

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO SELADIS**



**EXTRACCIÓN DE DNA DE *Leishmania sp.* PARA EL DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIASIS CUTANEA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR), A PARTIR DE FROTIS DE LESIÓN TEÑIDOS CON GIEMSA**

POSTULANTE:

UNIV. DIEGO BONIFAZ PEREZ

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ - BOLIVIA
2011

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS**



**EXTRACCIÓN DE DNA DE *Leishmania sp.* PARA EL DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIASIS CUTÁNEA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR), A PARTIR DE FROTIS DE LESIÓN TEÑIDOS CON GIEMSA**

POSTULANTE:

UNIV. DIEGO BONIFAZ PEREZ

ASESOR:

DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA
2011

DEDICATORIA

A mis padres, **Víctor y Elvira**. Por todo el apoyo y el esfuerzo que han realizado para que yo llegara hasta aquí; por hacerme sentir que siempre puedo contar con ustedes, por cuidarme y quererme tanto. Gracias de corazón.

A mis hermanos **Vania, Ricardo y Efraín**. Por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado, por su constante preocupación y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo de la realización de mi tesis han sido muchas las personas a las que he ido conociendo, y que de una forma u otra han contribuido a que hoy este trabajo sea una realidad. Me gustaría recordar y agradecer a todos ellas su colaboración y los buenos momentos pasados.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mi asesor de tesis, el Dr. Luis Fernando Sosa, por la dirección y el apoyo científico que me ha brindado y por toda su ayuda a lo largo de este tiempo. Gracias por darme ánimos cuando las cosas no salían y por su constante dedicación.

A las Dras. Maria Luz Soto y Maria Esther Chuquimia, quiero agradecerles por el constante asesoramiento técnico y consejos prácticos, por su apoyo moral y confianza que han hecho posible el desarrollo del presente trabajo.

A las Dras. Susana Revollo y Norma Plata. Gracias por su colaboración en el desarrollo práctico de este trabajo, y por la ayuda en la provisión de materiales y reactivos.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio y a aquellos, que aunque ya no están, en algún momento compartimos en el ambiente de trabajo: Dra. Viviana Pelaez, Dra. Elizabeth Alcala, Dra. Ana Cruz, Jose Luis Choquehuanca, Lorena Riveros, de todos he aprendido algo.

Para terminar, debo expresar el agradecimiento a los amigos, compañeros y a todo el personal del Instituto SELADIS por aportar su granito de arena a este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 2 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 4. OBJETIVOS | 4 |
| 4.1. Objetivo general..... | 4 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 4 |
| 5. ANTECEDENTES | 5 |
| 6. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 6.1. <i>Leishmania</i> y Leishmaniasis..... | 6 |
| 6.2. Ciclo de vida e interacción <i>Leishmania</i> – célula hospedadora..... | 8 |
| 6.3. Organización genómica..... | 10 |
| 6.4. Leishmaniasis Cutánea Americana..... | 11 |
| 6.5. Epidemiología..... | 14 |
| 6.6. Respuesta Inmune..... | 15 |
| 6.7. Diagnóstico de Laboratorio..... | 18 |
| 6.7.1. Frotis de lesión teñido con giemsa..... | 19 |
| 6.7.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)..... | 20 |
| 6.7.2.1. Extracción de DNA..... | 20 |
| 6.7.2.2. Cuantificación de DNA..... | 21 |
| 6.7.2.3. Fundamentos de PCR..... | 21 |
| 6.7.2.4. Etapas de la PCR..... | 22 |
| 6.7.2.5. Condiciones de la reacción..... | 24 |
| 6.7.2.6. Componentes..... | 24 |
| 7. DISEÑO METODOLÓGICO | 26 |
| 7.1. Descripción del Ámbito de Estudio..... | 26 |
| 7.2. Descripción del Ambiente de Investigación..... | 26 |
| 7.3. Metodología..... | 27 |
| 7.4. Procedimientos..... | 30 |
| 7.4.1. Población..... | 30 |
| 7.4.2. Cultivo de parásitos de <i>Leishmania braziliensis</i> | 31 |
| 7.4.3. Preparación de las muestras de <i>L. braziliensis</i> para la determinación de la sensibilidad de cada protocolo de extracción de DNA..... | 31 |
| 7.4.3.1. Suspensiones de parásitos en medio de cultivo Schneider..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 7.4.3.2. Suspensiones de parásitos con sangre anticoagulada | 32 |
| 7.4.4. Preparación de frotis a partir de lesión | 32 |
| 7.4.5. Tinción de frotis con colorante Giemsa..... | 32 |
| 7.4.6. Examen parasitológico directo de los frotis de lesión..... | 33 |
| 7.4.7. Obtención de DNA de <i>Leishmania</i> a partir de los frotis teñidos..... | 33 |
| 7.4.7.1. Protocolo A: Utilizando solución de lisis con Proteinasa K..... | 33 |
| 7.4.7.2. Protocolo B: Utilizando el Kit de extracción de DNA Promega Wizard Genomic (PROMEGA, USA)..... | 34 |
| 7.4.7.3. Protocolo C: Utilizando calentamiento (Boiling)..... | 35 |
| 7.4.8. Cuantificación y determinación de la pureza de DNA por Espectrofotometría..... | 36 |
| 7.4.9. PCR para <i>Leishmania</i> | 37 |
| 7.4.10. Electroforesis en geles de agarosa..... | 39 |
| 7.4.11. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los métodos estandarizados..... | 40 |
| 8. RESULTADOS | 41 |
| 8.1. Determinación de la concentración inicial de amastigotes de <i>Leishmania</i> en las muestras provenientes de frotis de lesión..... | 41 |
| 8.2. Determinación de la sensibilidad analítica de los métodos de extracción de DNA con muestras preparadas de <i>Leishmania</i> en medio de cultivo Schneider | 42 |
| 8.3. Estandarización de tres métodos de extracción de DNA a partir de frotis preparados de suspensiones de <i>L. braziliensis</i> con sangre anticoagulada, previamente teñidos con Giemsa..... | 45 |
| 8.4. Realización de PCR para <i>Leishmania sp.</i> utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre..... | 50 |
| 8.5. Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con el método de extracción con Solución de lisis con Proteinasa K..... | 53 |
| 8.6. Comparación de los resultados de PCR de frotis de lesión para <i>Leishmania sp.</i> con los exámenes laboratoriales de rutina para el diagnóstico de leishmaniasis..... | 56 |
| 8.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad del método de extracción de DNA (Solución de lisis con Proteinasa K)..... | 59 |
| 9. DISCUSIÓN | 60 |
| 9.1. Extracción de DNA a partir de frotis preparados de suspensiones de <i>L.</i> <i>braziliensis</i> con sangre anticoagulada | 60 |
| 9.2. Rendimiento de la extracción de DNA de <i>Leishmania sp.</i> a partir de frotis de lesión..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 9.3. Comparación de los resultados de PCR de frotis de lesión para <i>Leishmania sp.</i> con los exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis | 65 |
| 10. CONCLUSIONES | 68 |
| 11. RECOMENDACIONES | 70 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 71 |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Leishmania</i> | 9 |
| Figura 2. Características generales de la interacción entre neutrófilos y parásitos de <i>Leishmania</i> | 16 |
| Figura 3. Relación dinámica en el espectro clínico de leishmaniasis humana: Entre inmunidad mediada por célula (CMI), Hipersensibilidad retardada (DTH), y carga parasitaria..... | 18 |
| Figura 4. Tiempos y temperaturas por ciclo de PCR..... | 23 |
| Figura 5. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de las diluciones de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> con medio de cultivo Schneider..... | 44 |
| Figura 6. Comparación de los valores de pureza del DNA extraído a partir de diferentes concentraciones de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> con medio de cultivo Schneider..... | 44 |
| Figura 7. Comparación de la concentración de DNA de los frotis preparadas con cultivos de <i>Leishmania</i> y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA..... | 49 |
| Figura 8. Comparación de la pureza de las muestras de DNA de los frotis preparadas con cultivos de <i>Leishmania</i> y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA..... | 50 |
| Figura 9. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el método Boiling de los frotis de <i>Leishmania</i> con sangre..... | 52 |
| Figura 10. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Kit Comercial Wizard (Promega) de los frotis de <i>Leishmania</i> con sangre..... | 52 |
| Figura 11. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK) de los frotis de <i>Leishmania</i> con sangre..... | 53 |
| Figura 12. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K..... | 55 |
| Figura 13. Comparación de los índices de pureza del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K..... | 55 |
| Figura 14. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo A..... | 56 |
| Figura 15. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo B..... | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Especies y subespecies de <i>Leishmania</i> | 7 |
| Tabla 2. Diagnóstico diferencial de Leishmaniasis..... | 13 |
| Tabla 3. Concentraciones y volúmenes de los reactivos usados en PCR..... | 38 |
| Tabla 4. Recuento de amastigotes detectados por examinación microscópica de los frotis de lesión teñidos con Giemsa..... | 41 |
| Tabla 5. Comparación de las absorbancias, índices de pureza y concentraciones de las muestras de DNA obtenidas a partir de diferentes diluciones de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> en medio de cultivo Schneider..... | 43 |
| Tabla 6. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 200 parásitos / 10 uL sangre..... | 46 |
| Tabla 7. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 20 parásitos / 10 uL..... | 46 |
| Tabla 8. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 10 parásitos / 10 uL..... | 47 |
| Tabla 9. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 5 parásitos / 10 uL..... | 47 |
| Tabla 10. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 2 parásitos / 10 uL..... | 48 |
| Tabla 11. Resultados de la PCR obtenidos con material genético a partir de las diluciones de parásitos con sangre..... | 51 |
| Tabla 12. Resultados de concentración y pureza de DNA obtenido de frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K..... | 54 |
| Tabla 13. Comparación de los resultados de PCR provenientes de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis..... | 58 |

ABREVIATURAS

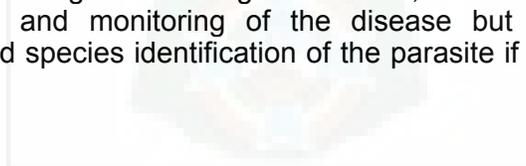
| | |
|--------------------|--|
| A | Adenina |
| Abs | Absorbância |
| ACD | Ácido cítrico – Citrato - Dextrosa |
| C | Citocina |
| C3 | Proteína sérica del Complemento 3 |
| CMI | Respuesta Inmune mediada por células |
| CR1 | Receptor del complemento 1 |
| CR3 | Receptor del complemento 3 |
| ddH ₂ O | Água bidestilada |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleíco |
| DNAk | DNA kinetoplastidae |
| dNTP | Desoxinucleótido trifosfato |
| DO | Densidad Óptica |
| DTH | Hipersensibilidad retardada |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| fg | femtogramos |
| G | Guanina |
| gp63 | Glucoproteína 63 |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferón |
| Kb | Kilobases |
| LCL | Leishmaniasis cutánea localizada |
| LPG | Lipofosfoglucono |
| mAmp | miliamperios |
| MCL | Leishmaniasis mucocutánea |
| MCP-1 | Proteína quimiotáctica del macrófago 1 |
| Mg ⁺⁺ | iones de magnesio |
| MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| min | Minutos |
| MIP- α | Proteína inflamatoria del macrófago alfa |
| MIP- β | Proteína inflamatoria del macrófago beta |
| mM | milimolar |
| nm | nanometros |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la Polimerasa |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SLPK | Solución de lisis con Proteinasa K |
| T | Timina |
| TBE | Buffer: Tris base – ácido bórico – EDTA |
| TE | Buffer: Tris base – EDTA |
| Th | Células T colaboradoras |
| Tm | Temperatura de fusión |
| TNF | Factor de Necrosis Tumoral |
| ug | microgramos |
| uL | Microlitros |
| uM | micromolar |

RESUMEN

En Leishmaniasis la patogenicidad, abordaje terapéutico y los posibles métodos de control son determinados en gran parte, por la especie de *Leishmania* infectante; por lo tanto, es importante que en cualquier caso de leishmaniasis, este sea identificado. Continuamente se van proponiendo nuevas estrategias o métodos en el diagnóstico de la leishmaniasis, para lo cual surge como propuesta efectiva la combinación de técnicas, como el Examen parasitológico directo con el diagnóstico molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En el presente trabajo se propone estandarizar y validar un procedimiento de extracción de DNA de *Leishmania* a partir de frotis teñidos con Giemsa como una nueva alternativa para mejorar el diagnóstico y seguimiento molecular de esta patología. Los procedimientos utilizados para alcanzar los objetivos incluyeron varios pasos: El cultivo celular de parásitos de *L. braziliensis*, la preparación de frotis a partir de suspensiones de parásitos con sangre anticoagulada a los cuales posteriormente se realizó la tinción con colorante Giemsa y la extracción de material genético mediante tres protocolos de extracción de DNA a evaluar: Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK), Boiling y Kit Comercial Wizard Genomic; toma de muestra de frotis de lesión de pacientes, realizando luego la tinción con colorante Giemsa y el Examen parasitológico directo; extracción de DNA a partir de los frotis de lesión teñidos mediante el método de SLPK, el material genético obtenido fue utilizado para la PCR cuyos resultados mediante un test diagnóstico fueron comparados con los exámenes de laboratorio de rutina utilizados para el diagnóstico de leishmaniasis (PCR convencional y Examen parasitológico directo); los datos obtenidos fueron utilizados para los cálculos estadísticos para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y grado de correlación por el método de SLPK frente al Examen parasitológico directo y PCR convencional. En la etapa de estandarización de los tres protocolos de extracción de DNA, el método de SLPK presentó el mejor rendimiento de los tres métodos evaluados con concentraciones de DNA en el rango de 19,77 a 38,18 ng/uL y con índices de pureza de DNA en el rango de 1,037 a 1,046. Con los resultados de la PCR, el método SLPK presenta una sensibilidad diagnóstica de 93%, especificidad de 45%, valor predictivo positivo de 68% y valor predictivo negativo de 84%. El grado de correlación según el índice de Kappa del método SLPK frente al frotis fue Moderada de 0,403 ($p < 0,005$) y entre los dos métodos de PCR la correlación fue Buena con índice de Kappa de 0,700 ($p < 0,005$). Estos resultados demuestran que el método SLPK es una buena alternativa al diagnóstico de leishmaniasis, ya que puede detectar la presencia del parásito en pacientes con carga parasitaria baja en los que el Examen parasitológico directo daría resultados falsos negativos, y que sería una herramienta útil no solo para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad sino también para determinar polimorfismos genéticos e identificación de especies del parásito si se utilizan frotis históricos de pacientes.

SUMMARY

In Leishmaniasis the pathogenicity, therapeutic boarding and possible control methods are largely determined by the infecting *Leishmania* species; therefore, it is important that in any case of leishmaniasis this has been identified. Continually, new strategies or methods for the diagnosis of leishmaniasis are being proposed, as a combination of techniques such as direct parasitological examination and molecular diagnostics by Polymerase Chain Reaction (PCR). Presently work intends to standardize and validate a procedure for Leishmania DNA extraction from Giemsa-stained smears as a new alternative to improve the molecular diagnosis and monitoring of this pathology. The procedures used to achieve the aims included several steps: Cell culture of *L. braziliensis* parasites, preparation of smears from suspensions of anticoagulated blood mixed with parasites to which subsequently were stained with Giemsa dye and extraction of genetic material using three DNA extraction protocols to be assessed: lysis solution with proteinase K (SLPK) Boiling and the Commercial Kit Wizard Genomic, swab sampling of patient lesion, then by staining with Giemsa stain and direct parasitological examination, extraction of DNA from lesion smears stained by the method of SLPK, the genetic material obtained was used for the PCR test , then the obtained results were compared with routine laboratory tests used for diagnosis of leishmaniasis (conventional PCR and direct parasitological examination), the data obtained were used for statistical analysis for determining Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and correlation degree off SLPK method with the direct parasitological examination and conventional PCR results. In the standardization step of the three DNA extraction protocols, SLPK method showed the best performance of the three methods evaluated with DNA concentrations in the range of 19.77 to 38.18 ng / uL and DNA purity rates in the range of 1.037 to 1.046. The PCR results shows that the SLPK method has a diagnostic sensitivity of 93%, specificity of 45%, positive predictive value of 68% and negative predictive value of 84%. The correlation degree by the Kappa index shows that between SLPK method and smear is moderate 0.403 ($p < 0.005$) and between the two PCR, methods the correlation is good with Kappa index of 0.700 ($p < 0.005$). These results demonstrate that the SLPK method is a good alternative for the diagnostic of leishmaniasis, because it can detect the presence of the parasite in patients with low parasite load in the indirect parasitological examination that could give false negative results, and would be a useful tool not only for the diagnosis and monitoring of the disease but also to determine genetic polymorphisms and species identification of the parasite if historical smears of patients are used.



1. INTRODUCCION

En nuestro país la leishmaniasis constituye un problema de salud pública creciente, el incremento de casos en el área rural y periurbana implica para el sistema público de salud una importante inversión económica en lo referido a planes de contención, información, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las poblaciones en riesgo y afectadas respectivamente.

En Leishmaniasis la patogenicidad, abordaje terapéutico y los posibles métodos de control son determinados en gran parte, por la especie de *Leishmania* infectante (Cuba, 2002). Es por lo tanto, importante que en cualquier caso de leishmaniasis, el agente etiológico sea identificado; para lo cual, en varios países las investigaciones, van destinadas al desarrollo de métodos que asocien diagnóstico e identificación del agente patológico de manera simultánea. Siendo los métodos moleculares, los que mejor se ajustan a estas características.

Como resultado de lo antes mencionado, continuamente se van proponiendo nuevas líneas de desarrollo en este campo; para lo cual surge como propuesta efectiva la combinación de técnicas, como el frotis de lesión con el aislamiento de material genético y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En este proceso, se utiliza como fuente de material genético sangre venosa o frotis de lesión teñidos con Giemsa. En investigaciones previas se han usado frotis de cuatro años de antigüedad, si bien existía la posibilidad de que con el tiempo se produzca una degeneración del Ácido Desoxirribonucleíco (DNA) (Yokota y col., 1995; Motazedian y col., 2002); la calidad del DNA era lo suficientemente buena para realizar PCR.

En base a estos antecedentes y la necesidad para realizar un diagnóstico e identificación de las leishmaniasis, en el presente trabajo nos proponemos brindar una alternativa al diagnóstico molecular de leishmaniasis, estandarizando un método de extracción de DNA de *Leishmania sp.* a partir de los frotis de lesión previamente teñidos con Giemsa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea o mucocutánea se recurre al frotis de la lesión, el cual presenta una sensibilidad entre 33% y 90% (Zerpa y col., 2002), el clínico para tratar al paciente con leishmaniasis debe recurrir a su experiencia en el diagnóstico de esta patología.

Con el advenimiento de la técnicas moleculares, se ha incrementado la eficiencia de la pruebas de diagnóstico, pero aún se tropieza con el problema de tomar una buena muestra y obtener el material genético en las condiciones adecuadas (ausencia de contaminación e inhibidores) para realizar la PCR.

En base a estudios previos referidos a la obtención de material genético a partir de frotis teñidos, en el presente trabajo nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿A partir de frotis de lesión previamente teñidos con Giemsa, se podrá obtener un DNA que permita que el diagnóstico por PCR de leishmaniasis tenga sensibilidad y especificidad diagnóstica similar a la PCR realizada por los métodos de extracción convencionales?

3. JUSTIFICACIÓN

Los problemas culturales, migratorios (colonización) y socio-económicos por los cuales nuestro país a estado atravesando, ha favorecido el crecimiento en la morbi - mortalidad de ciertos tipos de enfermedades infecciosas, entre ellas las Leishmaniasis.

Por el predominio de la leishmaniasis en áreas tropicales y sub tropicales del país, la colonización de estas áreas por agricultores y madereros o el crecimiento de las comunidades rurales, se han incrementado los casos de leishmaniasis. Actualmente, el área endémica de la leishmaniasis en Bolivia se extiende cada vez más, haciendo complicada la cobertura y control por parte de centros de diagnóstico y tratamiento de estas patologías.

Con el antecedente de que el frotis de lesión presenta una sensibilidad entre 33 % y 90 % (Zerpa y col., 2002) en los casos de leishmaniasis, de que el cultivo celular es caro y poco accesible para fines de diagnóstico y que para garantizar un buen resultado por PCR, el paciente debe preferentemente trasladarse a la ciudad. En el presente trabajo nos proponemos estandarizar y validar un procedimiento de extracción de DNA de *Leishmania* a partir de frotis teñidos con Giemsa como una nueva alternativa para mejorar el diagnóstico molecular de esta patología.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un procedimiento de extracción de DNA de *Leishmania sp* para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración inicial de parásitos en las muestras de frotis provenientes de lesión.
- Determinar la sensibilidad analítica de los métodos de extracción de DNA con muestras de *Leishmania* cultivadas en medio Schneider.
- Estandarizar tres métodos de extracción de DNA a partir de frotis preparados de cultivo de *Leishmania* con sangre, previamente teñidos con Giemsa.
- Realizar PCR para *Leishmania sp.* utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre
- Determinar la concentración y pureza del DNA proveniente de muestras de frotis de lesión de pacientes, con el método de extracción estandarizado.
- Comparar los resultados de PCR de frotis de lesión obtenidos por el método de extracción DNA estandarizado, con los exámenes laboratoriales que se utilizan de manera rutinaria para el diagnóstico de leishmaniasis.
- Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de extracción de DNA estandarizado usando como Gold Standard el diagnóstico clínico basado a los resultados de frotis de lesión de los pacientes.

5. ANTECEDENTES

Los métodos clásicos para la detección de infección por *Leishmania* se basan en la examinación microscópica en frotis de lesión. Hace 15 años, se propuso una nueva técnica, en la cual la extracción y amplificación de DNA humano era a partir de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Yokota y col., 1995) obteniendo buenos resultados en sus experimentos; ya en el diagnóstico de las leishmaniasis cutánea (Motazedian y col., 2002; Al-Jawabreh y col., 2006; Volpini y col., 2006; Kazemi-Rad y col., 2008) diferentes investigadores trabajaron con frotis de lesión que tenían un tiempo mayor a cuatro años de guardado. Los resultados de sensibilidad para los PCR de frotis de lesión varían según el número de muestras: Al-Jawabreh el 2006 determinó un 87%; Volpini el 2006 un rango de 70% a 94%, y Kazemi-Rad el 2008 un 90%. Todos estos resultados favorecieron al diagnóstico – identificación del agente causal de esta patología por este método.

Posteriormente, se han ido desarrollando varias investigaciones, que implicaban no solamente al trabajo con *Leishmania* sino también con otros microorganismos como: *Mycobacterium leprae* presentando un 33% de sensibilidad (Kamble y col., 2010) y *Plasmodium* con un 73% de sensibilidad (Scopel y col., 2004). Los resultados de estos estudios varían según el protocolo de extracción de DNA utilizado.

La leishmaniasis afecta a hombres y mujeres de cualquier edad que viven y/o trabajan en áreas rurales sub tropicales y tropicales, donde la enfermedad puede ser mal diagnosticada por falta de conocimiento sobre la misma por el personal de salud o por falta de centros asistenciales con el equipamiento necesario para el diagnóstico laboratorial de la enfermedad.

En el Instituto SELADIS de la F.C.F.B. de la U.M.S.A. el diagnóstico molecular de Leishmaniasis por PCR fue implementado hace más de 10 años; pero a la fecha se sigue tropezando con el inconveniente de que cuando se hace trabajo de campo en las poblaciones endémicas para *Leishmania*, muchos de los PCR

resultan inhibidos por fallas en la toma y conservación de las muestras, ya sea por problemas en la preparación de los reactivos o contaminación de los mismos entre otros, lo cual representa un serio perjuicio al paciente quien debe esperar una nueva toma de muestra para que le den el resultado e inicie tratamiento para la enfermedad.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Leishmania y Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades muy dispares entre sí, producidas por protozoos pertenecientes al género *Leishmania*, descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright en un niño armenio (García, 2004), su clasificación taxonómica ha sido revisada recientemente (Moreira y col., 2004) y es la siguiente:

Phylum: *Euglenozoa* (Cavalier-Smith, 1981)

Clase: *Kinetoplastea* (Vickerman, 1976)

Subclase: *Metakinetoplastina* (Moreira, 2004)

Orden: *Trypanosomatida* (Kent, 1880; Hollande, 1952)

Género: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgénero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgénero: *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987)

Al menos existen 20 especies patógenas de *Leishmania* (tabla 1), las cuales varían según el tipo de leishmaniasis que producen. Hay dos formas clínicas básicas, cutánea y visceral; tiene como vector a mosquitos del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África; y *Lutzomyia* en América; el reservorio presenta una amplia variedad de vertebrados (perro doméstico, roedores,

marsupiales, equinos y mulas); el parasitismo se da en células del sistema reticuloendotelial del hospedador (sobre todo, macrófagos).

Tabla 1. Especies y subespecies de *Leishmania*

| Especie | Localidad |
|---|---|
| SUBGÉNERO LEISHMANIA (ROSS, 1903) | |
| Complejo <i>L. Donovanii</i> | |
| <i>L. donovani</i> (Laveran y Mesnil, 1903) | India, China, Bangladesh |
| <i>L. archibaldi</i> (Castellani y Chalmers, 1919) | Sudán, Etiopía |
| Complejo <i>L. Infantum</i> | |
| <i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908) | Centronorte de Asia, noroeste de China, Oriente Medio, noroeste de África |
| <i>L. chagasi</i> (Cunha y Chagas, 1937) | América central y del sur |
| Complejo <i>L. Tropica</i> | |
| <i>L. tropica</i> (Wright, 1903) | Áreas urbanas de Próximo Oriente e India |
| <i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte y Pratkling, 1986) | Túnez |
| <i>L. major</i> | África, Oriente Medio, norte de Asia |
| <i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari, Evans, 1986) | Arabia Saudí |
| <i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford, Bray, 1973) | Etiopía, Kenya |
| <i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu, Guan, 1973) | China, Mongolia |
| Complejo <i>L. Mexicana</i> | |
| <i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953) | México, Belice, Guatemala, sur de Estados Unidos, Bajo Amazonas y Brasil |
| <i>L. amazonensis</i> (Lainson and Shaw, 1972) | Venezuela |
| <i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980) | |
| SUBGÉNERO VIANNIA (LAINSON AND SHAW, 1977) | |
| Complejo <i>Leishmania braziliensis</i> | |
| <i>L. braziliensis</i> (Viannia, 1911) | Brasil |
| <i>L. peruviana</i> (Vélez, 1913) | Oeste de los Andes |
| Complejo <i>L. Guyanensis</i> | |
| <i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954) | Guayana Francesa, Guyana y Surinam |
| <i>L. panamensis</i> (Lainson and Shaw, 1972) | Panamá, Costa Rica |

Fuente: Pereira y Pérez, 2002

6.2. Ciclo de vida e interacción *Leishmania* – célula hospedadora

La forma promastigote es de vida extracelular, posee flagelo y es alargada, con una longitud de 15-20 μm incluyendo el flagelo. Por el contrario, el amastigote es de vida intracelular, carece de flagelo y tiene forma redondeada, midiendo de 2-5 μm (Folgueira, 2006).

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe (Sánchez y col., 2004). Dentro del tubo digestivo del vector, las características del promastigote van cambiando desde la fase de *nectomona*, sujeto a las microvellosidades del tubo digestivo, a la de *promastigote infectivo o metacíclico*, libre en hipofaringe, pasando por una fase intermedia de *haptomona*. Este proceso se conoce como metaciclogénesis y dura unos 10 días. Los promastigotes metacíclicos rellenan la faringe y probóscide del mosquito y permanecen allí hasta una nueva picadura, momento en el que serán inoculados a un nuevo huésped (García, 2004).

Cuando el vector infectado entra en contacto con un huésped le inyecta entre 10 y 100 promastigotes presentes en la proboscis y que penetran en la dermis, la entrada de estos promastigotes activa la cascada del complemento, lo que permite que la proteína sérica C3 del complemento se deposite en la superficie del parásito y se una a los receptores del complemento (CR1 o CR3) presentes en el macrófago. La unión de los promastigotes al macrófago puede realizarse también directamente, gracias a la existencia en la superficie del parásito de moléculas tales como el lipofosfoligucano (LPG) y una metaloproteína, la glucoproteína 63 (gp63) de 63 kDa (Folgueira, 2006); también se ha visto que la saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados (Hall,

1995), cuando los promastigotes de *Leishmania* son fagocitados por los macrófagos en la zona de la picadura.

