

# EVALUACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE LEISHMANIA OBTENIDOS DE PACIENTES EN PANAMÁ. 2005

Licda. Aracelis Miranda T.M., Licda. Yaxelis Mendoza, Lic. Franklin Samudio, Dr. Héctor Paz, Dr. Octavio E. Sousa\*, Dr. José E. Calzada, Dr. Juan M. Pascale.

Instituto Commemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES),\*Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP),Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

## RESUMEN

El presente estudio describe la estandarización y evaluación preliminar de tres técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico y caracterización de parásitos de *Leishmania*. Las pruebas fueron inicialmente estandarizadas empleando cepas de referencia y posteriormente utilizadas para analizar parásitos aislados de raspados de lesiones cutáneas y biopsias de lesiones mucocutáneas. Además, se evaluó el potencial de estas pruebas empleando como material biológico preparaciones obtenidas directamente de lesiones de pacientes. Los resultados preliminares demuestran la utilidad de las pruebas moleculares para diagnosticar y caracterizar simultáneamente de forma rutinaria las infecciones causadas por *Leishmania*. Además, se logró confirmar que *L. b. panamensis* es el principal agente etiológico de la leishmaniasis cutánea en Panamá.

**PALABRAS CLAVES:** leishmaniasis, PCR, PCR-RFLP

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un problema importante de salud pública que afecta alrededor de 12 millones de personas que habitan en regiones tropicales y subtropicales del mundo<sup>13</sup>. Puede presentarse con diferentes manifestaciones clínicas dependientes de la edad, género, así como de una diversidad de patrones epidemiológicos determinados principalmente por la relación reservorio-vector y la especie de *Leishmania* involucrada en la infección<sup>1</sup>. El protozoo *Leishmania (Viannia) panamensis* es el principal agente etiológico de la leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) en Panamá, pero también se han descrito casos esporádicos de LC por *L. mexicana amazonensis*<sup>11</sup>. En Panamá, el número de casos nuevos registrados anualmente es cercano a 2,000<sup>5</sup>, con un subregistro de hasta un 70% en algunas regiones del país<sup>12</sup>.

La confirmación del diagnóstico es crítica porque las lesiones de la piel pueden ser muy similares clínica y epidemiológicamente a las producidas

por otros agentes patógenos<sup>2</sup>. A su vez, la caracterización del parásito es de suma importancia ya que la especie de *Leishmania* involucrada en la infección determina en gran medida las manifestaciones clínicas de la enfermedad y su respuesta al tratamiento<sup>9,10</sup>. El examen microscópico de frotis de lesiones y de parásitos es inadecuado para estos propósitos, debido a la similitud morfológica que presentan las diferentes especies<sup>2</sup>.

Los procedimientos tradicionales para caracterizar el parásito de *Leishmania* basados en métodos bioquímicos e inmunológicos carecen de la especificidad necesaria, aparte de ser muy complicados para su uso rutinario<sup>6,7</sup>. Por tal motivo en este estudio se evaluaron distintas técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para diagnosticar y caracterizar aislados de *Leishmania* obtenidos de pacientes en Panamá.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico

Las cepas de referencia empleadas para estandarizar los procedimientos moleculares fueron facilitadas por el CIDEP y el ICGES. Las muestras clínicas (n = 20) para aislar los parásitos de *Leishmania* se obtuvieron de raspados o biopsias de las lesiones cutáneas de

pacientes que asistieron a la Clínica de Medicina Tropical del ICGES. Para cultivar los parásitos el material obtenido de las lesiones cutáneas se inoculó en medio bifásico de Senekjic con MI99. También se analizaron diez raspados cutáneos que se inocularon directamente en 200 µl de Buffer TE

## Metodos moleculares

Para extraer el ADN de los cultivos se empleó el Kit comercial "Wizard Genomic DNA purification Kit" (Promega). Se midió la concentración del ADN extraído determinando la densidad óptica (DO) a 260nm por espectrofotometría y se empleó 1ng en cada reacción de PCR. Las preparaciones directas de

lesiones cutáneas en buffer TE fueron calentadas a 100°C durante 10 minutos y una alícuota (5µl) se usó directamente en la reacción de PCR. La tabla 1 detalla la secuencia de los oligonucleotidos y las características del producto amplificado para cada uno de los procedimientos empleados.

## 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*. La cepa *L. colombienseis*, que según algunos autores pertenece a este subgénero, no amplificó en nuestro estudio con esta metodología (Fig. 1).

