

Implementación de un PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar especies de *Leishmania* en una zona endémica a Leishmaniasis Cutánea Atípica en Honduras

Leslye Torres Avila, Gabriela Rodríguez, Wilfredo Sosa Ochoa¹

José Jafet Ortiz²

David Martínez Colindres³

RESUMEN

Introducción. La leishmaniasis cutánea atípica es una variante no ulcerada de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (L.) infantum*. En Honduras está presente en los departamentos de La Paz, Francisco Morazán, Choluteca, El Paraíso y Valle. El espectro clínico incluye lesiones cutáneas menores a 10 mm y benignas hasta afecciones viscerales que pueden comprometer la vida del paciente. El objetivo del presente estudio fue implementar una técnica de biología molecular para la detección y tipificación de *Leishmania* spp en individuos con lesiones sospechosas a leishmaniasis cutánea atípica. **Metodología.** Para la implementación se usó ADN de cepas de referencia: *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* con un producto esperado de 1200 pares de base (pb). Se utilizaron las enzimas de restricción Hae III, BclI, RsaI y MluI para la identificación de especies del género *Leishmania*. Se seleccionaron muestras clínicas (frotis en lámina) de los departamentos de Francisco Morazán y Valle. El estudio fue sometido al comité de ética de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas. **Resultados:** Se analizaron 39 muestras (27 de Francisco Morazán y 12 Valle). Se identificó a *Leishmania (L.) infantum* en el 100% de las muestras (29/29). **Conclusiones/Recomendaciones:** Se demostró que el polimorfismo del gen hsp70 junto con la digestión enzimática (RFLP) proporciona buenos resultados en la amplificación de parásitos a partir de muestras en lámina agilizando así el proceso de identificación molecular. Siendo una herramienta útil para tipificar especies de *Leishmania*

¹ Grupo de Investigación en Parasitología. Instituto de Investigaciones Microbiológicas, UNAH

² Departamento de Bioanálisis, Escuela de Microbiología, UNAH

³ Escuela de Biología, UNAH

spp en zonas donde prevalece más de una especie del parásito. Se recomienda realizar una vigilancia epidemiológica constante, para lograr determinar el comportamiento geográfico de las especies de *Leishmania*.

Palabras Clave: *Leishmania infantum chagasi*, *Hsp70*, *PCR-RFLP*.

ABSTRACT

Introduction. The atypical cutaneous leishmaniasis is a non-ulcerated variant of the cutaneous leishmaniasis produced by *Leishmania* (L.) *infantum*. In Honduras, it is present in the departments of La Paz, Francisco Morazán, Choluteca, El Paraíso, and Valle. The clinical spectrum includes from cutaneous lesions smaller than 10 mm and benign, thru visceral affections tan can compromise the patient's life. The objective of the present study was to implement the molecular biology technique for the detection and typing of the *Leishmania* spp in individuals with suspected atypical cutaneous leishmaniasis lesions. **Methodology.** For the implementation, reference strain DNA was used: *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, *Leishmania* (L.) *mexicana*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *Leishmania* (V.) *braziliensis* with an expected product of 1200 base pairs (pb). Hae III, BclI, RsaI, and MluI restriction enzymes were used for the *Leishmania* gender specie identification. Film smear clinical samples were selected from departments of Francisco Morazán and Valle. The study was submitted to the Ethics Committee of the Master of Infectious and Zoonotic Diseases. **Results:** 39 samples were analyzed (27 from Francisco Morazán and 12 from Valle). *Leishmania* (L.) *infantum* was identified in the 100% of the samples (29/29). **Conclusions/Recommendations:** It was demonstrated that the polymorphism of the *hsp70* gene, together with the enzymatic digestion (RFLP) provides good results in the parasite amplification from film smear samples, expediting the molecular identification, being a very useful tool for the *Leishmania* spp specie typication in areas where this parasite is more prevalent. It is recommended to make a constant epidemiological surveillance to determine the *Leishmania* specie geographical behavior.