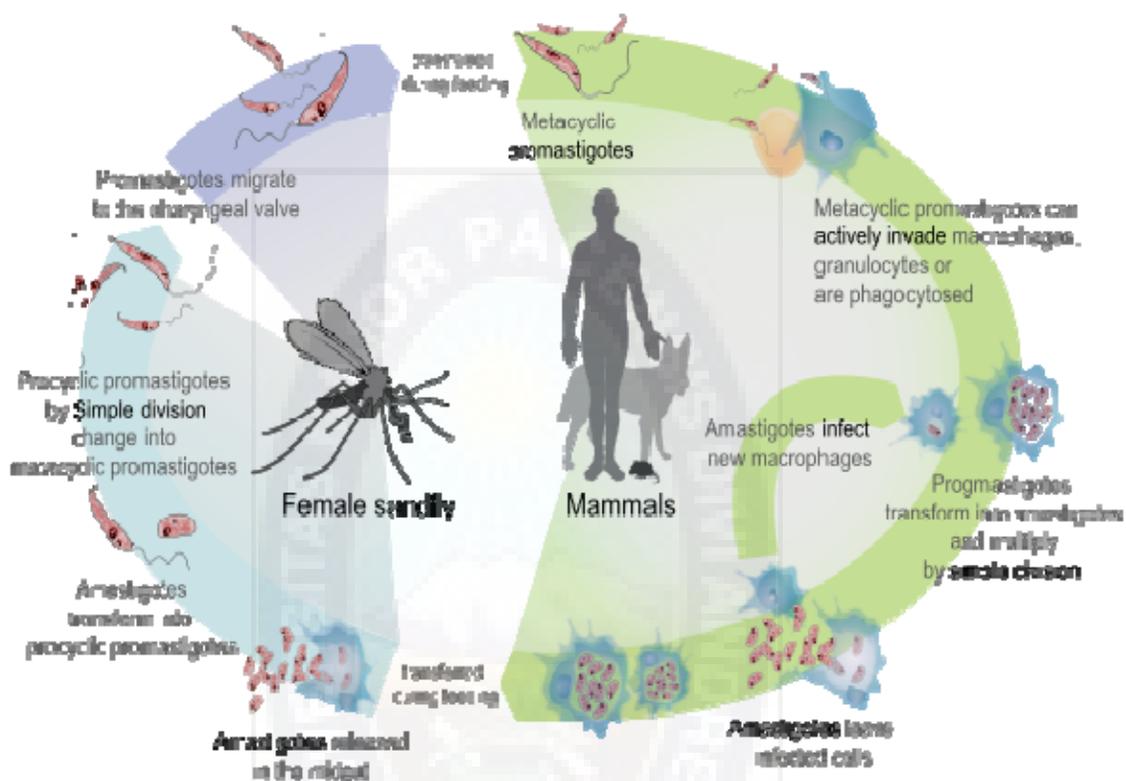


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Leishmania*. Fuente: Wikipedia, 2011

Una vez fijados los promastigotes al macrófago, son englobados en una vacuola parasitófora, que se unen a lisosomas que contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir la *Leishmania*; sin embargo esta se diferencia y se transforma en amastigote que resiste esta agresión (Ministerio de Salud de Perú, 2000), además la producción de derivados oxidativos, destinados a la destrucción de las leishmanias, queda inhibida por dos mecanismos: El LPG forma una barrera alrededor del parásito y es capaz de captar radicales libres de oxígeno, previniendo también la unión del fagosoma con los lisosomas (Siu y col., 1998). Por otra parte la gp63, dada su actividad proteolítica, degrada los enzimas lisosomales destinados a destruir a los amastigotes; dando lugar a la multiplicación dentro de estas vacuolas hasta que

los macrófagos infectados ya no puedan contener más amastigotes de *Leishmania* y la célula muere, liberando amastigotes que van a infectar otras células adyacentes produciendo lesión tisular (Folgueira, 2006). Cuando el mamífero infectado es picado de nuevo por un insecto vector, los macrófagos infectados pasan al intestino del insecto donde son destruidos, liberándose así los amastigotes que se diferencian en promastigotes procíclicos y continuando así con el ciclo de vida del protozoario.

6.3. Organización genómica

Los protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* poseen un DNA genómico localizado en dos compartimentos: a) en el núcleo como DNA cromosómico b) en la mitocondria o kinetoplasto (DNAk). El DNAk es rico en A+T (72-73%) a diferencia del DNA cromosómico, rico en G+C (>60%) (Morales, 2002).

En general, se acepta que *Leishmania* posee un genoma constituido por 20-36 cromosomas con un tamaño de 150 kilobases en los cromosomas de menor tamaño y de 4 megabases en los de mayor tamaño; aun no ha sido posible determinar con certeza el carácter diploide del genoma de *Leishmania*, pero se acepta que es funcionalmente asexual (Morales, 2002).

El DNA del kinetoplasto se caracteriza por formar una estructura altamente compleja que consta de círculos de diferente tamaño concatenados en cadenas entrelazadas, y que puede suponer entre el 10 y el 20% del contenido total de DNA del organismo. Los componentes de esta estructura se denominan maxicírculos y minicírculos (Zurita, 2003), estas estructuras se replican independientemente y su presencia es inusual en la naturaleza (Simpson, 1972).

Los maxicírculos son el homólogo funcional del DNA mitocondrial de otros eucariotas; poseen un tamaño que varía entre 20 y 40 Kb en las distintas

especies y están bastante conservados, en ellos se encuentran los genes que codifican los ARN ribosómicos mitocondriales y las proteínas que participan en los procesos energéticos que ocurren en la mitocondria, como la citocromooxidasa y NADH-deshidrogenasa entre otras. Los minicírculos tienen un tamaño que oscila entre 0,5 y 2,9 Kb, y su número varía entre 6.000 y 30.000. Presentan un alto grado de variabilidad de secuencia, alrededor del 80%, con pequeñas regiones conservadas. Los minicírculos codifican los RNA-guía necesarios para la edición de los RNA mitocondriales (*RNA-editing*), uno de los procesos que distinguen la expresión génica en los tripanosomátidos (Zurita, 2003).

6.4. Leishmaniasis Cutánea Americana

La Leishmaniasis cutánea americana es considerada como un conjunto de manifestaciones clínicas que siguen a la infección por protozoos del género *Leishmania*. *Leishmania (Viannia) braziliensis* es una de las especies más importantes y responsable de esta entidad; siendo considerada de alto riesgo para las poblaciones que habitan en áreas endémicas tropicales y subtropicales de los países en vías de desarrollo. La Leishmaniasis cutánea localizada es la presentación clínica más frecuente, caracterizada por la presencia en la piel de una o más lesiones ulceradas o costrosas, aspecto redondeado, poco profundas, de alrededor de 3 mm, bien delimitadas y no dolorosas; su presencia generalmente se da en zonas expuestas del cuerpo (cara y miembros inferiores principalmente) que evolucionan en un intervalo de 3 a 4 semanas luego de la picadura del vector (Bobbio, 2000). Pueden adquirir aspecto de furúnculo o simular una esporotricosis o tener un aspecto verrugoso similar a la cromomicosis, otras veces simula un tumor y se puede confundir con un carcinoma basocelular o espinocelular; a veces son úlceras extensas y el diagnóstico diferencial es con tuberculosis cutánea (Rondón y col., 2006).

Los principales determinantes para el grado de expresión de las manifestaciones clínicas y la cronicidad de las lesiones, son el tipo de *Leishmania* infectante, la localización de la lesión y la respuesta inmune del huésped. Por ejemplo las lesiones causadas por *Leishmania (Leishmania) mexicana* tienden a ser pequeñas y menos crónicas que aquellas causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*; en la leishmaniasis producida por *L.(V.) peruviana* se presenta principalmente formas pápulofooliculares y las llamadas “nodulares dérmicas”, a diferencia de las lesiones cutáneas producidas por la *L.(V.) braziliensis* donde predominan las formas ulcerosas francas. Se ha observado que un signo precoz en los casos de leishmaniasis cutánea la aparición de nódulos linfáticos satélites. El inicio de los síntomas linfáticos puede aparecer antes, simultáneamente o después de la ulceración de la piel, y en casos muy raros podría inclusive ser el único signo de infección (Ministerio de Salud de Perú, 2000).

La migración de los parásitos por vía linfática puede llegar a producir lesiones secundarias en la piel y ocasionalmente en mucosas de otras partes del cuerpo, la linfadenopatía regional algunas veces ocurre. La forma mucocutánea tiende a ocurrir 1 a 5 años después causada la leishmaniasis cutánea, los signos iniciales son eritema y ulceraciones de las fosas nasales, seguido por una inflamación destructiva que afecta la estructura nasal y en algunos casos la faringe y laringe; la inflamación puede perforar el septum nasal y causar severo desfiguramiento de la cara o bloqueo de faringe y laringe (Rovid, 2009).

En el área rural de nuestro país debido a la poca importancia que se da a las lesiones, el acceso a la medicina tradicional y la poca higiene tienden a que ocurra un proceso de sobre infección bacteriana que pueden cambiar las características típicas de la lesión, pudiendo imitar otras enfermedades dermatológicas especialmente de tipo micológico (esporotricosis, cromomicosis) (Rondón y col., 2006); siendo necesario un diagnóstico diferencial para descartar otras afecciones cutáneas y mucosas (Tabla 2).

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de Leishmaniasis

| Leishmaniasis cutánea | Leishmaniasis mucosa |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Infecciones de piel bacteriales | Síndrome de Behçet |
| Blastomicosis | Lupus eritematoso discoide |
| Ántrax cutáneo | Histoplasmosis |
| Eccema | Granuloma de línea central letal |
| Infecciones de piel fúngicas | Paracoccidioidomicosis |
| Lepra | Rhinoscleroma |
| <i>Mycobacterium marinum</i> | Sarcoidosis |
| Miasis | Sífilis |
| Sarcoidosis | Tuberculosis |
| Cáncer de piel | Granulomatosis de Wegener |
| Sporotricosis | |
| Sífilis | |
| Tuberculosis | |
| Lesiones verrugosas | |

Fuente: William y col., 2004

Las lesiones primarias empiezan a auto limitarse a medida que empieza a prevalecer la respuesta inmune del huésped, tienden a evolucionar y a cicatrizar espontáneamente al cabo de 6 meses a 3 años, lo que no significa que se haya curado la enfermedad pues los parásitos pueden quedar en estado de latencia y después de uno o varios años reactivarse, debido a traumas locales en la cicatriz (Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, 2007); o conducir a la forma mucocutánea de la enfermedad.

6.5. Epidemiología

En nuestro país las especies identificadas de *Leishmania* son *L. braziliensis*, *L. amazoniensis*, *L. chagasi*, *L. lainsoni* y *L. guyanensis*. Se encuentra distribuida geográficamente en zonas tropicales y subtropicales de áreas rurales, en los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija; presentando tasas de incidencia importantes, para el año 2006 se han reportado 3152 casos sospechosos de *Leishmaniasis* en 80 Municipios (1/4 del total de municipios). De donde el departamento de La Paz es el que notifica aproximadamente la mitad de casos reportados a nivel nacional; en la gestión 2006: 1.502 (48% del total de casos), seguido por el departamento del Beni con 889 casos (28%) y Pando 416 (13%) (Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, 2007).

Para la gestión 2008 la proporción de casos según género es la siguiente: (hombres: mujeres) La Paz 707:431; Pando 249:75 y Beni 371:130 siendo los departamentos con mayor incidencia de leishmaniasis. El departamento de La Paz se ha destacado por tener los más altos índices de Leishmaniasis mucocutánea (MCL) y Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), para el año 2007 se notificaron 3153 casos, de los cuales 1753 (56%) correspondieron al departamento de La Paz, siendo los casos presentes en varones de 1071 (Programa Nacional de Control de la Leishmaniasis, 2008).

En áreas endémicas el diagnóstico de leishmaniasis se basa prácticamente en la evaluación de los antecedentes epidemiológicos y las manifestaciones clínicas del paciente; el diagnóstico definitivo de leishmaniasis se fundamenta en la demostración del parásito en material obtenido y teñido de lesiones sospechosas para lo cual se utiliza el frotis de la lesión como método directo de confirmación (Gonzalez y Zerpa, 2004).

6.6. Respuesta Inmune

Tan pronto el parásito es inoculado se inicia un proceso inflamatorio local, con acumulación de células del sistema inmune innato (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos y células *natural killer*), estas células son atraídas al sitio inflamatorio en la piel a través de estímulos generados por *Leishmania* y células, como macrófagos, queratinocitos y células endoteliales, entre otras; esta inducción puede ser directa, cuando moléculas propias del parásito estimulan la llegada de neutrófilos, eosinófilos; o indirecta cuando el parásito estimula la producción de citocinas, como la interleucina 8 (IL-8), proteínas inflamatorias del macrófago α y β (MIP- α y β) y proteína quimiotáctica del macrófago-1(MCP-1) que a su vez, inducen migración de neutrófilos, células NK y monocitos (Bonilla, 2005).

Al encontrarse los neutrófilos con los promastigotes de *Leishmania* interactúan y el parásito es internalizado. Esta entrada al interior celular puede llevar a la activación de otras células, a la producción de citocinas, a una mayor viabilidad celular y a la supervivencia o la destrucción del parásito, según la influencia de diferentes factores (Figura 2). En esta interacción los parásitos *Leishmania* llegan a ser internalizados, sobreviviendo dentro de ellos sin poder multiplicarse ni diferenciarse como un “caballo de Troya” para entrar finalmente a su hospedero sin ser reconocido, estos polimorfonucleares infectados serían fagocitados por los macrófagos, donde *Leishmania* se diferenciaría y proliferaría (van Zandbergen y col., 2004).

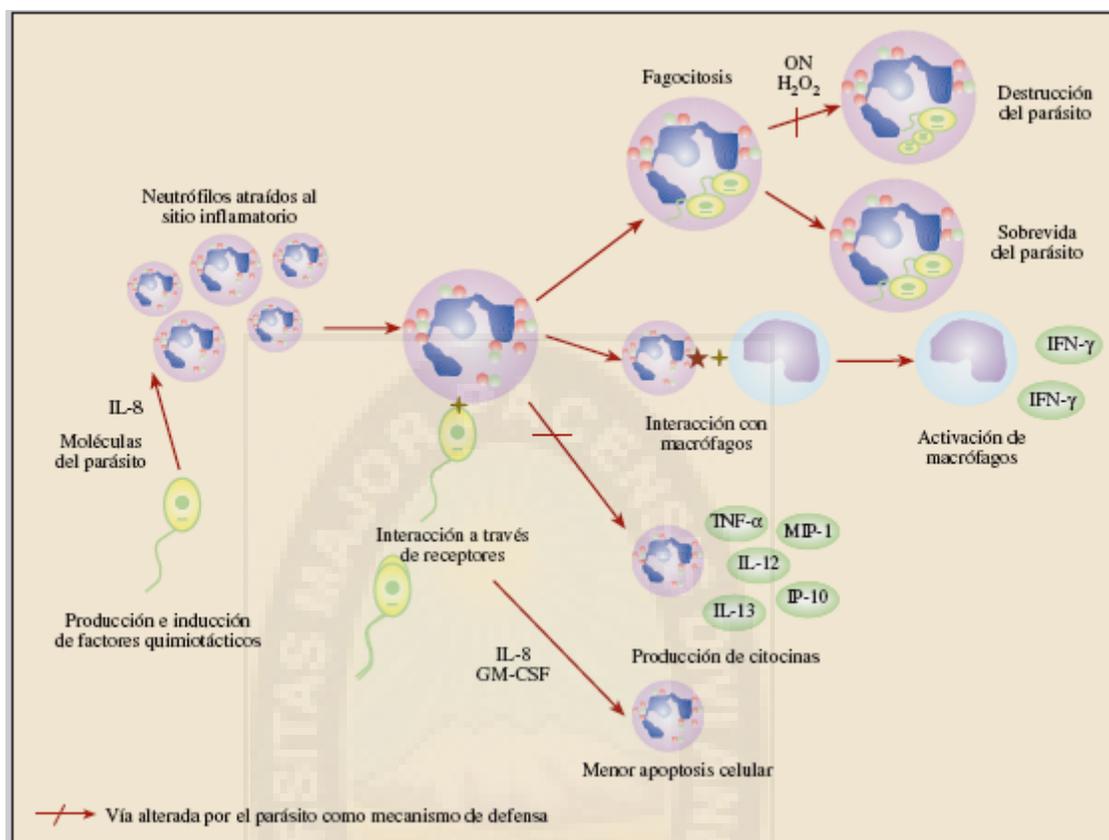


Figura 2. Características generales de la interacción entre neutrófilos y parásitos de *Leishmania*. Fuente: Bonilla, 2005

En el sitio de infección los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación, incluyendo el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), las interleuquinas IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas del Complemento (C3). El TNF y la IL-1 actúan como pirógenos endógenos y activan el endotelio vascular permitiendo la extravasación de leucocitos a través de la unidad perivascular dérmica y la subsecuente migración de estas células hacia el endotelio. La IL-6 participa en la respuesta de fase aguda y en el desarrollo de una respuesta inmune específica mediada por células B, mientras que la IL-12 constituye un potente activador de células asesinas naturales y estimula la diferenciación de las células T colaboradoras (Th) a células Th1 (Zuluaga y Robledo, 2004). Las *Leishmanias* al ser destruida por los

macrófagos, liberan antígenos que son expresados vía MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase II en la membrana del macrófago y presentados a los linfocitos T.

Según el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), los niveles de citocinas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células T CD4+ y CD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definido que induce funciones efectoras diferentes. Las citocinas de tipo Th1, como IFN-gamma y TNF, participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos IgG1 e IgG3 en seres humanos (IgG2a en ratones), mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata e IL-13 (Hernández y Becker, 2006).

Por otra parte la acción del sistema del complemento es de gran importancia, ya que una gran proporción de los promastigotes inoculados por el vector es destruida por el complemento con lo que se reduce la probabilidad de establecer una infección inicial. Así mismo, el complemento lisa los amastigotes liberados por macrófagos infectados y en esta forma se limita la invasión de nuevas células vecinas y se evita la perpetuación de la infección y el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que los promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento y los promastigotes de varias especies tienen capacidad de resistir la lisis mediada por complemento (Franke y col., 1985).

Esta respuesta inmune tiende a presentar variantes según la presentación clínica de la leishmaniasis (Figura 3), observándose variantes; en leishmaniasis mucocutánea y cutánea crónica, la respuesta inmune mediada por células (CMI) y la hipersensibilidad retardada (DTH) es mayor a la carga parasitaria. En cambio en leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis visceral es inversa

la relación: CMI/DTH es menor en relación a la carga parasitaria (Murray y col., 2005).

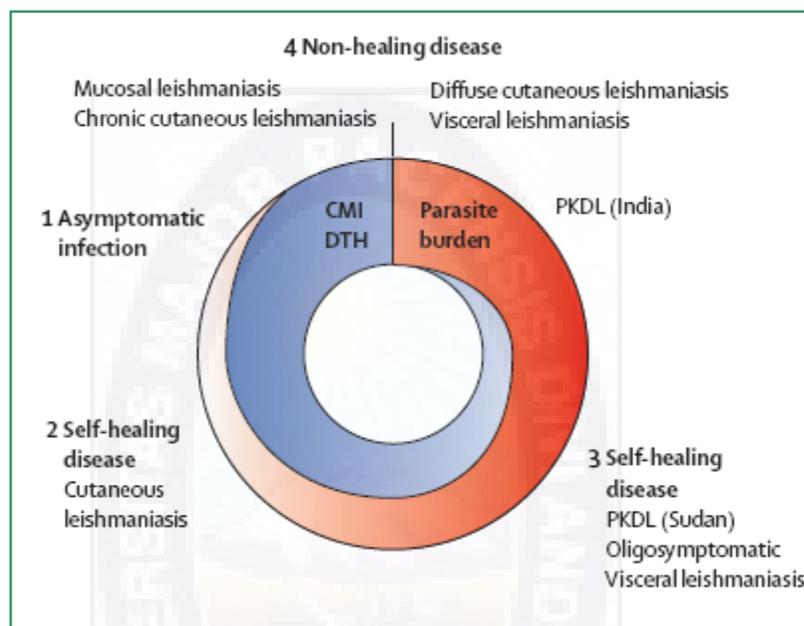


Figura 3. Relación dinámica en el espectro clínico de leishmaniasis humana: Entre inmunidad mediada por célula (CMI), Hipersensibilidad retardada (DTH), y carga parasitaria. Fuente: Murray y col., 2005

6.7. Diagnóstico de Laboratorio.

Tradicionalmente la identificación de las especies de *Leishmania* ha estado basada en el cuadro clínico provocado, su distribución geográfica y en el comportamiento al ser cultivado en medios de cultivo o inoculado a animales de experimentación. Actualmente, se utilizan otros criterios inmunológicos y moleculares que han perfeccionado su diagnóstico para la posterior toma de decisiones en el tratamiento.

Se basa generalmente en la aplicación conjunta de métodos de diagnóstico directo e indirecto, los cuales varían en función del cuadro clínico presentado, ya sea de tipo visceral, cutáneo o mucocutáneo. El diagnóstico definitivo es la demostración de la presencia del agente etiológico; mediante la observación del parásito en frotis obtenidos de lesiones, estudios histopatológicos, cultivos, inoculación en animales de experimentación y la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6.7.1. Frotis de lesión teñido con Giemsa

El mejor sistema de diagnóstico directo implica la observación del parásito, para lo cual debe efectuarse en primer lugar la obtención de muestras para su posterior observación al microscopio, previa tinción con los colorantes panópticos. La muestra para el frotis se puede obtener a través de la escarificación de la superficie o del borde de la lesión (surco dérmico), utilizando un bisturí; también algunos utilizan un palillo de madera con una de sus extremidades en bisel (mondadientes) (Naiff, 1997).

La presencia de amastigotes en las lesiones varía de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad y a la forma clínica, observándose mayor cantidad de parásitos en las formas difusas y menos en las formas intermedias y localizadas. Generalmente en lesiones recientes de Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) se observan mayor número de parásitos, por lo que es más fácil su detección en frotis, mientras que en lesiones de evolución crónica se hace más difícil el hallazgo de los mismos (Zerpa y col., 2002).

La sensibilidad de este método de diagnóstico es de 43% (Morales, 2008), valor que varía por diferentes factores como la cantidad de número de muestras, el personal de toma de muestra y el lugar de la lesión del cual se toma la muestra (centro o borde de la lesión). Debido a que todas las especies de *Leishmania* son muy similares morfológicamente, su identificación como agente causal de

una infección se dificulta mediante la técnica citada, teniendo que recurrir a otros procedimientos para su confirmación.

6.7.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; amplifica una secuencia blanco de DNA obteniendo al final de este procedimiento una mayor probabilidad y facilidad para la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.

Para la realización del PCR es necesario que el material genético que vayamos a amplificar tenga una buena concentración y pureza, siendo importante el trabajo previo que se vaya a realizar en la extracción y cuantificación de DNA.

6.7.2.1. Extracción de DNA

El aislamiento de material genético, se lo realiza generalmente a partir de la biopsia o de los parásitos ya cultivados a partir de las lesiones o de biopsias. Actualmente nuevos estudios utilizan como fuente de DNA los frotis de lesión teñidos con Giemsa que presentaban cuatro años de antigüedad, obteniendo resultados positivos (Motazedian y col., 2002); esta técnica permite una confirmación exacta de los casos positivos de Leishmania logrando determinar su género y especie con ayuda del PCR.

Para lograr la extracción de DNA, se puede realizar por dos métodos (digestión en buffer de lisis o por boiling) (Motazedian y col., 2002), ambos métodos presentan diferencias, pero los dos logran la obtención de material genético.

6.7.2.2. Cuantificación de DNA

El DNA, RNA, oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco, la interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente», dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del DNA y el RNA puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0 (Somma, 2010).

Con una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 ng/ μ L de DNA bicatenario, 37 ng/ μ L de DNA monocatenario, 40 ng/ μ L de RNA o 30 ng/ μ L de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores, debe precisarse que la espectrofotometría no permite identificar de forma fiable impurezas de RNA presentes en las soluciones de DNA, puede emplearse la absorbancia a 325 nm para poner de manifiesto la presencia de restos en la solución o la suciedad de la cubeta (Somma, 2010).

6.7.2.3. Fundamentos de PCR

Esta metodología es considerada como una revolución dentro la biología molecular ya que con la amplificación exponencial es posible el análisis de moléculas de DNA o RNA, a partir de mínimas cantidades de muestras. El método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de DNA. Este fragmento está determinado por secuencias introducidas en la reacción, denominadas “primers”, y a partir de los cuales la

enzima DNA polimerasa, realiza la síntesis exponencial. Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión

La importancia de la amplificación por PCR en Infectología se basa en que con esta magnitud de amplificación es posible el análisis de moléculas de DNA o RNA, a partir de mínimas cantidades de muestras. Así por ejemplo, si consideramos que una bacteria contiene 1 fg (10^{-15} g) de DNA, la amplificación por PCR permitirá generar alrededor de 0,1 μ g (10^{-6} g) de una región específica de DNA bacteriano. En la práctica, este método permite identificar secuencias presentes entre 10 y 50 copias en una muestra clínica y sin condiciones especiales de mantención. Aunque la PCR permite la amplificación de ácidos nucleicos, la visualización del producto amplificado requiere de otras metodologías posteriores a la amplificación, el método más utilizado es la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (Corvalán, 2002). Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un equipo llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción, controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

6.7.2.4. Etapas de la PCR (Family Brochure, 2006)

Son tres las etapas que se desarrollan en un ciclo de PCR los cuales varían en temperaturas y tiempos de reacción (Figura 4).

Desnaturalización: La reacción se calienta a altas temperaturas (usualmente $> 90^{\circ}\text{C}$) separando la doble hélice del ADN a cadenas simples por ruptura de los puentes de hidrógeno entre bases. Estas cadenas se tornan accesibles a los cebadores.

Hibridación: Los primers son cortos, secuencias sintéticas de simple cadena, consisten de 20 – 30 bases, los cuales hibridan con las regiones complementarias de las cadenas del ADN patrón, proceso que ocurre entre 40 y

65°C dependiendo de la longitud y secuencia de los primers, como producto se forman nuevamente cadenas dobles entre los cebadores y las secuencias complementarias.

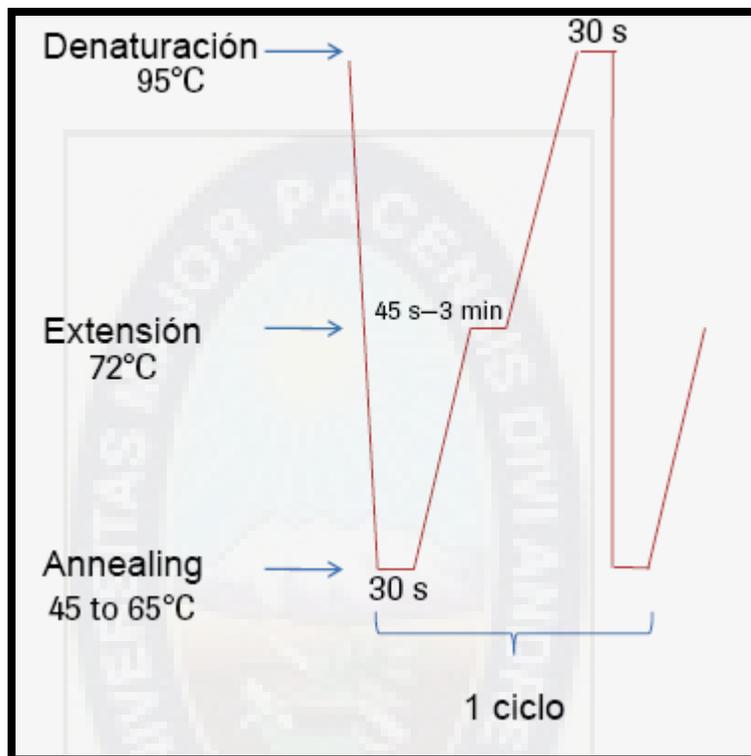


Figura 4. Tiempos y temperaturas por ciclo de PCR. Fuente: Horst, 2008

Extensión: Se requiere aproximadamente 72°C y una polimerasa termoestable (Taq DNA polimerasa) para sintetizar una cadena complementaria. La enzima lee la secuencia de la cadena opuesta y extiende los cebadores agregando nucleótidos (dNTPs) en el orden en que pueden emparejarse. La síntesis de la nueva cadena es exclusivamente en dirección 5' a 3'.

