

Nuevas variantes para la identificación molecular de especies de *Leishmania* en un entorno global.

Autoría principal

Ana Margarita Montalvo¹, Jorge Fraga¹.

Otros autores

Lianet Monzote¹, Orestes Blanco¹, Jean Claude Dujardin², Gert Van der Auwera².

Colaboradores

Simonne de Doncker, Ilse Maes, Ana Lineth García, Jorge Arévalo, Nicolás Veland, Alejandro Llanos, Sayda El Safi, Marina Gramiccia, Charles L. Jaffe, Andrea K. Boggild, Carlos Muskus, Iván Darío Vélez.

Entidad ejecutora principal

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

Entidades participantes

²Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica

Autor para correspondencia

Ana Margarita Montalvo Alvarez.

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Departamento de Parasitología.

Autopista Novia del Mediodía km 61/2. Apartado Postal 601. La Lisa. La Habana. Cuba.

Email: amontalvo@ipk.sld.cu

mmontal@infomed.sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ Lic. **Ana M. Montalvo** Dr.C. (35%): Concibió y diseñó el trabajo. Colaboró en el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *hsp70*. Ejecutó la optimización la fase experimental analítica. Realizó la evaluación con ADN de cepas de referencia y la evaluación diagnóstica. Analizó e interpretó los resultados, realizó la redacción de todos los artículos de su primera autoría y participó en la revisión crítica del resto. Implementó los métodos en el laboratorio de Leishmania del IPK y en laboratorios de Colombia, Bolivia y Perú.
- ✓ Lic. **Jorge Fraga** Dr.C. (30%): Participó en el diseño del trabajo y realizó el análisis *in silico* de secuencias nucleotídicas del gen *hsp70*. Participó en el trabajo experimental en fase analítica y en la evaluación en muestras clínicas. Participó en el análisis de los resultados, la redacción de los artículos científicos de su autoría y la revisión de los restantes. Implementó los métodos en laboratorios de Perú y Bolivia.
- ✓ Lic. **Lianet Monzote** Dr.C (15%): Realizó el mantenimiento *in vitro* e *in vivo* de cepas para la obtención de ADN. Se encargó de la implementación de los procesos de gestión de la calidad en los laboratorios. Colaboró con la evaluación de muestras con ADN puro. Realizó el diagnóstico de casos por el método directo y cultivo.
- ✓ Dr. **Orestes Blanco** MSc (10%): Realizó la evaluación clínica de casos sospechosos en Cuba y de los posibles casos negativos, para el grupo control, con otras enfermedades dermatológicas. Realizó la toma de muestras clínicas y el seguimiento a los pacientes en Cuba.

- ✓ Prof. **Jean Claude Dujardin** Dr.C (5%), **Dr Gert Van der Auwera** Dr. C (5%): Ambos constituyeron la contraparte extranjera en el proyecto de investigación conjunto que permitió la obtención de los resultados que se presentan. Participaron en la asesoría científica, facilitaron programas de análisis bioinformático, la utilización de cepas de referencia y muestras clínicas del Viejo Mundo para la evaluación del desempeño de las nuevas variantes moleculares, así como en la interpretación de resultados y la revisión crítica de las diferentes publicaciones.

Resumen

La leishmaniasis es una parasitosis “olvidada” que permanece sin control, causada por cerca de 20 especies de *Leishmania*. Recientemente se recomendó la identificación de la especie infectante como parte del proceso diagnóstico por varias razones: facilitar un pronóstico adecuado de la enfermedad, debido a la relación que existe entre la especie que parasita y el tratamiento, y por motivos epidemiológicos. Para responder a la necesidad de diagnóstico avanzado en las condiciones de Cuba, donde no hay leishmaniasis autóctona pero sí un número creciente de colaboradores en áreas endémicas, se diseñó una estrategia molecular que permite detectar las especies de *Leishmania* de importancia médica y realizar su identificación a nivel de especie o complejo en un entorno global. En base al análisis de 51 secuencias nucleotídicas del gen *hsp70*, se diseñaron tres nuevas variantes de PCR más sensibles y específicas que la versión original. El polimorfismo genético permitió detectar sitios relacionados con enzimas de restricción útiles para identificar las diferentes especies, mediante el análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP en inglés). Los tres algoritmos de PCR-RFLP demostraron su buen desempeño al ser evaluados con ADN de 121 cepas de referencia pertenecientes a 14 especies de *Leishmania*. La evaluación diagnóstica se realizó con 529 muestras clínicas humanas de 10 tipos diferentes, obtenidas de pacientes con las formas principales de la enfermedad, procedentes de 8 países. Se corroboró la sensibilidad, especificidad, eficiencia en la tipificación y posibilidades de adaptación de las nuevas variantes a contextos clínicos y geográficos diferentes. El desarrollo de estas herramientas permite al Laboratorio Nacional de Referencia contar con capacidades para el diagnóstico molecular de leishmaniasis que lo sitúan entre los de mayor alcance para este propósito a nivel mundial, que se incorporaron al algoritmo diagnóstico para la atención de casos importados. Esto permite ofrecer una valiosa información para el manejo clínico y terapéutico de los pacientes. Los nuevos procedimientos, además, se han incorporado en otros laboratorios con fines diagnósticos o investigativos, contribuyendo a disminuir la poca atención que esta enfermedad ligada a la pobreza recibe en muchas de las áreas endémicas.

