

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS CANINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): UN PROCEDIMIENTO SIMPLE PARA USO EN LA CLÍNICA.

P. Zaragoza¹, I. Martín-Burriel¹, R. Osta¹,
M. Gascón²

¹Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos.

Facultad de Veterinaria,
50013 Zaragoza.

²Departamento de Patología Animal.

Facultad de Veterinaria,
50013 Zaragoza.

RESUMEN.

Para detectar la presencia de *Leishmania ssp.*, en distintas muestras clínicas de perros sospechosos de padecer esta enfermedad, se ha utilizado la técnica PCR, amplificando para ello un fragmento del gen SSU rRNA, repetido más de 100 veces en el genoma del parásito. El método se ha optimizado para utilizarlo como método de rutina en la clínica. El procesado de las muestras es rápido y simple. El diagnóstico se ha realizado por presencia/ausencia del parásito, utilizando para ello muestras de sangre, médula ósea y ganglio linfático principalmente. En el caso de existir el parásito en el huésped se visualiza una banda nítida de un tamaño de 603 bp y en el caso de que el parásito esté ausente, no se detecta la presencia de esta banda. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la muestra de partida fue médula o ganglio linfático. El método presenta la ventaja adicional de detectar portadores asintomáticos, incluidos los títulos de IFI dudosos. La técnica PCR se presenta como test de diagnóstico rutinario, siendo más rápida, eficaz y económica que los métodos de diagnóstico clásicos.

Palabras clave:

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades endémicas son un riesgo para la calidad de vida y significan un riesgo de morbilidad, debilidad y mortalidad para la población.

La salud de la población es un factor muy importante a tener en cuenta en un país y por supuesto región, pues produce un fuerte impacto tanto

ABSTRACT.

The technique PCR has been used in order to detect the presence of *Leishmania ssp.* in different clinic examples of dogs that might suffer from this illness. The technique was performed by amplifying a fragment of the gene SSU rRNA, that is repeated more than a hundred times in the parasite's genome. This method has been optimized to use it as a routine method in the clinic since the processing of the specimen is quick and simple.

The diagnostic was carried out by checking the presence/absence of the parasite using, mainly, blood samples, bone marrow and lymphatic gland. In the case that the parasite existed in the host, a clear band with a dimension of 603 bp can be visualized. On the contrary, if the parasite is absent no clear band can be visualized.

The best results were obtained when the used samples were lymphatic gland or bone marrow. This method shows the additional benefit of detecting the asymptomatic carriers, including the doubtful IFI. The PCR technique shows to be a faster, more efficient and more economic diagnosis than the classic methods.

Key words:

económico como social. Las enfermedades endémicas disminuyen la calidad de vida de una zona, siendo por tanto, muy importante poder diagnosticar de forma precoz estas enfermedades y localizar a sus portadores.

Los protozoos del género *Leishmania* son un grupo de parásitos de morfología similar que causan enfermedades en el hombre y en el perro,



siendo esta última una zoonosis que produce la muerte en los individuos en los que no se realiza un diagnóstico claro y temprano. Concretamente, la leishmaniosis es una enfermedad endémica en Aragón y de amplio interés en la actualidad ya que está considerada por la OMS como indicadora de SIDA.

Esta enfermedad es de difícil diagnóstico ya que pueden existir pocos parásitos, incluso en individuos con aparente clínica y además su localización suele ser bastante errática y en forma de granulomas no visibles a simple vista.

Las técnicas clásicas de diagnóstico de leishmaniosis canina se han basado principalmente en la observación microscópica del parásito en extensiones de aspirado de nódulo linfático y médula ósea y en métodos serológicos como IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) (prueba de referencia de la OMS). El desarrollo de la técnica de PCR para la detección de distintos parásitos (Mathis y Deplazes, 1995) ha proporcionado una herramienta rápida y eficaz para el diagnóstico de esta enfermedad. Osman y cols. (1997) evaluaron la eficacia de esta técnica frente a métodos clásicos para la detección de leishmanias en personas que sufrían la enfermedad y en pacientes sospechosos de padecerla, encontrando una mayor sensibilidad de la PCR frente a la microscopía.

