

Artículo Original

Identificación de kinetoplastidos aislados en el Ecuador mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Hernan O. Aviles,¹ Rodrigo X. Armijos,^{1,4} Sonia Murgueytio,² Gloria Guzman,¹ Roberto Rodriguez,¹ Gerald McLaughlin.³

¹ Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central, ² Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central, ³ Departamento de Patología, Universidad de Indiana, Indianápolis, USA, ⁴ Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Perez, Quito-Ecuador.

Resumen

La amplificación del DNA del kinetoplasto, cada vez tiene mayor aplicación en la detección *Leishmania* y diagnóstico de leishmaniasis. En el presente estudio se emplea un par de sondas: KIN 1 y KIN 2, que se amplificaron en todas las especies de *Leishmania*, tanto las cepas de referencia como las aisladas a partir de lesiones en humanos, en quienes se observó un segmento de 470 pares de bases (pb), mientras que en *Trypanosoma cruzi*, un segmento de 520 pb. Es importante recalcar la necesidad de validar la utilidad de esta prueba en el diagnóstico clínico, epidemiológico y entomológico de esta enfermedad.

Palabras clave: *Leishmania*, Reacción en cadena de la polimerasa.

Summary

The amplification of kinetoplast DNA is becoming increasingly important in the detection of *Leishmania* and diagnosis of leishmaniasis. The present study used a pair of primers: KIN 1 and KIN 2, which can amplify all *Leishmania* species. These primers were able to amplify all of the *Leishmania* reference strains as well as the ones which were isolated from the lesions of the human patients. A segment of 470 base pairs was observed in all the tested strains. In contrast, 520 base pairs were detected for *Trypanosoma cruzi* using these primers. It is important to emphasize the necessity to validate this test for clinical diagnosis as well as for epidemiological and entomological investigations.

Key words: *Leishmania*, Polymerase chain reaction.

Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador 1999; 24 (1): 27-30

Introducción

La leishmaniasis es una parasitosis de distribución mundial en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales. Está presente en 80 países correspondientes a todos los continentes excepto Oceanía. En América constituye un problema de salud pública y está presente en por lo menos 24 de sus países. En Ecuador la leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) son endémicas en 18 de las

21 provincias. En la mayoría de sus focos, afecta principalmente a los niños y a sujetos de migración reciente,^{3a,3b,4,5} en donde, a partir de lesiones humanas, se han identificado 5 especies diferentes de *Leishmania* que incluyen: *L.(V) braziliensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) guyanensis*, *L.(L) amazonensis* y *L.(L) mexicana*. Las cuatro primeras están presentes en los subtropicos y trópicos mientras que la última en algunos valles andinos.^{1,2,3a,3b,6,7}

Entre las técnicas que en la actualidad se cuentan para el diagnóstico de la leishmaniasis está el raspado, que es de fácil ejecución, barata, específica, pero con una sensibilidad que va del 45 al 50%, lo que da lugar a un elevado número de pacientes, que teniendo leishmaniasis, no pueden ser diagnosticados como tales y consecuentemente no reciben tratamiento. Las pruebas inmunológicas tienen una buena sensibilidad pero no pueden diferenciar entre enfermedad actual, pasada o infección subclínica y además, presentan reacción cruzada con *T. cruzi* y micobacterias, principalmente,⁸ por lo que la búsqueda de técnicas alternativas con adecuada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la leishmaniasis es una prioridad. En relación a la tipificación de *Leishmania*, al momento se cuentan con técnicas inmunológicas y bioquímicas como la electroforesis de isoenzimas, anticuerpos monoclonales, DNA de kinetoplasto digerido con enzimas de restricción, densidad de flotación del DNA. El inconveniente actual es que para definir a que especie pertenece una cepa, se deben realizar al menos tres de las técnicas mencionadas.^{2,3,5,11,13} En los últimos años se han realizado esfuerzos importantes tendientes a mejorar las técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico de la leishmaniasis y tipificación de *Leishmania*, basándose en las características de su DNA del kinetoplasto (kDNA). Wirth y MacMahon-Pratt (1982) describieron la ausencia de hibridación cruzada entre el kDNA total de *L.(V) braziliensis* y *L.(L) mexicana*,¹⁰ esto permitió el desarrollo de sondas moleculares basadas en copias de segmentos del minicírculo, que son los mayores componentes del kDNA y por que presentan características que hacen de ellos blancos ideales, especialmente por su elevado número de copias (cerca de 10.000) y por ser una región altamente conservada, para cada uno de los subgeneros (*Leishmania* y *Viannia*), en por lo menos 120 pares de bases. De los minicírculos clonados completamente, los fragmentos fueron usados con éxito

