proyecto O.S.C.A.R, responsable de los ensayos clínicos en el Hospital de Palos Blancos.
6. Mabel Montero, Investigadora Asociada, Instituto SELADIS - Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas - Universidad Mayor de San Andrés, encargada de evaluar la eficacia terapéutica en base al seguimiento serológico y molecular de los pacientes)
7. Noemí Fernández, enfermera auxiliar encargada de mantener al día las historias clínicas, los cuadernos de registro y realizar las curaciones de los pacientes en el Hospital de Palos Blancos