Keys words: *Leishmania infantum chagasi*, *Hsp70*, *PCR-RFLP*.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por diferentes especies de parásitos intracelulares del género *Leishmania* spp. y transmitidos por vectores hematófagos de la familia Psychodidae. (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo, Ruiz-Esmenjaud, & Arenas, 2017) Endémica en grandes áreas del trópico, subtropico y el mediterráneo, que abarca más de 98 países. Hay ~350 millones de personas en riesgo y ~12 millones de casos, con una incidencia anual estimada en todo el mundo de 0,7 -1,2 millones de casos de leishmaniasis cutánea (CL) y 0,2 – 0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral (LV) (Alvar et al., 2012). La diversidad fenotípica expresada por el género *Leishmania* spp. ha originado una compleja clasificación taxonómica identificándose hasta el momento 39 especies descritas en la literatura (Maurício, 2018)

En Honduras se han descrito cuatro formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea ulcerada, leishmaniasis cutánea no ulcerada, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, distribuidas en 12 de los 18 departamentos; siendo la forma cutánea atípica la más frecuente y de distribución principalmente en la zona sur del país. (Matute et al., 2009; Sosa-Ochoa et al., 2015).

El diagnóstico definitivo de leishmaniasis estará orientado a la observación de amastigotes del parásito, para ello se ha utilizado por excelencia la coloración con Giemsa de raspados, aspirados o biopsias de las lesiones de pacientes sospechosos. (Cannova, Brito, & Simons, 2016). Sin embargo esta técnica es poco sensible (aproximadamente 50-70%), ya que su éxito dependerá de varios factores: Calidad de la coloración, intensidad parasitaria, experiencia del personal del laboratorio en la observación de los estadios y además se limita a la identificación del género de *Leishmania* spp. y no es capaz de identificar las diferentes especies asociadas con las manifestaciones clínicas. (Ana M Montalvo, Fraga, Monzote, García, & Fonseca, 2012)

Debido a la dificultad que implica la diferenciación de las especies basándose solo en características morfológicas, la identificación genética del parásito para asociarla a la entidad clínica cada vez es más frecuente y necesaria. Hasta el momento se han desarrollado una serie de ensayos moleculares para ayudar a desentrañar la compleja diversidad genética del parásito. (Ana Margarita Montalvo et al., 2006)

En este trabajo de investigación se propusieron como objetivos la optimización e implementación de una técnica molecular (PCR-RFLP) basada en la amplificación de

regiones génicas polimórficas del parásito en especial aquellos genes que codifican para las proteínas de choque térmico HSP70 para la identificación de especies del género *Leishmania* spp. Así como su aplicación en la identificación del parásito en muestras de pacientes de diferentes zonas de Honduras.

METODOLOGÍA

Enfoque del estudio: Estudio cuantitativo; caracterizando las especies de *Leishmania* spp en distintas muestras de lesiones procedentes de zonas endémicas.

Tipo de estudio: Se realizó un estudio descriptivo -transversal realizando una búsqueda activa de pacientes con lesiones características a leishmaniasis cutánea atípica en los municipios de Amapala, Reítoca y Alubaren.

Población y muestra: Se realizó un muestreo por conveniencia. Se colectaron 29 muestras de pacientes con lesiones cutáneas compatibles a leishmaniasis cutánea atípica. Para tales efectos, se definió a la lesión compatible con leishmaniasis cutánea no ulcerada, como una pápula, placa o nódulo asintomático, no ulcerativa, eritematosa o de color de la piel, con o sin presencia de un halo hipopigmentado. A todos los pacientes se les tomó una muestra de la lesión la cual fue fijada en una lámina y posteriormente coloreada para la observación microscópica. Todos los pacientes fueron diagnosticados con leishmaniasis por personal de la Secretaría de Salud de Honduras.

Implementación de PCR-RFLP's HSP70

La extracción de DNA de las láminas positivas se realizó con 100 μ L de Chelex al 5% (Bio-Rad Lab Inc., Hercules, California, USA). Para implementar la técnica de biología molecular que amplifica una región de 1,3 Kpb del gen que codifica la proteína Hsp70 se sintetizaron las siguientes secuencias de primers (IDT-DNA, USA). Hsp70 sense (5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3') y Hsp 70 antisense (5' CCGCCCAT-GCTCTGGTACATC 3'). Como controles positivos se utilizó ADN de (*Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, *Leishmania* (*L.*) *mexicana*, *Leishmania* (*V.*) *panamensis*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*). La mezcla de la PCR se realizó con un volumen final de 50 μ l que contenía: 25 μ l de Master Mix (PROMEGA), 0.6 μ mol/L de cada cebador, 15 uL de agua libre de nucleasas, 1 ul de MgCl₂ y 5 μ L de ADN. Con un volumen final de 50uL. La reacción de amplificación para el gen Hsp70 se realizó en un termociclador

Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler con el programa siguiente: Desnaturalización inicial 94 °C durante 5 min, seguida de: desnaturalización (94 °C, 30 s), hibridación (61 °C, 1 min) y extensión (72 °C, 3 min), seguido de una extensión final a 72 °C por 10 min, por 37 ciclos. Los resultados fueron verificados mediante electroforesis de agarosa al 2% a 100 V por 1 hora.

