

578
581

DIAGNOSTICO PRECISO DE ESPECIE EN LA LEISHMANIASIS A TRAVES DE SONDAS DE DNA



J. A. Floru *
D.C. Barker**

La Leishmaniasis humana es un problema de salud pública mundial con más de 400.000 casos nuevos anuales (1) en los trópicos y subtropicos. No se tienen prevalencias exactas, pero se estima que la Leishmaniasis afecta a 20 millones de personas en el tercer mundo y en algunos países desarrollados.

En Bolivia, la Leishmaniasis cutáneo-mucosa y cutánea, ha sido reportada desde 1928 en los Yungas (2). En el Alto Beni, zona continuación de los Yungas hacia el Amazonas, la enfermedad fue reportada y comprobada desde 1974 (3) con la presencia de *Leishmania braziliensis braziliensis* (*L.b.b.*).

La Leishmaniasis visceral humana era prácticamente desconocida en Bolivia, habiéndose reportado casos aislados (4,5). Desde 1982 ésta patología cobra importancia, habiéndose descrito 2 casos en la región de los Yungas (6), demostrando la infección en el perro (7) y hallando *L. donovani chagasi* (*L.d.c.*) en el intestino de Flebotomos de la región. Se demostró también la infección doble en humanos con *L.b.b.* y *L.d.c.* (Barker, comunicación personal, 1987).

La Leishmaniasis tiene un espectro amplio de signos clínicos. El clínico sólo puede determinar en pocos casos que la enfermedad es causada por una especie en particular. La

infección inicial generalmente es una lesión granulomatosa pequeña. Una lesión cutánea solitaria es el signo clínico más común y puede ser causada por cualquiera de las 15 subespecies infecciosas en el hombre incluyendo las que causan Leishmaniasis mucocutánea grave (*L.b.b.*) o kala azar (*L.d.c.*) (8). En la mayoría de los hospitales, todos los casos son inicialmente tratados de acuerdo a si la infección es visceral, mucosa o cutánea. Las decisiones clínicas de tratar con drogas tóxicas (9) (Antimoniales Pentavalentes) debería depender de la especie de *Leishmania* presente; pero ésta información rara vez está presente en el momento necesario.

El problema diagnóstico no sólo está restringido al médico. Para el epidemiólogo, la incriminación de los huéspedes de reserva presenta dificultades diagnósticas similares al igual que la detección de vectores. La existencia de dos o más ciclos de transmisión de la leishmania en cierta área complica más el cuadro epidemiológico. Actualmente estas consideraciones tienen mayor vigencia debido a la creación de zonas de colonización, extensión de la prospección aurífera y petrolera, apertura de nuevos ejes de comunicación, etc... Esto plantea la necesidad de contar con métodos seguros y aplicables, para la detección de éste parásito.

INTERES DE LAS SONDAS DE DNA

Hasta ahora los mejores métodos de identificación de la *Leishmania* han usado anticuerpos monoclonales (10), o isoenzimas (11), pero éstos y otros métodos que usan los

* I.B.B.A., Depto. Inmunología Parasitaria, Casilla 824, La Paz - Bolivia.

** MRC Biochemical Parasitology - Unit., Moltano Institute, Cambridge CB2 3 EE - Inglaterra.

Salud Boliviana, 6 (1) 1988

factores excretorios, tipificación de ácidos grasos, radioespirometría y experimentos de crecimiento, están sujetos a la variación Fenotípica. Un carácter genético puede ser expresado o no y su producto (RNA o proteína) puede ser afectado por arreglos del material genético.

En cambio, el DNA de un organismo usualmente no varía durante su ciclo de vida y es el principio de las técnicas de análisis del DNA (12) por: Schizodeme (13), cariotipo molecular (14) (usando la localización de los genes de Tubulina). Estas técnicas muestran considerable evidencia de variación genotípica o alteraciones en la secuencia del DNA. Estos estudios pueden complementar el método más usado y de mayor suceso: el uso del kDNA.

