

Raúl H. Lucero¹
Bettina L. Brusés¹
Sandra V. Sobrado²
Enrique A. Szelag²
Juan R. Rosa²

¹Área de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Provincia de Chaco- Argentina.
²Área Entomología del Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Provincia de Chaco- Argentina

Correspondencia:
Raúl Horacio Lucero
Instituto de Medicina Regional (UNNE)
Av. Las Heras 727. 3500 Resistencia. Chaco. Argentina
E-mail: rhlucero@bib.unne.edu.ar

ORIGINAL

DetECCIÓN DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN HAMSTER DORADO (*Mesocricetus auratus*) EXPERIMENTALMENTE INFECTADO

Resumen

El diagnóstico inmunológico y parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria (LT) y visceral (LV) continúa siendo un desafío ya que una limitante es la demostración etiológica mediante extendidos coloreados, histopatología, cultivos, inoculación en animales de laboratorio, xenodiagnósticos. El procedimiento de PCR incrementa la sensibilidad del diagnóstico microscópico directo considerándola actualmente una herramienta muy valorable en la identificación y caracterización de las diferentes especies de *Leishmania*.

En el presente trabajo se evalúan dos métodos de extracción de ADN en diferentes tejidos de hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectado con *Leishmania (Viannia) braziliensis* con material de un enfermo con LT con confirmación parasitológica. Los ADN obtenidos fueron sometidos a una técnica de PCR específica para *Le. braziliensis*. Se consideró positiva a toda muestra que evidenciara un amplicón de 126 pb en electroferograma de agarosa al 2%. Se realizaron otros métodos como el xenodiagnóstico y técnicas microscópicas directas para comparar la sensibilidad con la PCR.

Todas las muestras del roedor infectado evidenciaron el amplicón correspondiente a *Le. braziliensis*.

En este trabajo se demuestra que el detergente CTAB es adecuado para obtener una ADN óptimo para una amplificación específica y que PCR es el método más sensible ensayado.

Palabras clave: *Leishmania braziliensis*. PCR. ADN. Hamster dorado (*Mesocricetus auratus*).

Summary

The etiologic diagnostic of Tegumentary Leishmaniasis (TL) and Visceral Leishmaniasis (VL) is performed by microscopic examination of stained smears of skin lesions, by histopathology, by culture, inoculation in animals or by xenodiagnostic. PCR procedure is currently considered as one promisory diagnostic tool due to its sensitivity, being usually used in identification and characterization of *Leishmania* genus.

In this work two DNA extraction methods using different golden hamster's (*Mesocricetus auratus*) tissues experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* from a patient with parasitologic confirmation of TL are evaluated. DNA obtained were put through specific *L. braziliensis* PCR, considering positive every sample showing an amplicon of 126 pb in the electroferogram of agarose 2%.

PCR sensitivity was compared with xenodiagnostic and direct microscopic examination. All infected mice's samples showed the correspondig amplicon to *L. braziliensis*, demonstrating that CTAB use is adequated to obtain a top quality DNA and that, in these conditions, PCR is the highest sensitivity method.

Key words: *Leishmania braziliensis*, PCR, DNA, golden hamster (*Mesocricetus auratus*).

Introducción

El género *Leishmania* (Trypanosomatidae: Kinetoplastida), es un hemoflagelado responsable de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) y Leishmaniasis Visceral (LV) distribuidas en 88 países constituyendo un problema para la salud pública en algunos¹.

La importante diversidad fenotípica de *Leishmania* ha ocasionado una compleja taxonomía con más de 20 especies descritas², la mayoría en América Latina. Dada la complejidad epidemiológica de algunas de sus regiones, con una distribución muy heterogénea de parásitos, los ciclos de transmisión pueden superponerse y coexistir varias especies³. Además, la intensa migración humana así como el turismo, pueden llevar a la dispersión de la enfermedad más allá de su límite geográfico y ecológico tradicional⁴, justificando la necesidad de tipificar las especies existentes.

Diferentes formas clínicas pueden presentarse en estrecha relación con la especie de *Leishmania* involucrada y la respuesta del huésped que resulta del equilibrio entre la inmunidad celular y humoral⁵.

La confirmación parasitológica directa es importante para diferenciar la leishmaniasis de otras entidades clínicas.

El diagnóstico definitivo de leishmaniasis se fundamenta en la demostración del agente etiológico en las diversas muestras según las formas clínicas de presentación de la enfermedad como ser frotis obtenidos de lesiones dérmicas (LT) y de punción medular/esplénica principalmente (LV). Los métodos convencionales (extendidos, histopatología, cultivos, inoculación en animales de laboratorio y xenodiagnóstico) presentan diferentes grados de sensibilidad, debiendo realizarse la combinación de varios de ellos para la certeza del resultado⁶.

