

Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp en áreas endémicas de Venezuela

Noris Rodríguez, Marta Cardona, Olga Zerpa, Miguel Barrios, Alexandra Sosa y Alexis Fernández

La utilización de técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de Polimerasa (PCR), el análisis de restricción con endonucleasas y la hibridación molecular han sido de gran utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y visceral.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en 781 muestras aisladas de humanos, con lesiones sospechosas de leishmaniasis cutánea provenientes de distintas áreas endémicas del país. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de las técnicas moleculares en la evaluación epidemiológicas de focos de leishmaniasis, con rapidez, sensibilidad y especificidad, permitiendo la identificación del ciclo biológico de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* en su ambiente natural. Se logró la identificación taxonómica de aislados provenientes de 20 estados del país, lo que permitió conocer la distribución de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* en las áreas estudiadas. De los estudios realizados podemos deducir que *Leishmania Viannia* es responsable del 80% de leishmaniasis cutánea localizada, mientras que el sub género *Leishmania* es responsable del 20% de los casos. Esta distribución es la misma para todos los estados a excepción del estado Yaracuy, donde existe un 40% de casos producidos por *Leishmania mexicana*. En nuestras manos, la PCR fue sensible en un 88.86% de los casos en comparación con el cultivo que solo fue positivo en el 18% de los casos.

Palabras clave: *Leishmania* spp, diagnóstico, caracterización, PCR, hibridación molecular, análisis de restricción.

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad que actualmente es considerada como un problema de salud pública en Venezuela, tanto por su morbilidad como por los cambios en su comportamiento, en cuanto a su patrón epidemiológico. La información en cuanto a la morbilidad de la leishmaniasis no refleja exactamente el número de casos. El 70% de los casos diagnosticados en los servicios de Dermatología Sanitaria no tienen confirmación diagnóstica, lo cual es esencial, ya que muchos de ellos provienen de áreas endémicas para otras enfermedades por lo que el diagnóstico diferencial

con otras afecciones es necesaria, la confusión en el diagnóstico influye directamente en los índices de morbilidad reportados.

El diagnóstico preciso de la enfermedad, así como la identificación de su agente causal y su relación con sus vectores y reservorios es necesario para el diseño e implementación de las medidas de control.

En los últimos años, los avances en la Biología molecular han abierto la posibilidad de desarrollar herramientas específicas para el diagnóstico de enfermedades, en

este sentido, la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), desarrollada por Mullis y col (1987); ha sido una de las más utilizadas. Esta técnica consiste en la amplificación in vitro de un fragmento específico de ADN debido a la extensión simultánea de las dos cadenas por la acción de primers complementarios. Los requerimientos de esta reacción son muy simples: deoxinucleótidos para proveer tanto la energía como los nucleótidos para la síntesis de ADN primers, ADN como blanco o molde y buffer conteniendo Magnesio para garantizar la actividad de la enzima.

La PCR ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios tales como mutaciones puntuales, análisis genómico de variación de secuencia, utilizando tanto ADN de material fresco o material de archivo. Sin embargo el uso más amplio que se le ha dado a esta técnica esta relacionado con su aplicación al diagnóstico de diversas enfermedades.

En leishmaniasis muchos autores reportan su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (Poper y Wirth, 1987; De Bruijn y Barker, 1992, 1993; Rodríguez y col, 1994). Sin embargo, las investigaciones se han orientado hacia la obtención de secuencias de ADN con especificidad de especie, que permitan además del diagnóstico de la enfermedad, la identificación de la especie del parásito infectante. En Venezuela, según el servicio de Dermatología Sanitaria, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) representa entre el 90-95% de los casos registrados en el país. Entre 1985-1998 se reportaron en el país 1700 casos con un sub-registro estimado entre el 20-30%, entre las causas principales de este sub-registro se mencionan las dificultades para acceder a los servicios de salud y las dificultades en el diagnóstico. La PCR ha demostrado ser una técnica rápida, sensible y específica en el diagnóstico de esta enfermedad, por lo que en el presente proyecto nos propusimos desarrollar y utilizar herramientas específicas para el diagnóstico e identificación de las distintas especies de *Leishmania* que circulan en las diferentes áreas endémicas del país. Esta metodología permitirá la evaluación epidemiológica rápida con un diagnóstico preciso de la enfermedad.