Final de ciclo: Al final del primer ciclo de PCR, se obtienen dos nuevas cadenas de DNA idénticas a la molécula original, subsecuentemente los ciclos se repiten y el número de copias de DNA se incrementa de manera exponencial; el producto final de estas copias de DNA es llamado amplicon.

6.7.2.5. Condiciones de la reacción

En la etapa inicial de desnaturalización, es esencial que se desnaturalice completamente el patrón de DNA; la desnaturalización incompleta del DNA dará como resultado el uso ineficiente del patrón en el primer ciclo de amplificación y, en consecuencia, en un escaso rendimiento del producto de la PCR. La temperatura de hibridación se calcula en 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplo cebador-patrón de DNA.

Si se obtienen productos de la PCR no específicos, además del producto esperado, la temperatura de hibridación se puede optimizar aumentándola por incrementos de 1 a 2°C. La etapa de extensión se realiza, generalmente, a 72°C y una extensión de 1 min es suficiente para sintetizar fragmentos de PCR de hasta 2 Kb (Kb = kilobase = 1000 pb). Cuando se amplifican fragmentos de ADN más grandes, el tiempo generalmente se extiende a razón de 1 min por cada 1000 pb.

El número de ciclos de la PCR dependerá, básicamente, del rendimiento esperado del producto de la PCR. Después del último ciclo, las muestras suelen incubarse a 72°C durante 5 min para completar los extremos que sobresalen de los productos de la PCR recién sintetizados (IPGRI, 2003).

6.7.2.6. Componentes

- **ADN patrón.** Casi todos los métodos estándar de extracción de DNA son apropiados, la cantidad adecuada está entre 0.1 y 1 μ g de DNA genómico, para una mezcla total de reacción de 100 μ L. Cantidades más grandes de DNA patrón elevan, generalmente, el rendimiento de productos de la PCR no específicos (Family Brochure, 2006).

- **Primers.** Los cebadores de la PCR deben tener entre 10 y 24 nucleótidos de longitud; el contenido de GC debe estar entre 40% y 60%. El cebador no debe ser auto-complementario o complementario de otro cebador en la mezcla de reacción, para evitar así la formación de dímeros de cebadores u horquillas; las temperaturas de fusión de los pares de cebadores no deben diferir en más de 5°C, de modo que tanto el contenido de GC como la longitud se deben elegir adecuadamente (IPGRI, 2003). Las temperaturas de fusión y de hibridación de un cebador se calculan así: si la longitud del cebador es menor que 25 nucleótidos, el valor de la temperatura de fusión se calcula con la fórmula: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$. La temperatura de hibridación debe ser, aproximadamente, 5°C inferior que la temperatura de fusión (IPGRI, 2003).
- **Concentración de MgCl₂.** La DNA polimerasa termoestable para ejercer su función requiere de la acción de cationes divalentes, siendo necesaria la acción de iones Mg⁺⁺ para influir en la actividad enzimática y para incrementar el T_m de la doble cadena de DNA, formando complejos solubles con los dNTPs. Si los iones Mg⁺⁺ son demasiado escasos, se obtiene un bajo rendimiento del producto de la PCR y si son demasiado abundantes, aumentará el rendimiento de productos no específicos. El intervalo recomendado de concentración de MgCl₂ es de 1 a 3 mM, en las condiciones de reacción estándar especificadas (Family Brochure, 2006).
- **Taq polimerasa.** La automatización del proceso de PCR se debe al descubrimiento de la enzima *Taq polimerasa* termoestable, extraída del *Thermus aquaticus* (Chien, 1976) que eliminó el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción. Si las

concentraciones de Taq polimerasa son mayores que las requeridas pueden sintetizarse productos no específicos.

- **Desoxinucleótidos (dNTP).** La concentración de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción es generalmente de 200 μ M, se debe comprobar que estas concentraciones sean iguales, porque una inexactitud aumentará el grado de incorporación errónea; para algunas aplicaciones las concentraciones de un rango de 50 a 500 μ M pueden ser aceptables (Family Brochure, 2006).

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Descripción del Ámbito de Estudio

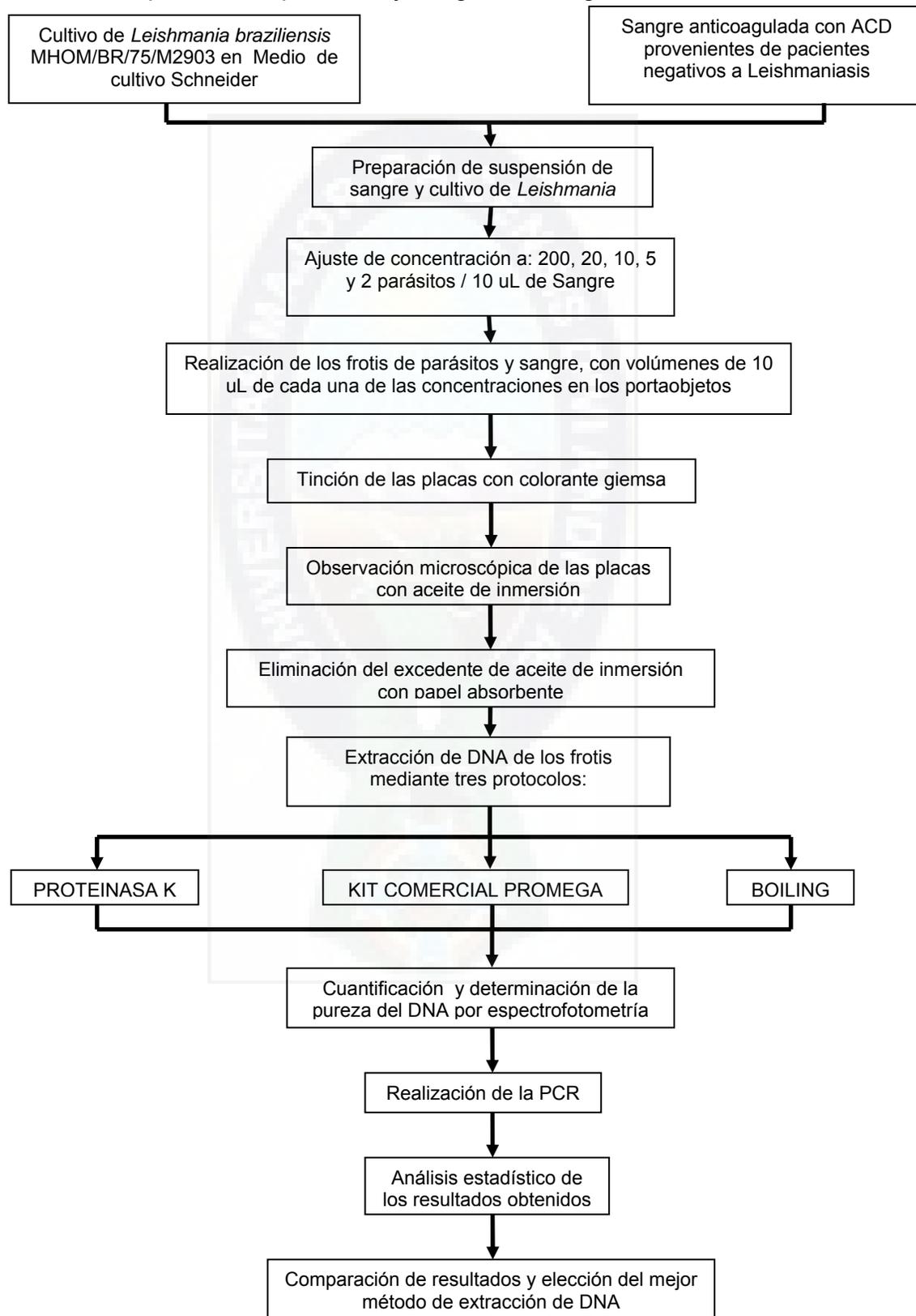
La población en estudio estaba constituida por 25 muestras de pacientes que acudieron al Instituto SELADIS entre los meses junio y diciembre del 2010, los cuales solicitaban exámenes laboratoriales de PCR y frotis de lesión para el diagnóstico de Leishmaniasis,

7.2. Descripción del Ambiente de Investigación

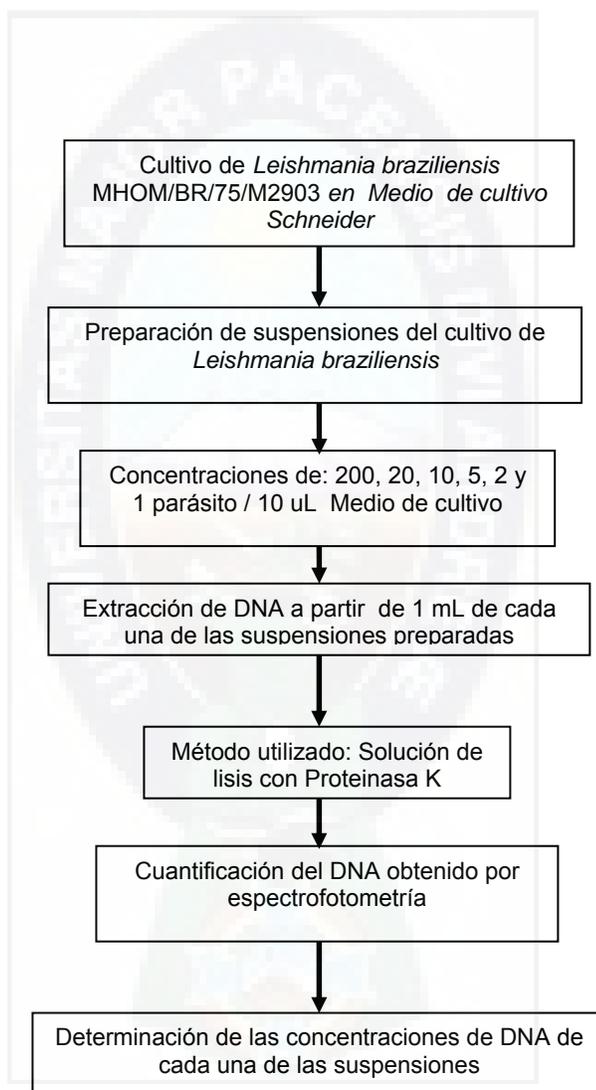
Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética, con la colaboración de los laboratorios de Biología Molecular y Parasitología, del Instituto SELADIS dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés del departamento de La Paz.

7.3. Metodología

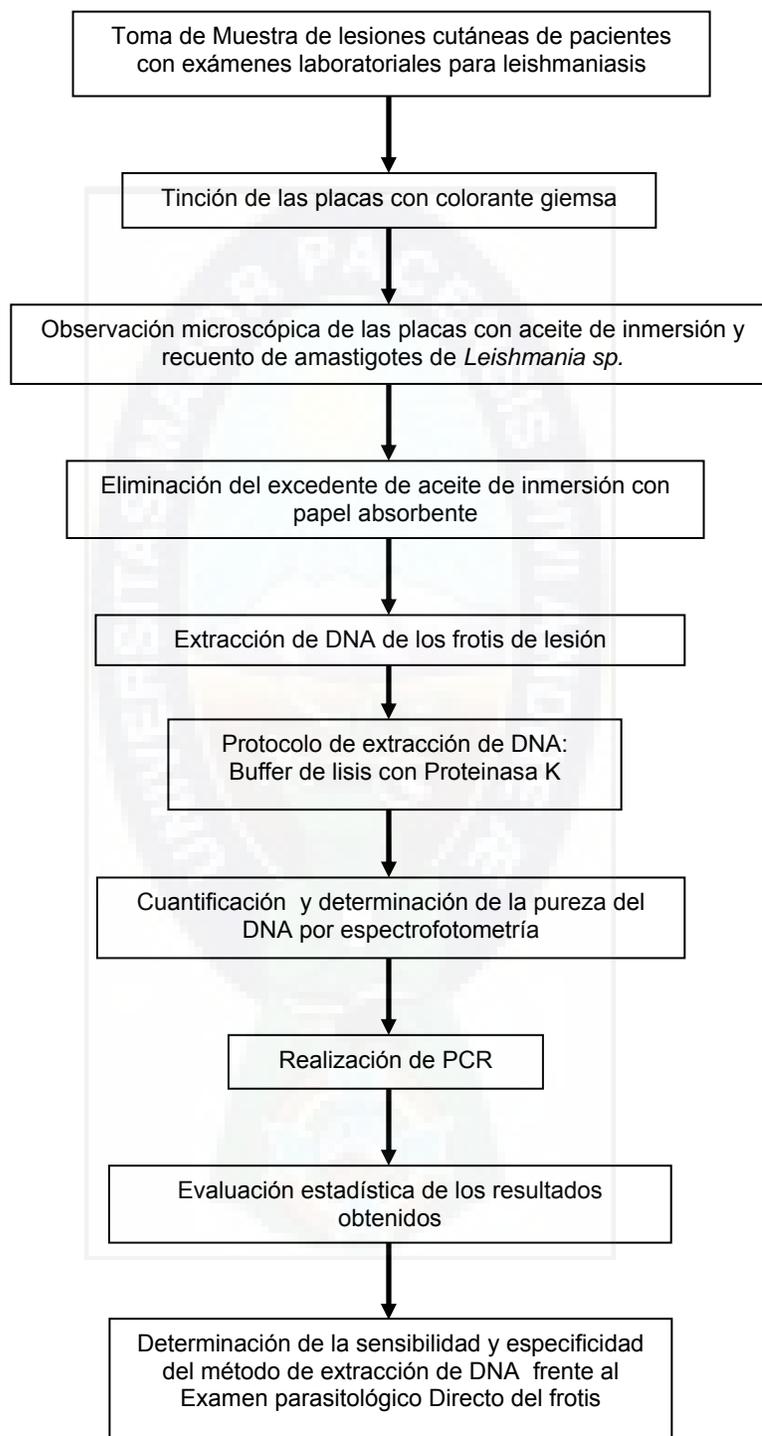
- Procedimiento utilizado para la obtención de DNA a partir de frotis preparados con una suspensión de parásitos y sangre anticoagulada:



- Procedimiento utilizado para la determinación de la sensibilidad analítica del método de extracción de DNA estandarizado (solución de lisis con Proteinasa K).



- Procedimiento utilizado para la obtención de DNA a partir de frotis de lesión de pacientes:



7.4. Procedimientos

7.4.1. Población

La población en estudio fue conformada por dos grupos:

Grupo 1: 57 frotis preparados a partir de suspensiones de parásitos de *Leishmania braziliensis* usando como diluyente sangre anticoagulada con ACD, a distintas concentraciones de parásitos (200, 20, 10, 5, 2 parásitos/ 10 μ L sangre), muestras que fueron utilizadas para la comparación de las sensibilidad analítica de los tres protocolos de extracción de DNA a evaluar.

Grupo 2: Veinticinco frotis de lesión de personas provenientes de regiones endémicas de *Leishmania* en los Yungas, que acudieron al Instituto SELADIS para la realización de exámenes laboratoriales para el diagnóstico o descarte de leishmaniasis. Este grupo fue dividido en dos subgrupos: Subgrupo A, que esta formado por 15 frotis de lesión de pacientes que solicitaban exámenes laboratoriales de PCR y examen directo por microscopia; y el Subgrupo B, que esta formado por 10 frotis de lesión de pacientes que sólo solicitaban examen directo por microscopia.

Se tomaron en cuenta aquellos pacientes que presentaban lesiones activas aparentes y los cuales dieron su consentimiento informado para la toma de muestra (Anexo 1).

El tamaño muestral fue determinado por conveniencia, y correspondía al número de pacientes que asistieron al servicio de laboratorio durante el periodo del estudio.

7.4.2. Cultivo de parásitos de *Leishmania braziliensis*

Se utilizó una cepa de referencia de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, los promastigotes de esta cepa fueron mantenidos en medio líquido de cultivo Schneider, suplementado con suero fetal bovino 10% y antibióticos (estreptomycin y penicilina), los cuales fueron incubados en cajas de cultivo de 50 mL a 26°C en una estufa BINDER (BD-53).

Para los cambios de medio se verificaba el estado de los promastigotes en las cajas de cultivo con ayuda de un microscopio de luz invertida OLYMPUS (CK-2), y se los realizaba cada 72 horas cuando las células alcanzaban la fase estacionaria de crecimiento.

7.4.3. Preparación de las muestras de *L. braziliensis* para la determinación de la sensibilidad de cada protocolo de extracción de DNA

7.4.3.1. Suspensiones de parásitos en medio de cultivo Schneider

Para la determinación de la sensibilidad analítica del método de extracción de DNA con Solución de lisis con Proteinsasa K; se prepararon suspensiones a partir del cultivo celular de *L. braziliensis* con medio de cultivo Schneider, y se llegaron a las concentraciones de 200, 20, 10, 5, 2 y 1 parásito/10 μ L. Posteriormente se trabajó con 1 mL de cada una de estas suspensiones para realizar la extracción de DNA por triplicado de cada dilución.

7.4.3.2. Suspensiones de parásitos con sangre anticoagulada

Para determinar la sensibilidad de los tres métodos de extracción de DNA, a partir del cultivo celular de *Leishmania* con medio de cultivo Schneider, se prepararon suspensiones del parásito utilizando como diluyente sangre anticoagulada con ACD, a las concentraciones de 200 parásitos/10 μ L, 20 parásitos /10 μ L, 10 parásitos/10 μ L, 5 parásitos/10 μ L y 2 parásitos/10 μ L. Luego, se colocó 10 μ L de cada una de estas suspensiones sobre portaobjetos para realizar la extensión y su posterior tinción con el colorante Giemsa.

7.4.4. Preparación de frotis a partir de lesión

Se procede retirando un poco de tejido de la úlcera pinchando el borde de la lesión con un escarba dientes o palillo de madera limpio y autoclavado, luego se realiza el extendido de la muestra en el porta objetos de vidrio previamente identificado y se lo deja secar a temperatura ambiente.

7.4.5. Tinción de frotis con colorante Giemsa

Para la tinción de frotis de las diluciones de cultivo de *Leishmania* y los frotis de lesión de pacientes, se siguen las siguientes instrucciones: Se fija el frotis con metanol p.a. durante 3 minutos, se seca al aire y se sumerge en una solución diluida al 1/10 de colorante Giemsa con tampón PBS (pH 7,4) durante 25 minutos, se lava con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente.

7.4.6. Examen parasitológico directo de los frotis de lesión.

Todos los frotis teñidos de lesión colectados han sido examinados en un microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100x; los amastigotes encontrados en los frotis fueron clasificados en cuatro grupos según su número: Mayor a 50 amastigotes (+++), de 21 a 50 amastigotes (++) , de 1 a 20 amastigotes (+) y Cero amastigotes (-) (Motazedian y col., 2002).

7.4.7. Obtención de DNA de *Leishmania* a partir de los frotis teñidos

A los frotis teñidos con Giemsa, luego del análisis por observación directa al microscopio óptico se les realizó el siguiente procedimiento previo al proceso de extracción de material genético:

- Se eliminó el excedente del aceite de inmersión con papel absorbente y luego fue mantenido a temperatura ambiente hasta su utilización.
- El raspado del frotis se lo realiza con hojas de bisturí (uno por cada muestra) y el material obtenido del raspado fue colectado en tubos eppendorf de 1,5 mL para el procedimiento de extracción de DNA (Anexo 2).

Para obtener el material genético de las muestras de frotis se evaluaron tres métodos:

7.4.7.1. Protocolo A: Utilizando Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK)

- El material biológico de los frotis teñidos, fue cubierto con 250 μ L de buffer de lisis (50 mM NaCl, 50 mM Tris [pH 7,4], 10 mM EDTA, 1% [vol/vol] Tritón 100X, Proteinasa K 50 μ g/mL), luego de 5 minutos el buffer de lisis que reaccionó con la superficie del frotis fue retirado del

portaobjetos conjuntamente con el material biológico mediante un raspado con hojas de bisturí.

- El producto fue colectado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL e incubado por 3 horas a 60°C en un Bloque calentador Microtube Thermal Mixer (Fisher Scientific).
- Se adicionó 30 μ L de SDS 10% y fue incubado 30 minutos a 60°C en el Bloque calentador, se terminó este proceso incubando 10 minutos más a 94°C en el bloque calentador.
- Se adicionó 130 μ L de solución precipitante de proteínas, se mezcló por inversión y fue llevado a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos en una centrifugadora Mikro 22 (Hettich Zentrifugen).
- El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora.
- El DNA fue concentrado por centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70%, luego se llevo a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos.
- Se descarto el sobrenadante y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

7.4.7.2. Protocolo B: Utilizando el Kit de extracción de DNA Promega Wizard Genomic (PROMEGA, USA).

- Los frotis fueron cubiertos con 250 μ L de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)], y el material biológico es retirado con un hojas de bisturí en un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Se adicionó 900 μ L del Buffer de lisis celular, se mezcló 20 segundos por inversión y fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente, luego

fue llevado a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos en una centrifugadora Mikro 22 (Hettich Zentrifugen).

- Se desecho el sobrenadante y se agregó nuevamente al precipitado 900 μ L de Buffer de lisis celular repitiendo el paso anterior de este protocolo.
- Al precipitado se le agregó 400 μ L de Buffer de lisis de núcleos y 1,5 μ L de RNAasa, luego fue incubado a 37°C por 30 minutos en un Bloque calentador Microtube Thermal Mixer (Fisher Scientific).
- Después de la incubación se atemperó los tubos eppendorf por dos minutos y se le agregó 130 μ L de Buffer de lisis de proteínas, fue mezclado por inversión y llevado a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL previamente etiquetado y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora.
- El DNA fue precipitado por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70% y se llevo a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos.
- El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

7.4.7.3. Protocolo C: Utilizando calentamiento (Boiling).

- Para el raspado de los frotis se adicionó 250 μ L de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)] y fue raspado con hojas de bisturí para su colección en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y es incubado por 20 minutos a 97°C en un bloque calentador Microtube Thermal Mixer (Fisher Scientific).

- Se dejó enfriar 10 minutos, se adicionó 130 μ L de solución precipitante de proteínas y fue llevado a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos en una centrifugadora Mikro 22 (Hettich Zentrifugen).
- El sobrenadante es transferido cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora.
- El DNA fue precipitado por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70% y se centrifugó a 14000 rpm por 1,5 minutos.
- El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)

Para los tres protocolos de extracción el material genético obtenido fue debidamente etiquetado y separado en dos alícuotas, uno para el proceso de cuantificación y la otra guardada a -20°C hasta la realización de los PCR.

7.4.8. Cuantificación y determinación de la pureza de DNA por Espectrofotometría

Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1/10 del DNA extraído para un volumen final de 200 μ L, se usó como diluyente el buffer TE, debido a que había sido utilizado para resuspender el DNA extraído en los tres protocolos de extracción. Los 200 μ L de muestra fueron colocados en cubetas de cuarzo para su lectura en el Espectrofotómetro Shimadzu (UV-1800) a longitudes de onda de 260 y 280 nm; como blanco se utilizó el buffer TE.

A una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 μ g/mL de DNA bicatenario y para el cálculo de las concentraciones de las muestras se utilizó la siguiente fórmula (Somma, 2010):

$$(A\ 260) \times (\text{Factor de dilución}) \times (50\ \mu\text{g/mL}) = \mu\text{g/mL DNA}$$

Debido a que la absorbancia de las soluciones de proteínas corresponde a 280 nm, la determinación de la pureza de las muestras se puede calcular mediante el cociente de (A_{260}/A_{280}) , el resultado de este cociente obtenido nos proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes obtenidos del DNA puro son aproximadamente de 1,8 a 2,0 (Somma, 2010); valores por debajo de este nos indica una contaminación protéica y valores altos una contaminación por fenol (si es utilizado en el proceso de extracción de DNA) o RNA.

7.4.9. PCR para *Leishmania*

Para determinar la funcionalidad del DNA extraído de las muestras de pacientes y de los frotis preparados a partir de suspensiones de *L. braziliensis* / sangre anticoagulada, se realizaron PCR para la amplificación del DNA de *Leishmania sp.*

El protocolo que se siguió fue el estandarizado y validado en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto SELADIS que además es usado rutinariamente para el diagnóstico molecular de la enfermedad. Los materiales y reactivos utilizados para esta parte experimental fueron gentilmente donados por este laboratorio (Anexo 3).

La preparación de la mezcla (mix) de reacción se realizó en un PCR work station CBS Scientific CO. (P-036-202) con material exclusivo para este procedimiento; las proporciones de reactivos para el mix de reacción es la siguiente:

Tabla 3. Concentraciones y volúmenes de los reactivos usados en PCR

| Reactivo | Concentración Inicial | Concentración final/tubo | Volumen por tubo (μ L) |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Buffer 10X * | 10X | 1X | 1,25 |
| dNTPs | 5 mM | 0,2 mM | 0,5 |
| Primer 1 (13A) | 10 μ M | 1,0 μ M | 1,25 |
| Primer 2 (13B) | 10 μ M | 1,0 μ M | 1,25 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,0 mM | 1,0 |
| ddH ₂ O | | | 4,56 |
| DTT | 100 mM | 1 mM | 0,125 |
| Taq | 5 UI/mL | 0,025 UI/mL | 0,0625 |
| TOTAL | | | 9,935 |

* Buffer 10X [100mM Tris-HCL (pH 8,8), 500mM KCl, 0.1% Tritón]

A este mix de reacción se adiciona posteriormente el volumen de 2,5 μ L del material genético usado para el PCR:

DNA Muestra: DNA extraído de los frotis teñidos con giemsa

DNA Controles: Control (+) DNA extraído de cultivos de *L. braziliensis*

Control (-) DNA extraído de cultivos de *M. tuberculosis*

Control de Inhibición (INH) DNA extraído de cultivos de *L. braziliensis*

Los primers que se utilizaron son los oligonucleotidos 13A (GTG GGG GAG GGG CGT TCT) y 13B (ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT) cuyo producto de amplificación es de 120 bp, correspondientes a la región conservada del minicírculo kinetoplasto *Leishmania* (DNAk) (Rodgers y col., 1990; Laskay y col., 1995).

La mezcla de reacción fue cubierta con 30 μ L de aceite mineral y transferido a un termociclador Px2-ThermalCycler (Thermo Electrón Corporation) para su amplificación, el cual estaba programado de la siguiente manera:

| Nº de ciclos | Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|--------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | Desnaturalización | 94 | 3 |
| 35 | Desnaturalización | 94 | 1 |
| | Alineación | 54 | 1 |
| | Elongación | 72 | 1 |
| 1 | Extensión final | 72 | 10 |

El producto final es conservado a 4°C hasta el momento de la realización de la electroforesis en geles de agarosa.

7.4.10. Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de los amplicones fue realizada mediante su siembra en geles de agarosa al 1,5% y diluido con 50 mL de tampón TBE 1X [89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico, 1 mM EDTA (pH 8)] que fue calentado en un horno microondas por 2 minutos (aproximadamente 86±2.0°C) hasta que la solución de agarosa quede disuelta, pasado este tiempo se dejó enfriar la solución aproximadamente hasta 50°C y se adicionó 2 μ L de SYBR green (1:10000); posteriormente la solución de agarosa fue vertida en un molde de cámara electroforética con peines MicroSSP TM Gel System (One Lambda, Inc) para la formación de los pocillos de siembra para las muestras.