CARACTERÍSTICAS DEL DNA

DEL KINETOPLASTO

El kinetoplasto es un disco microscópico visible, de 1 - 2 μ m. de diámetro, el cual contiene aproximadamente 10 bp. de DNA mitocondrial. Se lo encuentra entre la membrana mitocondrial en la base del flagelo en todos los kinetoplastidos incluyendo a las Tripanosomas y Leishmanias (Fig. 1).

El DNA del kinetoplasto (kDNA) consiste en cerca de 50 maxi-círculos que codifican para genes mitocondriales, y aproximadamente 10.000 - 20.000 minicírculos altamente repetitivos con secuencias de 900 - 2.500 bp (Fig. 2).

Las secuencias de los minicírculos evolucionan rápidamente y la mayoría de los laboratorios han mostrado divergencias de éstas secuencias entre especies. Al contrario de los Tripanosomas que tienen 300 clases de secuencias de minicírculos, las leishmanias tienen un número limitado de clases de secuencias mayores (usualmente menos de 10). En la mayoría de los casos, 80% de los minicírculos son de cuatro o menos clases de secuencia mayor. Este pequeño número de clases de secuencia significa que hay muchas

copias (más de 3.000) de unos pocos 600 bp. listos para la hibridización.

Así el kDNA tiene algunas características únicas que llenan el criterio general aplicado al diagnóstico con sondas de DNA. Tiene secuencias repetitivas suficientes para realizar un buen blanco, está libre de códigos de restricción como los Intrones y los spacers. El kDNA es fácilmente aislado y purificado de hasta tan poco como 10 organismos.

MATERIAL Y METODOS

Los parásitos fueron obtenidos de cultivos realizados en el laboratorio de Inmunología Parasitaria del I.B.B.A., a partir de cepas autóctonas. El aislamiento, purificación, y digestión con enzimas de restricción en gel de Agarosa al 2% realizado como descrito en el manual de laboratorio del Dr. D.C. Barker y coll (15).

Transferencia del kDNA al papel de nitrocelulosa

Para la técnica de transferencia con el método de Southern (15), el gel de agarosa al 2% fue tratado como sigue: se desnaturalizó el DNA con 0.5 M N-OH, 1.5 M NaCl, con agitación constante por espacio de 60 minutos. Se neutralizó el DNA con 1.5 M NaCl, 0.5 M tris HCl, 0.05 M Na₂ EDTA pH 7.2 por 60 min. con agitación constante. Se lavó el filtro de nitrocelulosa 10 min. en agua destilada y luego 15 min. en 2 x SSC (1 x SSC = 0.15 M NA CITRATO pH 7.0). Se realizó el transporte de DNA del gel al filtro de nitrocelulosa con 20 SSC como buffer en 16 hrs, según el método de Southern Blot. El papel de nitrocelulosa ya transferido fué lavado con 2 x SSC 1 minuto, secado a 42° C/1 hora y cocido a 70° C/1 hora. El filtro fué lavado en Baja "Stringency" en 2 x SSC 0.1% sds a 65 C/2 horas y la autoradiografía se realizó a -80° C con pantalla intensificadora durante 1 semana usando el probe radioactivo L.b.g. 4147.

Hibridización "in situ" sobre portaobjetos con sondas de DNA

La técnica de microscopía "in situ" necesita menos de 100 microorganismos sobre un portaobjetos.

Los parásitos se tomaron de un paciente, y cultivos de cepas, entre las cuales tenemos a:

- L.m.a PH 8
- L.d.c. LEM 379 (venez)
- L.b.g. 4147
- L.b.b.
- L.m.m. 379

Se confrontaron con dos sondas realizadas en el Laboratorio de Parasitología, Instituto Molteno, Universidad de Cambridge por el equipo de D.C. Barker siendo esta:

- a) P/L.m.a. PH 8.
- b) P/L.b.b. 2903.

Se siguió el protocolo corregido para la identificación 12 horas según el Dr. D.C. Barker y Lorna J. Gibson. Se tomó una gota de los cultivos, los cuales se fijaron en 3 partes ethanol y una parte de ácido acético.