Materiales y Métodos.

Extracción de ADN. Muestras (biopsia de piel o mucosa nasal) tomadas a pacientes con diagnóstico clínico de

leishmaniasis cutánea, las mismas son colocadas en 50 μ l de buffer de lisis (10Mm TE, 10 Mm EDTA), una vez recibidas en el laboratorio, se le agrega 1ug/ul de proteinasa K y se calienta a 56°C por una hora, luego de centrifugación a 13.000 RPM por 10 min., el sobrenadante es colocado en un tubo limpio, posteriormente se realiza una extracción vol/vol con una mezcla de fenol/cloroformo. El ADN es precipitado de la fase acuosa al agregar 2 ½ volúmenes de etanol y 1/10 del volumen de cloruro de litio a -20° C. El ADN es recolectado después de centrifugación a 10.000 RPM por 10 min y guardado a 4° C.

Cultivo de parásitos:

Los parásitos fueron aislados de biopsias tomadas a pacientes, en medio de agar base sangre con 10% de sangre desfibrinada de conejo y 1000 U de penicilina, los cultivos son mantenidos en estos medios con pases sucesivos semanalmente, una vez que el parásito ha sido adaptado al medio, se cultiva masivamente para la extracción de ADN y para criopreservación en nitrógeno líquido

Reacción en cadena de Polimerasa (PCR). La PCR se realiza con 1ul de ADN (100ng) en una mezcla de reacción que contiene 200ng de cada primer; 2,5 mM de deoxinucleótidos (dNTPs) y 1 U de Taq Polimerasa. La mezcla de reacción es sometida a 35 ciclos de amplificación; cada ciclo consiste de 1 minuto a 94° C para desnaturalizar el ADN, 1 minuto a 60 o 65° C (dependiendo de los primers) para la alineación de los primers a su secuencia homologa y finalmente 1 minuto a 72° C para amplificación.

Los productos de PCR son visualizados con luz ultravioleta, después de electroforesis en geles de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio (0.5 ug/ul)

Análisis de restricción del ADN.

10 ul de ADN son digeridos con 10 U de endonucleasa (Gibco-BRL) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los productos de la digestión son separados mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida según sea el caso.

Hibridación Molecular. Los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis, son transferidos a papel de nitrocelulosa por Southern blotting (Southern, 1975).

La membrana de nitrocelulosa se pre-hibridiza durante 16 horas a 42° C en buffer (5XSSC; 1% SDS; 5X Denhardt; 50ug/ml de esperma de salmón y 50% formamida). La hibridación se realiza en el mismo buffer, al cual se le agrega la sonda marcada con dATP marcado o no radiactivamente.

La hibridación molecular también se realizó en dot blot, en este caso, el ADN es aplicado directamente sobre el papel de nitrocelulosa y posteriormente desnaturalizado sobre el papel con 1N de NaOH, neutralizado con acetato de amonio 2N. Después de secar la nitrocelulosa en horno de vacío, se procede a la pre-hibridación y posteriormente la hibridación. Después de la hibridación, los filtros se lavan a 65° C en 2XSSC, 0,1% SDS y posteriormente se revelan por auto radiografía o por fluorescencia según sea el caso.

Clonamiento Molecular:

A partir de una librería genómica de *Leishmania guyanensis*, se logró obtener una secuencia específica de ADN de kinetoplasto, la cual permite la identificación específica de ésta especie de *Leishmania*, la cual ha sido utilizada como sonda, en el desarrollo de este trabajo para identificación específica de las distintas especies de *Leishmania* que circulan en las distintas áreas endémicas (Rodríguez y col 2000)

Resultados.

Entre Julio de 1997 y Septiembre de 1999 se han procesado un total 781 muestras de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada,. En cuanto a la leishmaniasis visceral, se han estudiado 89 muestras provenientes de individuos residentes de áreas donde se reportan casos de leishmaniasis visceral y 289 muestras de perros domésticos ambos procedentes de 8 focos del Estado Nueva Esparta, 81 muestras provenientes del Estado Anzoátegui, de las cuales 15 corresponden a casos de leishmaniasis visceral.