El gel de agarosa fue transferido a una cámara electroforética OWL D3-14 (Thermo Scientific) cubierta con tampón TBE 1X, donde la siembra de los productos de la PCR se la realizó mezclando 7 μ L de la muestra con 3 μ L de colorante AmpliTaq® (PROMEGA); el orden de siembra es el siguiente:

| Pozo 1 | Pozo 2 | Pozo 3 | Pozo 4 | Pozo 5 | Pozo 6 | Pozo 7 | Pozo 8 | Pozo 9 |
|----------------------------|-------------|-------------|------------------|-------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| Marcador de Peso Molecular | Control (+) | Control (-) | Control Interno* | Control Interno** | Muestra X | Muestra X con Inhibidor | Muestra Y | Muestra Y con Inhibidor |

* ddH₂O utilizada en la preparación de la Mezcla de reacción

** ddH₂O utilizada en el proceso de extracción de DNA de *Leishmania*

Una vez realizada la siembra de todas las muestras, se realizó la corrida electroforética con ayuda de una Fuente de poder EC 300XL Power Supply (Thermo Scientific) a 150 voltios, 350 mAmp por 7 minutos; transcurrido este tiempo se observó la corrida de las muestras en el transiluminador de luz UV Spectroline® (Select TM Series) a una longitud de onda de 312 nm.

7.4.11. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del los métodos estandarizados

Para conocer la sensibilidad diagnóstica de los métodos estandarizados, se tomó como Gold Standard el diagnóstico clínico del paciente basado en el frotis de lesión. Mediante la construcción de una tabla 2x2 y la metodología del test diagnóstico determinaremos los indicadores: Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo y el Índice de correlación Kappa de los métodos estandarizados. Este análisis nos permitirá seleccionar el mejor método de extracción de DNA a partir de frotis teñidos con Giemsa, para su posible aplicación en el diagnóstico molecular de la enfermedad.

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de la concentración inicial de amastigotes de *Leishmania* en las muestras provenientes de frotis de lesión

Fueron evaluados 25 frotis de lesión provenientes de pacientes, que acudieron al instituto SELADIS para exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis; de estos pacientes, 15 presentaban pruebas de PCR (en sangre y/o lesión) y examen directo por microscopia; y 10 pacientes solo presentaban examen directo por microscopia. Los resultados encontrados en los frotis de lesión se expresan en la Tabla 4, donde el recuento de amastigotes fue clasificada en cuatro grupos: Mayor a 50 amastigotes, de 21 a 50 amastigotes, de 1 a 20 amastigotes y Cero amastigotes (Motazedian y col., 2002).

Tabla 4. Recuento de amastigotes detectados por examinación microscópica de los frotis de lesión teñidos con Giemsa

| Recuento de Amastigotes | > 50 (+++) | 21-50 (++) | 1-20 (+) | 0 (-) | Total |
|-------------------------|------------|------------|----------|----------|-----------|
| Subgrupo A* | 0 | 5 | 2 | 8 | 15 |
| Subgrupo B** | 2 | 0 | 2 | 6 | 10 |
| Total | 2 (8%) | 5 (20%) | 4 (16%) | 14 (56%) | 25 (100%) |

* Pacientes que solicitaron diagnóstico de leishmaniasis por PCR y examen directo por microscopia

** Pacientes que solicitaron diagnóstico de leishmaniasis por examen directo por microscopia

8.2. Determinación de la sensibilidad analítica de los métodos de extracción de DNA con muestras preparadas de *Leishmania* en medio de cultivo Schneider

A partir del cultivo de promastigotes de *L. braziliensis* en medio Schneider se prepararon diluciones de 200, 20, 10, 5, 2 y 1 promastigote por cada 10 μ L de muestra, de los cuales se realizó la extracción de DNA por el método de SLPK; los resultados de absorbancias a 260 nm de las muestras de DNA obtenidas de estas diluciones fueron transformadas para un volumen de 10 μ L mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Abs 1} = (10 \mu\text{L} \times \text{Abs2}) / 1000 \mu\text{L}$$

Abs 1 = Absorbancia de la muestra a un volumen de 10 μ L

Abs 2 = Absorbancia de la muestra a un volumen de 1000 μ L

Ejemplo:

Absorbancia leída a 260 nm: 1,07

$$\text{Abs Muestra} = (10 \mu\text{L} \times 1,07) / 1000 \mu\text{L}$$

$$\text{Abs Muestra} = \mathbf{0,0107}$$

En la tabla 5 y en la figura 5 se muestran los resultados de las concentraciones de DNA obtenidas, a la concentración de 200 parásitos se obtuvo 0,532 ng/ μ L, a la concentración de 20 parásitos se obtuvo 0,450 ng/ μ L la cual representa la concentración máxima en un frotis positivo de dos cruces (++) , a la concentración promedio del frotis (+) (10 parásitos) se obtuvo una concentración de DNA de 0,430 ng/ μ L, a la concentración de 5 parásitos fue de 0,342 ng/ μ L; a la concentración de 2 parásitos se obtuvo 0,097 ng/ μ L y a la concentración de 1 parásito fue de 0,034 ng/ μ L .

Tabla 5. Comparación de las absorbancias, índices de pureza y concentraciones de las muestras de DNA obtenidas a partir de diferentes diluciones de promastigotes de *L.braziliensis* en medio de cultivo Schneider

| MUESTRA | Absorbancia 260 nm | Pureza | Concentración ng/uL |
|--------------------------------------|--|--|--|
| 200 parasitos/10 uL Medio de cultivo | 0,0107 0,0102 0,0110 $\bar{x} = 0,0106$ | 1,059 1,052 1,048 $\bar{x} = 1,053 \pm 0,006$ | 0,535 0,510 0,550 $\bar{x} = 0,532 \pm 0,020$ |
| 20 parasitos/10 uL Medio de cultivo | 0,0091 0,0089 0,0090 $\bar{x} = 0,009$ | 1,046 1,059 1,058 $\bar{x} = 1,054 \pm 0,007$ | 0,455 0,445 0,450 $\bar{x} = 0,450 \pm 0,005$ |
| 10 parasitos/10 uL Medio de cultivo | 0,0086 0,0085 0,0087 $\bar{x} = 0,0086$ | 1,049 1,062 1,061 $\bar{x} = 1,057 \pm 0,007$ | 0,430 0,425 0,435 $\bar{x} = 0,430 \pm 0,005$ |
| 5 parasitos/10 uL Medio de cultivo | 0,0071 0,0065 0,0069 $\bar{x} = 0,0068$ | 1,044 1,048 1,061 $\bar{x} = 1,051 \pm 0,009$ | 0,355 0,325 0,345 $\bar{x} = 0,342 \pm 0,015$ |
| 2 parasitos/10 uL Medio de cultivo | 0,0017 0,0021 0,0020 $\bar{x} = 0,0058$ | 1,062 1,050 1,053 $\bar{x} = 1,055 \pm 0,006$ | 0,085 0,105 0,100 $\bar{x} = 0,097 \pm 0,010$ |
| 1 parásito/10 uL Medio de cultivo | 0,00064 0,00068 0,00070 $\bar{x} = 0,00067$ | 1,067 1,046 1,061 $\bar{x} = 1,058 \pm 0,011$ | 0,032 0,034 0,035 $\bar{x} = 0,034 \pm 0,002$ |

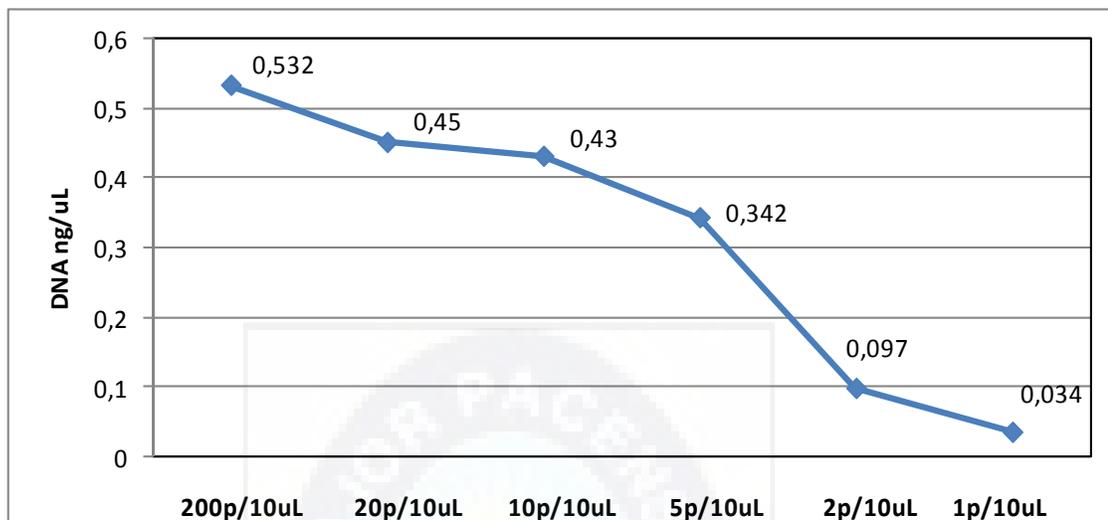


Figura 5. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de las diluciones de promastigotes de *L. braziliensis* con medio de cultivo Schneider. Los valores mostrados son los promedios de las concentraciones en ng/uL.

En la tabla 5 y en la figura 6 se muestran los resultados de las purezas obtenidas de las extracciones de DNA a partir de suspensiones de parásitos en medio de cultivo, valores que se encuentran entre los rangos de 1,051 y 1,058.

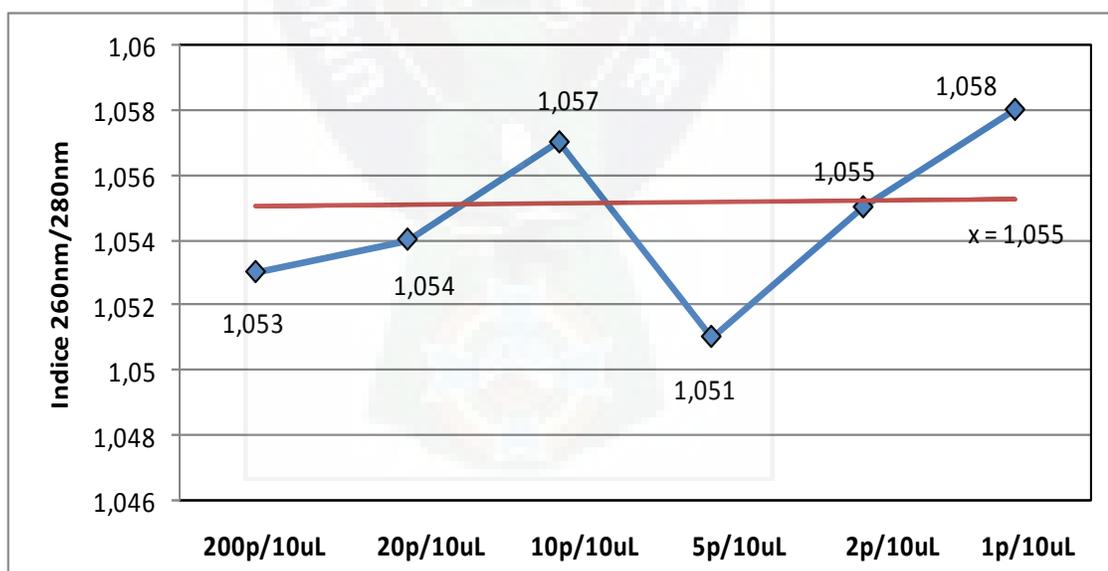


Figura 6. Comparación de los valores de pureza del DNA extraído a partir de diferentes concentraciones de promastigotes de *L. braziliensis* con medio de cultivo Schneider. Los valores utilizados son los promedios de los cocientes de 260 nm/280 nm

8.3. Estandarización de tres métodos de extracción de DNA a partir de frotis preparados de suspensiones de *L. braziliensis* con sangre anticoagulada, previamente teñidos con Giemsa

En este estudio el primer paso fue determinar cual de los tres métodos propuestos para la extracción de DNA a partir de frotis teñidos con Giemsa era el que mejor calidad de material genético proporcionaba, una vez realizadas las extracciones de DNA, a partir de los frotis teñidos de diluciones de promastigotes de *L. braziliensis* con sangre anticoagulada a las concentraciones de 200, 20, 10, 5 y 2 parásitos/10 μ L sangre, se determinó la concentración en ng/ μ L del material genético obtenido y la pureza del mismo en base al índice de absorbancia 260 nm/280 nm. Los resultados obtenidos de este estudio son los que a continuación se detallan:

En la tabla 6, se muestran los resultados obtenidos de la extracción de DNA a partir de frotis que contenían 200 promastigotes por 10 μ L de muestra, se utilizaron tres muestras de sangre de pacientes aparentemente sanos, con cada una de las muestras se realizó los tres protocolos de extracción de DNA. Se observa que con el protocolo que utiliza SLPK se obtuvo mayor concentración de DNA 38,18 ng/ μ L. Ninguno de los tres métodos de extracción de DNA alcanzó la pureza de DNA deseada, si bien con el método SLPK se obtuvo mayor concentración se observó que presenta una pureza baja de 1,043. El método de Promega Wizard mostró obtener una mayor pureza 1,053.

Tabla 6. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 200 parásitos / 10 uL sangre

| Método | ng DNA / μ L | Indice Abs 260 / 280 |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| Solución de lisis con Proteinasa K (n = 4) | 38.18 \pm 8.13 | 1.043 \pm 0.028 |
| Kit Comercial Promega Wizard (n = 4) | 25.45 \pm 4.37 | 1.053 \pm 0.023 |
| Boiling (n = 4) | 22.45 \pm 5.49 | 1.040 \pm 0.024 |

n = número de muestras

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos por los tres métodos de extracción de DNA a la concentración de 20 parásitos en 10 μ L de muestra; el método de extracción de DNA con SLPK obtuvo el mejor rendimiento con una concentración de 24,45 ng/ μ L, los índices de pureza a 260 nm/280 nm muestran que el método de extracción con el Kit Comercial Promega Wizard obtuvo mejor resultado 1,062.

Tabla 7. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 20 parásitos / 10 uL

| Método | ng DNA / μ L | Indice Abs 260 / 280 |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| Solución de lisis con Proteinasa K (n = 4) | 24.45 \pm 7.75 | 1.042 \pm 0.014 |
| Kit Comercial Promega Wizard (n = 4) | 24.25 \pm 4.29 | 1.062 \pm 0.024 |
| Boiling (n = 4) | 20.68 \pm 6.71 | 1.046 \pm 0.019 |

n = número de muestras

A la concentración de 10 parásitos/10 μ L de muestra se observó que con el método basado SLPK se obtuvo un rendimiento mayor en el material genético obtenido 22,27 ng/ μ L. El material genético obtenido por el método de Boiling

mostró menor rendimiento 18,13 ng/ μ L y menor pureza siendo el índice 260 nm/280 nm de 1,030 (tabla 8).

Tabla 8. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 10 parásitos / 10 μ L

| Método | ng DNA / μL | Indice Abs 260 / 280 |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| Solución de lisis con Proteinasa K (n = 3) | 22.27 \pm 2.66 | 1.037 \pm 0.005 |
| Kit Comercial Promega Wizard (n = 3) | 19.98 \pm 2.07 | 1.038 \pm 0.019 |
| Boiling (n = 3) | 18.13 \pm 0.61 | 1.030 \pm 0.012 |

n = número de muestras

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos por los tres métodos de extracción de DNA a la concentración de 5 parásitos/10 μ L muestra. Se observa que el método de SLPK es el que presenta mayor rendimiento 19,77 ng/ μ L; el método de Boiling fue con el que se obtuvo menor concentración 18,70 ng/ μ L y menor pureza 1,039 en comparación con el método de SLPK que dio un índice de 1,046.

Tabla 9. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 5 parásitos / 10 μ L

| Método | ng DNA / μL | Indice Abs 260 / 280 |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| Solución de lisis con Proteinasa K (n = 3) | 19.77 \pm 2.40 | 1.046 \pm 0.001 |
| Kit Comercial Promega Wizard (n = 3) | 19.03 \pm 2.14 | 1.040 \pm 0.015 |
| Boiling (n = 3) | 18.70 \pm 3.01 | 1.039 \pm 0.014 |

n = número de muestras

En la tabla 10 se compara los resultados obtenidos por los tres métodos de extracción a una concentración de 2 parásitos/10 μ L; el método de SLPK fue el que dio una mayor concentración 20,95 ng/ μ L. El método Boiling presento el menor rendimiento 17,12 ng/ μ L y la menor pureza 1,040 en comparación al Kit comercial Wizard Promega que obtuvo un índice de 1,046.

Tabla 10. Comparación de las concentraciones y purezas de las muestras de DNA obtenida por los tres métodos de extracción a una concentración de 2 parásitos / 10 uL

| Método | ng DNA / μ L | Indice Abs 260 / 280 |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| Solución de lisis con Proteinasa K (n = 5) | 20.95 \pm 2.96 | 1.043 \pm 0.008 |
| Kit Comercial Promega Wizard (n = 5) | 20.65 \pm 0.35 | 1.046 \pm 0.009 |
| Boiling (n = 5) | 17.12 \pm 1.20 | 1.040 \pm 0.015 |

n = número de muestras

En la figura 7 se comparan los resultados obtenidos de concentración de DNA en ng/uL, se observa que a las concentraciones de 200, 20, 10, 5 y 2 parásitos/10 μ L el método de SLPK fue el que produjo un mayor rendimiento, y el método del Boiling el que produjo menor rendimiento.

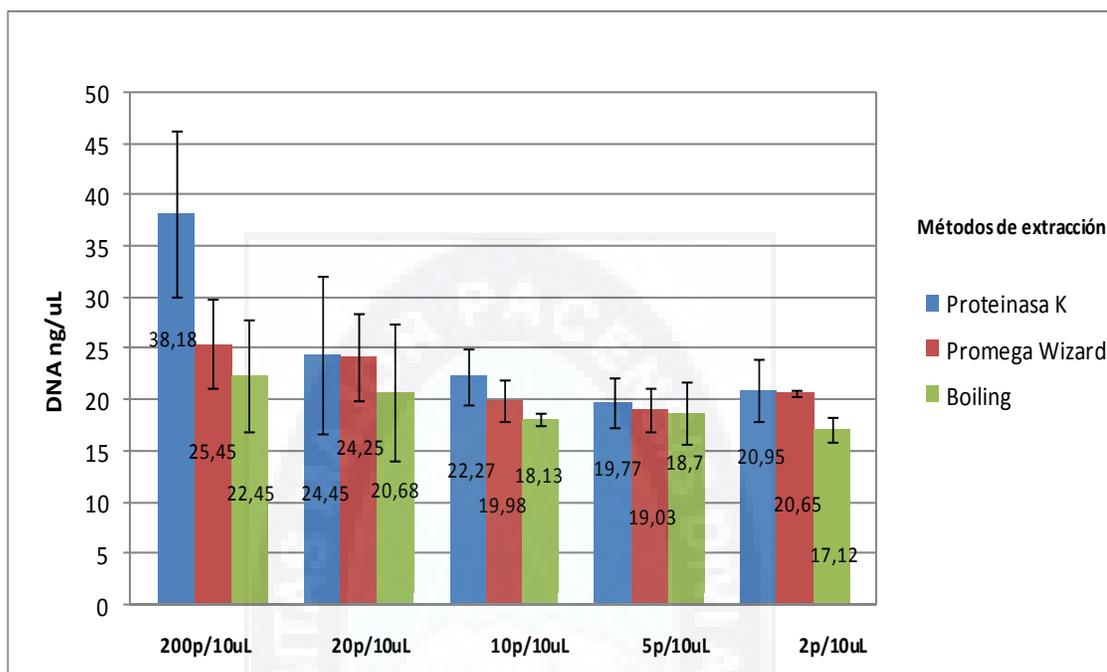


Figura 7. Comparación de la concentración de DNA de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA. Los valores son promedios de las concentraciones de DNA en ng/uL con sus desviaciones standard.

En cuanto a la pureza del cociente 260 nm/280 nm de longitud de onda (figura 8), se muestra que el método de Boiling presenta un rendimiento menor que los otros dos protocolos de extracción de DNA, a excepción de la muestra a una concentración de 20 parásitos/10 μ L donde el método de SLPK tuvo menor rendimiento 1,042. Para todas las concentraciones de parásitos evaluadas el método de Promega Wizard mostró un promedio de pureza del DNA extraído de 1,048, en los métodos de SLPK y boiling promedios de 1,042 y 1,039 respectivamente.

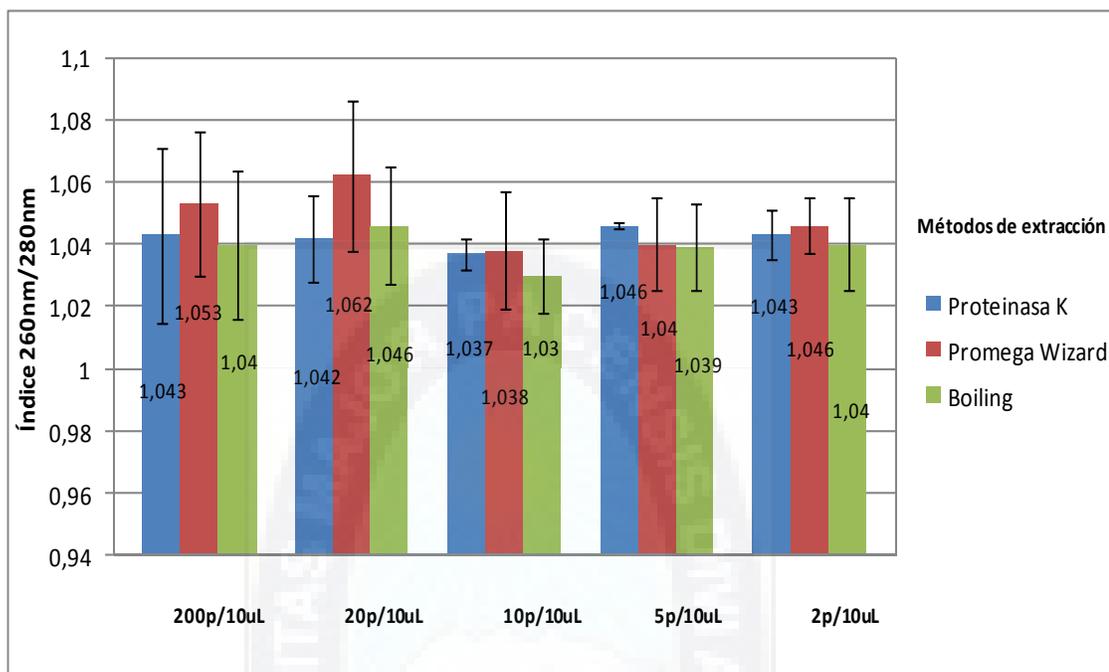


Figura 8. Comparación de la pureza de las muestras de DNA de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA. Los valores son promedios de los cocientes 260 nm/280 nm con sus desviaciones standard.

8.4. Realización de PCR para *Leishmania sp.* utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre

Luego de determinar la concentración y pureza de las muestras de DNA provenientes del cultivo celular de parásitos por espectrofotometría, se realizaron los PCR de estas muestras. En la tabla 11 se resume el número de resultados positivos y negativos de la PCR, se observa que por los tres métodos se detectan casos positivos hasta la dilución de 5 parásitos. También se observó que los tres métodos a la concentración de 2 parásitos dan

resultados falsos negativos y que de los tres métodos evaluados el Kit Comercial Promega Wizard es el que más resultados falsos negativos produjo.

Se observó también la correlación de resultados de los métodos de Boiling y el Kit Comercial Wizard Genomic con respecto al método SLPK, donde el método de Boiling presenta un 95% y el Kit Comercial con un 68% de correlación. Los tres métodos dieron resultados falsos negativos en dos de los ensayos. La sensibilidad diagnóstica encontrada para cada uno de los métodos de extracción de DNA evaluados fue la siguiente: 89% para el método de SLPK, 58% para el método Promega Wizard Genomic y 84% para el método basado en el Boiling.

Tabla 11. Resultados de la PCR obtenidos con material genético a partir de las diluciones de parásitos con sangre.

| | SLPK | KIT EXTRACCIÓN | BOILING |
|----------------------------|--|--|--|
| 200 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) |
| 20 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 10 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 5 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 2 parásitos/10 uL sangre | Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Negativo (-) Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Negativo (-) | Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |

En las figuras 9, 10 y 11 se muestran los resultados de uno de los experimentos representativos realizados por cada uno de los métodos de extracción, en estas figuras se observa que luego de la PCR y durante el revelado del gel en los

casos positivos se evidenciaba la presencia del producto de amplificación de 120 pb.

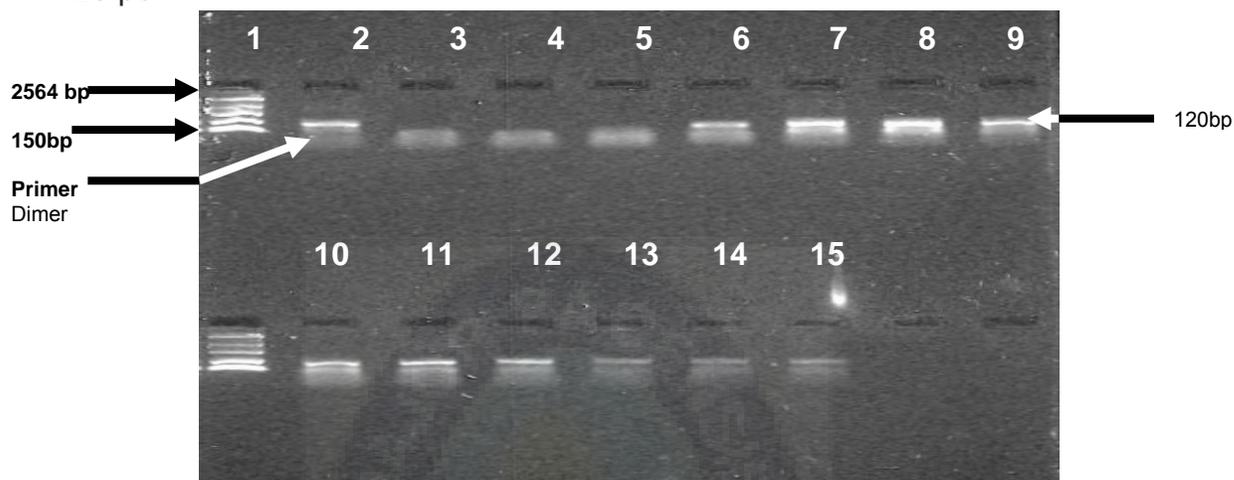


Figura 9. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el método Boiling de los frotis de *Leishmania* con sangre. Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestra de 200 parasitos/10 uL sangre (6), Muestra de 200 p/10 uL sangre con Inhibidor (7), Muestra 20 p/10 uL (8), Muestra de 20 p/10 uL con Inhibidor (9), Muestra 10 p/10 uL (10), Muestra de 10 p/10 uL con Inhibidor (11), Muestra 5 p/10 uL (12), Muestra de 5 p/10 uL con Inhibidor (13), Muestra 2 p/10 uL (14), Muestra de 2 p/10 uL con Inhibidor (15). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania*.