La PCR es una técnica sensible y específica para el diagnóstico de varias infecciones, considerándose además altamente eficaz si los cebadores utilizados para el diagnóstico acotan una zona del genoma del parásito, que corresponde a secuencias de más de una copia por célula. En el caso de la leishmania, estas zonas pueden estar en el kinetoplasto (pequeños círculos de DNA), en los que se incluyen genes muchas veces repetidos.

De las secuencias pertenecientes a este grupo de genes multicopia, podemos indicar según la bibliografía consultada, una serie de secuencias candidatas: SSUrRNA y 18SrRNA. Estas zonas son bien conocidas ya que han sido secuenciadas para más de 100 especies incluyendo *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata*.

Conocer una zona candidata que nos permita diferenciar con claridad al parásito, del hospedador y del vector, permitirá proponer un nuevo método de diagnóstico. La comparación de las secuencias antes indicadas entre humano y perro (hospedador), artrópodos (vector) y Kinetoplasto (parásito), las hacen idóneas para su posible utilización (Eys y cols., 1995).

El uso de la PCR como método de diagnóstico, permite descartar, en zonas endémicas, individuos que, aún con titulación de anticuerpos aparente, no sean ya portadores del agente. Esto lógicamente, solo es posible con el diagnóstico directo del agente causal y en la actualidad el método más rápido, económico, sensible y eficaz es la PCR. Por todas estas razones el presente artículo pretende demostrar la eficacia de la genética molecular como herramienta de diagnóstico y así poder reemplazar otras técnicas hoy utilizadas y, desde nuestro punto, de vista menos fiables.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de muestras y grupos de animales.

A partir de animales afectados de leishmaniosis, procedentes principalmente de perros sospechosos de ser portadores de leishmania que acuden a la Consulta de Medicina Interna de Pequeños Animales (SMIPA) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, se han obtenido las siguientes muestras:

- Aspirado de ganglio linfático (25 a 100 ml disueltos en 100 µl TE pH8).
- Aspirado de médula ósea (25 a 100 µl disueltos en 250 ml TE pH8).
- Sangre, basta con 500 µl.

Entre las muestras recibidas en nuestro servicio, se eligieron animales afectados de leishmaniosis correspondientes a los siguientes grupos:

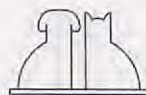
1. Animales asintomáticos, con título de IFI dudoso (1/60 ó menor) (20 perros).

2. Una camada de cinco cachorros, hijos de una perra portadora de leishmania, todos positivos serológicamente (IFI positiva a diluciones mayores de 1/160).

3. Animales tratados de leishmania, en este caso se realizaron controles a los 3 meses y al año post-tratamiento (10 casos).

4. Animales con cuadros clínicos inespecíficos, inclusive no compatibles con el cuadro clásico de leishmaniosis, donde se descarta leishmania dentro de un protocolo más amplio. Concretamente en este grupo se incluyen dos casos con sólo síntomas de colitis crónica, sin responder, evidentemente, a ningún tratamiento y sin encontrar otra causa después de realizar todo el protocolo diagnóstico, y con títulos IFI dudosos para Leishmania (positivo a dilución 1/60).

Otro grupo lo constituiría el de los animales claramente positivos por IFI y por visualización direc-



ta de leishmania en aspirados de médula ósea; en estos casos el clínico utiliza menos la PCR, ya que las otras técnicas son más asequibles para su clínica. Evidentemente en estos casos, los que hemos recibido en nuestro servicio para contrastar las dos técnicas, siempre hubo correlación de la IFI, visualización directa y resultados de la PCR. En los grupos descritos más arriba, las muestras fueron remitidas por que no se observaron formas de leishmanias en los aspirados de médula ósea.