La tabla 1 muestra la distribución por estados de las muestras obtenidas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, que resultaron positivas por PCR donde se observa que el mayor número de casos se concentra en los estados; Lara, Mérida y Miranda.

Tabla 1.- PCR-Diagnóstico de muestras de pacientes con Leishmaniasis.

ESTADO	N° de Pacientes	Positivos Lb	Positivo Lm	Negativos
Anzoátegui	4	2	1	1
Apure	5	1	2	2
Aragua	9	9	0	0
Barinas	2	1	1	0
Bolívar	27	22	2	3
Carabobo	4	4	0	0
Dtto. Federal	22	11	1	10
Falcón	1	0	0	1
Guárico	7	4	1	2
Lara	175	136	6	33
Mérida	145	102	5	38
Miranda	66	41	6	19
Nueva Esparta	1	0	0	1
Portuguesa	27	19	0	8
Sucre	3	0	2	1
Táchira	1	1	0	0
Trujillo	2	0	0	2
Vargas	29	14	6	9
Yaracuy	45	34	8	3
Zulia	7	4	0	3
Otros	23	10	0	13
TOTAL	605 (100%)	415 (68,59%)	41(6,77%)	149 (24,62%)

LB = *Leishmania brasiliensis*
LM = *Leishmania mexicana*

Los pacientes con úlceras sospechosas de leishmaniasis fueron evaluados por clínicos especialistas y previo consentimiento del paciente se le aplicó la intra dermoreacción de Montenegro. Los pacientes que resultaron positivos a la prueba se les tomó una biopsia para el diagnóstico parasitológico mediante frotis, cultivo y PCR.

La fig 1 es una muestra de los productos de PCR obtenidos al realizar la amplificación de biopsias tomadas a pacientes con lesiones sospechosas de leishmaniasis. El producto esperado de 700 pb utilizando los primers B1 y B2, para el diagnóstico de *Leishmania braziliensis*, fue observado en la mayoría de las muestras. Sin embargo, las muestras 2, 3, 7, 10 resultaron negativas para *Leishmania braziliensis*, siendo positivas para *Leishmania mexicana* al obtenerse el producto esperado para esta especie, después de la amplificación con primers específicos para la detección de estos parásitos.

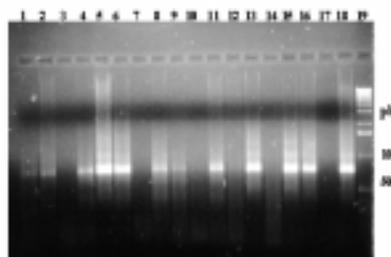


Fig. 1. Productos de PCR de muestras de pacientes en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

De la información obtenida al realizar la PCR tanto para la detección de *Leishmania braziliensis* como para *L. mexicana*, se pudo determinar la relación existente entre ambas especies de *Leishmania* para producir leishmaniasis cutánea. La fig 2 muestra el porcentaje de ambas especies de *Leishmania* encontradas en las muestras de los pacientes estudiados, siendo *L. braziliensis* responsable de la enfermedad en el 80.05% de los casos estudiados y *L. mexicana* en el porcentaje restante. La PCR resultó mas sensible que el cultivo para el diagnóstico parasitológico, encontrándose un porcentaje de positividad en los cultivos solo de un 18% en comparación con un 88% de positividad encontrado por PCR.