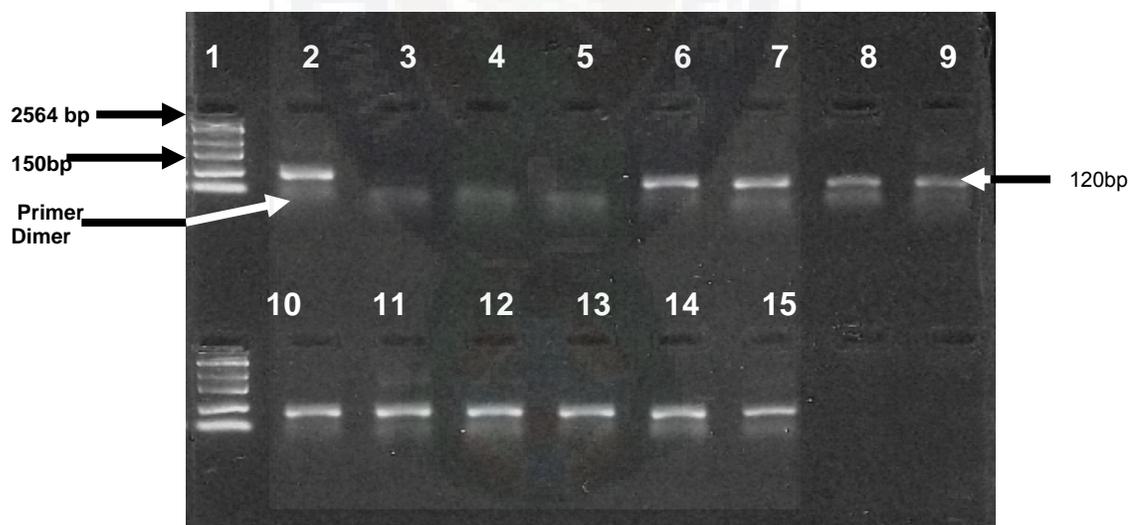


Figura 10. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Kit Comercial Wizard (Promega) de los frotis de *Leishmania* con sangre. Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestra de 200 parasitos/10 uL sangre (6), Muestra de 200 p/10 uL sangre con Inhibidor (7), Muestra 20 p/10 uL (8), Muestra de 20 p/10 uL con Inhibidor (9), Muestra 10 p/10 uL (10), Muestra de 10 p/10 uL con Inhibidor (11), Muestra 5 p/10 uL (12), Muestra de 5 p/10 uL con Inhibidor (13), Muestra 2 p/10 uL (14), Muestra de 2 p/10 uL con Inhibidor (15). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania*.

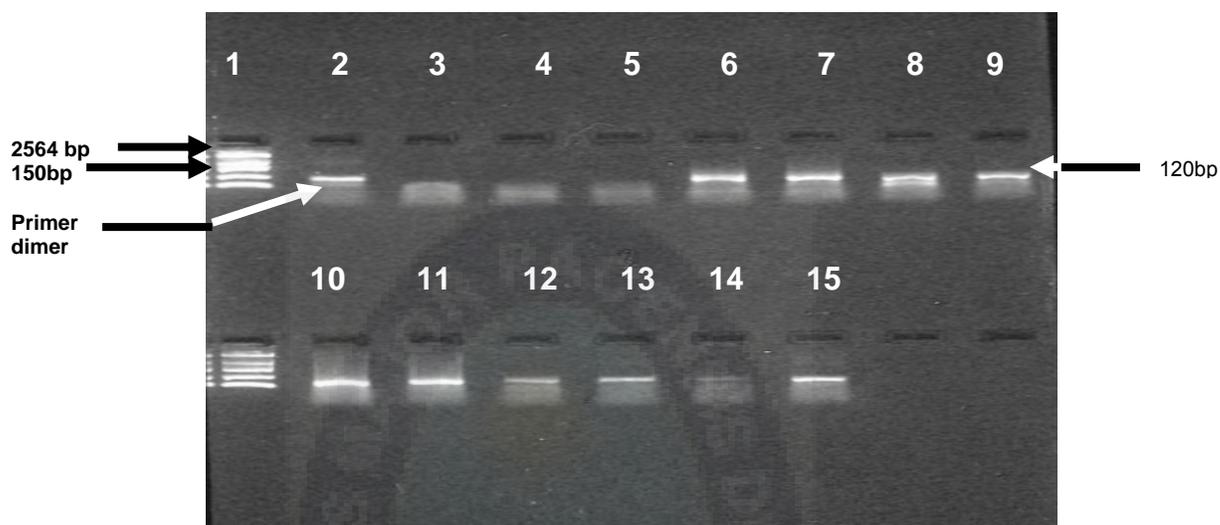


Figura 11. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasas K (SLPK) de los frotis de *Leishmania* con sangre. Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestra de 200 parasitos/10 uL sangre (6), Muestra de 200 parasitos/10 uL sangre con Inhibidor (7), Muestra 20 p/10 uL (8), Muestra de 20 p/10 uL con Inhibidor (9), Muestra 10 p/10 uL (10), Muestra de 10 p/10 uL con Inhibidor (11), Muestra 5 p/10 uL (12), Muestra de 5 p/10 uL con Inhibidor (13), Muestra 2 p/10 uL (14), Muestra de 2 p/10 uL con Inhibidor (15). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania*.

8.5. Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con el método de extracción con Solución de lisis con Proteinasas K

Una vez definido que el método de Solución de lisis con Proteinasas K era el que tenía mayor sensibilidad, se lo utilizó para extraer DNA a partir de muestras de lesión. Los 25 pacientes que solicitaron diagnóstico de leishmaniasis por observación microscópica directa y por PCR, los cuales dieron su consentimiento informado para participar en el estudio, fueron categorizados en dos grupos (A) y (B), se observa que el promedio de DNA obtenido a partir de muestras de lesión es de 20,8 ng/ μ L con límites extremos de 16,1 y 30,1 ng/ μ L. En la figura 12 se encuentran los resultados obtenidos de las

concentraciones de DNA, en las que se puede observar de manera más clara que las concentraciones de DNA tienen una distribución uniforme. También se observó que el promedio de la pureza obtenida era 1,078 con valores extremos de 1,035 y 1,21(Figura 13).

Tabla 12. Resultados de concentración y pureza de DNA obtenido de frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K

| | MUESTRA | CONCENTRACIÓN ng/uL | PUREZA |
|------------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------|
| SUBGRUPO A* | PACIENTE 1 | 17,5 | 1,087 |
| | PACIENTE 2 | 18,4 | 1,045 |
| | PACIENTE 3 | 27,2 | 1,210 |
| | PACIENTE 4 | 16,1 | 1,045 |
| | PACIENTE 5 | 20,8 | 1,083 |
| | PACIENTE 6 | 18,8 | 1,044 |
| | PACIENTE 7 | 20,0 | 1,087 |
| | PACIENTE 8 | 17,2 | 1,089 |
| | PACIENTE 9 | 26,0 | 1,204 |
| | PACIENTE 10 | 19,6 | 1,065 |
| | PACIENTE 11 | 18,4 | 1,045 |
| | PACIENTE 12 | 18,8 | 1,044 |
| | PACIENTE 13 | 18,0 | 1,046 |
| | PACIENTE 14 | 19,2 | 1,066 |
| | PACIENTE 15 | 20,0 | 1,042 |
| SUBGRUPO B** | PACIENTE 16 | 23,4 | 1,116 |
| | PACIENTE 17 | 23,1 | 1,100 |
| | PACIENTE 18 | 21,4 | 1,070 |
| | PACIENTE 19 | 21,7 | 1,069 |
| | PACIENTE 20 | 30,1 | 1,075 |
| | PACIENTE 21 | 20,6 | 1,054 |
| | PACIENTE 22 | 21,3 | 1,070 |
| | PACIENTE 23 | 21,0 | 1,071 |
| | PACIENTE 24 | 20,6 | 1,035 |
| | PACIENTE 25 | 21,0 | 1,090 |
| PROMEDIO CON DESV. ESTANDAR | | 20,8 ± 3,21 | 1,078 ± 0,044 |

* Pacientes que presentaban exámenes de PCR y examen directo por microscopia

** Pacientes que sólo presentaban examen directo por microscopia

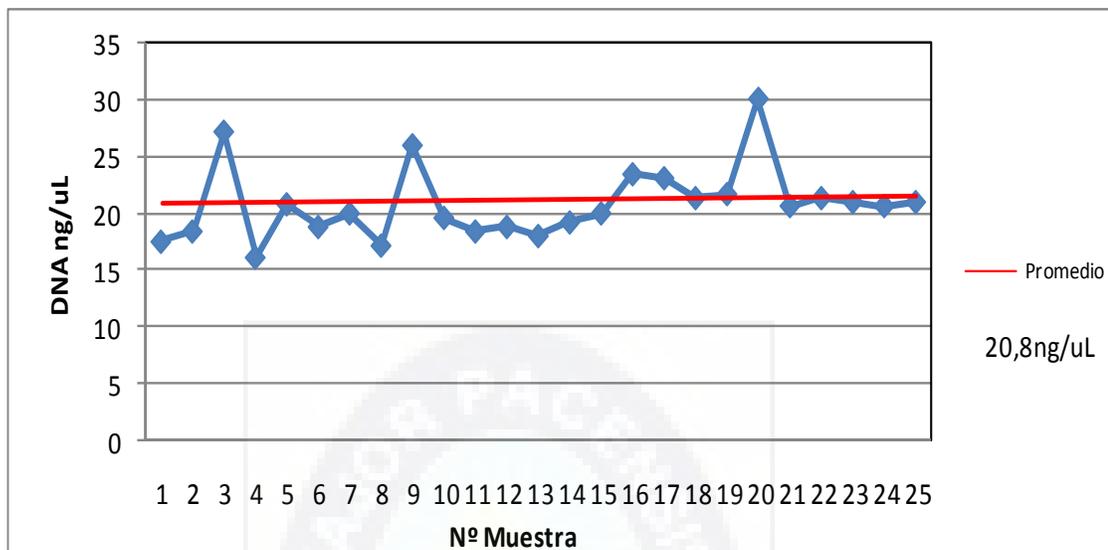


Figura 12. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K

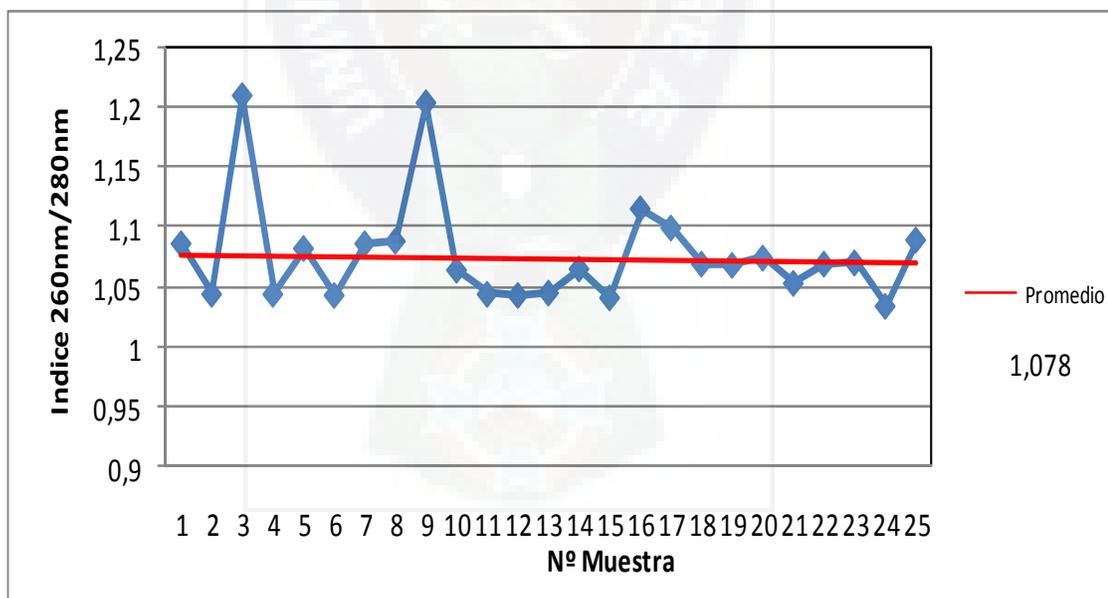


Figura 13. Comparación de los índices de pureza del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K

8.6. Comparación de los resultados de PCR de frotis de lesión para *Leishmania sp.* con los exámenes de laboratorios de rutina para el diagnóstico de leishmaniasis

Luego de realizado el PCR a partir de los frotis de lesión de pacientes, se hizo la corrida electroforética para determinar la sensibilidad y especificidad del método de extracción de DNA con SLPK. En las figuras 14 y 15 se observan las evidencias fotográficas de los resultados de la PCR obtenidas para ambos subgrupos de pacientes. En la tabla 13 se muestran los resultados del PCR del método de SLPK y del PCR de uso rutinario frente a los resultados obtenidos del diagnóstico parasitológico por observación directa (frotis).

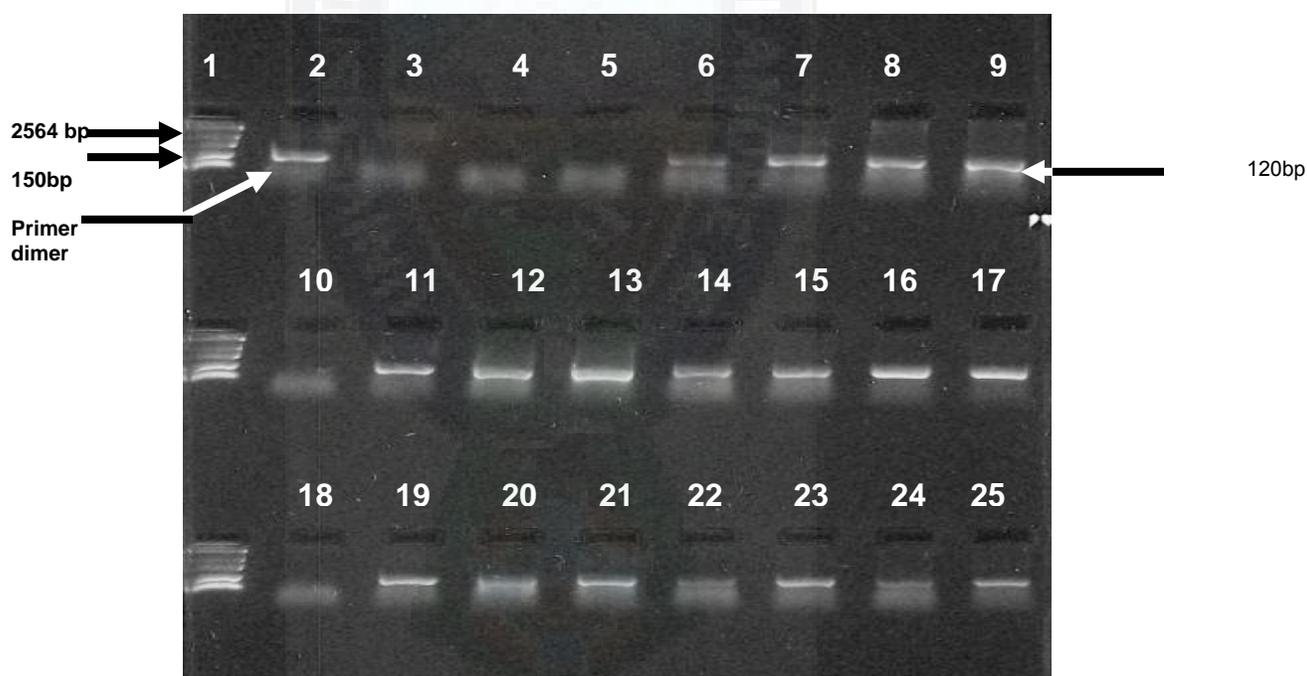


Figura 14. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteínasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo A. Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestras de los diez primeros pacientes del subgrupo A, cada muestra presenta su inhibidor correspondiente (6 – 25). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania*.

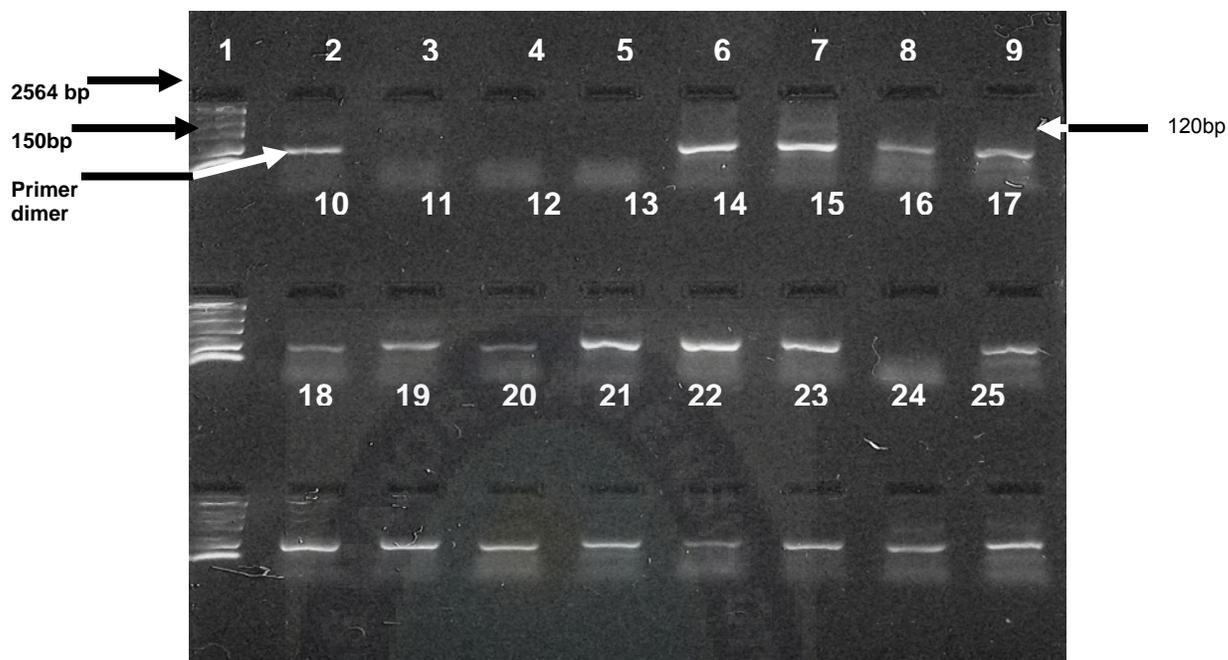


Figura 15. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteínasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo B. Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestras de los pacientes del subgrupo B, cada muestra presenta su inhibidor correspondiente (6 – 25). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania*.

Para el PCR SLPK se observa que en el caso de los frotis positivos para leishmaniasis se obtuvo un resultado falso negativo, para esta muestra el PCR convencional dio resultado positivo. En el caso del método de PCR convencional, para las quince muestras analizadas se observó la presencia de un resultado falso negativo el cual por el método SLPK había dado positivo.

En las quince muestras analizadas en el subgrupo A se observó que el método SLPK dio un resultado falso positivo el cual por frotis y PCR convencional había dado negativos; el método de PCR convencional dio dos resultados falsos positivos, en los cuales el frotis y PCR SLPK habían dado resultados negativos. Por otra parte se observó para este grupo de pacientes que en cuatro casos los resultados de los dos métodos de PCR evaluados dieron resultados positivos y el frotis fue negativo.

Para la determinación de la Positividad de los PCR de frotis de lesión, solo se tomaron en cuenta las 11 muestras positivas por el examen directo por microscopía, muestras que al ser analizadas por PCR para frotis de lesión dieron positivos solo en 10 muestras, datos que nos dan un 91% de positividad para el método de extracción de DNA con SLPK.

Tabla 13. Comparación de los resultados de PCR provenientes de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis

| | MUESTRA | PCR SLPK | FROTIS | PCR CONVENCIONAL |
|-------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------|
| SUBGRUPO A | PACIENTE 1 | Positivo (+) | Positivo (+) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 2 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 3 | Negativo (-) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 4 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 5 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 6 | Positivo (+) | Positivo (++) | Negativo (-) (S) |
| | PACIENTE 7 | Negativo (-) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 8 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 9 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 10 | Positivo (+) | Positivo (+) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 11 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 12 | Positivo (+) | Negativo (-) | Negativo (-) (L) |
| | PACIENTE 13 | Negativo (-) | Negativo (-) | Negativo (-) (S) |
| | PACIENTE 14 | Negativo (-) | Negativo (-) | Negativo (-) (L) |
| | PACIENTE 15 | Negativo (-) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| SUBGRUPO B | PACIENTE 16 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 17 | Positivo (+) | Positivo (+) | |
| | PACIENTE 18 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 19 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 20 | Positivo (+) | Positivo (+++) | |
| | PACIENTE 21 | Negativo (-) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 22 | Positivo (+) | Positivo (+++) | |
| | PACIENTE 23 | Positivo (+) | Positivo (+) | |
| | PACIENTE 24 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 25 | Positivo (+) | Negativo (-) | |

(S) Sangre. (L) Lesión

8.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad del método de extracción de DNA (Solución de lisis con Proteinasa K)

Para la determinación de la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo del método Solución de lisis con Proteinasa K frente a los resultados del examen parasitológico directo; se analizó por un lado el total de resultados positivos y negativos del examen parasitológico directo, encontrando que ambos métodos de PCR evaluados mostraron ser positivos cuando el frotis era negativo (falso negativo), para el análisis de sensibilidad se considero estas tres muestras de frotis como positivas, por lo tanto la sensibilidad encontrada para el método de PCR Solución de lisis con Proteinasa K fue del 93%. La especificidad diagnóstica encontrada fue del 45% con Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo del 68% y 84% respectivamente.

El grado de correlación encontrado para el método SLPK frente al frotis según el Índice de Kappa fue Moderado de 0,403 ($p < 0,005$) y entre los dos métodos de PCR fue Buena del 0,700 ($p < 0,005$).

- Cálculos de la Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo e Índice Kappa, entre los métodos de PCR SLPK y el examen parasitológico directo del frotis.

| PCR SLPK / FROTIS | Positivo (+) | Negativo (-) | TOTAL |
|-------------------|--------------|--------------|-------|
| Positivo (+) | VP 13 | FP 6 | 19 |
| Negativo (-) | FN 1 | VN 5 | 6 |
| TOTAL | 14 | 11 | 25 |

| | | |
|----------------------|-----------------------------|-----|
| SENSIBILIDAD | $[VP/(VP + FN)] \times 100$ | 93% |
| ESPECIFICIDAD | $[VN/(VN + FP)] \times 100$ | 45% |
| VALOR PREDICTIVO (+) | $[VP/(VP + FP)] \times 100$ | 68% |
| VALOR PREDICTIVO (-) | $[VN/(FN + VN)] \times 100$ | 84% |

| | |
|-------------------------------|--------|
| CONCORDANCIA OBSERVADA | 0,72 |
| CONCORDANCIA ESPERADA | 0,5312 |

| ÍNDICE KAPPA | ERROR ESTÁNDAR | I.C 95% | Fuerza de la concordancia |
|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------------------|
| 0,403 | 0,192 | (0,027 , 0,778) | Moderada |

- Cálculos del Índice Kappa, para la determinación del grado de correlación entre los métodos de PCR SLPK y el PCR convencional.

| PCR SLPK / PCR convencional | Positivo (+) | Negativo (-) | TOTAL |
|-----------------------------|--------------|--------------|-------|
| Positivo (+) | VP 9 | FP 1 | 10 |
| Negativo (-) | FN 1 | VN 4 | 5 |
| TOTAL | 10 | 5 | 15 |

| | |
|-------------------------------|--------|
| CONCORDANCIA OBSERVADA | 0,87 |
| CONCORDANCIA ESPERADA | 0,5556 |

| ÍNDICE KAPPA | ERROR ESTÁNDAR | I.C 95% | Fuerza de la concordancia |
|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------------------|
| 0,700 | 0,197 | (0,313 , 1,087) | Buena |

9. DISCUSIÓN

9.1. Extracción de DNA a partir de frotis preparados de suspensiones de *L. braziliensis* con sangre anticoagulada

La preparación de los frotis de parásitos en un inicio se pensó realizarla con suspensiones de los promastigotes de *L. braziliensis* diluidas en el medio de cultivo Schneider, pero al momento de realizar el extendido en los portaobjetos y realizar su tinción con Giemsa en la mayoría de los casos, la muestra no se llegaba a fijar eficientemente con probable pérdida de los parásitos a analizar,

también se observó que la calidad de la tinción no era suficientemente buena; razón por la cual se decidió a realizar las suspensiones con sangre anticoagulada, y ajustar la concentración deseada de parásitos al volumen de 10 μ L de sangre (200, 20, 10, 5 y 2 parásitos), siendo este volumen el mínimo de una gota de sangre con el que se puede realizar un extendido en el portaobjetos y es el volumen aproximado de muestra de lesión que se toma con un mondadientes. Al trabajar de esta manera se logra una buena tinción del frotis y también se llega a simular los frotis de lesión, en los cuales junto con los amastigotes de *Leishmania* se encuentran células sanguíneas.

Para elegir el mejor método de extracción de DNA, se evaluaron los criterios de concentración y pureza del DNA obtenido. De los tres métodos estandarizados, el método basado en SLPK mostró ser el más eficiente.

Al trabajar con el método de extracción de DNA mediante calentamiento (Boiling), la primera dificultad que se observa es el raspado de la muestra en los portaobjetos, ya que al cubrir la muestra con el tampón TE y realizar el raspado con las hojas de bisturí, no se llega a arrastrar toda la muestra al tubo eppendorf, perdiendo cantidades de muestra en el portaobjetos, en las hojas de bisturí y en las paredes del tubo eppendorf. Por lo tanto no se llega a trabajar con el 100% de la muestra, esto puede incidir en el resultado de la PCR en el caso de que la carga parasitaria sea pequeña (1–2 parásitos/frotis). El tiempo empleado para obtener DNA por este procedimiento es relativamente más corto que los otros métodos (tres horas), aunque no garantiza buenos resultados a bajas concentraciones de parásitos por el defecto en el paso inicial del procedimiento ya antes mencionado.

El Kit Comercial de extracción de DNA Wizard Genomic (PROMEGA, USA), se presenta con un tiempo de procesamiento de cuatro horas (mayor que el encontrado para el Boiling), pero que al final por modificaciones realizadas en tiempos de incubación puede llegar a durar menos tiempo (tres horas y media). El paso inicial para la colección de la muestra presenta el mismo problema que

el método por Boiling, ya que también se utiliza el tampón TE para el raspado de la muestra.

El protocolo de extracción de DNA, con SLPK, al contrario que los anteriores métodos no presenta el problema de la colección de las muestras a partir de los frotis, ya que la solución que se utiliza para el raspado, es la solución de lisis, la cual entre sus componentes contiene el detergente Tritón 100X, este reactivo al interactuar con la superficie de los portaobjetos permite que las muestras sean más fácilmente obtenidas, llegando a arrastrar todo el contenido del frotis en el tubo eppendorf, sin llegar a perder cantidades importantes y permitiendo el trabajo con la totalidad de la muestra, lo cual es una ventaja frente a los dos métodos mencionados arriba. Si bien el tiempo de procesamiento es mucho mayor (seis horas) a los otros métodos, este asegura mejores resultados por el hecho de trabajar con todo el contenido del frotis. En el presente estudio no se evaluó si el utilizar la Solución de lisis con Proteinasa K podría mejorar los resultados en los métodos de Boiling y Kit Comercial Wizard Genomic.

Las concentraciones de DNA determinadas por espectrofotometría (Figura 5) muestran que el método de SLPK es el que sistemáticamente genera mayor concentración de DNA, también se notó que la concentración no es significativamente superior a los otros métodos cuando se procesan muestras que contienen entre 20 y 2 parásitos por frotis. Esas diferencias se pueden deber a que la solución de lisis contiene el detergente tritón 100X que es capaz de arrastrar la totalidad de la muestra del portaobjetos. Yokota y col. en 1995 al trabajar con volúmenes de muestra de los frotis de sangre de 4 a 7 μL obtuvo concentraciones de DNA humano entre 20 y 120 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en un total de 407 muestras; nuestros resultados obtenidos por los tres protocolos de extracción presentan valores más bajos, entre los rangos de 17,12 y 38,18 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pero en un total de 57 muestras.

Los valores de pureza obtenidos de las muestras de DNA, mostraron estar muy por debajo del rango aceptado que es de 1,8 – 2,0 (Somma, 2010), los valores

promedios obtenidos oscilan entre 1,030 y 1,062 (figura 7), lo que nos indica que nuestras muestras se encuentran contaminadas con proteínas.