Obtención de DNA a partir de sangre, exudado de ganglio linfático y médula ósea.

El DNA se extrae mediante una técnica rápida (4 horas), basada en la digestión con proteinasa K y el detergente Tritón X-100. El proceso es el siguiente:

1º. Disolución de 200 µl de muestra en un ml. de NE (CINa: 0,585 gr; EDTA: 3,725 gr; hasta 1l de H₂O; pH: 7.5).

2º. Agitar y centrifugar a 13.000 rpm durante un minuto y retirar el sobrenadante (repetir tres veces). El precipitado obtenido se agita enérgicamente.

3º. Añadir al precipitado 400 µl de una solución que contiene Proteinasa K (2x10⁻³ gr/ml.)

4º. Mantener a 62 °C durante 1h. 30 m.

5º. Añadir un volumen de Fenol-Cloroformo isoamílico. Agitar y centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 10 m.

6º. Recoger la fase acuosa y añadir un 10% de AcNA 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Mantener a -70 °C durante 5 m.

7º. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 m. y tras retirar el sobrenadante, lavar con etanol al 70%, centrifugando un minuto.

8º. Secar la muestra (normalmente con Speed Vac), y restaurar en distintas cantidades de TE (1,208 gr. de Tris ClH, 0,372 gr. EDTA en 1l de H₂O, Ph 8).

9º. Conservar congelado a -30 °C.

Búsqueda de secuencias de los distintos genes candidatos en las bases de datos.

Para la búsqueda de las posibles secuencias de DNA, que permitan su utilización para el diagnóstico de Leishmaniosis canina, se ha comenzado el estudio de aquellas que presentan un mayor grado de homología entre las distintas especies de *Leishmania*.

El estudio se realizó en las bases de datos EMB y Gen Bank, cuya dirección en internet es: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>.

Diseño de los primers.

A partir de las secuencias obtenidas en las bases de datos, y la información obtenida en la bibliografía (Mathis y Deplazes, 1995), se eligió la amplificación de una zona del gen que codifica la subunidad pequeña del RNAr (SSUrRN). Los primers elegidos fueron:

Pr221: GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG

Pr332: GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG

Amplificación del DNA con los primers diseñados.

La reacción de amplificación fue llevada a cabo mediante un termociclador 9600 Perkin Elmer. El volumen de la muestra empleado fue de 15 µl. Como parámetros más importantes se buscarán las condiciones de tiempo y temperatura que nos permita la obtención de bandas nítidas e intensas. Se utilizaron 35 ciclos para realizar la amplificación:

94 °C- 5'

94 °C- 1'

60 °C- 1' 35 ciclos

72 °C- 1'

72 °C- 10'

4 °C- hasta recoger la muestra

Análisis de los fragmentos amplificados.

A partir de un volumen de 15 µl de producto amplificado se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, para la visualización posterior con UVA de los fragmentos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para detectar la presencia de *Leishmania spp.*, en distintas muestras clínicas de perros sospechosos de padecer esta enfermedad, se ha utilizado la técnica PCR, amplificando para ello un fragmento del gen SSU rRNA, repetido más de 100 veces en el genoma del parásito (Uliana y cols., 1991; Van Eys y cols., 1992). Concretamente, el fragmento obtenido en el caso de detectar la presencia del parásito en el huésped, fué de un tamaño de 603 bp (véase Fig. 1).

Es necesario indicar que paralelamente y para saber si el fragmento amplificado de 603bp, se

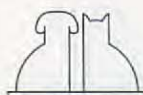




Fig. 1. Diagnóstico por PCR de Leishmaniosis canina. Detección de productos amplificados después de una electroforesis horizontal en gel de agarosa y tinción con Bromuro de etidio. El fragmento de 603 bp. corresponde al DNA amplificado de *Leishmania*. Línea 1: marcador de talla: BRL 1Kb. Línea 2: Control interno positivo (animal enfermo). Línea 3: Muestra 1 (positiva a *Leishmania*). Línea 4: Muestra 2 (negativa a *Leishmania*). Línea 5: Muestra 3 (positiva a *Leishmania*). Línea 6: Control interno negativo (animal sano). Línea 7: Muestra sin DNA.