Dirección para la correspondencia: Dr. Rodrigo Armijos, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central, Casilla 61-20 CCI, Teléfonos 528690, 528810, Quito-Ecuador.

en la detección y tipificación de *Leishmania* (Barker y Butcher 1987, Barker y col. 1986, López y Wirth 1986, Roger y col. 1988), pero pronto se vio su limitado margen de detección (100-1000 parásitos por muestra).^{12,14-19,24,25,30,31}

Se desarrollaron otras sondas de diferentes partes del genoma nuclear pero no mejoró la sensibilidad.²⁰⁻²³

En el presente estudio se identificaron 36 cepas de *Leishmania* mas una de *T. cruzi*, aisladas a partir de humanos, mediante la extracción de su DNA y la posterior amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de sondas dirigidas a amplificar el DNA ribosómico (rDNA) 18S-5.8S ITS1 de kinetoplastídeos. (Vodkin 1992; Howe 1992; McLaughlin 1992).²⁷⁻²⁹

Pacientes y métodos

Los pacientes provienen de varias zonas subtropicales, tropicales y andina del país. La *Leishmania* se aisló de 34 pacientes residentes en el occidente de la provincia de Pichincha que incluye el área rural de los cantones Santo Domingo de los Colorados, Los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Puerto Quito y Pacto. Un paciente del Cantón Francisco de Orellana, provincia del Napo. Un paciente del Cantón Alausí, provincia del Chimborazo. Un paciente con enfermedad de Chagas agudo que proviene del Canton Nueva Loja, provincia de Sucumbios, de quien se aisló *T. cruzi*.

Aislamiento del Parásito

Para el aislamiento de *Leishmania*, previa anamnesis y examen clínico del paciente, se realizó asepsia de la lesión y de su borde mas inflamado, se procedió a realizar aspirado con

jeringuilla de 3ml conteniendo 500ul de PBS estéril, para luego inocular el contenido en un tubo con medio de cultivo NNN modificado. Se incubó a 24 grados centígrados y se determinó la negatividad o positividad mediante observaciones semanales a partir del tercer día hasta por un mes. Para aislar la cepa de *T. cruzi* se tomó 5ml de sangre periférica del paciente y se sembró en medio NNN, seguido de observaciones periódicas hasta verificar su positividad o negatividad. Posteriormente, las cepas aisladas fueron tipificadas por electroforesis de isoenzimas en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, USA, indicando las siguientes especies: del occidente de la provincia de Pichincha, 20 cepas como *L.(V) guyanensis*, 10 como *L.(V) panamensis* y 4 como *L.(V) braziliensis*. Del Canton Francisco de Orellana una cepa como *L.(V) braziliensis* y del Cantón Alausí una cepa como *L.(L) mexicana*.

Se utilizaron como control las cepas de referencia de la OMS, *L.(V) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, *L.(V) panamensis* MHOM/PA/LJ94, *L.(V) guyanensis* HOM/BR/75/M4147, *L.(L) mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21, y *L.(L) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269, donadas por el Instituto Boliviano de Biología de Altura, la Paz, Bolivia (IBBA), y otras por el CDC de Atlanta.

Reacción de PCR

LISIS DEL PARÁSITO: Tanto de las cepas de referencia como de las obtenidas a partir de pacientes, en un tubo eppendorf de 0.5ml, se tomó 1ul de sobrenadante con aproximadamente 1×10^6 promastigotes/mL, que luego de mezclarlo con 19ul de "gen releaser" (Bioventures Inc, Murfreesboro), se sometió al termociclador (MJ Research) bajo el programa recomendado por la casa fabricante, que consiste en: 65°C-30sg; 8°C-30sg; 65°C-90sg; 97°C-180sg; 8°C-60sg; 65°C-180 sg; 97°C-60sg; 65°C-60sg; 8°C-60sg, luego de lo cual cada muestra fue centrifugada a 12.000 x g durante 5 minutos, se toma 4ul de sobrenadante, que fue utilizado como template, al que se le añadió 36ul de una mezcla que contiene 50ul de ampli Taq DNA polimerasa (5U/ul); 320ul de cada desoxinucleótido trifosfato disuelto en agua pH:7 (dATP,dCTP, dGTP,dTTP 10mM), 1,4mL de tampón de reacción (100mM Tris-HCl,500 mM ClK, 15 mM MgCl2, 0.01%(p/v) gelatina (Sigma). GeneAmp PCR Reagent Kit (Perkin Elmer Cetus).