Comunicación Corta

Introducción

La leishmaniasis está considerada como una de las enfermedades tropicales olvidadas, que afecta a los segmentos más pobres de la población en Asia, África, América Latina y en menor grado, Europa. Existen tres presentaciones clínicas fundamentales de diferente evolución, gravedad y pronóstico. El diagnóstico depende de la forma clínica, y los métodos varían en sensibilidad y especificidad. La detección del ADN del parásito es el método más sensible y específico para confirmar la

leishmaniasis y en años recientes se ha documentado la importancia de identificar la especie que parasita como parte del proceso diagnóstico. Ello se basa en la relación que existe entre la especie, la forma clínica y su evolución; en la diferente susceptibilidad al tratamiento; y a razones epidemiológicas relacionadas con vectores y reservorios.

La discriminación de especies puede realizarse, entre otros, mediante la digestión enzimática del producto de la PCR con enzimas que revelan fragmentos de restricción cuya longitud puede ser analizada para diferenciar las especies (RFLP siglas en inglés). La amplificación y digestión posterior de un fragmento del gen que codifica para la proteína HSP70 (PCR-G) se encuentra entre los métodos más utilizados. Sin embargo, este procedimiento posee una sensibilidad muy baja y amplifica ADN de *Trypanosoma spp.*, por lo cual se hizo necesario desarrollar otras propuestas que respondieran a las necesidades del contexto cubano, aprovechando las características del mismo gen.

En Cuba no hay leishmaniasis autóctona, pero existe un vector con potencialidades biológicas para la posible transmisión. La colaboración de personal cubano en áreas endémicas de todas las latitudes es creciente, lo que favorece la exposición a vectores y reservorios de numerosas especies patógenas. En este escenario, nos propusimos diseñar, desarrollar y evaluar nuevas variantes moleculares de PCR-RFLP, basadas en el gen *hsp70*, que permitan diagnosticar la enfermedad producida por las especies de mayor importancia médica a nivel global, e identificar la especie que parasita en todos los contextos clínicos y geográficos, para ofrecer un diagnóstico avanzado de esta enfermedad, como parte del Laboratorio Nacional de Referencia y con ello, ofrecer una atención médica de alta calidad a nuestros pacientes.

Diseño, desarrollo y evaluación analítica de las nuevas variantes moleculares de PCR-RFLP

El alineamiento de 51 secuencias nucleotídicas del gen *hsp70* permitió diseñar tres juegos de cebadores específicos al género *Leishmania*, que amplifican fragmentos más cortos que la PCR-G (original): 1422pb. Estos poseen una talla de 1286pb (PCR-F); 593pb (PCR-N) y 741pb (PCR-C) y detectan las 14 especies de *Leishmania* analizadas. La amplificación se evaluó con ADN de 121 cepas de referencia de especies de importancia médica a nivel global y se demostró que todos los PCR poseen una sensibilidad analítica superior, situada en un rango entre 10 y 100fg de ADN, lo que se corresponde con la posibilidad teórica de detectar un parásito de *Leishmania* o menos. La especificidad también es superior, lo que se confirmó al usar como molde de cada PCR el ADN de los 22 microorganismos relacionados evaluados: parásitos, hongos, bacterias y virus. **(Montalvo et al., 2012).**