Fig. 2. Prueba de que el fragmento de 603 bp. coreponde con el gen SSU rRNA de *Leishmania*. Patrones de restricción obtenidos con la enzima *Hae 3*, tras la amplificación de fragmento de 603 bp del gen SSU rRNA de *Leishmania*. Línea 1: marcador de talla: BRL 1Kb. Línea 2: fragmento amplificado sin digerir (talla: 603 bp). Línea 3, 4 y 5: Amplificación digerida con *Hae* (fragmentos de 281 bp, 211 bp y 71 bp).

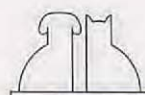
corresponde realmente con fragmentos de *Leishmania*, se realizó digestión del mismo con distintas enzimas de restricción, analizando los distintos modelos obtenidos y comparándolos con la bibliografía existente. Concretamente cuando se digiere con la enzima de restricción *Hae3*, el fragmento de 603bp se digiere en 6 fragmentos de tallas: 281bp, 24bp, 211bp, 4bp, 71bp y 13bp. Logicamente en un gel de agarosa solamente los fragmentos más grandes se pueden visualizar (véase Fig. 2). Tras comprobar que la banda obtenida corresponde específicamente a *Leishmania* y para evitar falsos positivos, en cada diagnóstico se incluyó el análisis de un animal sano y un control negativo (muestra sin DNA), así como un control positivo de amplificación (animal enfermo). En todas la muestras negativas (ausencia del parásito) se realizó la comprobación de existencia de DNA, como método de control.

La menor sensibilidad de la técnica se observó cuando la muestra es sangre periférica, tal vez por el limitado tiempo de permanencia del parásito en sangre. Ello nos indica que esta muestra no es adecuada para el diagnóstico, esta observación es válida para todos los grupos.

En todos los casos en los que se utilizó como material biológico médula ósea y siempre que el análisis microscópico fue positivo, el diagnóstico por PCR también lo fue. Igualmente, en más de un 95% de los casos de animales sospechosos de padecer la enfermedad, así como en animales tratados previamente frente a leishmaniosis, el diagnóstico por PCR determinó la presencia del parásito, a pesar de que el bajo grado de parasitosis había impedido la visualización de *Leishmanias*,

en el caso de frotis medular. Esta circunstancia es frecuente encontrarla en el grupo C, animales tratados, en los que tras el tratamiento, si el clínico se deja llevar por los resultados de la IFI y la visualización directa de leishmania en muestras de médula ósea, puede dar al animal como curado, al encontrar títulos bajos y no observar *Leishmanias* en la médula, varios de los casos analizados de este grupo presentaron esta circunstancia y en cambio dieron positivos en el PCR de muestras medulares. No obstante, hemos encontrado animales tratados que llegan a ser PCR negativos unos meses después del tratamiento: ¿Curados ó portadores asintomáticos? ¿Depende del protocolo utilizado? ¿Está en relación con la respuesta inmunitaria de cada animal y en función del estadio evolutivo de la enfermedad en el momento de iniciar el tratamiento? ¿Puede ocurrir que en zonas endémicas el animal se reinfeste? Estas son preguntas cuya respuesta no es fácil, la opinión de los clínicos está dividida y que requiere el seguimiento a largo plazo de un mayor número de casos. De los 10 casos estudiados 7 dieron negativos por PCR a los 3 meses, y en 4 de estos 7 casos la PCR volvió a ser positiva al año de haber suprimido el tratamiento.

