

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis agrupa a un conjunto de enfermedades causadas por un protozoario del género *Leishmania* (Fig. 2 y 3). Esta enfermedad es transmitida en América por la picadura de insectos dípteros del género *Lutzomyia* conocidos popularmente como "chitras". En Panamá la leishmaniasis es una infección parasitaria muy importante presente en las áreas boscosas y montañosas de casi todas las provincias excepto en el área seca y árida de Herrera (Fig 1). Las formas clínicas que se manifiestan en nuestro país son la cutánea (Fig. 4) y la mucocutánea (Fig.5). La forma cutánea se caracteriza por úlceras generalmente en extremidades y en la cara. En Panamá, el principal agente etiológico es *L. braziliensis panamensis* aunque también se han reportado casos por *L. mexicana amazonensis*. La forma mucocutánea es una complicación de la forma cutánea que por lo general se manifiesta años después de la infección primaria. Hasta la fecha no se ha documentado la grave forma visceral de esta enfermedad en nuestro país.

La caracterización del parásito de *Leishmania* es de suma importancia para aplicar regímenes de tratamientos, para el manejo del paciente, el pronóstico de la enfermedad y para conocer la distribución de las especies del parásito. El examen microscópico de frotis de lesiones o los cultivos de parásitos son inadecuados para este propósito debido a la similitud morfológica que presentan las diferentes especies. Los procedimientos tradicionales para caracterizar el parásito de *Leishmania* basados en métodos bioquímicos e inmunológicos carecen de la especificidad necesaria o son complicados para su uso rutinario en el laboratorio. Por tal motivo en este estudio se evaluaron distintas técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para caracterizar aislados de *Leishmania*.

METODOLOGIA

Se analizaron diez cepas de referencia, veinte cepas aisladas de raspados de lesiones cutáneas y biopsias mucocutáneas, y diez preparaciones obtenidas directamente de lesiones de pacientes que asistieron a la Clínica del ICGES. Las preparaciones directas de lesiones cutáneas en buffer TE fueron hervidas por 10 minutos y una alícuota se usó directamente en la reacción de PCR. Inicialmente las técnicas moleculares fueron evaluadas y estandarizadas empleando las cepas de referencia y posteriormente se analizaron las muestras de los pacientes. Las metodologías moleculares empleadas fueron: PCR para subgénero *Viannia*; PCR-Multiplex para Complejos (*braziliensis*, *mexicana* y *chagasi*) y PCR para género *Leishmania* más la técnica RFLP (Tabla 1).

TABLA 1

Técnicas Moleculares basadas en la PCR para caracterizar *Leishmania* sp

Técnica	Descrita	Primers	ADN blanco	Tamaño del producto esperado
PCR Subgénero <i>Viannia</i> .	De Bruijn y col.(1993)	B1 B2	Minicírculo entero del kinetoplasto de <i>L. subgénero Viannia</i>	750 pb
PCR Multiplex para caracterizar los Complejos de <i>Leishmania</i>	Harris y col. (1998)	LU-5A LB-3C LM-3A LC-3L	Gen minixión en donde en una sola reacción se logra amplificar y diferenciar los tres complejos de <i>Leishmania</i> del continente americano	Complejo 351 a 397pb → <i>L. donovani</i> 218 a 249 pb → <i>L. mexicana</i> 146 a 149 pb → <i>L. braziliensis</i>
PCR-RFLP	Majumder y col. (1995)	LSUC LSUL	Minicírculo de los parásitos de <i>Leishmania</i>	Entre 600 y 700 pb
PCR Género específico <i>Leishmania</i>	Carrasco (2001)		Producto de PCR digerido con las enzimas <i>Hae</i> III y <i>Rsa</i> I	Patrón particular para las distintas especies del parásito.

RESULTADOS

De las cepas de referencia analizadas con la metodología PCR subgénero *Viannia* sólo amplificaron *L. panamensis* y *L. braziliensis*, ambas pertenecientes al subgénero *Viannia*. No se observó amplificación con la cepa de *L. colombienseis* (Fig. 6).

Con la metodología PCR Complejo Multiplex se analizaron todas las cepas de referencia y todas amplificaron un producto de tamaño esperado. Al realizarse mezclas *in vitro* de especies pertenecientes a diferentes complejos, se logró amplificar y diferenciar en una sola reacción los diferentes complejos. La cepa de referencia *L. colombienseis* no amplificó con esta metodología. La cepa de referencia *L. hertigi* amplificó una banda de tamaño correspondiente a complejo *mexicana* (Fig. 7).

Todas las cepas de referencia amplificaron con los primers LSUC y LSUL productos entre 600 y 700 pb. Los productos amplificados de las cepas de referencia se digirieron con enzimas de restricción *Hae* III y *Rsa* I, dando como resultados patrones característicos observados en geles de agarosa. Estos patrones de digestión fueron usados como referencia para comparar y caracterizar las otras muestras del estudio (Fig. 8).

Los resultados moleculares indicaron que todas las muestras aisladas de pacientes con lesiones pertenecen al subgénero *Viannia*, complejo *braziliensis* y subespecie *panamensis*. Aunque se analizó un tamaño de muestra muy bajo, los resultados obtenidos de preparaciones directas de lesión con las técnicas moleculares fueron prometedores. Con el PCR subgénero *Viannia* se obtuvieron seis amplificaciones específicas, el PCR-Complejo-multiplex detectó dos muestras positivas que coinciden con el complejo *braziliensis* y con la técnica PCR-RFLP se obtuvieron cuatro muestras que tenían patrones comparados con la cepa de referencia *L. panamensis*.