La restricción de los productos de PCR fueron realizados usando la enzima Hae III (Promega), agregando a la reacción 5 ul de ADN amplificado, incubándose a 37°C por 3 horas, a continuación, se realizó una corrida electroforética de todo el producto digerido en gel de agarosa de alta resolución al 2 % a 100 Voltios por 1 hora, con el fin de identificar los perfiles de bandas correspondientes a cada especie estudiada. Según el patrón obtenido con la enzima Hae III se usaron las siguientes enzimas: BclI: si el patrón obtenido con Hae III coincide con el grupo de *L. panamensis* y *L. guyanensis*; RsaI: Se usa si el patrón obtenido con Hae III coincide con *L. braziliensis* de *L. peruviana*.

Análisis de datos

Se utilizó estadística descriptiva por medio del software InfoStat/Profesional (versión 1.1), para determinar la frecuencia absoluta de las especies encontradas en las muestras colectadas.

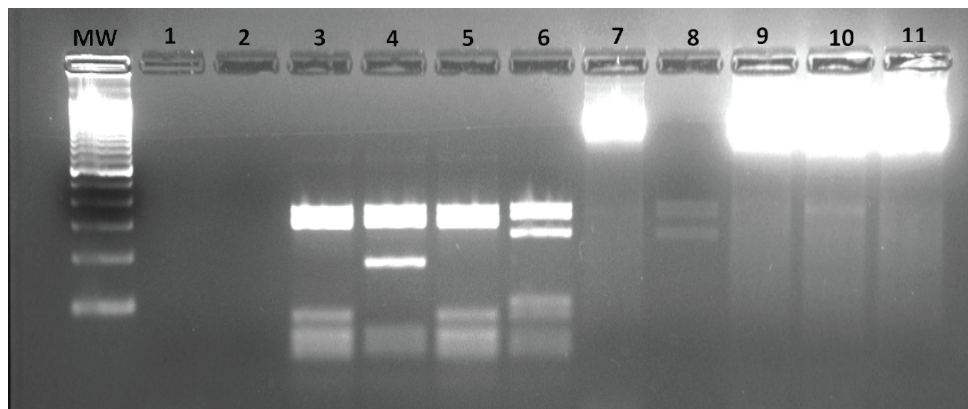
RESULTADOS

Para la implementación del PCR-RFLP Hsp70 se utilizó ADN de cepas de referencia de *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) infantum chagasi* y *Leishmania (L.) mexicana*.

Los diferentes patrones de bandas obtenidas, tras la restricción del producto amplificado y digerido con 1,5 U de enzima HaIII (figura 1), posibilitan la diferenciación entre *Leishmania (L.) infantum chagasi* y otras especies del género *Leishmania*.

Se colectaron muestras en lámina a 29 pacientes procedentes de los municipios de Reitoca (10), Alubaren (2), Amapala (17) con lesiones compatibles a leishmaniasis cutánea atípica, las cuales se confirmaron por microscopia observado amastigotes de *Leishmania* spp. En el cuadro No. 1 se muestran los resultados obtenidos, donde se logró tipificar a *Leishmania (L.) infantum chagasi* en el 100% de las muestras.

Figura 1. PCR-RFLP. Obtención de patrones de amplificación posterior a la digestión con la enzima Hall. MW. Marcador 100 pb, Pozo 1 control negativo, pozo 2. Control negativo, pozo 3. *L. (V.) panamensis*, pozo 4. *L. braziliensis* (V.), pozo 5. *L. (V.) guyanensis*, pozo 6. *L. (L.) infantum*, pozo 8. *L. (L.) mexicana*. Pozo 7, 9-11 Controles sin digerir



Cuadro 1. Resultados obtenidos por medio de PCR-RFLP Hsp70 en muestras de pacientes procedentes de una zona endémica a leishmaniasis cutánea atípica.