El kDNA nuclear y kinetoplastido fue desnaturalizado en hebras simples con NaOH 0.07 N por 5 minutos, y la hibridización fué realizada en el portaobjetos con la sonda en gotas de 30 - 50 µl. Posteriormente se realizaron los lavados de "Stringency" en 2 x SSC a 65°C por 15 minutos. La detección se realizó con el kit de Betesda Research Laboratories para la detección con fotobiotina siguiendo sus propias instrucciones pero con modificaciones de tiempo. Se realizó la visualización de los parásitos en un microscopio a contraste de fases (Ver fig 5 y 6). La señal de hibridización se observa al microscopio de luz por la fotobiotina, detectada por un tratamiento secuencial con streptavidina, fosfatasa alcalina biotinilada y un sustrato cromogénico.

RESULTADOS

1.- Hibridización en gel de Agarosa al 2%:

Se aisló el kDNA de varias cepas de *Leishmania* como ser;

— L.b.b. 2903, cepa de referencia de la O.M.S. y cepas autóctonas como ser:

- MHOM/BO/82/LPZ 17
- MHOM/BO/83/LPZ 155
- MHOM/BO/83/LPZ 355
- MHOM/BO/84/LPZ 714
- WH 8601 (cepa desconocida).

Se realizaron dos digestiones:

- 1.- ECO R1 (G/aattc)
- 2.- Bcl I (T/GATCA)

En la digestión realizada, los minicírculos son cortados sólo 1 vez y se liberan de las redes de kDNA. En la electroforesis del gel de Agarosa, aparecen, gracias a la acción del Bromuro de Ethidium y los U.V., como una banda única de DNA de aprox. bp. y otra banda quedándose en el pozo del depósito. El tamaño de los minicírculos parece conservado dentro de una misma especie de *Leishmania*, aunque la utilización de diferentes condiciones de gel y de migración han establecido diferencias dentro de las sub-especies. (Fig. 3).

Después de realizar la autoradiografía del gel con la sonda *L.b.b.* se comprueba la hibridización total con la cepa MHOM/BO/83LPZ 155 en las digestiones con ambas enzimas y la cepa *L.b.b.* 2903 en la digestión con la enzima Bcl I. Se observa hibridización débil con la cepa MHOM/BO/84/LPZ 714 con ambas enzimas, así como la cepa MHOM/BO/83/LPZ 355, siendo la hibridización totalmente negativa con la cepa desconocida WH 8601 concluyéndose que ésta no es del complejo *L. braziliensis*. (Fig. 4).

Hibridización DNA-DNA sobre portaobjetos.

Se observa positividad en la reacción entre las cepas:

— *L.m.a. P118* y la sonda P/PH8 (*L.m.a.*).

— Paciente y sonda P/PH8 (*L.m.a.*)

La hibridización es negativa en:

— Cepa *L.d.c. LEM 379* con sonda P/PH8 (*L.m.a.*).

— Cepa *L.b.g. 4147* con sonda P/PH8.

— Cepa *L.m.a. P118* con sonda P/2903 (*L.b.b.*).

— Paciente con sonda P/2903 (*L.b.b.*).

— Cepa *L.m.m.* con sonda P/2903 (*L.b.b.*).

Ver figuras 5 a 9.

CONCLUSIONES

Los resultados anunciados muestran especificidad entre las sondas de kDNA usadas y los parásitos complementarios, demostrando de ésta manera la ventaja principal de éste método, que consiste en la demostración de homología de secuencia con muy pocos parásitos.

Este método nos permite discriminar las cepas entre complejos. Otras ventajas son que es un método que se puede utilizar en biopsias de pacientes y se puede aplicar en flebotomos con el consiguiente interés epidemiológico.