La técnica de PCR resultó ser el segundo método más sensible (71,4%) después de la microscopía directa de frotis de lesiones, para demostrar la presencia de *Leishmania*. A pesar de ser un método altamente sensible y específico, ya que nos permite identificar directamente la especie del parásito, la muestra requiere extremos cuidados de transporte, alma-

cenamiento y procesamiento evitando así la desnaturalización del ADN del parásito, lo que puede derivar en resultados falsos negativos⁷⁻⁹.

En el presente trabajo se comparan los resultados de dos métodos de extracción de ADN en diferentes tejidos de hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectado con *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) a partir de un enfermo con LT. Los ADN obtenidos fueron sometidos a una PCR específica para *L. braziliensis* para constatar la presencia de ADN del protozoo.

Materiales y Métodos

Estudio en hamster

Xenodiagnóstico. Se utilizaron 70 hembras de *Lutzomyia sallesi* y *Lu. neivai* de ocho días de edad, provenientes de la colonia del Instituto de Medicina Regional (IMR). Se expusieron durante 60 minutos a la lesión tegumentaria del miembro posterior de un hamster anestesiado intramuscularmente con Thipental sódico (Pentotal[®]) 1g/20ml diluido en agua destilada a razón de 0.7-0.8ml/animal¹⁰.

Los flebotominos se mantuvieron en el insectario hasta su disección a partir del séptimo día de exposición.

Muestra de tejido: Posterior a la realización del xenodiagnóstico, el hamster se sacrificó por inhalación de vapores de Ether Sulfúrico en cámara mortífera. Las muestras de tejidos se colectaron individualmente en condiciones asépticas con instrumental quirúrgico estéril conservándose en solución buffer PBS en tubos Eppendorf.

Se seleccionaron las lesiones de piel de miembro posterior y hocico (sitios primarios de inoculación). Asimismo se ablacionó hígado, bazo, ileon, colon, ambas cadenas ganglionares paraaílicas y se tomó muestra de sangre anticoagulada con EDTA.

Como control negativo se estudiaron simultáneamente muestras de sangre y tejido de un hamster no infectado, procesados con la metodología descrita y utilizando los mismos lotes de reactivos para todos los procedimientos.

Extracción de ADN

Se compararon los métodos DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) y Hexadecyl trimethyl Ammonium bromide (CTAB).

DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN)

El tejido fue seccionado en porciones pequeñas utilizando bisturí estéril en gabinete de flujo laminar, recogiendo el material en buffer PBS. Cada muestra fue procesada según las normas establecidas por el fabricante, con la modificación de que el tiempo total de incubación en solución de proteinasa K fue de 5 horas a 56°C¹¹.

Extracción de ADN mediante el método de CTAB (Hexadecyl trimethyl Ammonium bromide)¹²

El procesamiento del tejido recibido, al igual que en el método anterior, se realizó en flujo laminar seccionando en pequeñas piezas mediante bisturí estéril (disgregación mecánica).

El material se incubó a 60°C durante siete horas en solución de homogeneización (2% (p/v) de CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,2% (p/v) β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 7.5). Posteriormente, se procedió a la extracción de proteínas con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Luego de la centrifugación, la solución quedó dividida en tres fases: la superior o acuosa, que contiene los ácidos nucleicos en solución, la intermedia o interfase con las proteínas; y la inferior donde se concentran los lípidos. La fase superior se transvasó a otro tubo Eppendorf. Se precipitó con un volumen de alcohol isopropílico. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y se agregó etanol 70%. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el ADN obtenido en agua destilada estéril.

PCR- *Leishmania braziliensis*:

Los oligonucleótidos usados para llevar a cabo la reacción de amplificación derivan de la secuencia de ADN

de un gen espaciador no transcrito (Nº de acceso a GenBank M75133)¹³.

La secuencia de primers fue:

- LB1: 5´-GCAGCACAGGGAAAG-3´
- LB2: 5´ ATGGAGAGAGGCACTAGC-3´

La mezcla de reacción consistió de: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM de cada DNTPs, 1µM de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa (Fermentas).

La amplificación fue llevada a cabo en Termociclador MyCycler (BioRad) según los siguientes ciclos: 5 min. 94°, 1min.60°, 1min.72°, 1min. 94 (x10 veces los 3 últimos ciclos), 1min.60°, 1min.72°, 1min.93° (x25 veces los 3 últimos ciclos), 1min.60°, 5min.72°. Se consideró positiva toda muestra que presentara la banda específica de 126 pb.