Procedencia	Frecuencia	Porcentaje	Tipificación Hsp70
Alubaren	2	6.90 %	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
Amapala	17	58.62 %	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
Reitoca	10	34.48 %	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
Total	29	100.00 %	

DISCUSIÓN

En la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) que involucra todas las variantes clínicas y un espectro amplio de especies de *Leishmania*, la tipificación temprana y segura puede ser muy importante para el monitoreo de la evolución clínica, un tratamiento oportuno y evaluar el riesgo epidemiológico. Lo antes mencionado se apoya en el hecho que varias especies de *Leishmania* pueden ocasionar la misma forma clínica (Rotureau et al., 2006) y diferentes especies pueden necesitar distintos tratamientos (Croft, Yardley, & Kendrick, 2002)

El presente estudio, basado en la implementación del PCR-RPLP del gen de choque térmico de 70 Kd, logró mostrar la capacidad de discriminar entre distintas especies a través de la digestión enzimática donde una sola sustitución de nucleótidos puede añadir o quitar sitios específicos para que esta enzima actué, estos resultados coinciden con los reportados por Esquerri y Montalvo respectivamente (Esquerri, 2001) (A. M. Montalvo et al., 2010).

El protocolo propuesto por García et al, determinó un 100% de sensibilidad diagnóstica especialmente con especies del Sub-género *Leishmania Viannia*, contrario a los resultados observados en el presente estudio, el cual mostró mejores resultados de sensibilidad para especies del sub-género *Leishmania* específicamente *L. infantum chagasi*.

La mayoría de los ensayos para diagnóstico están basados en secuencias genómicas repetitivas o secuencias del kDNA, pero se limitan a la detección a nivel de géneros y complejos del parásito. La identificación a nivel de especies es una importante ventaja; en el caso de leishmaniasis cutánea ya que diferentes especies pueden causar lesiones cutáneas parecidas y requerir distintos esquemas de tratamiento, por otro lado la información es epidemiológicamente relevante para identificar el foco de transmisión activa y el diseño de estrategias de control, en cuanto a la leishmaniasis atípica en el que hasta el momento solo se reconoce a *L. infantum chagasi*, su caracterización es epidemiológicamente relevante como un punto de partida a los focos de transmisión de la leishmaniasis visceral, en este caso la técnica es útil ya que detecta con una primera digestión en este caso con la enzima HaeIII para discriminar entre otras especies. Con respecto a la sensibilidad de la PCR-Hsp70 que fue del 100% y teniendo en cuenta que la talla esperada era bastante alta de 1,280 pb lo que resulta difícil alcanzar una mejor eficiencia.

Se determinó la concentración de ADN, pero no se encontró ninguna diferencia entre las concentraciones altas y bajas para que se produjera una amplificación. Debido a que no es un ADN puro, se propone realizar diluciones para corroborar que el ADN de menor concentración tenga mejores resultados, disminuyendo así los componentes que puedan interferir en la actividad de la enzima de síntesis de ADN; así como realizar un método de purificación posterior a la extracción del ADN. Con la observación microscópica se determinó que un grado de parasitemia de 1+ (1-10 parásitos/100 campos) son necesarios para realizar un método molecular (datos no mostrados) el método de extracción de ADN chelex al 5% fué el cual dio mejores resultados.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio se logró realizar la identificación y tipificación de *Leishmania infantum* chagasi a partir de muestras de raspados cutáneos de pacientes con *Leishmaniasis* cutánea atípica sin necesidad de aislar y cultivar el parásito, la cual es una ventaja porque permite un diagnóstico más específico del agente etiológico involucrado en la forma clínica de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., . . . den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 7(5), e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Cannova, D., Brito, E., & Simons, M. I. (2016). Evaluación de técnicas de coloraciones para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea. *Salus*, 20(2), 24-29.
- Croft, S. L., Yardley, V., & Kendrick, H. (2002). Drug sensitivity of Leishmania species: some unresolved problems. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1, S127-129.
- Matute, N., Espinoza, C., Alger, J., Padgett, D., López, E., & Zúniga, C. (2009). Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con Leishmaniasis atendidos en el Hospital Escuela. *Rev Med Hondur*, 77(1).
- Maurício, I. L. (2018). Leishmania Taxonomy. In F. Bruschi & L. Gradoni (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* (pp. 15-30). Cham: Springer International Publishing.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Aylema Romero, J., Monzote, L., Montano, I., & Dujardin, J. C. (2006). PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar Leishmania de la región neotropical. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58, 0-0.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64, 108-131.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Parasitology*, 137(8), 1159-1168. doi: 10.1017/S0031182010000089
- Rotureau, B., Ravel, C., Couppie, P., Pratlong, F., Nacher, M., Dedet, J. P., & Carne, B. (2006). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and

polymorphism by application of the assay to clinical samples. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Microbiol*, 44(2), 459-467. doi: 10.1128/JC-M.44.2.459-467.2006

Sosa-Ochoa, W., Cortedano, X. M., Argüello, S., Zuniga, C., Henríquez, J., Mejía, R., . . . Quan, D. (2015). Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*(14), 115-128.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6.