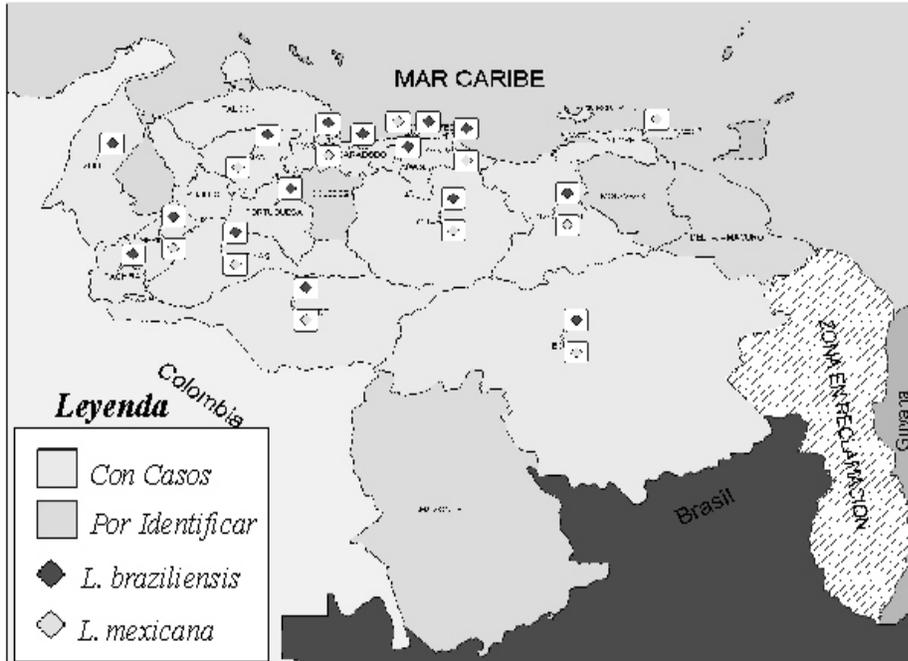


Figura 2. Distribución de *Leishmania* spp. en Venezuela.

La hibridación molecular utilizando sondas especie específicas (Fig 3), permitió demostrar *Leishmania* (V) *braziliensis* con algunas variantes genéticas (resultado no mostrado), está mayoritariamente presente en las áreas estudiadas. *L*(V) *guyanensis* fue encontrada solo en un aislado de un paciente roveniente del Municipio Tovar del Estado Mérida.

Los resultados obtenidos han permitido conocer la distribución de las especies del sub-genero *Viannia* y *Leishmania* (fig 4), que mayoritariamente producen la leishmaniasis cutánea en las distintas áreas endémicas del país.

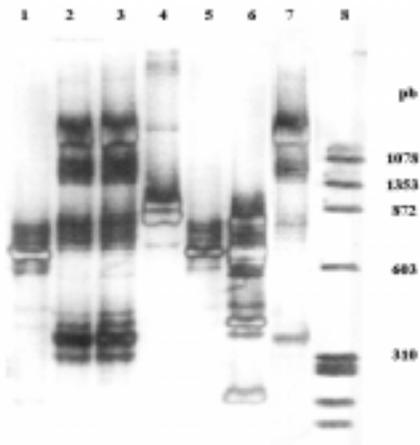


Fig. 3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradientes. ADNk de aislados obtenidos de animales diversos digeridos con la enzima MSPL orden de las muestras: 1 a 3- aislados obtenidos de animales silvestres (*Rattus*, *Sigmodon* y *Ratus*); 4) *L* (V) *braziliensis*; 5) *L* (V) *guyanensis*; 6) *L* (L) *amazonensis*; 7) *T. cruzi* Marcadores de pesos moleculares.

Fig. 4.- Productos de PCR de muestras de vectores en electroforesis en el gel agarosa al 1% usando primers 3J1 y 3J2. Orden de las muestras: 1) Control negativo (mezcla de reacción). 2) Control positivo *L. (V) braziliensis*. 3) *Lu. panamensis*. 4-5) *Lu. trinidadensis*. 6-7) *Lu. panamensis*. 8-10) *Lu. cayennensis*. 11-12) *Lu. gomezi*. 13) Control negativo. MW. marcadores de peso molecular. (Pool de flebotomos no infectados).

DISCUSIÓN

La utilidad de la detección de DNA por PCR como criterio diagnóstico en muestras humanas ha sido ampliamente demostrado en nuestro trabajo. Sin embargo una de las contribuciones más importantes, ha sido sin duda la adaptación de la técnica para la evaluación epidemiológica rápida de un foco de leishmaniasis muy corto tiempo, teniendo al mismo tiempo el diagnóstico de la enfermedad y la especie del parásito infectante, así mismo la técnica puede ser aplicada para el estudio de vectores y reservorios tal como ha sido demostrado en nuestras publicaciones (Rodríguez y col 1999, De Lima y col, 2002)

La aplicación de esta técnica en el diagnóstico de leishmaniasis ahorra tiempo, lo cual beneficia al paciente, quien puede ser tratado de una manera más eficaz.