En muestras con títulos serológicos de 1/60 (grupo A) se obtuvieron diagnósticos positivos por PCR (8 animales) y también negativos (12 animales). Los casos que incluimos en este grupo fueron aquellos casos en los que la ausencia de síntomas podía inclinar al clínico hacia la negatividad, ó bien al propietario se le había ofrecido el iniciar un protocolo de tratamiento en base a una posible positividad. En ambos supuestos se decidió en



todos los casos contrastar con la PCR para asegurar el diagnóstico. Otra alternativa sería esperar un periodo de tiempo y volver a repetir la serología; no sugerimos esta opción pues en nuestras apreciaciones personales hemos visto como en algunos casos, en el periodo de espera, cuadros viscerales sin síntomas dérmicos han avanzado lo suficiente como para sugerir la eutanasia del animal (por desarrollo principalmente de insuficiencias renales graves). Tanto en un supuesto como en otro, la PCR resuelve las dudas en cuestión de horas evitando errores lamentables.

En el grupo B, los cachorros tenían título serológico alto, pero fueron descartados de padecer la enfermedad tras el diagnóstico por PCR, que fue negativo en todos ellos. Este resultado es debido a la presencia de anticuerpos provenientes de la madre en el cachorro, sin existir el agente etiológico en los mismos. La combinación de IFI - PCR en este caso diferencia si el animal es portador del agente etiológico y tiene anticuerpos ó, como en los cachorros estudiados, hay anticuerpos pero no agente etiológico.

Se esta realizando en este momento el estudio de la especificidad y sensibilidad de la técnica PCR comparada con el resto de métodos de diagnóstico, utilizados de forma habitual. Para ello se pro-

cesarán los sueros por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Aglutinación Directa (AD) y una vez analizadas las biopsias de nódulo linfático y médula ósea, además de la sangre, se analizará estadísticamente la concordancia de los resultados de cada una de estas pruebas con los resultados de la PCR.

CONCLUSIÓN FINAL.

Por la simplicidad, economía, tiempo, rapidez, sensibilidad de la técnica, se propone como método de diagnóstico de leishmaniosis canina, el método PCR a partir de exudado de ganglio linfático o biopsia de médula ósea, sin descartar el posible uso de otras muestras como piel hasta ahora no analizadas. Las muestras de sangre periférica no son adecuadas para este tipo de test. Hemos presentado diferentes supuestos en los que la inclusión de la PCR en el diagnóstico de leishmaniosis permite al clínico ganar tiempo para instaurar un tratamiento más precoz, hacer el seguimiento del animal antes, durante y después del mismo, y evitar en otros casos errores diagnósticos, y así, situaciones embarazosas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fremamdes O, Degraive W, Barker RH, Badaro R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 53: 251-255.
2. Blackwell JM. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology* 1992; 104 supp: S19-34.
3. Brujin MHI, Labrada LA, Smyth AJ, Santrich C, Barker DC. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.* 1993; 44: 201-207.
4. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.
5. Laskay T, Miko TL, Negesse Y, Solbach W, Rollinghoff MY, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 273-275.
6. Mathis A, Deplazes P. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of clinical microbiology.* 1995; 3: 1145-1149.
7. Osman FO, Oskan LM, Zijlstra ED, Kroon MM, Schoones GJM, Tahir E, Khalil AG, Hassan AM, Kager PA. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology.* 1997; 35: 2454-2457.
8. Ouellette M, Papadopoulos B, Olivier M. Nouveaux aspects moléculaires et cellulaires du parasite *Leishmania*. *Médecine/Science.* 1997; 13: 934-941.
9. Piaroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary CH, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *Journal of clinical microbiology.* 1994; 32: 746-749.
10. Pogue GP, Lee NS, Koul S, Dwyer DM, Nakhasi HL. Identification of differentially expressed *Leishmania donovani* genes using arbitrarily primed polymerase chain reactions. *J Gene.* 1995; 165: 31-38.
11. Uliana SR, Affonso MHT, Camaro EP, Floete-Winte LM. *Leishmania*: genus identification base on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol.* 1991; 72: 157-163.
12. Van Eys GJJ, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1992; 51: 133-142.