Con la prueba PCR Complejo Multiplex las cepas de referencia amplificaron productos del tamaño esperado de acuerdo al complejo de *Leishmania* al que pertenecen. Al realizarse mezclas *in vitro* de especies pertenecientes a diferentes complejos, se logró amplificar y diferenciar en una sola reacción los diferentes complejos (Fig. 2). La cepa de referencia *L. colombienseis* no amplificó con esta metodología, mientras que la cepa de referencia *L. hertigi*

amplificó una banda de tamaño correspondiente a complejo *mexicana*. Todas las cepas de referencia amplificaron productos del tamaño esperado con los primers género específico los cuales al ser digeridos con las enzimas de restricción mostraron patrones que fueron usados como referencia para comparar y caracterizar las muestras clínicas del estudio (Figura 3).

Los resultados de las tres pruebas moleculares indicaron que todas las muestras clínicas aisladas de pacientes durante el estudio (n = 20) pertenecen al subgénero *Viannia*, complejo *braziliensis* y subespecie *panamensis*.

Como parte del estudio también se evaluaron estas metodologías con 10 preparaciones directas de lesiones cutáneas. La tabla 2 muestra los resultados.

Figura 1.  
PCR *Viannia* usando cepas de referencia.

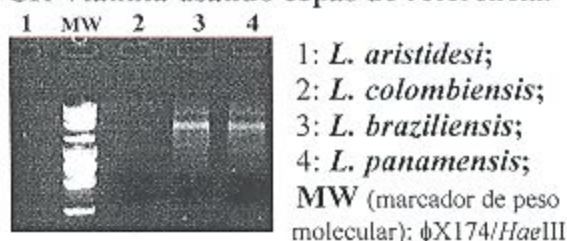
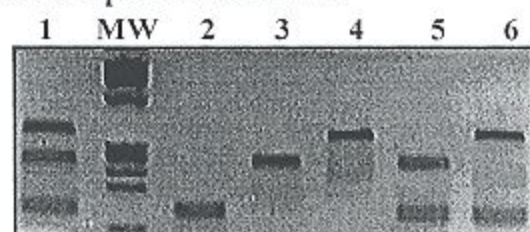
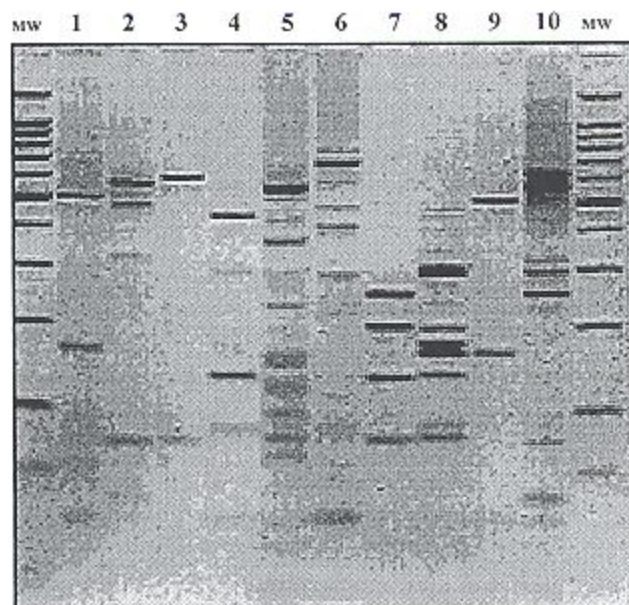


Figura 2.  
PCR Multiplex de Complejo usando cepas de referencia



- 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 de peso molecular):  $\phi$ X174/*Hae*III

Figura 3.  
PCR-RFLP usando 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

## DISCUSIÓN

Todos los aislados de lesiones de pacientes durante el estudio pertenecen al subgénero *Viannia*, complejo *braziliensis* y subespecie *panamensis*. La prueba de PCR Multiplex para Complejos permite en una sola amplificación detectar las dos especies de *Leishmania* que hasta la fecha circulan en Panamá. También detecta especies de *Leishmania* que producen leishmaniasis visceral (LV).

Se evaluaron los límites de detección empleando la cepa de referencia *L. b. panamensis* para cada metodología siendo para el PCR subgénero *Viannia* de 0.1 pg, para el PCR género de *Leishmania* 0.8 pg y para el PCR Multiplex 0.01 ng.

Aunque se analizó un tamaño de muestra bajo, los resultados preliminares obtenidos con preparaciones directas de lesiones fueron prometedores. Estas pruebas permiten diagnosticar y caracterizar simultáneamente sin tener que aislar y cultivar previamente los

parásitos. Se observó que el método más sensible es el PCR subgénero *Viannia*, seguido del PCR género de *Leishmania* y con una menor sensibilidad el PCR Multiplex para Complejo. Por tal motivo con el PCR subgénero *Viannia* resultaron dos muestras de preparaciones directas que amplificaron a pesar de ser negativas por frotis, cultivo y Prueba de Montenegro (Tabla 2). Al evaluar las tres metodologías empleadas en el estudio con raspados directos de lesiones podemos recomendar como el mejor método de diagnóstico el PCR subgénero *Viannia* y como mejor método para caracterización PCR-RFLP por ser la prueba con mayor resolución al clasificar los parásitos de *Leishmania* hasta el nivel de subespecie. El método PCR Multiplex para Complejo debido a su bajo límite de detección sólo se recomienda para caracterizar parásitos aislados de cultivos, más no para diagnóstico.