Este proyecto nos ha permitido desarrollar una metodología diagnóstica, con aplicación directa en el campo, con un 80% -95% .

de sensibilidad para la detección del parásito leishmánico con especificidad de especie. Sin embargo el éxito de la técnica depende de la condición en la cual se tome la muestra, ya que es muy importante que se preserve la integridad del material genético y se evite su degradación por acción de las nucleasas, para ello se diseñó un protocolo que fue repartido a los servicios de dermatología y así lograr el éxito de la prueba.

La PCR resultó ser aproximadamente 60% mas efectiva, sensible y específica que el cultivo, el cual solo fue positivo en el 18% de los biopsias cultivadas en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. Uno de los problemas que encontramos es la contaminación por hongos y bacterias en los cultivos, lo cual es de esperar ya que la mayoría de las úlceras presentan infecciones secundarias por esos micro organismos.

El trabajo permitió conocer la distribución de las distintas especies de *Leishmania* responsables tanto de la leishmaniasis cutánea, donde pudimos determinar la prevalencia de *Leishmania braziliensis* en un 80% de los casos estudiados, mas aún se demostró que solo *L(V) braziliensis* está presente cuando se analizan a nivel mas específico los aislados del sub-genero *Viannia*, reportándose solamente un caso producido por *L(V) guyanensis* proveniente del estado Mérida, por lo que se está realizando un estudio mas amplio

para evaluar la abundancia de esta especie en la zona, para lo cual contamos con una sonda específica para la detección de esa especie. Así mismo queda demostrado el papel de *L(L) mexicana* en la leishmaniasis cutánea localizada, la cual se presenta aún dentro de un mismo foco, donde se encuentra un solo tipo de vector, este hallazgo corrobora los resultados previamente publicados donde se demuestra que una sola especie de vector puede ser portadora de *Leishmania braziliensis* y *L. mexicana* (Barrios y col, 1994). Los estudios continúan a fin de completar el mapa con la distribución geográfica de la leishmaniasis en Venezuela así como la distribución de sus diferentes vectores y reservorios.

Referencias

Barrios MA; Rodríguez N; Feliciangeli MD; Ulrich M; Telles S; Pinardi M and Convit J (1994). Coexistence of two species of *Leishmania* in the digestive tract of the vector *Lutzomyia ovallesi*. *Am. J. Trop. Med.Hyg.* 51(1):669-675

De Bruijn, M.H.L and Barker, D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica.* 52: 45-58

De Bruijn, M.H.L; Labrada, L.A; Smyth, A.J; Santrich, C and Barker, D.C. (1993). A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. and Parasitol.* 44: 201-207.

De Lima Hector; De Guglielmo Zoraya, Rodriguez Armando; Convit Jacinto and Rodriguez, Noris. Cotton rat (*Sigmodon hispidus*) and black rat (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania braziliensis* in an endemic area in Lara State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(2):169-174.

Feliciangeli M.D; Rodriguez, N; De Guglielmo, Z and Rodriguez, A (1999). The reemergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II: Vectors and Parasites. *Parasite* 6: 113-120.

Mullis, K and Faloona, F. (1987). DNA amplification. *Methods in Enzymology.* Vol 155 (ed. R. Wu) pp 135. Academic Press, New York and London.

Rodriguez, N; Guzman, B; Rodas, A; Takiff, H; Bloom, B and Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32(9): 2246-2252.

. Rodriguez, N; Aguilar, C.M; Barrios, M.A and Barker, D.C. (1999). Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected sandflies by the polymerase chain reaction and hybridization. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 47-49.

Rodriguez, N; Rodriguez, A; Cardona M; Barrios MA; McCann SHE; Barker DC(2000). *Leishmania (Viannia) guyanensis*: A new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library usefull for taxonomic purposes. *Experimental Parasitology* 94:143-149.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.