AMPLIFICACIÓN: El par de sondas que amplificaron el rDNA ITS1 (Vodkin 1992, Howe 1992, McLaughlin 1992) consistió de KIN2118. para: 5' CGCCGAAAGTTCACC y KIN106. reversa: 5' GCGTTCAAAGATTGGGCAAT (50ul de cada uno, 20uM). La mezcla se realizo en hielo, se añadió dos gotas de aceite mineral (Sigma) a cada tubo y se sometió al siguiente programa de amplificación en el termociclador: 94°C-2'; 94°C-1'; 58°C-1'; 72°C-1'; se repitió desde el paso 2 por 15 veces; 94°C-1'; 54°C-1'; 72°C-1'; se repitió 25 veces desde el paso 6; 94°C-1'; 54°C-2'; 72°C-5'.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y COLORACIÓN: 12ul de cada muestra amplificada fue analizada en gel de agarosa al 1,5 % en TBE como tampón, se corrió a 90 voltios por 1 hora en cámara de electroforesis horizontal

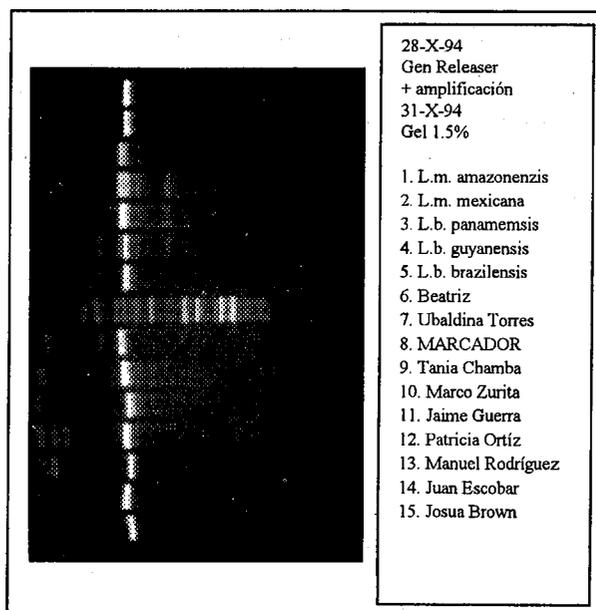


Figura 1. Amplificación de las cepas de referencia, junto con las cepas aisladas para el estudio. Muestra el producto 470PB mediante el uso de las sondas KIN1 y KIN2.

(Bio-rad), los productos de DNA fueron visualizados coloreando el gel con bromuro de etidid (1µg/µL) durante 20 minutos, seguido por 3 lavados con agua corriente por 15 minutos cada uno. Como marcador de DNA se utilizó el VI (Boehringer Mannheim), el cual tiene las siguientes bandas, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298-298, 234-234-220, 154-154, el tamaño de los segmentos está dado en pb.

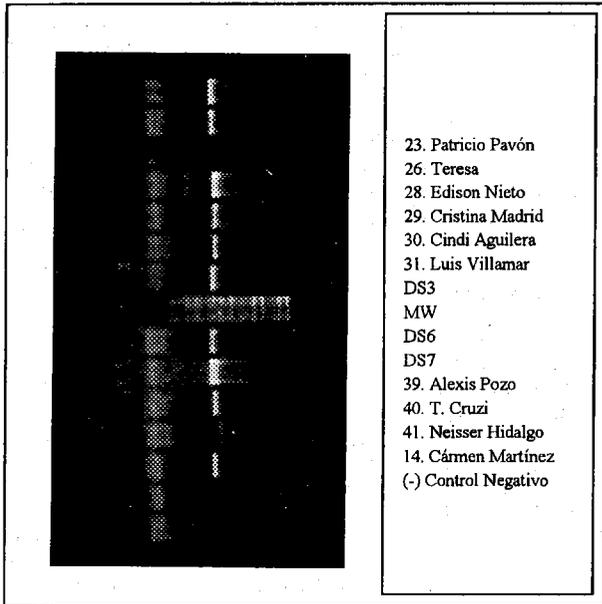


Figura 2. Amplificación del producto de 470pb de las diferentes especies de *Leishmania* y del producto de 520 correspondiente a *T. cruzi*, mediante el uso de la sonda KIN1 y KIN2.