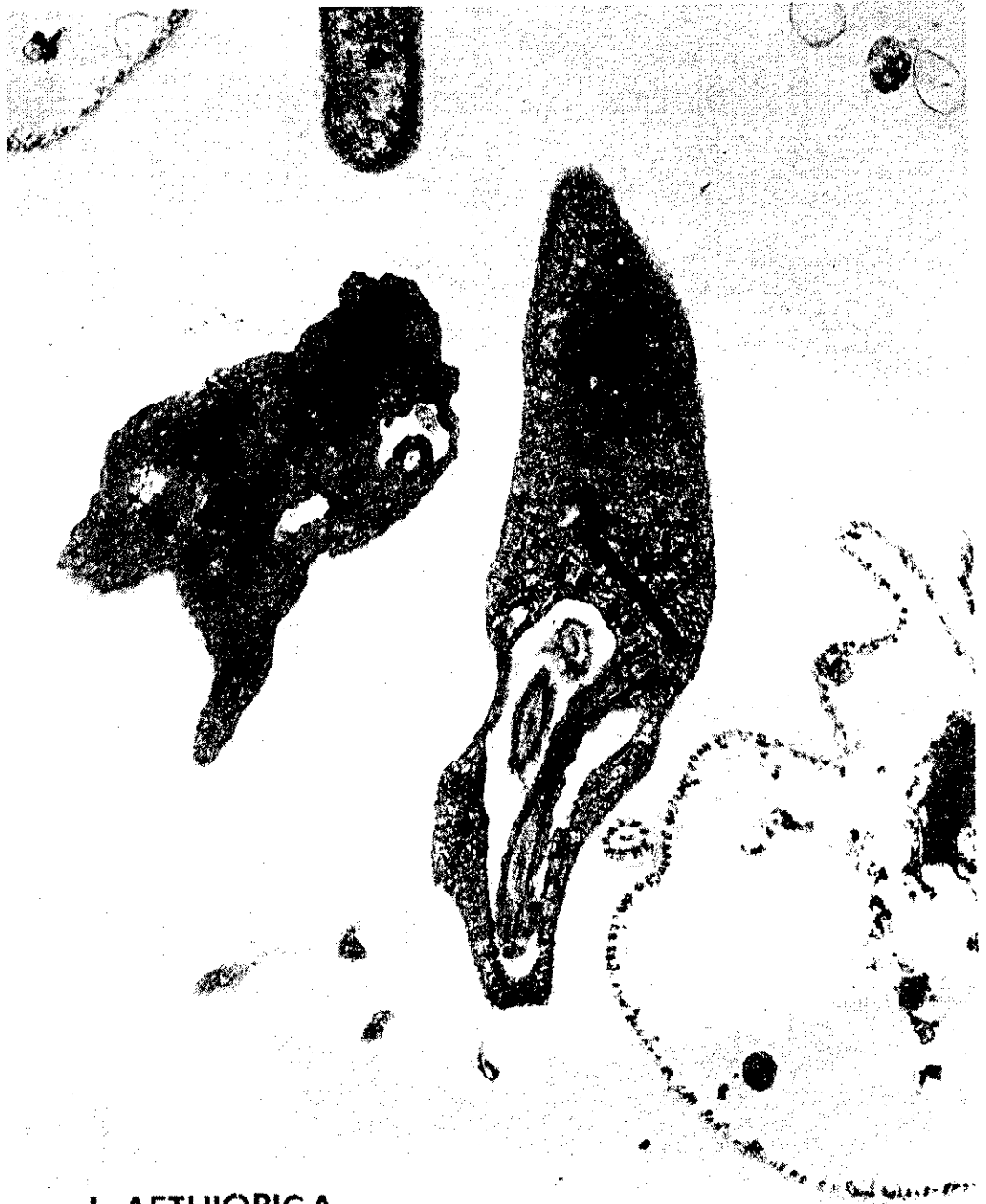
Es un método relativamente rápido ya que no necesita cultivo. Es bastante discriminativo ya que en Bolivia contamos con *Leishmanias* que pertenece a los complejos *L.b.*, *L.d.* y *L.m.* que no tienen problema de hibridización cruzada.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Patrice Pellerin por corregir el manuscrito y al Dr. D.C. Barker por proveer las sondas DNA-DNA para realizar la hibridización y a su equipo por proveer las fotografías por microscopio electrónico.