La contaminación protéica puede deberse a que en el procedimiento de extracción, el volumen con el que se trabaja es pequeño, y en cada proceso de lavado se pierde muestra especialmente durante la separación de los sobrenadantes. Al trabajar con muestras tan pequeñas lo que se busca es recuperar la mayor cantidad de DNA posible, especialmente en el diagnóstico de casos con carga parasitaria muy baja. Por lo tanto en el proceso de aislamiento del DNA existe la posibilidad de que la muestra este contaminada con proteínas, siendo este aspecto contradictorio ya que por obtener mayor cantidad de DNA se llega a obtener muestras contaminadas con proteínas. Afortunadamente el protocolo de PCR contempla un paso inicial de 3 minutos a 94°C que permitirá desnaturalizar las proteínas.

En los tres protocolos se precipitó el DNA con etanol absoluto, por el volumen aproximado de 10 μ L de muestra, al trabajar con este reactivo no logramos ver el DNA extraído, razón por la cual en estas muestras los lavados con etanol 70% se redujeron de tres a un solo lavado para no perder muestra en cada lavado.

Analizados los resultados de esta fase experimental y tomando en cuenta la concentración de DNA obtenida, y la ventaja de poder tomar la totalidad de la muestra del frotis se definió que el método de SLPK era el método más adecuado para obtener DNA a partir de frotis teñidos con Giemsa.

En este estudio utilizar como diluyente sangre anticoagulada, no permite determinar cual sería la concentración de DNA que obtendríamos al utilizar promastigotes diluidos en su mismo medio de cultivo. Por lo tanto hicimos el mismo experimento a las concentraciones antes definidas del parásito y del método de extracción de SLPK. En la tabla 5 se muestra que la pureza del DNA obtenido se encuentra en un rango de pureza de 1,058 a 1,051 y que las

concentraciones fluctúan desde 0,532 ng/ μ L (200 parásitos/10 μ L) a 0,034 ng/ μ L (1 parásito/10 μ L), siendo estos valores bajos para realizar una prueba de PCR, teniendo en cuenta que las cantidades mínimas de DNA bacteriano o de parásito para realizar un PCR son de 1 a 10 ng/ μ L (Family Brochure, 2006).

Una vez conocidas las ventajas y desventajas que tienen los métodos de extracción en cuanto a criterios de tiempo, de la concentración y pureza obtenida se realizó una prueba de funcionalidad. Para esto se sometieron las muestras de DNA a la PCR.

Se trabajó con los reactivos y condiciones de reacción de PCR para *Leishmania* establecidos por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto SELADIS, los resultados que obtuvimos a partir de los frotis de parásitos diluidos en sangre anticoagulada dieron positivos por los tres métodos de extracción de DNA hasta la mínima dilución de 5 parásitos (Tabla 11).

También se observó que los tres métodos dieron resultados falsos negativos a la concentración de 2 parásitos por frotis. A esta concentración, si bien el método del Kit Comercial Wizard Genomic era el que mostró mayor pureza de los tres métodos evaluados, también se observó que sistemáticamente dio resultados falsos negativos en cada una de las concentraciones de parásitos evaluadas. El método de Boiling que habría mostrado un menor rendimiento y pureza, produjo resultados comparables a los del método de SLPK, con la excepción que una muestra a la concentración de 200 parásitos dio un resultado falso negativo. Este fue otro factor que incidió en la toma de decisiones para afirmar que el método SLPK era el método más conveniente para extraer DNA a partir de frotis.

9.2. Rendimiento de la extracción de DNA de *Leishmania sp* a partir de frotis de lesión

Una vez elegido el método de SLPK, como el mejor método para obtener DNA a partir de frotis teñidos con Giemsa, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica de este método en relación a frotis de lesión de pacientes teñidos con Giemsa.

Luego del proceso de extracción de DNA a partir de los frotis, se determinó que el promedio de DNA total obtenido es de 20,8 ng/ μ L (tabla 12), concentración menor a la que se obtuvo en el ensayo de dilución de parásitos con sangre, esto se debe a que en la punción con el escarbadietes no se toman muchas células sanguíneas, y en su mayoría corresponden a células epiteliales, macrófagos residentes y fibroblastos. El promedio de pureza de DNA obtenido a partir de estas muestras fue de 1,078, este valor fue superior a los encontrados en los frotis de sangre (promedio de 1,042 para SLPK), esto se debe al hecho de que en los frotis de lesión existe menor cantidad de células sanguíneas y por lo tanto menor cantidad de proteínas y hemoglobina durante el proceso de extracción de DNA.

9.3. Comparación de los resultados de PCR de frotis de lesión para *Leishmania sp.* con los exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis

Una vez obtenidas las muestras se procedió a realizar la PCR, y los resultados obtenidos se compararon con los resultados del frotis que para fines de investigación fue considerado como Gold Standard, también se comparó con los resultados del PCR convencional que se utiliza en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto SELADIS

Para este estudio se tenía un total de veinticinco pacientes con frotis de lesión y de ellos quince habían solicitado además la realización del PCR convencional.

En el análisis de los resultados de PCR del método SLPK, los resultados de los quince pacientes con frotis y PCR convencional muestra que el método evaluado reportó un resultado falso positivo y un resultado falso negativo, por su parte el PCR convencional mostró dos falsos positivos y un falso negativo.

Otro hallazgo interesante, fueron los pacientes 7, 8 y 10 en los cuales ambos métodos de PCR dieron resultados positivos cuando el frotis era negativo, por lo que podemos asumir que esos frotis eran en realidad positivos y que tenían una baja cantidad de parásitos, también se atribuye al hecho de que el frotis presenta una sensibilidad promedio del 43% (Morales, 2008); estos pacientes para fines de análisis de Sensibilidad fueron considerados como positivos.

Interesantemente, se observó que ambos métodos de PCR dieron resultados falsos negativos en pacientes que eran frotis positivos (++) . En el caso del PCR convencional el resultado falso negativo fue en una muestra de DNA obtenida a partir de sangre venosa y debemos tener en cuenta que el realizar un diagnóstico de PCR en sangre para *Leishmania* es más dificultoso, por la baja probabilidad que existe de encontrar amastigotes en circulación.

En el análisis de la Sensibilidad del PCR del método SLPK con los veinticinco pacientes estudiados mostró tener una Sensibilidad del 93% ya que de los catorce pacientes con frotis positivos se observó un solo caso de resultado falso negativo, este parámetro es similar a los demostrados por Al Jawabreh el 2006 que presentó un 87%, Volpini el 2006 con un rango de 70% a 94% quien trabajó con primers específicos para el DNA kinetoplastidae, y Kazemi – Rad el 2008 con un 90% cuyo trabajo se realizó con primers correspondientes a regiones del rRNA. Nuestros hallazgos fueron obtenidos trabajando con primers 13A y 13B correspondientes al DNA kinetoplastidae, para aportar más datos estadísticos a la utilidad del PCR a partir de frotis sería conveniente la realización de un estudio con mayor número de muestras y la evaluación de otros tipos de

primers utilizados para *Leishmania* y que son útiles no sólo para la determinación del género sino también para la especie de *Leishmania* infectante, como por ejemplo primers para la amplificación de la secuencia de la glucoproteína 63, rRNA (Bensoussan y col., 2006) y para la proteína ribosomal L-14 para la identificación de *L. braziliensis* (Córdoba y col., 2005).

Contrariamente, la Especificidad diagnóstica es baja 45% ya que de once pacientes negativos por frotis seis fueron positivos por PCR SLPK. La Especificidad encontrada usando como Gold Standard resultados de frotis negativos puede ser objeto de duda debido a que como antes se mencionó, en pacientes con carga parasitaria baja el frotis puede dar resultados falsos negativos; como ejemplo se destaca que en el análisis de los nueve pacientes del subgrupo A con PCR positivo por dos métodos, tres mostraron ser falsos positivos (Sensibilidad del frotis = 66%).

Hallazgos similares fueron encontrados por Motazedian y col., 2002; quien atribuyo este tipo de resultados a formas inusuales o crónicas de las lesiones, en cuyos frotis la observación de amastigotes se hace dificultosa, siendo en estos casos de gran ayuda el diagnóstico de PCR a partir de los frotis de lesión.

También hay que tomar en cuenta que el dar un resultado falso negativo en microscopía es un hecho común ya que para el diagnóstico de leishmaniasis es necesario la observación por lo menos de un solo amastigote, y al realizar la lectura de estas placas no siempre se llega a cumplir la observación de todos los campos de la muestra en el portaobjetos, principalmente debido al cansancio en el microscopista. Otro factor es la presencia de una gran cantidad de otros microorganismos contaminantes, tejido de cicatrización y gran cantidad de células del sistema inmunitario que hacen difícil el reconocimiento de protozoarios de *Leishmania*, en estos casos se ha visto que es útil la PCR de frotis de lesión o de lesión directa para ayudar al diagnóstico (Motazedian y col., 2002).

10. CONCLUSIONES

- Se determinó que la concentración inicial de amastigotes de *Leishmania* en los 25 frotis de lesión de pacientes, presentaron resultados de: 8% recuento >50 amastigotes (+++), 20% recuento de 21 – 50 amastigotes (++) , 16% recuento de 1 – 20 amastigotes (+) y 56% de recuento negativo (-).
- En la extracción de DNA a partir de muestras de *Leishmania* con medio de cultivo Schneider mediante el método de SLPK, el rendimiento obtenido fue bajo encontrando valores en los rangos de 0,532 ng/ μ L (200 parásitos/10 μ L) a 0,034 ng/ μ L (1 parásito/10 μ L), siendo las cantidades mínimas de DNA bacteriano o de parásito para realizar un PCR de 1 a 10 ng/ μ L. Los índices de A260 nm/A280 nm muestran una clara contaminación proteica con rangos de pureza de 1,058 a 1,051.
- Se estandarizaron tres protocolos de extracción de DNA, el método de SLPK presentó mayores ventajas: 1ro La colección de las muestras de extendidos por raspado con hojas de bisturí es más fácil con ayuda de la solución de lisis, ya que el detergente tritón 100X que contiene permite que la totalidad de la muestra sea arrastrada al fondo del tubo eppendorf para su procesamiento. 2do Los valores obtenidos de promedios de concentraciones y purzas de las muestras de DNA, son aceptables en relación a los otros dos métodos de extracción.
- Los resultados de la PCR para *Leishmania sp.* utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre, muestran que el método de SLPK presenta el menor número de resultados falsos negativos y muestra más casos verdaderos positivos hasta la mínima dilución de dos parásitos en sangre.
- La concentración promedio de DNA obtenido a partir de los frotis de lesión de pacientes mediante el método SLPK, fue de 20,8 ng/ μ L resultado bajo en comparación a los obtenidos a partir de suspensiones

de parásitos con sangre, también se observó que el promedio de pureza obtenida era de 1,078.

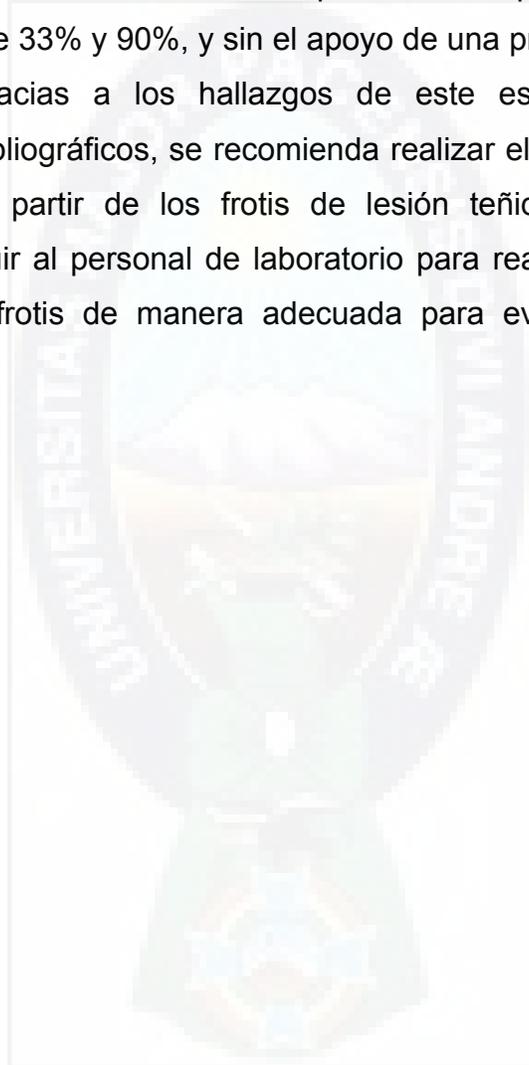
- De los veinticinco resultados observados entre el PCR SLPK y el examen directo parasitológico, trece fueron casos verdaderos positivos, un falso negativo, seis falsos positivos y cinco verdaderos negativos, tomando en cuenta en los casos correspondientes los resultados del PCR convencional.
- Se determinó que la Sensibilidad y Especificidad del método SLPK eran de 93% y 45% respectivamente, siendo el Valor predictivo positivo de 68% y el Valor predictivo negativo de 84%; también se determinó que el grado de correlación entre el método SLPK y el Examen directo parasitológico según el Índice Kappa fue Moderado de 0,403 ($p < 0,005$).

Conclusión General:

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que la obtención de material genético de *Leishmania sp.* a partir de frotis teñidos con Giemsa es una buena opción para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de pacientes con leishmaniasis. También se determinó que es una herramienta útil para el diagnóstico de pacientes en los cuales tienen una carga parasitaria baja y en los cuales el diagnóstico por Examen parasitológico directo puede dar falsos negativos.

11. RECOMENDACIONES

En la mayoría de los casos en los hospitales o postas médicas de las poblaciones endémicas para leishmaniasis el diagnóstico y el control del tratamiento leishmanicida se realiza por Examen parasitológico directo con sensibilidad entre 33% y 90%, y sin el apoyo de una prueba molecular de mayor sensibilidad. Gracias a los hallazgos de este estudio y en base a los antecedentes bibliográficos, se recomienda realizar el diagnóstico molecular de leishmaniasis a partir de los frotis de lesión teñidos con Giemsa; siendo importante instruir al personal de laboratorio para realizar una buena tinción y secado de los frotis de manera adecuada para evitar las contaminaciones cruzadas.



11. BIBLIOGRAFIA

AL-JAWABREH A; SCHOENIAN G; HAMARSHEH O; PRESBER W. **Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears.** Acta Tropica. Vol 99. No 1. pp 55-61. 2006

BENSOUSSAN E; NASEREDDIN A; JONAS F; SCHNUR L; JAFFE C. **Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** Journal of Clinical Microbiology. Vol 44. No 4. pp 1435 – 1439. 2006

BOBBIO MILKO. **Leishmaniasis Cutánea – Andina en el Distrito de Quinocay, Provincia de Yauyos, Lima.** Anales de la Facultad de Medicina. Vol 61. No 002. pp 142 – 145. 2000

BONILLA D. **Respuesta inmune a la leishmaniasis: algo más que linfocitos T.** Piel. Vol 20. No 8. pp 383- 395. 2005.

CHIEN A; EDGAR D; TRELA J. **Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile Thermus aquaticus.** Journal of Bacteriology. Vol 127. No 3. pp 1550-1557. 1976.

CÓRDOBA E; PIÑERO E; GONZÁLEZ A; VALLADARES B; LIZARRALDE M; O SALOMÓN. **Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction.** Memories of Institute Oswaldo Cruz. Vol 100. No 2. pp 187-192. 2005.

CORVALÁN A. **Biología molecular en Infectología. Parte I: desarrollo y metodologías.** Revista Chilena de Infectología. Vol 19. No 1. pp 14 – 24. 2002.

CUBA CUBA CÉSAR AUGUSTO. **DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA.** Revista Medica. No 17. 2000.

FAMILY BROCHURE PCR. **PCR Applications Manual.** 3ra Ed. 2006. www.roche-applied-science.com

FOLGUEIRA C. **Los genes *HSP70* de *Leishmania*: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen *HSP70-II*.** Universidad Autónoma de Madrid – Departamento de Biología Molecular. 2006.

FRANKE E, MCGREEVY P, KATZ S, SACKS D. **Growth cycle-dependent generation of complement resistant *Leishmania* promastigotes.** The Journal of Immunology. No 134. pp 2713 – 2718. 1985.

GARCÍA D. **LEISHMANIASIS CUTÁNEA: ESTUDIO EN EL ÁREA SANITARIA DE TOLEDO. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.** Facultad de Medicina. Departamento de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología. Tesis doctoral. 2004.

GONZÁLEZ F, ZERPA O. **Leishmaniasis cutánea en la infancia.** Dermatología y Pediatría Latinoamericana. Vol 2. No 2. 2004.

HALL L; TITUS R. **Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production.** Journal of Immunology. Vol 155. pp 3501- 3506. 1995.

HERNÁNDEZ-RUIZ J; BECKER I. **Linfocitos T citotóxicos CD8+en la leishmaniasis cutánea.** Salud Pública de México. Vol 48. No 5. 2006.

HORST G. **Fundamentos de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) e Introducción al PCR tiempo real y su aplicación en el diagnóstico de ISAv.** Seminario Biovac: "Fundamentos de PCR tiempo real e interpretación de resultados del diagnóstico de ISAV". Biovac. 2008.

IPGRI; CORNELL UNIVERSITY. **Tecnologías basadas en la PCR - Fundamentos de la PCR.** Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje - Tecnologías basadas en el ADN. 2003.

KAMBLE R; SHINDE V; MADHALE S; KAMBLE A; RAVIKUMAR B; JADHAV R. **Extraction and detection of Mycobacterium leprae DNA from ZNCF – stained skin smear slides for better identification of negative skin smears.** Indian Journal of Medical Microbiology. Vol 28. No 1. pp 57 – 59. 2010.

KAZEMI-RAD E; MOHEBALI M; HAJJARAN H; REZAEI S; MAMISHI S. **Diagnosis and Characterization of Leishmania Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP.** Iranian J Publ Health. Vol 37. No1. pp 54-60. 2008.

LASKAY T; MIKO T; NEGESSE Y; SOLBACH W; ROLLINGHO V; FROMMEL D. **Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol 89. pp 273–275. 1995.

Ministerio de Salud del Perú. Oficina General de Epidemiología. Instituto Nacional de Salud. **LEISHMANIASIS. Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos N° 8.** 2000.

Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia. Unidad de Epidemiología. Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis. **LEISHMANIASIS Guía operativa para el control en Bolivia.** Primera Edición. 2007

MORALES J. **Aspectos dermatológicos de la leishmaniasis.** Área Epidemiología – departamento de Control de vectores. Jujuy – Argentina. 2008. <http://www.fcm.uncu.edu.ar/medicina/posgrado/dermatologia/teoricos/Leishmaniasis.pdf>

MORALES M. **Epidemiología molecular de la coinfección por “Leishmania”- VIH.** Universidad Complutense de Madrid - Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid. 2002.

MOREIRA D; LOPEZ-GARCIA P; VICKERMAN K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class *Kinetoplastea*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol 54. pp 1861-1875. 2004.

MOTAZEDIAN H; KARAMIAN M; NOYES H. A.† ; ARDEHALI S. **DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR.** Annals of Tropical Medicine & Parasitology. Vol 96. No 1. 2002.

MURRAY H; BERMAN J; DAVIES C; SARAVIA N. **Advances in leishmaniasis.** Lancet. Vol 366. pp 1561– 1577. 2005.

NAIFF R. **A scarifier for obtaining specimens for diagnosis of leishmaniasis and other skin infections.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol 92. No 87. 1997.

PEREIRA A; PÉREZ M. **Leishmaniosis.** OFFARM. Vol 21. No 9. 2002.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LEISHMANIASIS. SNIS – Ministerio de Salud. Bolivia. 2008. <http://www.sns.gov.bo/WEB/DOCUMENTOS/112%20LEISHMANIASIS.pdf>

RODGERS M; POPPER S; WIRTH D. **Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*.** Experimental Parasitology. Vol 71. pp 267–275. 1990.

RONDÓN A, REYES O, ULRICH M, TAPIA F. Instituto Nacional de Biomedicina, **Leishmaniasis Cutáneo Mucosa.** Dermatología Venezolana. 2006.

ROVID A. The Center for Food Security and Public Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. **Leishmaniasis (cutaneous and visceral).** 2009

SÁNCHEZ L; SÁENZ E; PANCORBO J; ZEGARRA R; GARCÉS N; REGIS A. **Leishmaniasis**. Dermatología Peruana. Vol 14. No 2. 2004.

SCOPEL K; FONTES C; NUNES A; HORTA M; BRAGA E. **Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region**. BioMed Central - Malaria Journal. Vol 3. No 8. 2004

SIMPSON L. **Structure and function of Kinetoplast DNA**. 1972. <http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab%20publications/oldreview.pdf>

SIU K, BOVIS L. MATURA R, BAIXIN Z, SUHUI H, HAZEL L, SALVATORE J. **Leishmania Lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: Modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants**. The Journal of Immunology. No 160. pp 1857 – 1865. 1998.

SOMMA M. **Sesión nº 4 Extracción y Purificación de ADN**. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Organización Mundial de la Salud. Oficina Regional para Europa. 2010.

VAN ZANDBERGEN G; KLINGER M; MUELLER A; DANNENBERG S; GEBERT A; SOLBACH W; LASKAY T. **Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages**. Journal of Immunology. Vol 173. pp 6521-6525. 2004.

VOLPINI A. MARQUES M. LOPES DOS SANTOS S. MACHADO-COELHO G. MAYRINK W. ROMANHA A. **Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years**. Clinical Microbiology and Infection. Vol 12. No 8. 2006.

Wikipedia, the free encyclopedia. **Leishmania**. 2011. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg

WILLIAM H; MARKLE M; KHALDOUN M. **Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment**. American Family Physician. Vol 69. No 6. 2004.

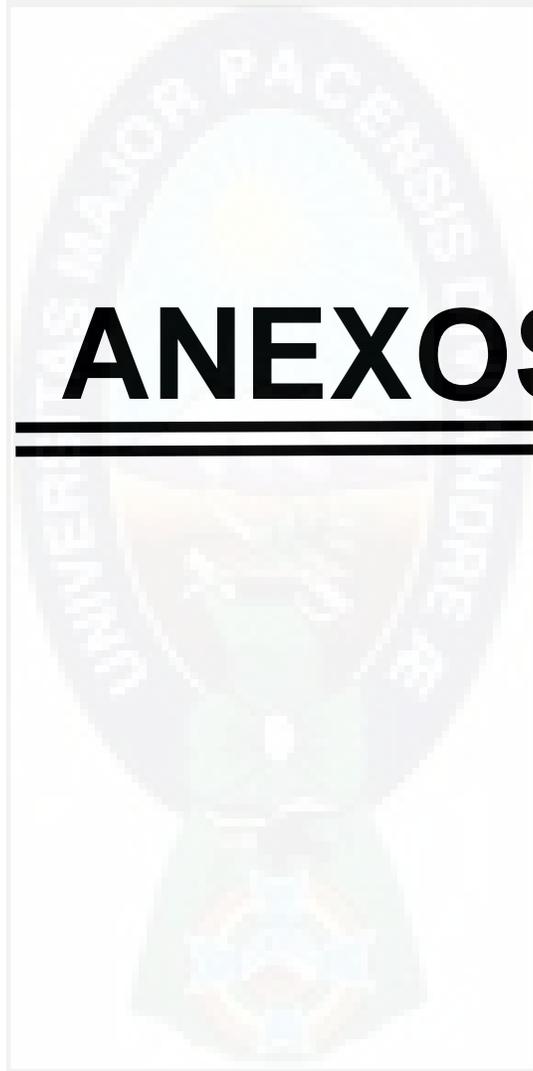
YOKOTA M; TATSUMI N; TSUDA I; YANO I. **DNA extraction and amplification from giemsa-stained blood smears**. Journal of Clinical Laboratory Analysis. Vol 9. No 6. pp 387 – 391. 1995.

ZERPA O; BORGES R; LOYO N; GALINDO W; BELISARIO D; RODRÍGUEZ N; SOSA A; CONVIT J. **Comparacion de cinco metodos para el diagnostico de leishmaniasis cutanea**. Dermatologia Venezolana. Vol 40. No 4. 2002

ZULUAGA M, ROBLEDO S. **Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis.** Biomédica. No 24. pp 302 – 317. 2004.

ZURITA A. **Búsqueda de proteínas antigénicas de Leishmania braziliensis. Aislamiento, caracterización génica y utilidad serodiagnóstica de la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70).** Universidad de la Laguna - Departamento de Parasitología, Ecología y Genética. 2003.





ANEXOS

Anexo 1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION A LOS PARTICIPANTES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“DETERMINACION DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgE-ANTI LEISHMANIA, NIVELES DE EOSINÓFILOS Y MONOCITOS COMO RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE DNA DE LEISHMANIA A PARTIR DE FROTIS DE LESIÓN”

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad que en el mundo afecta a entre 1,5 y 2 millones de personas al año, dependiendo de la especie que circula en una determinada zona endémica produce manifestaciones cutáneas, mucocutáneas y viscerales. Se considera una enfermedad infecciosa, no contagiosa. Es causada por parásitos del género *Leishmania*; además, es una enfermedad compleja que puede infectar a los bolivianos que viven o desarrollan actividades laborales en las áreas tropicales y sub-tropicales de nuestro país. La importante migración indígena de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria del bosque tropical, son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad haciendo que cada vez tenga mayor expansión geográfica y mayor magnitud cobrando notable importancia en la Salud Pública, esta enfermedad es transmitida por la picadura de un insecto vector del género *Lutzomyia*, que afecta a seres humanos y otras especies de mamíferos. Para hacer un buen tratamiento de la enfermedad es necesario contar con pruebas de laboratorio que identifiquen eficientemente al parásito de *Leishmania* y para saber si un paciente se ha curado realmente de la enfermedad se requiere de métodos de laboratorio capaces de predecir que el parásito ha sido eliminado del organismo del paciente, lamentablemente los métodos con los que actualmente se cuenta no cubren al 100% estas necesidades por eso que el presente estudio pretende incorporar otros marcadores laboratoriales que coadyuven a las necesidades antes mencionadas.

¿Cuáles son los objetivos de este estudio?

En este estudio nos hemos planteado investigar lo siguiente:

- Determinar el valor diagnóstico de los niveles de anticuerpos IgE anti-*Leishmania* y los niveles de eosinófilos y monocitos como respuesta al tratamiento anti-*Leishmania*.
- Cuantificar los niveles de anticuerpos IgE anti -*Leishmania*.
- Cuantificar los niveles de monocitos y eosinófilos a partir de sangre periférica en frotis de lesión de los pacientes que han recibido tratamiento leishmanicida.
- Determinar la capacidad fagocítica de los monocitos y eosinófilos de los pacientes que han recibido tratamiento leishmanicida.

¿Quién puede participar en el estudio?

Podrán participar en este estudio los pacientes que presenten diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Podrán ser incluidos en este estudio personas que se encuentran entre las edades de 18 y 55 años y que no hayan recibido tratamiento previo contra la enfermedad. Se excluirán del estudio a los pacientes que presenten las siguientes características: mujeres embarazadas y pacientes con antecedentes de enfermedades autoinmunes.

¿En qué consistirá participar en el estudio?

A los pacientes que participen en el estudio se les realizará una toma de muestra de 10mL de sangre periférica con heparina, esta toma de muestra se realizará dos veces, la primera será antes del tratamiento y la segunda posterior al cumplimiento de su tratamiento; en el caso de que el paciente presente una lesión cutánea se le realizará la toma de muestra de un frotis de la lesión.

Los resultados de los análisis (frotis de lesión y fluorescencia indirecta) se le harán conocer en un lapso no mayor a 48 Hrs. Para este fin se podrán contactar en la Unidad de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS con el Dr. Fernando Sosa o los Univ. Diego Bonifaz y José Luis Choquehuanca, al teléfono: 2222436.

¿Cuáles son los riesgos potenciales de su participación en este estudio?

La participación en este estudio no entraña riesgo alguno mas que el relacionado con la toma de muestra.

¿Se mantendrá la confidencialidad de su participación en este estudio?

Se garantiza mantener la confidencialidad de sus datos y siempre respetando los protocolos vigentes de bioética que están en actual vigencia en nuestro País.

Yo..... con CI
..... expedido en..... declaro que:

He recibido una explicación verbal de todos los alcances que el proyecto pretende.
He leído la hoja informativa que me ha sido entregada.
He tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el estudio.
He recibido respuestas satisfactorias.
He recibido suficiente información en relación con el estudio.
He hablado con los investigadores responsables del estudio
Entiendo que la participación es voluntaria.