Resultados

Las sondas utilizadas para la amplificación de la secuencia ITS1 de las diferentes cepas de *Leishmania*, tanto las de referencia como las aisladas de pacientes, presentaron un segmento de 470pb (Figura 1), mientras que con *T. cruzi* uno de 520pb (Figura 2). Esto indica que la región ITS1 en *Leishmania* difiere de su equivalente en *T. cruzi* por el número de pb.

Discusión

En este estudio ninguna especie de *Leishmania* presentó bandas similares a la cepa de *T. cruzi* analizada, que se traduce en un patrón de migración en el gel, claramente diferenciable entre estos dos géneros. Los hallazgos de McLaughlin y cols (1993), se reafirman con los resultados de este estudio en el que utilizamos las mismas sondas KIN1 y KIN2, que reconocen y amplifican todas las especies de *leishmania* utilizadas tanto del subgénero *Leishmania* como *Viannia*. Los resultados confirman a esta prueba como óptima en la detección de *leishmania* en cultivos. La sonda ensayada en este estudio se perfila en el futuro de mucha utilidad en la práctica epidemiológica ya que puede diferenciar claramente entre *Leishmania sp* y *T. cruzi* (diferencia que se repite en todos los ensayos realizados) parásitos que con regularidad están presentes en forma simultánea en las áreas en donde interesa estudiar y controlar estos agentes patóge-

nos, es conocido que con las técnicas serológicas que utilizan antígenos crudos, sea de *Leishmania* o de *T. cruzi*, es difícil evaluar estas patologías por separado, esto debido a la frecuente reacción cruzada entre estos dos géneros. Por otro lado, esta sonda debería ser aplicada en la detección de *Leishmania* en el intestino de *Lutzomyia*, su vector, pero con la precaución de evaluar la misma previamente en *Crithidia*,

otro *Tripanozomatidae* que también parasita a este insecto y que no tiene acción patogénica en el hombre, pero que al examen microscópico del intestino del vector no hay forma de diferenciarlo con *Leishmania*. En forma adicional, es mandatorio plantearse para el futuro, la utilización de sondas más específicas como la MP3H y MP1L descritas por López y cols, que amplifican una secuencia de kinetoplasto de 70 pares de bases específica de *Leishmania* del subgénero *Viannia* (trabajo en preparación), frente a las limitaciones existentes respecto a las pruebas de diagnóstico tradicionales, por su escasa sensibilidad. De esta forma, es inminente considerar la implementación del PCR como técnica de utilidad diaria en los centros diagnósticos de mediana y gran complejidad, así, en el caso de la leishmaniasis, es básica para realizar un diagnóstico más rápido, de mayor sensibilidad y especificidad, facilita la detección del parásito en vectores y reservorios, permite seguir la evolución de enfermos en tratamiento y además, como se mencionó anteriormente, utilizando sondas más específicas,^{14,31} en el futuro se podrá, a más de identificar *Leishmania*, tipificarla a partir de la misma muestra tomada para el diagnóstico, evitando en lo posible una probable selección por competición (cuando son infecciones mixtas) por la necesidad de un gran número de parásitos y el ahorro en el costo y el tiempo requerido por otras técnicas de tipificación. Finalmente, los justificativos presentados y el panorama de la salud en el país y el mundo, permiten considerar que en la actualidad se ha dado un importante avance en el desarrollo de técnicas de biología molecular, las mismas que ofrecen posibilidades de mayor efectividad en la detección de microorganismos y por consiguiente estas son herramientas adecuadas para el diagnóstico clínico, estudios epidemiológicos y entomológicos de la mayoría de la patología infecciosa.

Agradecimiento

Este estudio se realizó con la ayuda económica parcial del proyecto AID.ESR 5180058.

Bibliografía

1. Armijos RX, Weigel MM: Leishmaniasis. En: Panorama Epidemiológico del Ecuador. Ministerio de Salud Pública Quito, 1996.
2. Mimori T, Grimaldi G Jr, Kreutzer RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, Hashiguchi Y: Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 40: 154-158.
3. Armijos RX, Chico ME, Cruz ME, Guderian RH, Kreutzer RD, Berman JD, Grogl M: Human coetaneous leishmaniasis in Ecuador: identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg*, 1990; 42: 424-428.
4. Armijos RX, Thomas-Soccol V, Lanotte G, Racines J, Pratlong F,