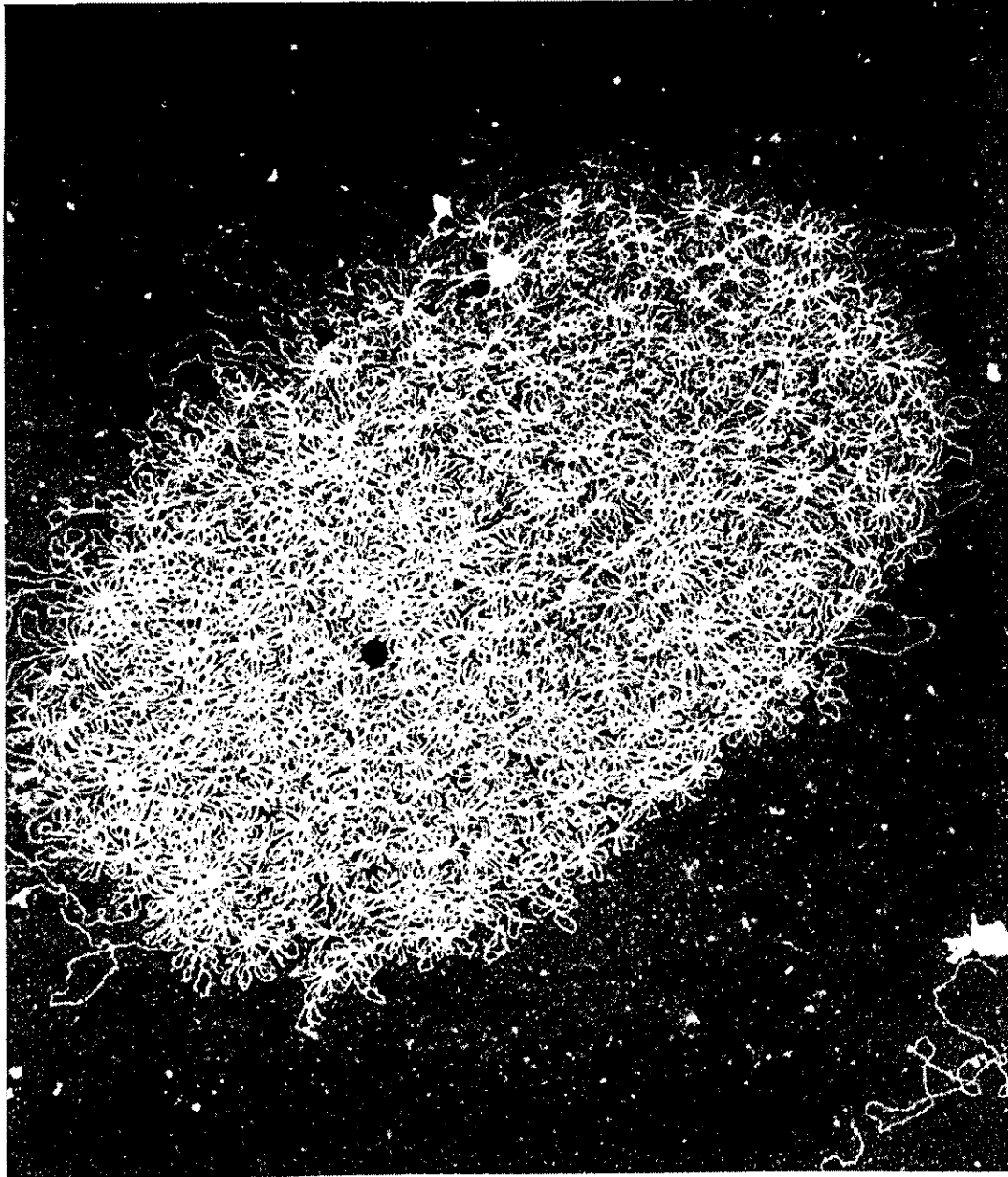
REFERENCIAS

- 1.- WHO: The Leishmaniasis, WHO Technical reports series 1984; 701, 1 - 140.
- 2.- Mencionado sin referencia por Balcazar, 1946.
- 3.- Desjeux P: Leishmaniose cutanée et cutanomuqueuse américaine. 113 cas observés en Bolivie. Thèse Doct. Med. 1974. pp. 1 - 1332.
- 4.- Gatti G, Boggino J, Prieto C: Un nouveau foyer de Leishmaniose viscerale en Amerique du sud. Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique 1933; 32: 602 - 605.
- 5.- Arruda W, Da Costa FC, Nahas S, Resenthal L: Leishmaniose visceral americana. Constatacao de do casos. Brasil Médico 1949; 9:63 - 65.
- 6.- Desjeux P, Le Pont F, Mollinedo: Leishmaniasis tegumentaria y visceral en departamento de La Paz Bolivia. Principales características clínicas, epidemiológicas terapéuticas. Anuario IBBA 1986-1987 pp. 265 - 272.
- 7.- Angles R, Le Pont F, Desjeux P: Visceral canine Leishmaniasis in Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 76: 704.
- 8.- Marsden PD: Parasitol. Today 1985; 1:129 - 133.