También he sido informado(a) de forma clara, precisa y suficiente de los siguientes extremos que afectan a los datos personales que se contienen en este consentimiento y en la ficha o expediente que se abra para la investigación:

- Se me garantiza la confidencialidad de mis datos que serán tratados y custodiados con respeto a mi intimidad y a la vigente normativa de protección de datos.
- Sobre estos datos me asisten los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que podré ejercitar mediante solicitud ante el investigador responsable que figura en este documento.

Declaro que he leído y conozco el contenido del presente documento, comprendo los compromisos que asumo de los posibles riesgos de la toma de muestra y los acepto voluntariamente. Y, por ello, firmo este consentimiento informado para **MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR COMO MIEMBRO DE ESTE EQUIPO DE INVESTIGACIÓN SOBRE “DETERMINACION DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgE-ANTI LEISHMANIA, NIVELES DE EOSINÓFILOS Y MONOCITOS COMO RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE DNA DE LEISHMANIA A PARTIR DE FROTIS DE LESIÓN”** hasta que decida lo contrario. Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos como paciente. Recibiré una copia de este consentimiento para guardarlo y poder consultarlo en el futuro.

La Paz,..... dede 2010.

Firma
DONANTE

Firma
PROF. DE SALUD

Anexo 2.- RASPADO DE LOS FROTIS Y COLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO EN TUBOS EPPENDORF



ANEXO 3.- MATERIALES UTILIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA



MATERIALES UTILIZADOS PARA LA PCR





**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS**



EXTRACCIÓN DE DNA DE *Leishmania sp* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), A PARTIR DE FROTIS DE LESIÓN TEÑIDOS CON GIEMSA

POSTULANTE :

UNIV. DIEGO BONIFAZ PÉREZ

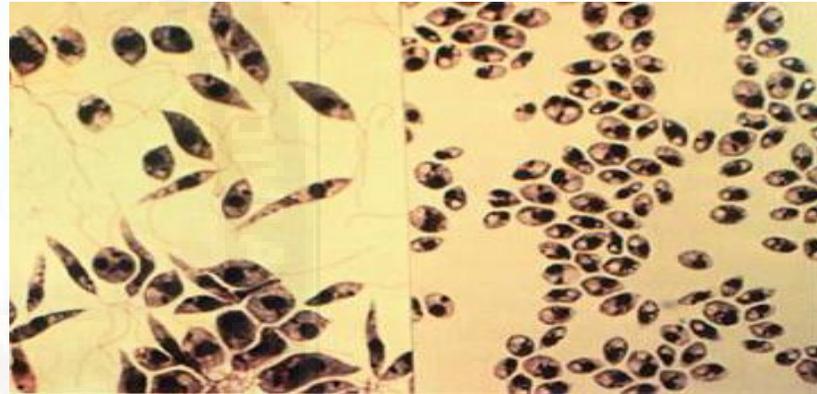
ASESOR:

Dr. LUIS FERNANDO SOSA

Leishmania y Leishmaniasis



Rey Jorge. LA LEISHMANIOSIS. 2007



Peters Wallace. The Leishmaniasis in Biology and medicine. 1987



Hernandez, Carlos. HISTORIA NATURAL DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOCUTÁNEA. 2006

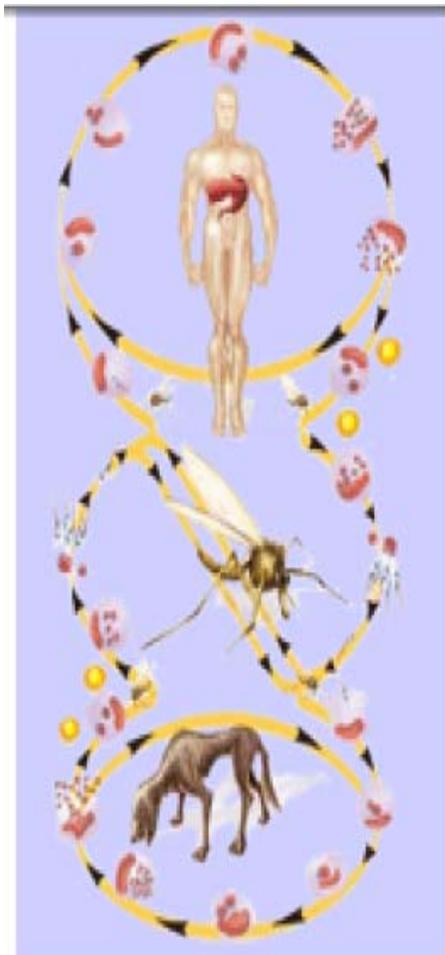


Hernandez, Carlos. HISTORIA NATURAL DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOCUTÁNEA. 2006

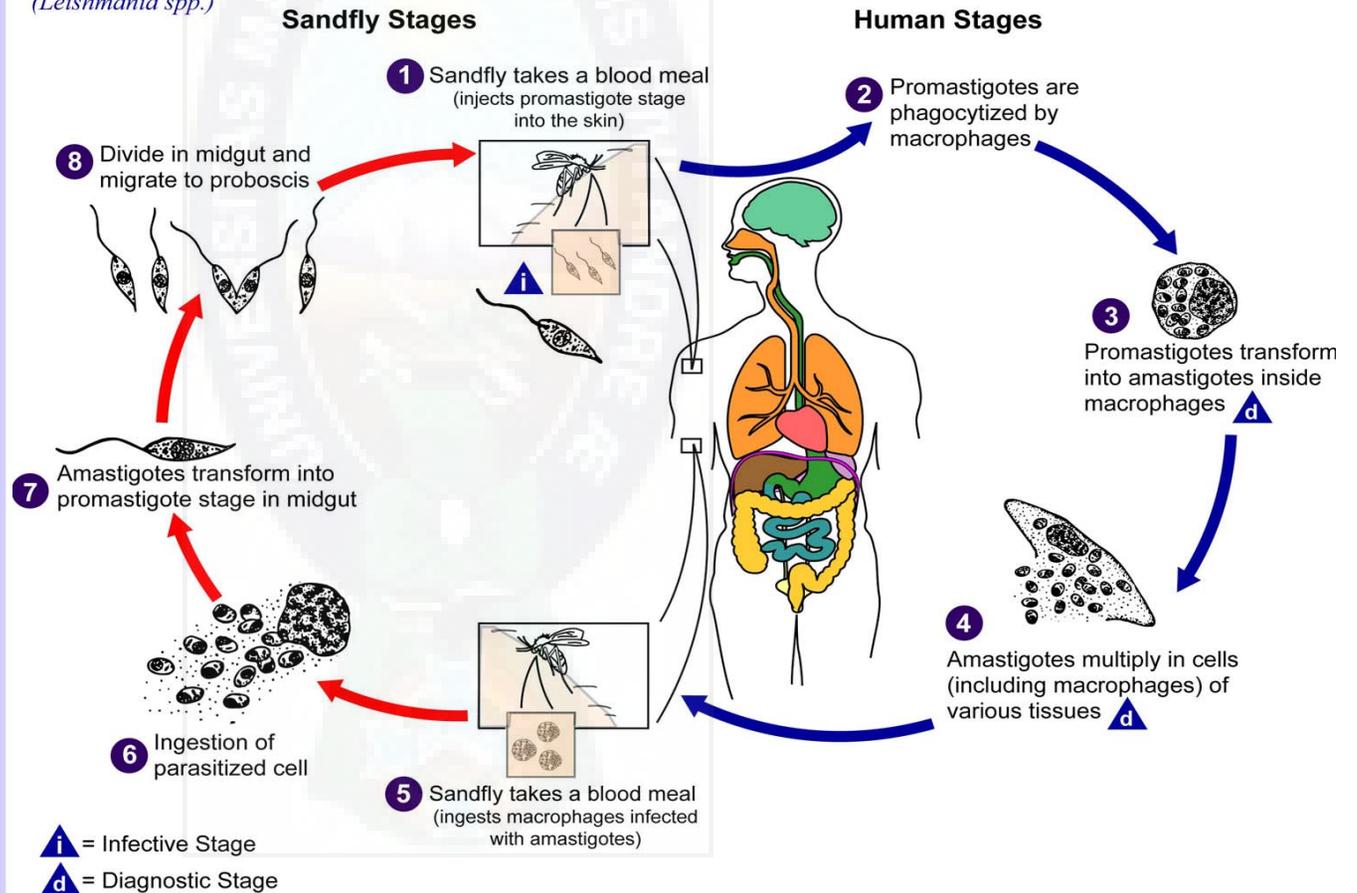


Peters Wallace. The Leishmaniasis in Biology and medicine. 1987

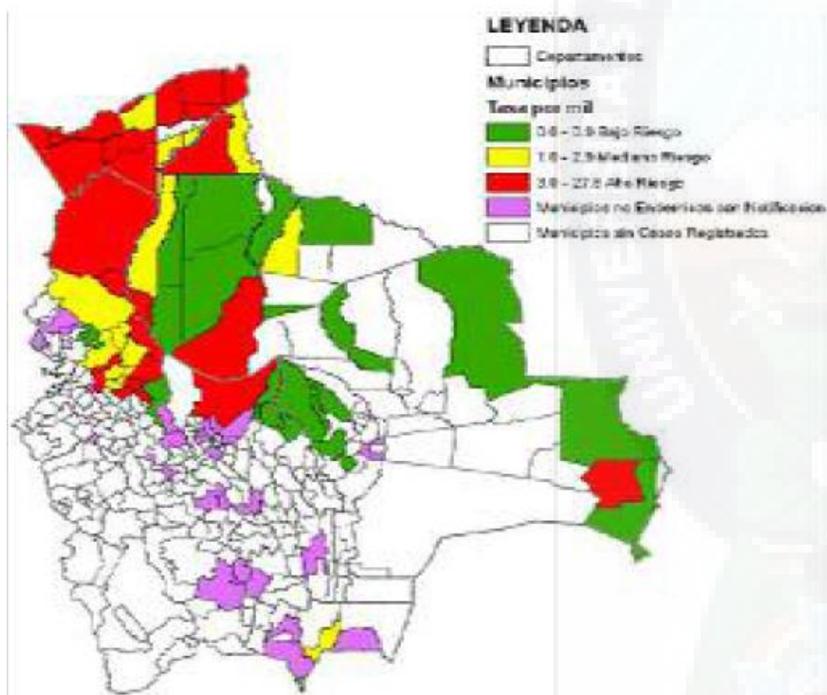
Ciclo de vida de *Leishmania*



Leishmaniasis (*Leishmania spp.*)

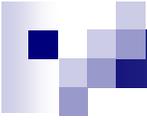


Epidemiología



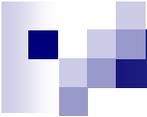
| Departamentos | GESTIÓN 2008 | | |
|--------------------|--------------|------------|-------------|
| | TOTAL-H | TOTAL-M | TOTAL |
| BENI | 371 | 130 | 501 |
| CHUQUISACA | 5 | 0 | 5 |
| COCHABAMBA | 180 | 64 | 244 |
| LA PAZ | 707 | 431 | 1138 |
| ORURO | 2 | 0 | 2 |
| PANDO | 249 | 75 | 324 |
| POTOSI | 2 | 1 | 3 |
| SANTA CRUZ | 20 | 9 | 29 |
| TARIJA | 19 | 8 | 27 |
| Total: | 1555 | 718 | 2273 |
| FUENTE SNIS | | | |

Programa Nacional de Control de Leishmaniasis. 2008



Justificación

- Por el predominio de la leishmaniasis en áreas tropicales y sub tropicales del país, la colonización de estas áreas por agricultores y madereros o el crecimiento de las comunidades rurales, se han incrementado los casos de leishmaniasis.
- Con el antecedente de que el frotis de lesión presenta una sensibilidad entre 33 % y 90 % en los casos de leishmaniasis, de que el cultivo celular es caro y poco accesible para fines de diagnóstico y que para garantizar un buen resultado por PCR, el paciente debe preferentemente trasladarse a la ciudad. En el presente trabajo nos proponemos estandarizar un procedimiento de extracción de DNA de *Leishmania* a partir de frotis teñidos con Giemsa.



Objetivo General

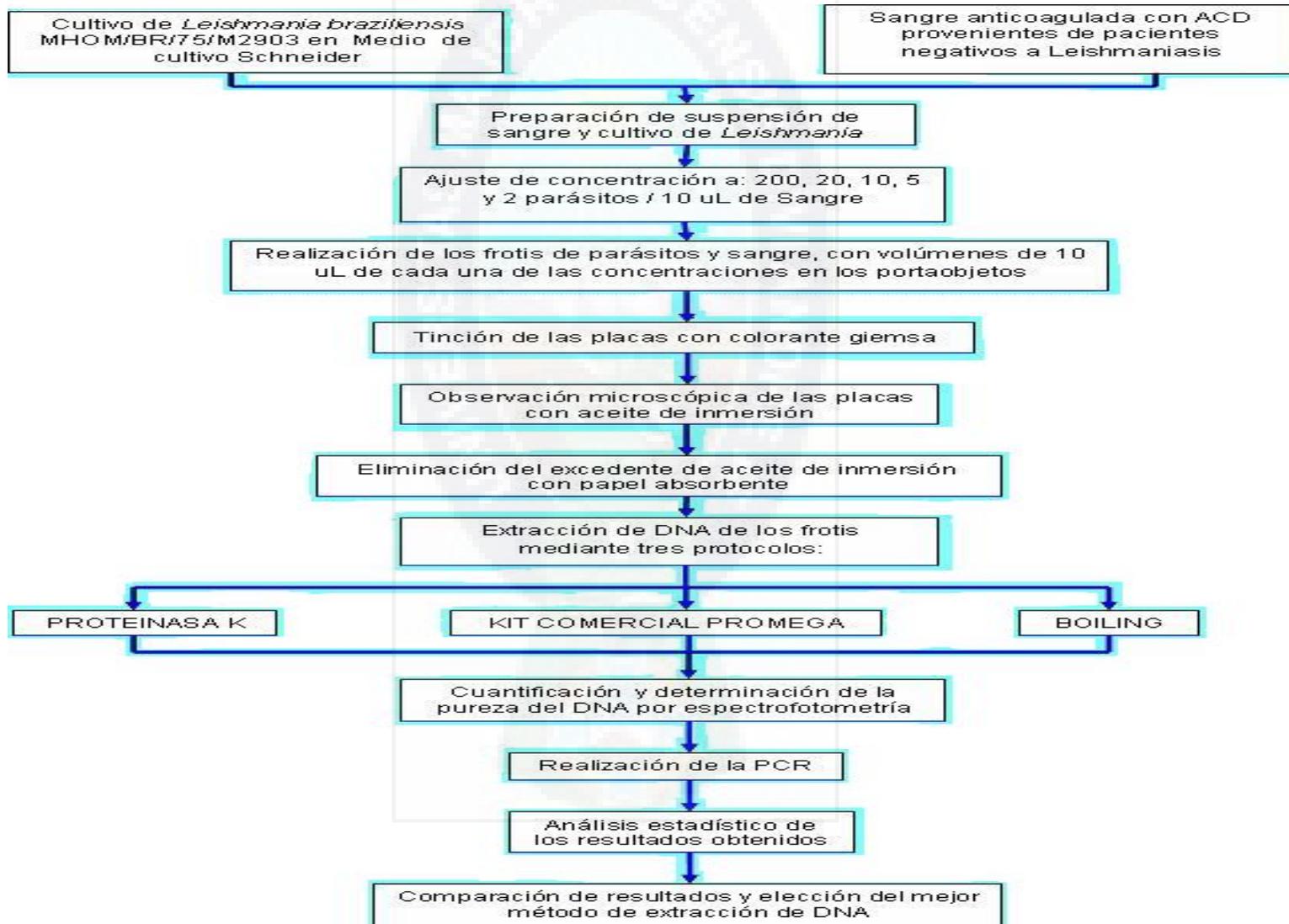
- Estandarizar un procedimiento de extracción de DNA de *Leishmania sp* para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa.

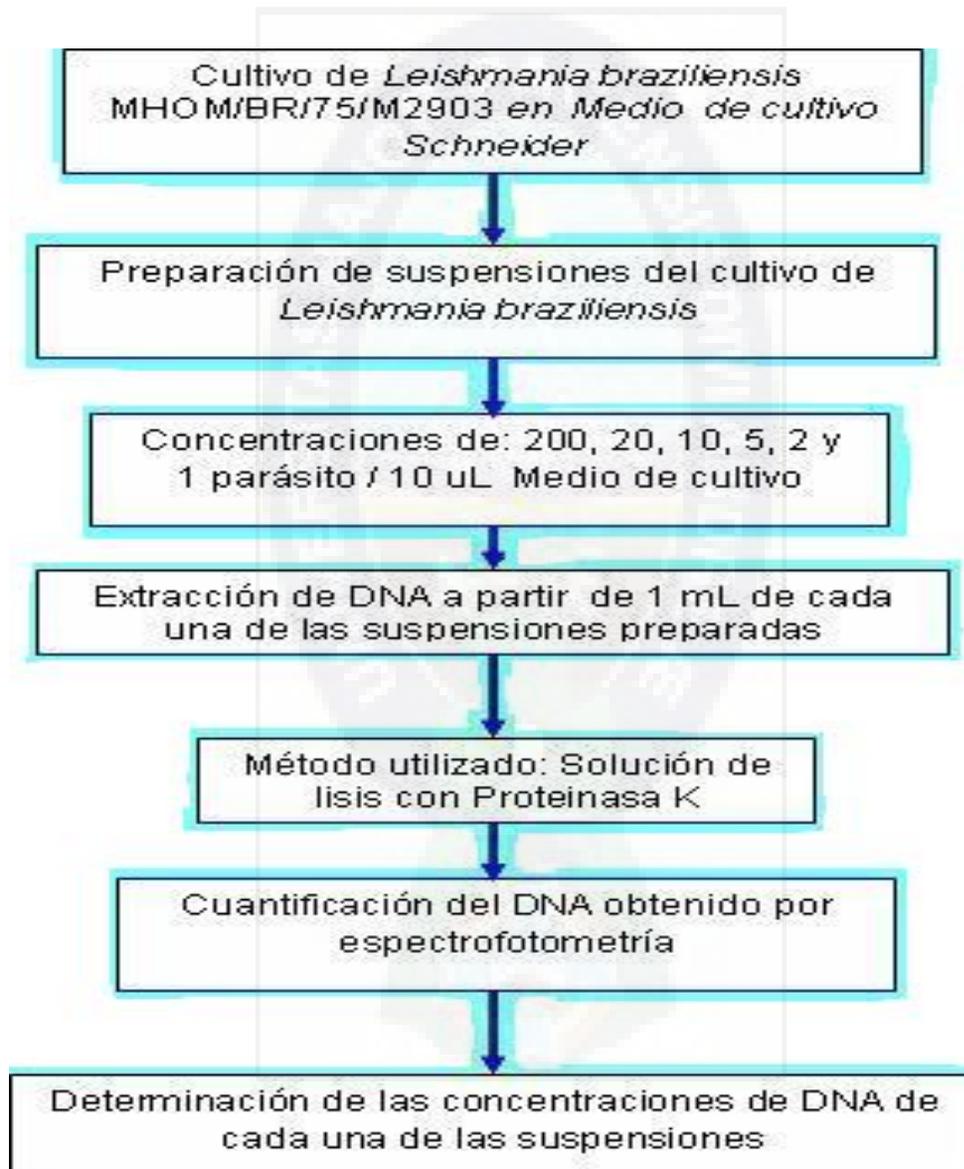
Objetivos Específicos :

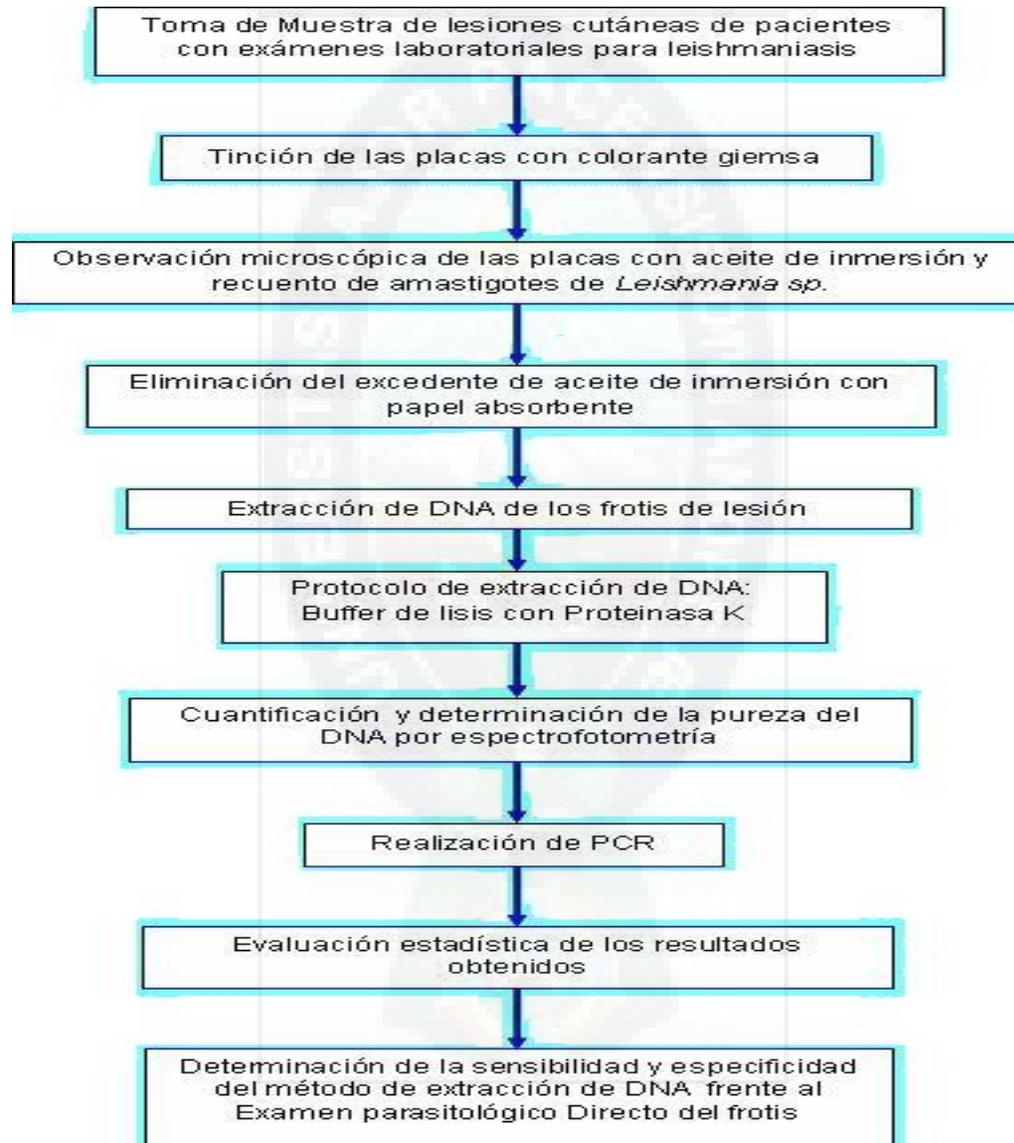
- Determinar la concentración inicial de parásitos en las muestras de frotis provenientes de lesión.
- Determinar la sensibilidad analítica de los métodos de extracción de DNA con muestras de *Leishmania* cultivadas en medio Schneider.

- 
- Estandarizar tres métodos de extracción de DNA a partir de frotis preparados de cultivo de *Leishmania* con sangre
 - Realizar PCR para *Leishmania sp.* utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre
 - Determinar la concentración y pureza del DNA proveniente de muestras de frotis de lesión de pacientes
 - Comparar los resultados de PCR de frotis de lesión obtenidos por el método de extracción DNA estandarizado, con los exámenes laboratoriales que se utilizan para el diagnóstico de leishmaniasis.
 - Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de extracción de DNA estandarizado

Procedimientos







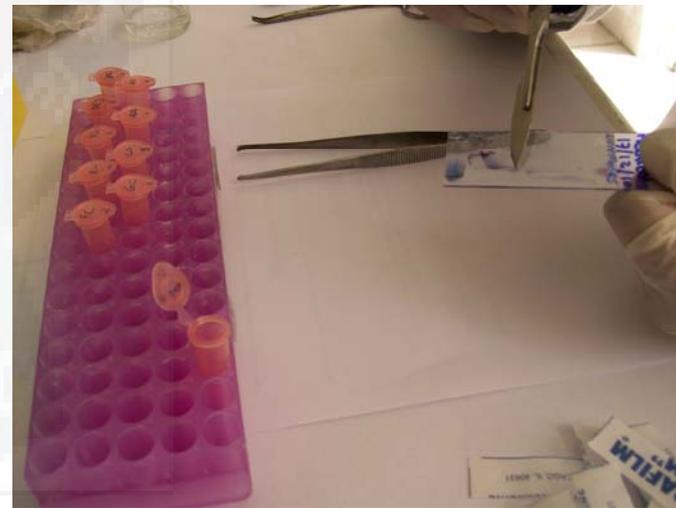
Resultados

Determinación de la concentración inicial de amastigotes de *Leishmania* en las muestras provenientes de frotis de lesión

| Recuento de Amastigotes | > 50 (+++) | 21-50 (++) | 1-20 (+) | 0 (-) | Total |
|-------------------------|------------|------------|----------|----------|-----------|
| Subgrupo A | 0 | 5 | 2 | 8 | 15 |
| Subgrupo B | 2 | 0 | 2 | 6 | 10 |
| Total | 2 (8%) | 5 (20%) | 4 (16%) | 14 (56%) | 25 (100%) |

Estandarización de tres métodos de extracción de DNA a partir de frotis preparados de suspensiones de *L. braziliensis* con sangre anticoagulada

Raspado de los frotis y colección del material biológico en tubos eppendorf



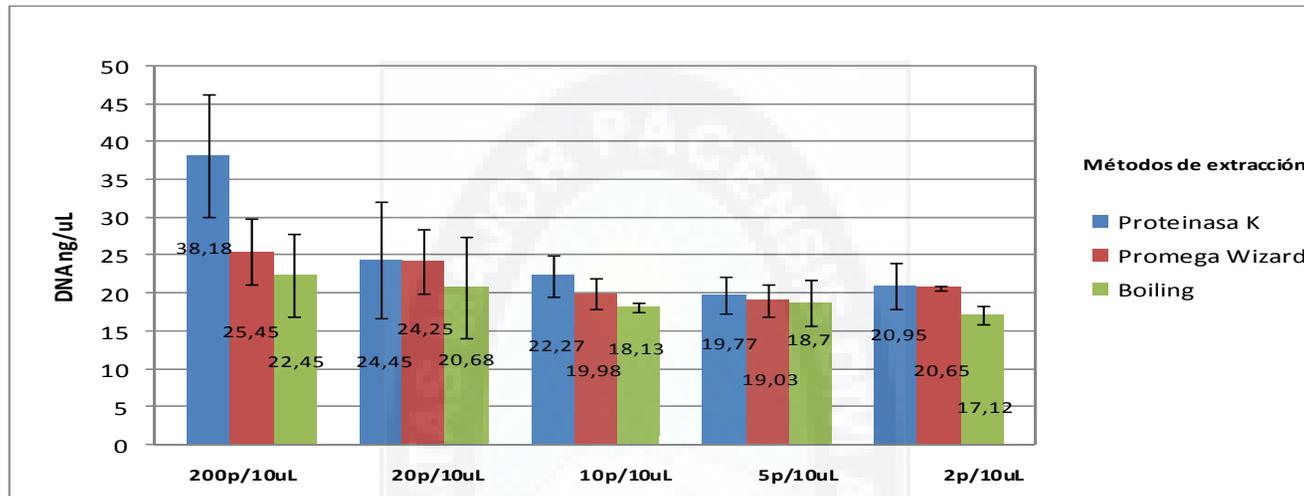


Figura 7. Comparación de la concentración de DNA de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA.