- Rioux J A: Analyze chimiotaxonomique de vingt-deux slouches de Leishmania isolees au nor-ouest de Lequateur. *Parasite*, 1995; 2: 302-305.
5. León LA: Formas clínicas de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Pren Med Arg*, 1975; 62: 73.
 6. Chico ME, Guderian RG, Cooper PJ, Armijos RX, Grogl M: Evaluation of direct immunofluorescent antibodies (DIFMA) Test using *Leishmania* genus-specific monoclonal antibody in the routine diagnostic of coetaneous leishmaniasis. *Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical*, 1995; 2: 99-103.
 7. Amunarriz M: Salud y Enfermedad Patología Tropical en la Región Amazónica. Napo, Ecuador: CICAME, 1982; 73-78.
 8. Diaz-Galarza F: Lecciones de Medicina Tropical. Universidad de Guayaquil, Ecuador, 1985; 189-218.
 9. Manson-Bahr PC: Diagnosis. In the *Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Ed. Peters, W & Killick-Kendrick R, 1987; 2: 703-729.
 10. Hashiguchi Y, Gomez EA: A brief review of leishmaniasis in Ecuador. En: Hashiguchi Y: *Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador*. Kochi, Japan Kyowa Printing Co. Res Rep Ser, 1987; 5-32.
 11. Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D: A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 41: 687-725.
 12. Wirt DF, McMahon-Pratt D: Rapid identification of leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1982; 79: 6999-7003.
 13. Arana M, Evans D, Zolessi A, Llanos A, Arévalo J: Biochemical characterization of *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* and *Leishmania* (Vianna) *peruviana* by isoenzymes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990; 90: 526-529.
 14. Arévalo J, Inga R, Lopez M: PCR Detection of *Leishmania braziliensis*. In: Persing DH, Penover FC, Smith TF, White TJ: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington, American Society of Microbiology, 1993; 456-461.
 15. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF: Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*, 1990; 71: 267-275.
 16. López M, Inga R, Cueva N, Alvarez E, Arevalo J: PCR: A tool for diagnosis of American tegumentary Leishmaniasis in a health post of rural endemic areas. *Archs Inst Pasteur Tunis*, 1993; 70(3-4): 499-504.
 17. De Bruijn M, Labrada L, Smyth A, Santrich D, 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. *Trop Med Parasitol*, 1993; 44: 201-207.
 18. Meredith S, Zijlstra E, Schoone G, Kroon C, Van Eys G, Schaeffer K, El-Hassan A, Lawyer P: Development and application of the Polymerase Chain Reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Archs Inst Pasteur Tunis*, 1993; 70(3-4): 419-431.
 19. Eresh S, McCallum S, Barker D: Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, 1994; 109: 423-433.
 20. Rodriguez N, Guzmán B, Rodas A, Takiff H, Bloom B, Convit J: Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994; 32: 2246-2252.
 21. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary CH, Toga B, Quilici M: Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994; 32: 746-749.
 22. Bhattacharyya R, Singh R, Hazra T, Majumder H: Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *FEMS Microbiology Letters*, 1993; 114: 99-104.
 23. Maarten H, de Bruijn, Barker D: Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropical*, 1992; 52: 45-58.
 24. Uliana S, Nelson K, Beverley S, Camargo E, Floeter-Winter L: Discrimination Amongst *Leishmania* by Polymerase Chain Reaction and Hybridization with Small Subunit Ribosomal DNA Derived Oligonucleotides. *J Euk Microbiol*, 1994; 41(4): 324-330.
 25. Fernandes O, Murthy V, Kurath U, Degraeve W, Campbell D: Mini-Exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994; 66: 261-271.
 26. Barker D: DNA. Diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, 1987; 3(6): 177-184.
 27. Barker D: Molecular approaches to DNA diagnosis *Parasitology*, 1989; 99: 125-146.
 28. Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U: Use of Molecular Probes and PCR for Detection and Typing of *Leishmania* Mini Review. *Mem inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 1994; 89(3): 463-469.
 29. McLaughlin G, Howe D, Biggs D, Smith A, Ludwinski P, et al: Amplification of rDNA loci to detect and type *Neisseria meningitidis* and other eubacteria. *Molecular and Cellular Probes*, 1993; 7: 7-17.
 30. Howe D, Vodkin M, Novak R, Shope R, MacLaughlin G: Use of polymerase chain reaction(PCR) for the sensitive detection of St. Louis encephalitis viral RNA. *Journal of Virological Methods*, 1992; 36: 101-110.
 31. Vodkin M, Howe D, Visvesvara G, McLaughlin G: Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *Lancet*, 1992; 337: 1568-1569.
 32. López M, Inga R, Cangalaya M, Echeverria J, Llanos Cuentas A, Orrego C, Arévalo J: Diagnosis of leishmania using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*, 1993; 49(3): 348-356.