- 9.- Ridley D S: Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 74: 515 - 521.
- 10.- McMahon - Pratt D, David J R: Natura 1982; 281 - 283.
- 11.- Peters W. (1986) (Peters, W. and Killick Kendrick, R, eds), Academic Press, London.
- 12.- Barker, D.C. and Butcher, J. (1983) Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 285 - 297.
- 13.- More C. M. Simpson L: Am J Trop Med Hyg 1980; 29: 1070 - 1074.
- 14.- Spithill T. W. Samaras N: Nucl Acids Res 41: 4169.
- 15.- Barker D. C. et al: Characterization of *Leishmania* sp. by DNA Hybridization Probes. WHO, Geneva. pp. 1 - 577.
- 16.- Southern E: J Mol Biol 1975; 98: 503 - 517.



L. AETHIOPICA

Fig 1. Fotografía por microscopio electrónico (X 27,712) de un corte sagital de la C. Aethiopica mostrando el Kineloplasto (K).



K DNA ▲ maxicirculos
● minicirculos

Fig 2. Fotografía por microscopio electrónico (X 35,136) mostrando la arquitectura del Kinetoplasto.

GEL DE AGAROSA AL 2%

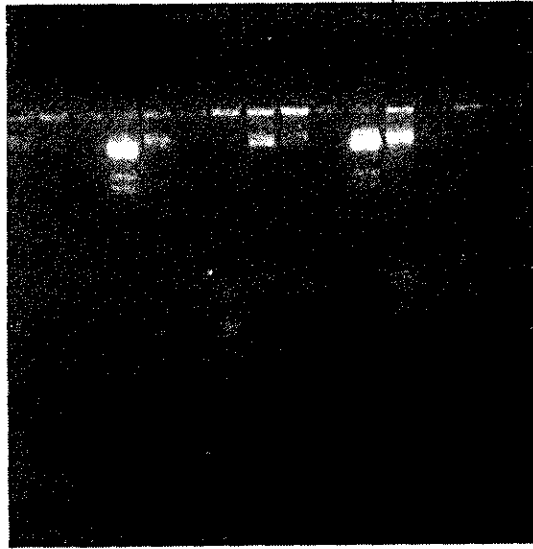


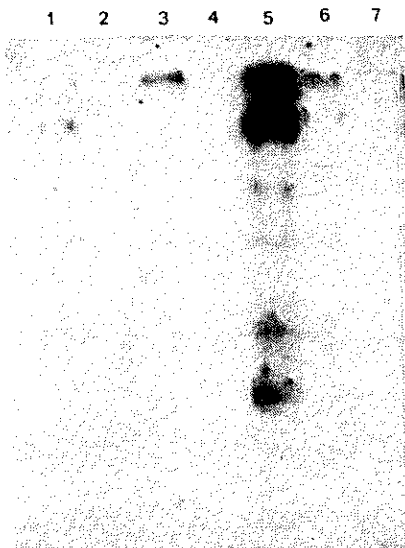
Fig 3.