CONCLUSIONES

Con las técnicas moleculares empleadas en el estudio se puede caracterizar los parásitos de *Leishmania* de manera rápida y específica. La combinación PCR-RFLP empleada en este estudio es muy útil para caracterizar hasta el nivel subespecie.

Todas las muestras de aislados de lesiones de pacientes del estudio son parte del subgénero *Viannia*, complejo *braziliensis* y subespecie *L. panamensis*. No se encontró ningún aislado perteneciente a *L. mexicana amazonensis*. Nuestros resultados coinciden con los estudios realizados en las diferentes provincias durante 1997 en donde la mayoría de las cepas aisladas de pacientes y caracterizadas por métodos enzimáticos fueron *L. panamensis*. Además, coincide con los resultados de cepas aisladas de pacientes captados pasivamente durante los últimos años en la Clínica de Medicina Tropical, ICGES y caracterizadas mediante zimodemas en el Departamento de Parasitología, ICGES. Los resultados obtenidos con preparaciones directa de lesiones permitirá en un futuro realizar el diagnóstico y caracterización simultáneamente sin tener que aislar y cultivar los parásitos de las lesiones. De esta forma se evitará el costoso y largo proceso de cultivar el parásito. En general, el diagnóstico de leishmaniasis basado en el cultivo del parásito es de baja sensibilidad y no todas las especies crecen adecuadamente en determinados medios de cultivo. Además, son frecuentes las contaminaciones por hongos y bacterias lo que inhibe el crecimiento de los parásitos. Las técnicas moleculares empleadas en este estudio tienen el potencial de mejorar considerablemente el diagnóstico y la caracterización del parásito *Leishmania*.

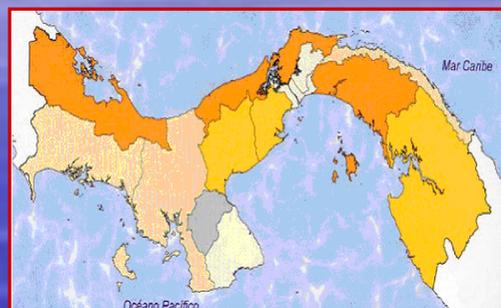


Figura 1. Número de casos de leishmaniasis por Provincias, 2001

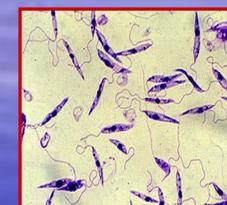
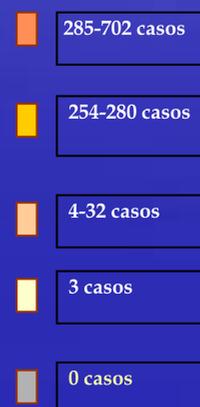


Figura 2. Promastigotes de *Leishmania* spp.

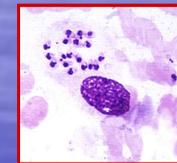


Figura 3. Amastigotes de *Leishmania* spp.



Figura 4. Leishmaniasis Cutánea



Figura 5. Leishmaniasis Mucocutánea

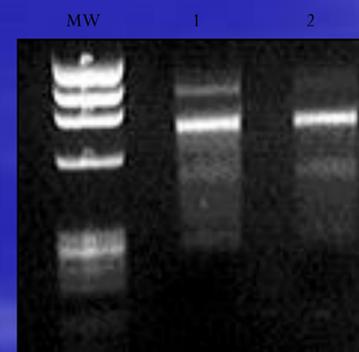


Figura 6. PCR de subgénero *Viannia*. Cepas de referencia. 1: *L. panamensis*, 2: *L. braziliensis*, MW: marcador molecular Φ X174/*Hae*III

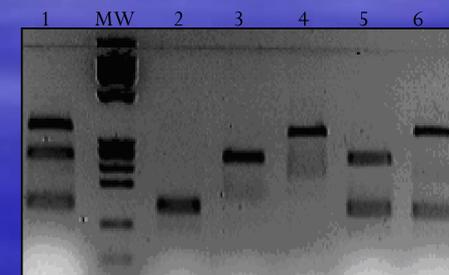


Figura 7. PCR Multiplex de Complejo. Cepas de referencia. 1: *L. panamensis*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*; 2: *L. panamensis*; 3: *L. amazonensis*; 4: *L. chagasi*; 5: *L. panamensis* y *L. mexicana amazonensis*; 6: *L. panamensis* y *L. chagasi*; MW: marcador molecular Φ X174/*Hae* III.

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 MW

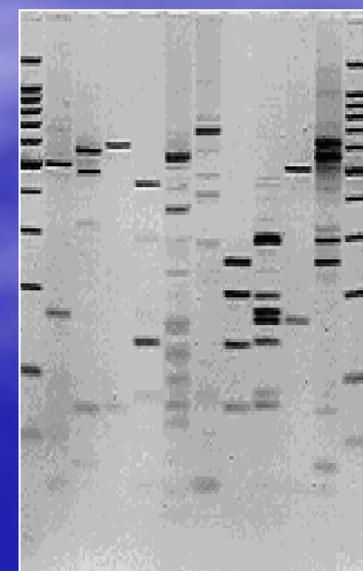


Figura 8. RFLP de cepas de referencia: 1 *L. mexicana*; 2: *L. panamensis*; 3: *L. garnhami*; 4: *L. aristidesi*; 5: *L. colombienseis*; 6: *L. hertigi*; 7: *L. amazonensis*; 8: *L. mexicana* (Londres); 9: *L. chagasi*; 10: *L. braziliensis*; MW: marcador molecular 100 pb.