Tabla 1  
Técnicas moleculares basadas en la PCR para caracterizar *Leishmania sp.*

Técnica	Primers	ADN blanco	Tamaño del producto esperado
PCR Subgénero <i>Viannia</i> <sup>1</sup>	B1 5'-GGGGTTGGTGTAATATAG TGG-3' B2 5'-CTA ATT GIG CAC GGGGAG G-3'	Mínicirculo entero del kinetoplasto subgénero <i>Viannia</i>	750 pb
PCR Multiplex para caracterizar Complejos de <i>Leishmania</i> <sup>9</sup>	LU-5A 5' TTTATTGGTATGCGAAACTTC-3' LB-3C 5' CGT(G/C)CCGAACCCCGTGTC-3' LM-3A 5' GCACCGCACC GG(A/G)CCAC-3' LC-3L 5' GCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT-3'	Gen mínixión en donde en una sola reacción se logra amplificar y diferenciar los tres complejos del continente americano	Complejo donovani: 351-397 pb mexicana 218-249pb braziliensis 146-149pb
PCR-RFLP PCR Género específico <i>Leishmania</i> <sup>8</sup> RFLP <sup>3</sup>	LSUC= 5'CAAAC TGGGGTTGTGT AA-3' LSUL= 5'TTTTGAACGGGGTTTCTG-3'	Mínicirculo de los parásitos de <i>Leishmania</i>  Producto de PCR digerido con las enzimas Hae III y Rsa I	Entre 600 y 700 pb  Patrón particular para las distintas especies del parásito.

Tabla 2

Resultados de las tres técnicas moleculares aplicadas en las preparaciones de lesiones directas, frotis, cultivo y prueba de Montenegro.

Número	PCR Complejo Multiplex	PCR Género Leishmania	PCR Subgénero Viannia	Frotis	Cultivo	Montenegro
5907	No Amplificó	No Amplificó	No Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5921	No Amplificó	Amplificó	Amplificó	Negativo	Positivo	Positivo
5922	No Amplificó	No Amplificó	No Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5937	No Amplificó	No Amplificó	No Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5951	No Amplificó	No Amplificó	No Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5963	No Amplificó	No Amplificó	Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5971	No Amplificó	No Amplificó	Amplificó	Negativo	Negativo	Negativo
5986	Amplificó	Amplificó	Amplificó	Positivo	Positivo	Negativo
5987	Amplificó	Amplificó	Amplificó	Positivo	Negativo	Negativo
5989	No Amplificó	Amplificó	Amplificó	Negativo	Positivo	Negativo

## REFERENCIAS

- Alvar, J. Las Leishmaniasis: de la biología al control. Madrid: Junta de Castilla y León, 1997.
- Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. Segunda Edición..Medellín: Carvajal S.A.1992. Pag.213
- Carrasco R. Diagnóstico Molecular de *Leishmania sp.* en *Lutzomyia sp.* Tesis de Maestría en Entomología Médica. Panamá: Universidad de Panamá. 2001.
- De Bruijn M., Labrada L, Smyth A, Santrich C, Barker D. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. Tropical Journal of Medicine and Parasitology.1993. 44: 201-207.
- Departamento de Vigilancia de Factores Protectores y de Riesgos a la Salud y Enfermedades, Boletín Epidemiológico del Ministerio de Salud. 2001, 25 (10,11,12)
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, y Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 37:1989-1995.
- Kreutzer R, Christensen, H. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1980. 29: 199-208.
- Majumder H, Bhattacharyya R, Das K, Sen S, Roy S. Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction. FEMS Microbiology Letters. 1996.135:195-200.
- Neva F, Sacks D. Leishmaniasis. En K.S Warren y A.A.F. Mahmoud(Ed.), Tropical and geographical medicine. New York: McGraw-Hill Information Services Co.1990.
- Peters W, Evans D, Lanham S. Importance of parasite identification in cases of leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.1983. 77:540-542.
- Petersen J, Johnson C, de Vásquez A, Sáenz R. Leishmaniasis causada por *Leishmania mexicana amazonensis* en Panamá. Revista Médica de Panamá.1987. 12 (3): 158-164.
- Vásquez, A., Paz, H., Alvar, Jorge., Perez, D., Hernandez, C. Informe final: Estudios sobre la epidemiología de la leishmaniasis en la parte occidental de la República de Panamá. Panamá: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud. MINSAL, 1998.
- WHO. The Leishmaniasis, Technical Report, World Health Organization. Geneva:1993.