- 1.- *L. b. brasiliensis* 2903 (OMS, ref)
- 2.- W.H. 8601 ?
- 3.- MHOM/80/83/ Ipz 355.
- 4.- Marcador Lambda Hind III.
- 5.- MHOM/80/83/ Ipz 155
- 6.- MHOM/80/83/ Ipz 714
- 7.- MHOM/82/80/ Ipz 17.
- 1'.- id. 1.
- 2'.- id. 2.
- 3'.- id. 3.
- 4'.- Marcador Lambda Hind III.
- 5'.- id. 5.
- 6'.- id. 6.
- 7'.- id. 7.

Las bandas son evidenciables gracias a la reacción entre el bromuro de Ethidio y la luz Ultravioleta.

AUTORADIOGRAFIA

ECO RI



BCL I



Fig 4. La sonda de KDNA marcada con Tritio radioactivo se Hibridiza al KDNA del filtro de nitrocelulosa, dando posteriormente una señal positiva al exponerse a una placa sensible.

«IN SITU»

Fig. 5

2903 — P-2903

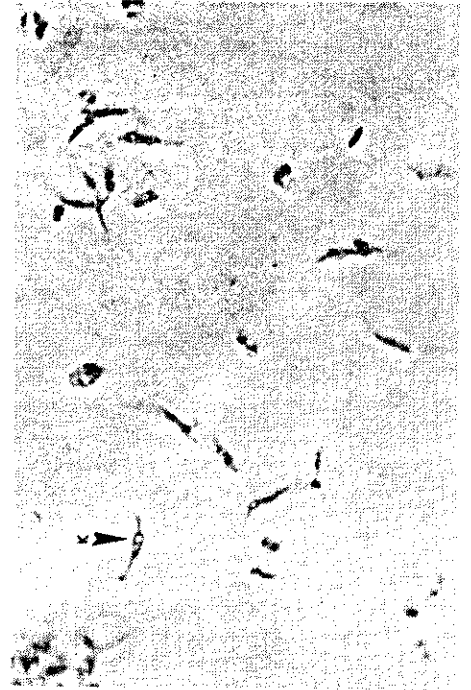
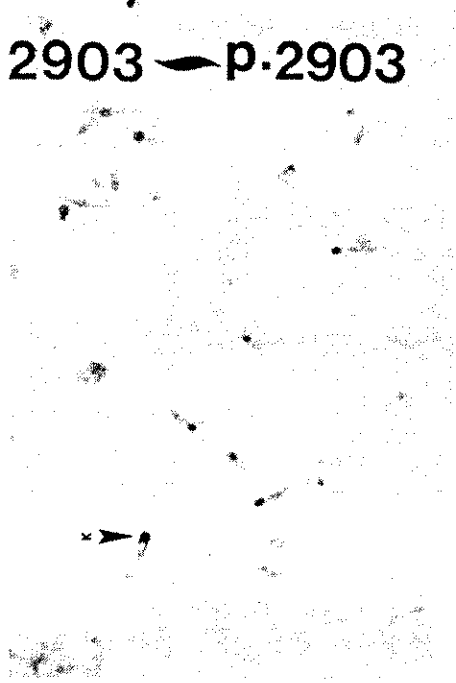