El control negativo de extracción consiste en una muestra de agua procesada en idénticas condiciones que las muestras de sangre y tejido y sirve para testear la contaminación en los reactivos utilizados en la etapa de extracción de ADN.

Todas las muestras se procesaron por duplicado y por operarios diferentes. En todos los casos las bandas obtenidas por electroforesis en Gel de agarosa al 2% y teñidas con Bromuro de Etidio fueron documentadas e interpretadas mediante un Digitalizador de imágenes UVI Bronze.

Resultados

Estudio en hamster

Xenodiagnóstico: Del total de 70 hembras de *Lu. sallesi* y *Lu. neivai* expuestas a la infección experimental sobre el hamster anestesiado, se alimentaron 22 (31,4%). De éstas 15 (21,4%) sobrevivieron hasta el séptimo día posterior a la exposición para iniciar la disección en procura de flagelados intestinales. En 1 (1,4%) hembra de *Lu. sallesi* se observaron promastigotes en acúmulos (rosetas) en formas libres debido a la rotura de la pared intestinal al momento de la disección.

Diagnóstico parasitológico: La infección parasitaria se confirmó en extendidos coloreados con solución de Giemsa

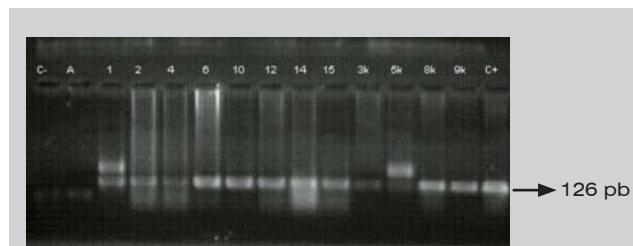


Figura 1. Electroforesis en Gel de Agarosa al 2%

C-: control negativo de PCR; A: control negativo de extracción de ADN; C+: control positivo de PCR de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (provisto por el Laboratorio de Biología Molecular de la Sede de Investigación Universitaria-SIU, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia)

(1:1) e histopatología (hematoxilina/eosina). Se observaron amastigotes en piel del miembro posterior y hocico (sitios primarios de inoculación experimental) y en bazo (esplenomegalia).

Extracción de ADN

Todas las muestras procesadas mediante los dos métodos de extracción evidenciaron el amplicón correspondiente a *L. braziliensis* de 126 pb (las muestras 1 y 5k con bandas inespecíficas extras) (Figura 1).

- Muestra 1: tejido ganglionar extraído con método CTAB.
- Muestra 2: tejido de intestino delgado extraído con método CTAB.
- Muestra 3k: tejido de intestino delgado extraído con kit comercial.
- Muestra 4: tejido de intestino grueso extraído con método CTAB.
- Muestra 5k: tejido de intestino grueso extraído con kit comercial.
- Muestra 6: tejido de hocico extraído con CTAB y remitido a Brasil.
- Muestra 8k: tejido de hocico extraído con kit comercial y remitido a Brasil.
- Muestra 9k: tejido de hocico extraído con kit comercial.
- Muestra 10: tejido de hocico extraído con CTAB.
- Muestra 12: tejido de Bazo extraído con CTAB.
- Muestra 14: tejido de Hígado extraído con CTAB.
- Muestra 15: sangre extraída con CTAB.
- Muestras 7, 11 y 13 fueron congeladas sin extraer como control interlaboratorial.

El control negativo no demostró amplificación, mientras que el control positivo de PCR evidenció la banda específica de 126pb.

Discusión

Leishmania (*Viannia*) *braziliensis*, al ser aislada y mantenida en hamster dorado se caracteriza por la formación de lesiones tegumentarias. La aparición espontánea de metástasis alejadas al sitio primario de inoculación no es característica¹⁴, sin embargo es frecuente su observación descrita a partir de los trabajos de Brasil, 1976.

En el presente trabajo se comprobó el diagnóstico parasitológico de la infección en muestras de tejido dérmico del miembro posterior y hocico (sitio primario de inoculación) y metástasis esplénica mediante histopatología coloreados con hematoxilina/eosina¹⁵.

Sin embargo no se observaron amastigotes en el resto de los tejidos analizados (hígado, ileon, colon y cadenas ganglionares parailíacas).

El xenodiagnóstico evidenció baja sensibilidad (1,4%) al menos con la especie de flebotomino utilizado (*Lu. sallesi*) siendo necesario reproducirlo en forma seriada con otras especies regionales. Asimismo no fue posible la confirmación del subgé-

nero de *Leishmania* según la clasificación propuesta por Lainson & Shaw (1987) por no hallar los promastigotes en el interior del tracto intestinal¹⁶.