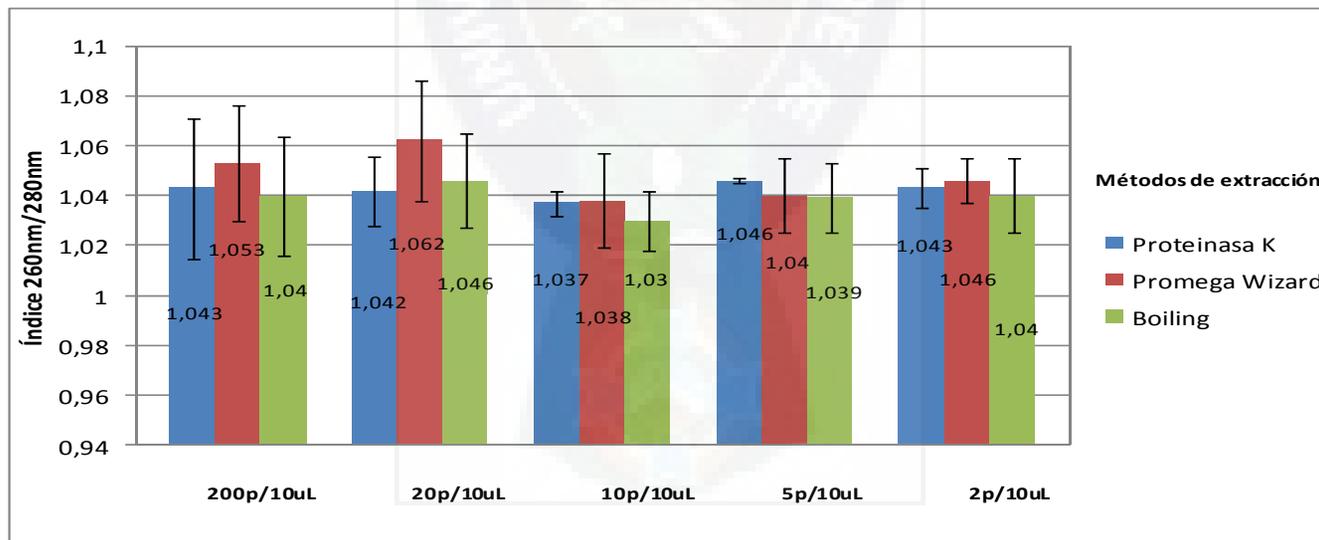


Figura 8. Comparación de la pureza de las muestras de DNA de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de DNA

Realización PCR para *Leishmania sp.* utilizando DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre

| | SLPK | KIT EXTRACCIÓN | BOILING |
|----------------------------|--|--|--|
| 200 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) |
| 20 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 10 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Negativo (-) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 5 parásitos/10 uL sangre | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Positivo (+) Positivo (+) Negativo (-) | Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |
| 2 parásitos/10 uL sangre | Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) | Negativo (-) Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Negativo (-) | Negativo (-) Negativo (-) Positivo (+) Positivo (+) Positivo (+) |

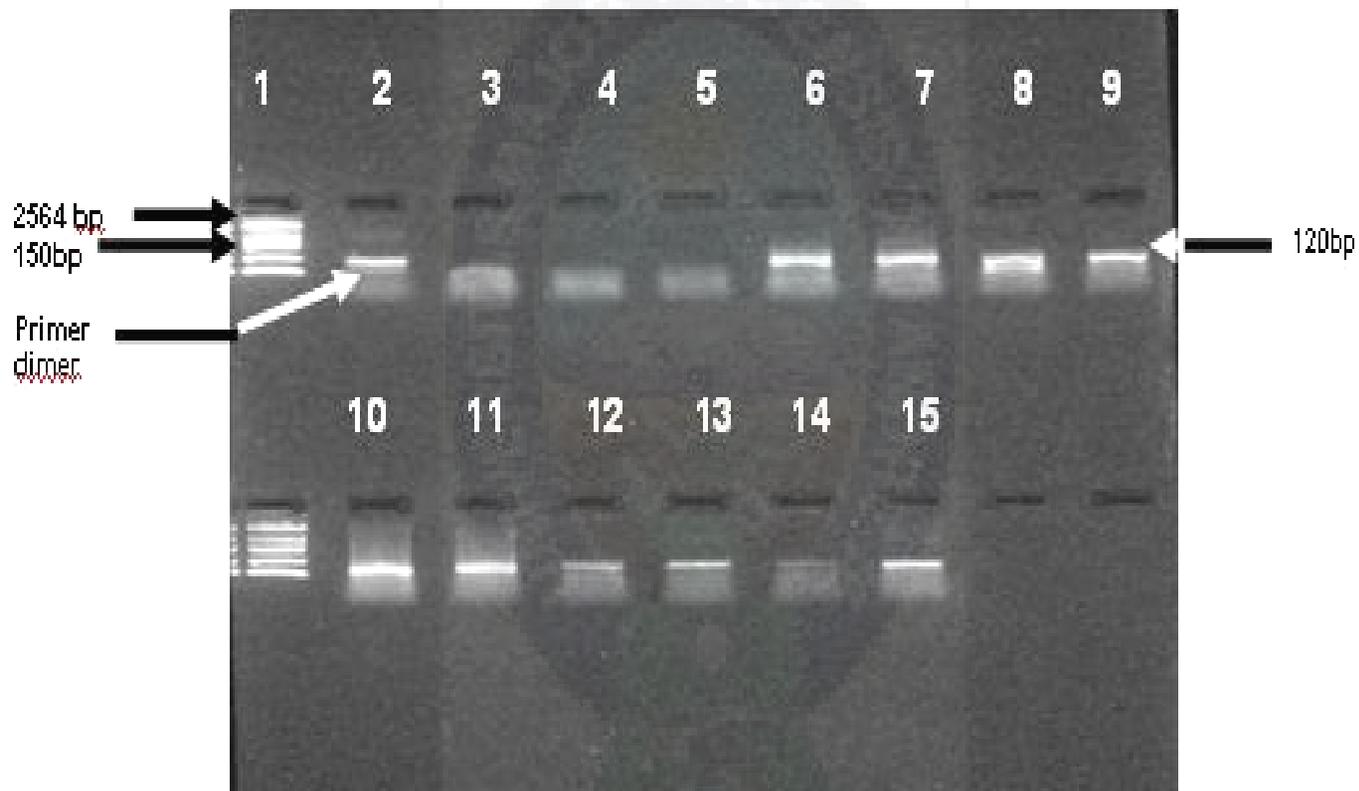


Figura 11. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK) de los frotis de *Leishmania* con sangre.

Determinación de la sensibilidad analítica de los métodos de extracción de DNA en muestras preparadas de *Leishmania* en medio de cultivo

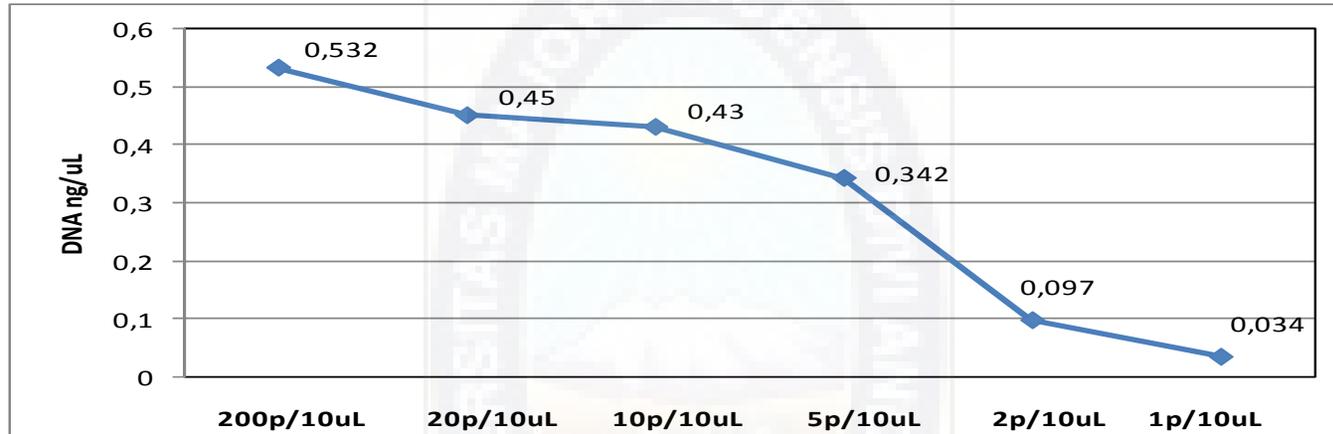


Figura 5. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de las diluciones de promastigotes de *L. braziliensis* con medio de cultivo Schneider.

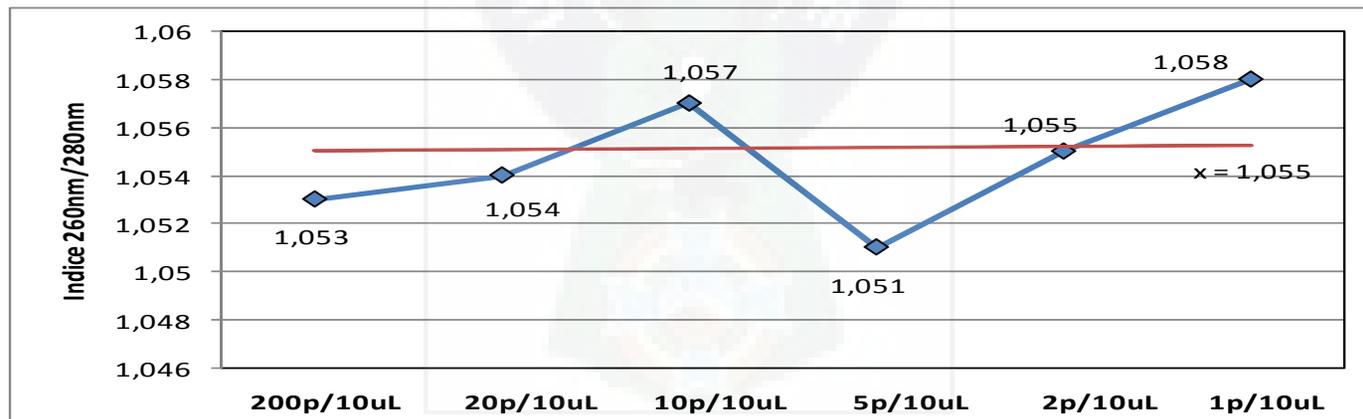


Figura 6. Comparación de los valores de pureza del DNA extraído a partir de diferentes concentraciones de promastigotes de *L. braziliensis* con medio de cultivo Schneider.

Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido de las muestras de frotis de lesión de pacientes

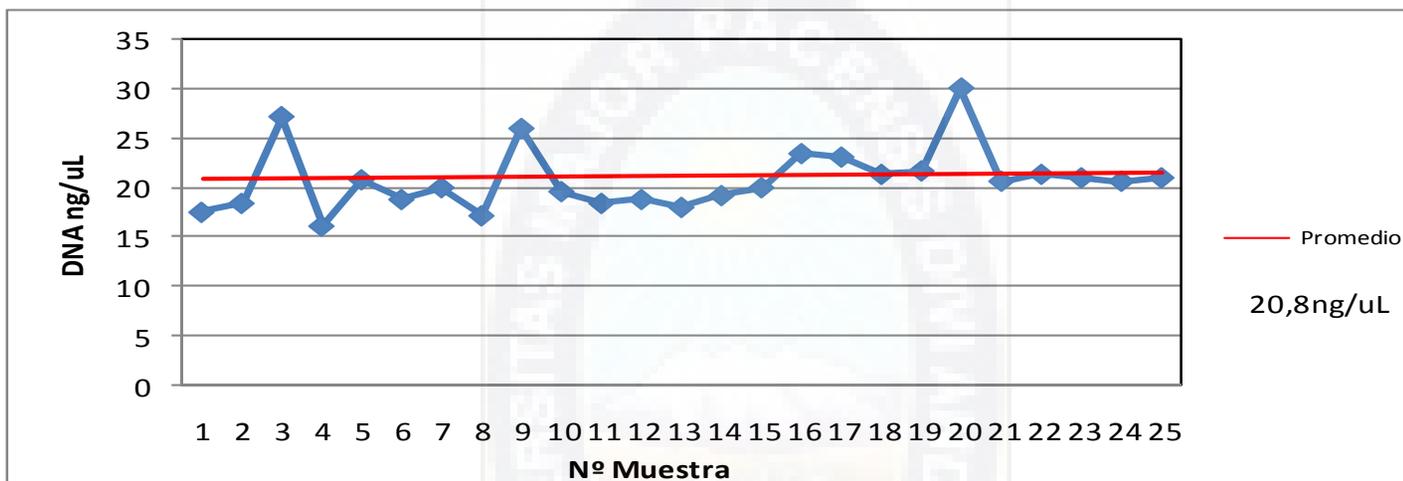


Figura 12. Comparación cuantitativa del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K

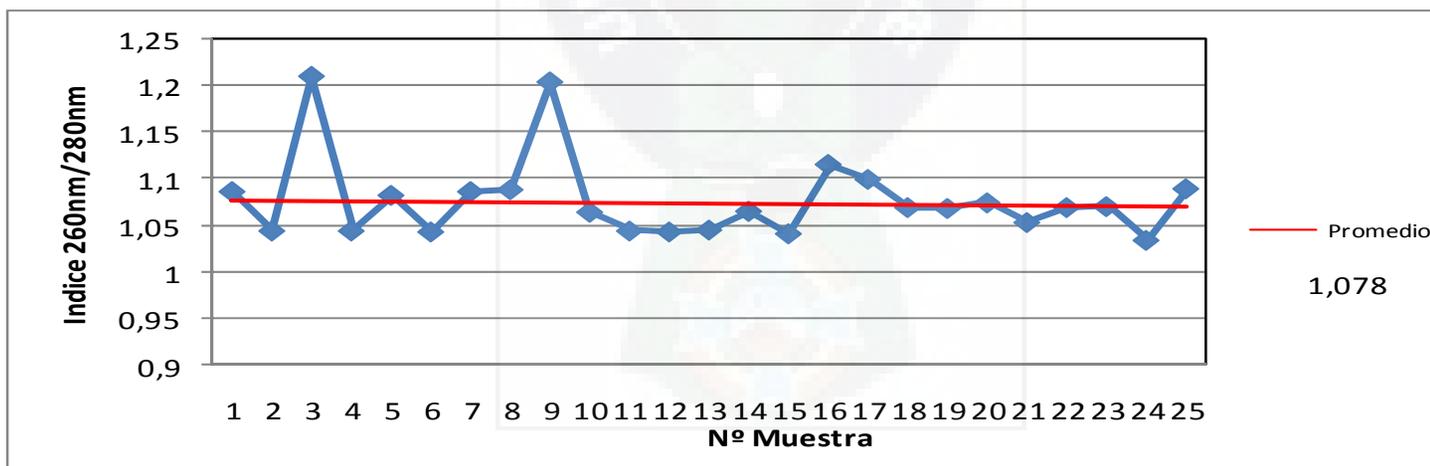


Figura 13. Comparación de los índices de pureza del DNA extraído a partir de los frotis de lesión de pacientes por el método de Solución de lisis con Proteinasa K

Comparación de los resultados de PCR de frotis de lesión para *Leishmania sp.* con los exámenes de laboratorios de rutina

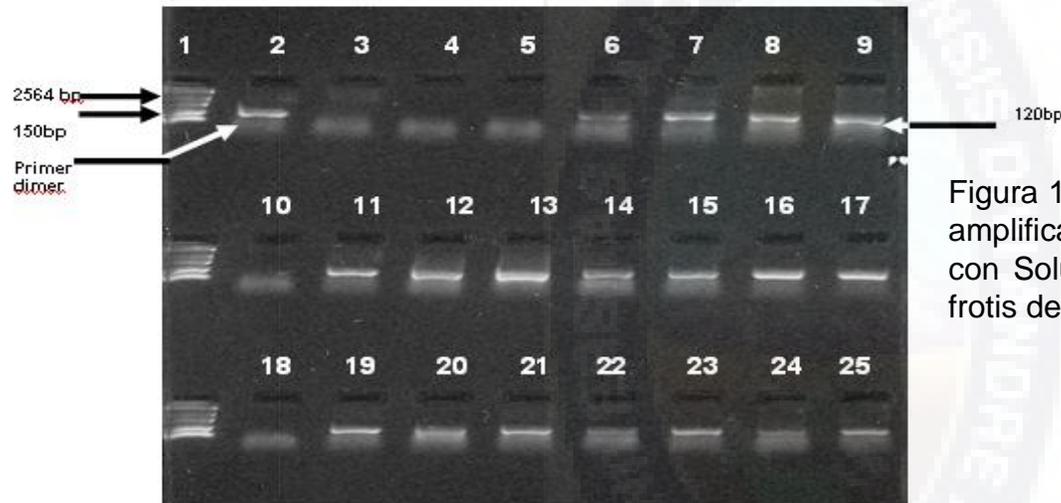


Figura 14. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo A

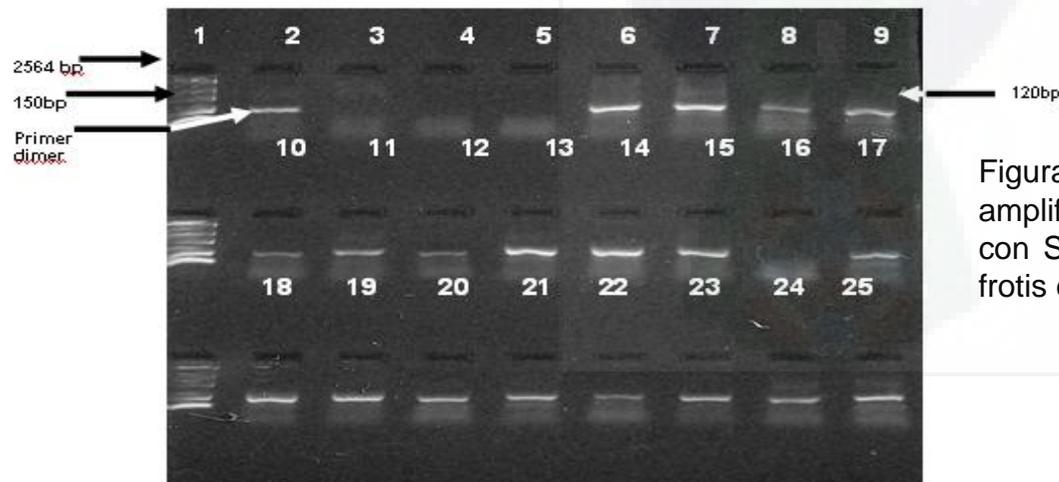


Figura 15. Resultados de PCR basados en la amplificación de DNA extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo B.

| | MUESTRA | PCR SLPK | FROTIS | PCR CONVENCIONAL |
|---|-------------|--------------|----------------|----------------------|
| A | PACIENTE 1 | Positivo (+) | Positivo (+) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 2 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 3 | Negativo (-) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 4 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 5 | Positivo (+) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 6 | Positivo (+) | Positivo (++) | Negativo (-) (S) |
| | PACIENTE 7 | Negativo (-) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 8 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 9 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S) |
| | PACIENTE 10 | Positivo (+) | Positivo (+) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 11 | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+) (S y L) |
| | PACIENTE 12 | Positivo (+) | Negativo (-) | Negativo (-) (L) |
| | PACIENTE 13 | Negativo (-) | Negativo (-) | Negativo (-) (S) |
| | PACIENTE 14 | Negativo (-) | Negativo (-) | Negativo (-) (L) |
| | PACIENTE 15 | Negativo (-) | Positivo (++) | Positivo (+) (S) |
| B | PACIENTE 16 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 17 | Positivo (+) | Positivo (+) | |
| | PACIENTE 18 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 19 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 20 | Positivo (+) | Positivo (+++) | |
| | PACIENTE 21 | Negativo (-) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 22 | Positivo (+) | Positivo (+++) | |
| | PACIENTE 23 | Positivo (+) | Positivo (+) | |
| | PACIENTE 24 | Positivo (+) | Negativo (-) | |
| | PACIENTE 25 | Positivo (+) | Negativo (-) | |

VP 
 VN 
 FP 
 FN 

(S) Sangre. (L) Lesión

Tabla 13. Comparación de los resultados de PCR provenientes de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con exámenes laboratoriales para el diagnóstico de leishmaniasis

Determinación de la sensibilidad y especificidad del método de extracción de DNA (Solución de lisis con Proteinasa K)

- Cálculos de la Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo e Índice Kappa, entre los métodos de PCR SLPK y el examen parasitológico directo del frotis.

| PCR SLPK / FROTIS | Positivo (+) | Negativo (-) | TOTAL |
|-------------------|--------------|--------------|-------|
| Positivo (+) | VP 13 | FP 6 | 19 |
| Negativo (-) | FN 1 | VN 5 | 6 |
| TOTAL | 14 | 11 | 25 |

| | | |
|----------------------|-----------------------------|-----|
| SENSIBILIDAD | $[VP/(VP + FN)] \times 100$ | 93% |
| ESPECIFICIDAD | $[VN/(VN + FP)] \times 100$ | 45% |
| VALOR PREDICTIVO (+) | $[VP/(VP + FP)] \times 100$ | 68% |
| VALOR PREDICTIVO (-) | $[VN/(FN + VN)] \times 100$ | 84% |

| ÍNDICE KAPPA | Fuerza de la concordancia |
|--------------|---------------------------|
| 0,403 | Moderada |

| kappa | grado de acuerdo |
|-----------|------------------|
| < 0 | sin acuerdo |
| 0 – 0,2 | insignificante |
| 0,2 – 0,4 | bajo |
| 0,4 – 0,6 | moderado |
| 0,6 – 0,8 | bueno |
| 0,8 – 1 | muy bueno |

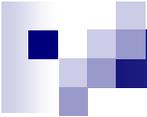
- Cálculos del Índice Kappa, para la determinación del grado de correlación entre los métodos de PCR SLPK y el PCR convencional.

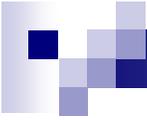
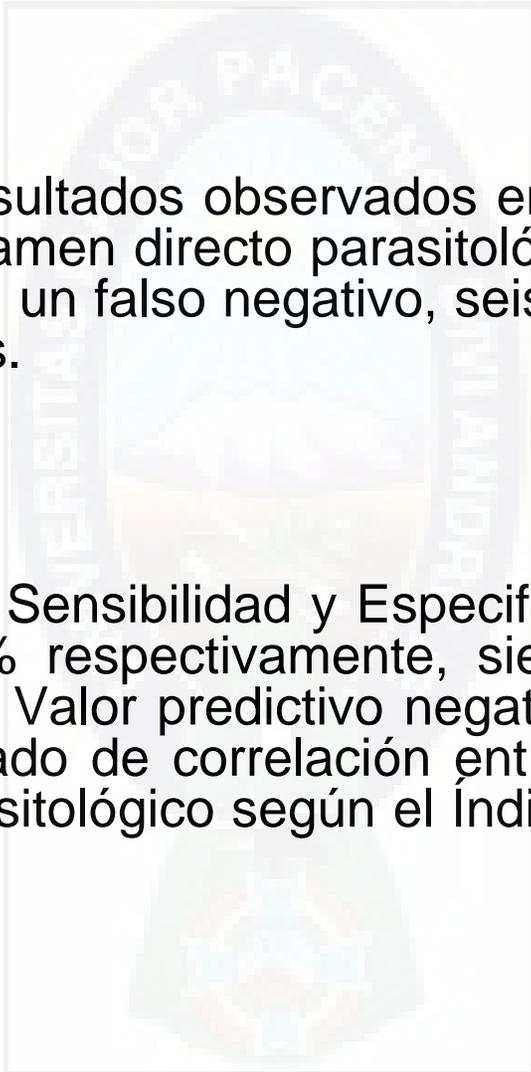
| PCR SLPK / PCR convencional | Positivo (+) | Negativo (-) | TOTAL |
|-----------------------------|--------------|--------------|-------|
| Positivo (+) | VP 9 | FP 1 | 10 |
| Negativo (-) | FN 1 | VN 4 | 5 |
| TOTAL | 10 | 5 | 15 |

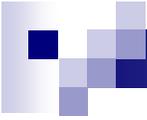
| ÍNDICE KAPPA | Fuerza de la concordancia |
|--------------|---------------------------|
| 0,700 | Buena |

Conclusiones

- Se determinó que la concentración inicial de amastigotes de *Leishmania* en los 25 frotis de lesión de pacientes, presentaron resultados de: 8% recuento >50 amastigotes (+++), 20% recuento de 21 – 50 amastigotes (++) , 16% recuento de 1 – 20 amastigotes (+) y 56% de recuento negativo (-).
- En la extracción de DNA a partir de muestras de *Leishmania* con medio de cultivo Schneider mediante el método de SLPK, el rendimiento obtenido fue bajo encontrando valores en los rangos de 0,532 ng/uL (200 parásitos/10 uL) a 0,034 ng/uL (1 parásito/10 uL), siendo las cantidades mínimas de DNA bacteriano o de parásito para realizar un PCR de 1 a 10 ng/uL. Los índices de A260 nm/A280 nm muestran una clara contaminación proteica con rangos de pureza de 1,058 a 1,051.

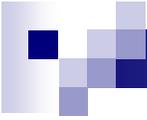
- 
- Se estandarizaron tres protocolos de extracción de DNA, el método de SLPK presentó mayores ventajas: 1ro La colección de las muestras de extendidos por raspado con hojas de bisturí es más fácil con ayuda de la solución de lisis, ya que el detergente tritón 100X que contiene permite que la totalidad de la muestra sea arrastrada al fondo del tubo eppendorf para su procesamiento. 2do Los valores obtenidos de promedios de concentraciones y purezas de las muestras de DNA, son aceptables en relación a los otros dos métodos de extracción.
 - Los resultados de la PCR para *Leishmania sp.* utilizando como material biológico el DNA obtenido a partir de las diluciones de parásitos con sangre, muestran que el método de SLPK presenta el menor número de resultados falsos negativos y muestra más casos verdaderos positivos hasta la mínima dilución de dos parásitos en sangre.
 - La concentración promedio de DNA obtenido a partir de los frotis de lesión de pacientes mediante el método SLPK, fue de 20,8 ng/uL resultado bajo en comparación a los obtenidos a partir de suspensiones de parásitos con sangre, también se observó que el promedio de pureza obtenida era de 1,078.

- 
- 
- De los veinticinco resultados observados entre el PCR SLPK, PCR convencional y el examen directo parasitológico, trece fueron casos verdaderos positivos, un falso negativo, seis falsos positivos y cinco verdaderos negativos.
 - Se determinó que la Sensibilidad y Especificidad del método SLPK eran de 93% y 45% respectivamente, siendo el Valor predictivo positivo de 68% y el Valor predictivo negativo de 84%; también se determinó que el grado de correlación entre el método SLPK y el Examen directo parasitológico según el Índice Kappa fue Moderado de 0,403 ($p < 0,005$).



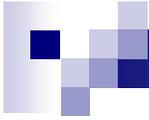
Conclusión general

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que la obtención de material genético de *Leishmania sp.* a partir de frotis teñidos con Giemsa es una buena opción para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de pacientes con leishmaniasis. También se determinó que es una herramienta útil para el diagnóstico de pacientes en los cuales tienen una carga parasitaria baja y en los cuales el diagnóstico por Examen parasitológico directo puede dar falsos negativos.



Recomendaciones

En la mayoría de los casos en los hospitales o postas médicas de las poblaciones endémicas para leishmaniasis el diagnóstico y el control del tratamiento leishmanicida se realiza por Examen parasitológico directo con sensibilidad entre 33% y 90%, y sin el apoyo de una prueba molecular de mayor sensibilidad. Gracias a los hallazgos de este estudio y en base a los antecedentes bibliográficos, se recomienda realizar el diagnóstico molecular de leishmaniasis a partir de los frotis de lesión teñidos con Giemsa; siendo importante instruir al personal de laboratorio para realizar una buena tinción y secado de los frotis de manera adecuada para evitar las contaminaciones cruzadas.



GRACIAS POR SU ATENCIÓN