Fig. 6

379 — P-2903

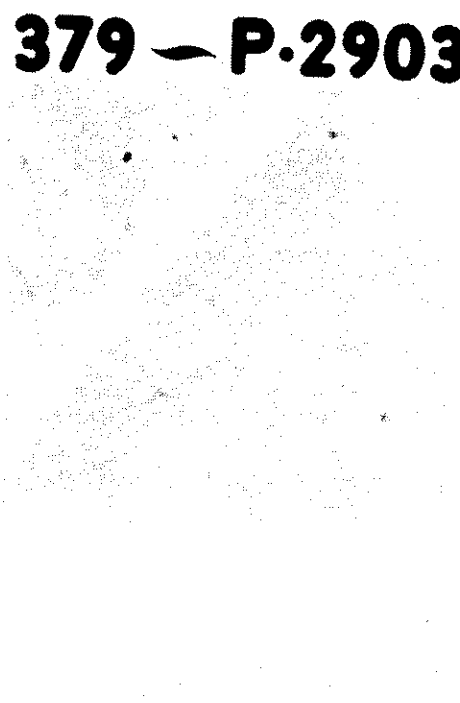


Fig. 7

Dan - P-PH 8

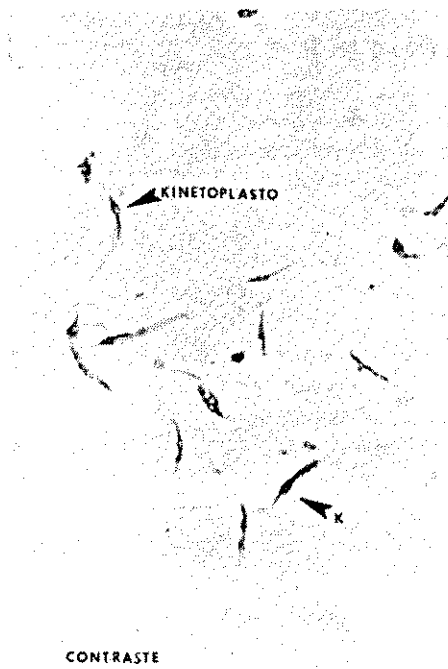
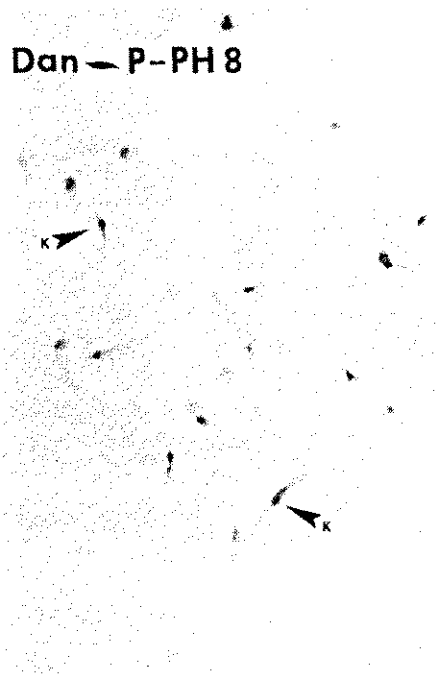
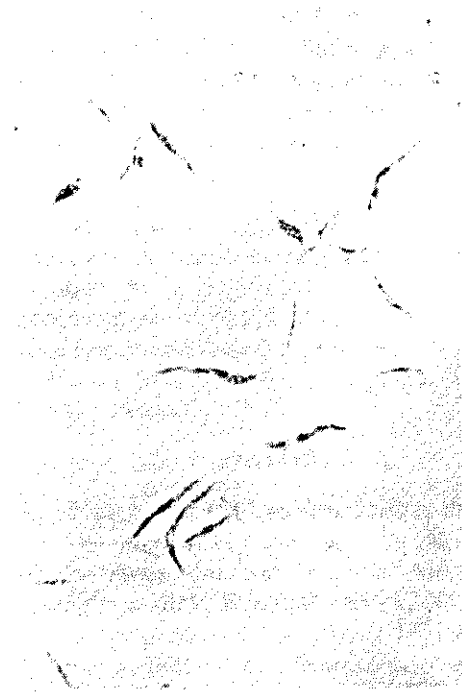


Fig. 8

Dan - p.2903



PH8 — P — PH8