Los métodos de amplificación por PCR dependen entre otros factores de la calidad y cantidad de ADN extraído que será empleado como molde para generar nuevas hebras nucleotídicas, por lo que el éxito de este método está relacionado al método de purificación de ácidos nucleicos elegido.

El detergente CTAB tiene la propiedad de formar complejos con polisacáridos y proteínas y su unión a las proteínas residuales y grupos carbohidratos presentes en los parásitos lisados permite obtener un ADN libre de contaminantes que potencialmente pueden interferir en los mecanismos de amplificación posteriores.

Otra ventaja indudable es que este protocolo no incluye Fenol en los reactivos utilizados, evitando el uso de productos tóxicos y corrosivos cuya manipulación requiere el uso de campanas de extracción, disminuyendo asimismo el tiempo de procesamiento¹².

En este trabajo se demuestra que este protocolo de extracción es adecuado para obtener un ADN óptimo para el proceso de PCR específica, incluso en muestras procesadas por ambos métodos, demostró tener mayor rendimiento que el método comercial.

En lo que respecta a las muestras procesadas, las muestras de hocico fueron las que dieron productos de PCR más limpios por ambos métodos y con una mayor intensidad de la banda específica. Para los demás tejidos el método que evidenció mejores resultados fue el de CTAB.

La amplificación por PCR es una herramienta diagnóstica sumamente útil, ya que la confirmación histológica no siempre es posible, como fue demostrado en nuestro estudio donde se positivizó la PCR incluso en tejidos donde no se constató la presencia de amastigotes por microscopía.

El uso de esta reacción como un test diagnóstico de leishmaniasis para áreas endémicas ya fue reportado por otros autores donde se describe la indudable ventaja de que no sólo incrementa la sensibilidad del laboratorio diagnóstico, sino que además puede demostrar la

presencia de *L. braziliensis* en sangre de pacientes sin síntomas clínicos al momento del estudio¹³ o incluso en pacientes curados o en diferentes estadios de la Inmunoterapia¹⁷.

Agradecimientos

Al Dr. Reginaldo P. Brazil del laboratorio de Biología Molecular y fisiología de insectos del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro- BRASIL quien dirigió el control interlaboratorial de PCR.

Al Dr. Omar Triana Chávez del Laboratorio de Biología Molecular de la Sede de Investigación Universitaria-SIU, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, quien aportó los ADN control de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Bibliografía

1. World Health Organization, *Intensified control of neglected diseases: report of an international workshop, Berlin, 10- 12 December 2003*. World Health Organization, Geneva, 2004. (WHO/CDS/CPE/CEE/2004.5).
2. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters W; Kendrick R, eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press 1987;1-120.
3. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreuzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:312-7.
4. Victorio K, Bañuls J, De Doncker S, Cabrera L, Alvarez E, Arévalo J, et al. Direct Identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with american tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:80-7.
5. Alvar-Ezquerria J, Moretti ML, Corachán-Cuyás M. Infecciones causadas por protozoos flagelados hemotísulares. En: Farreras P, Rozman C, eds. *Medicina Interna*. 14ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt 2000;2749-57.
6. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res* 2008;103:1159-62.
7. Welgle KA, De Davalos M, Heredia P, et al. Diagnosis of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: A Comparison of Seven Methods. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36(3):489-96.
8. Reed SG. "Diagnosis of Leishmaniasis". *Clinics in Dermatology* 1996;14:471-78.
9. Furtado T. Criterios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 1980;55:81-6.
10. Andrade Filho JD, Bianchi Galato EA, Falcão. Biology of the First Generation of Laboratory Colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004;99(6):597-601.
11. DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006. www.qiagen.com.
12. Escalante M, Montilla M, Santiago Nicholls R, Del Potrillo P, Puerta CJ. Extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante tratamiento con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio. *Biom* 1997; 17:120-5.
13. Lugo de Yarbu A, Premoli-De-Percoco G, Valera M. Localized cutaneous leishmaniasis using Polymerase Chain Reaction: a venezuelan family report. *Parasitol* 1997;21(3/4):71-5.
14. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the new world: taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 1972;28:44-8.
15. Cuba CA; Marsden P; Barreto AC, et al. Diagnóstico Parasitológico e Inmunológico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Bol Of Sanit Panam* 1980;89:195-206.
16. Lainson R & Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Pimenta P, Secundino N, Nieves Blanco E. *Interação vetor-hospedeiro* (5)275-283. *Flebotominos do Brasil*. Rangel E & Lainson R. Ed FIOCRUZ pp368).
17. Guevara P, Rojas E, González N, Scorza JV, Añez N, Valera M, Ramírez JL. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1(4):385-9.