Se seleccionaron un grupo de enzimas útiles para distinguir las especies o grupos de especies deseados, usando el menor número posible de digestiones, sin producir fragmentos numerosos o muy pequeños (menores de 50pb) y evitando variaciones intra específicas en diferentes cepas de una misma especie. Se obtuvieron patrones *in silico* que se confirmaron al realizar las evaluaciones con ADN puro, de acuerdo a las

respectivas propuestas: RFLP-F, N y C. Cada esquema de digestión permite identificar diferentes especies o grupos de especies, en las respectivas áreas geográficas de circulación. Cada protocolo solo necesita un único producto de PCR y un máximo de dos pasos de digestión enzimática, lo cual constituye también una ventaja en relación a propuestas de otros autores (**Montalvo et al., 2012**).

Se realizó un análisis adicional para distinguir *L. braziliensis* de *L. naiffi*. Esta última, a pesar de pertenecer al subgénero *L. (Viannia)*, cuyas especies producen la forma mucosa de la enfermedad, es una entidad menos patogénica para el hombre lo que hace su distinción importante para orientar la conducta adecuada en el manejo de casos. Además, se buscó una solución alternativa para disminuir los costos, resultando conveniente sustituir la enzima *EcoRII* por otra opción que cumpla los criterios antes establecidos, con lo cual el esquema se actualizó y completó (**Fraga et al., 2013**).

Evaluación del desempeño de las nuevas variantes con muestras clínicas humanas

Se demostró la superioridad de las nuevas variantes mediante la evaluación de un total de 529 muestras clínicas humanas, de 10 tipos diferentes, procedentes de pacientes con las tres formas clínicas principales, de 8 países. Se confirmó la buena especificidad tras analizar 69 muestras negativas. La sensibilidad diagnóstica fue superior para la PCR-N, C y F en ese orden, tendencia que se mantuvo para la eficiencia en la identificación de las respectivas RFLPs. Se identificó la especie infectante en el 76% de las muestras evaluadas, demostrándose correspondencia total entre los resultados de los distintos protocolos y concordancia geográfica con las especies reportadas. Esta evaluación global comenzó con el análisis de 102 muestras de países del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo, incluidas 6 de leishmaniasis canina, cuya sensibilidad diagnóstica se comportó de la manera antes descrita. (**Montalvo et al., 2012**). Además, se demostró la utilidad de los métodos más apropiados para la discriminación de especies neotropicales: PCR-RFLP F y N, utilizando muestras de Perú, donde 3 especies *L. braziliensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis* son responsables del mayor número de casos, junto a *L. lainsoni* y *L. amazonensis*. El ensayo en 89 muestras, 81 de ellas de casos con la enfermedad cutánea y 8 con la forma mucocutánea, demostró que la PCR-N tiene una mayor sensibilidad diagnóstica, con independencia de la forma clínica, o el tipo de muestra evaluada, seguida de la PCR-F, y por último la menos sensible resultó la PCR-G. Se identificaron tres de las especies presentes en el territorio: *L. braziliensis* (63%), *L. peruviana* (20%) y *L. guyanensis* (17%). (**Fraga et al., 2012**). El conjunto de muestras de Bolivia, Colombia y Honduras mantuvo la misma tendencia en la sensibilidad y se identificaron especies distribuidas en esos territorios. El raspado con palillo resultó más eficiente para identificar en Bolivia, mientras en Colombia la aplicación de las RFLP-F y RFLP-N deben adaptarse al estudio según las áreas por la gran presencia de *L. panamensis* en el territorio, que no puede distinguirse de *L. guyanensis* con la variante RFLP-N. En Honduras se identificó *L. infantum (chagasi)* relacionada a la enfermedad cutánea (**Resultados en vías de publicación**). De igual forma, se evaluaron 133 muestras clínicas de la enfermedad cutánea y visceral provenientes de 4 países del Viejo Mundo y se confirmó que también en este contexto la sensibilidad de las nuevas variantes siguió la tendencia descrita,

demostrando significativa superioridad sobre la versión original. La especificidad diagnóstica resultó 100%. La eficiencia en la identificación para esta área fue de 79%, identificándose en las muestras 4 de las de las 5 especies de importancia médica. Ninguna muestra resultó infectada con *L. aethiopica*. Los resultados generales permiten recomendar la versión PCR-RFLP-C como la mejor opción para la identificación de especies que circulan en el Viejo Mundo, directamente a partir de la muestra clínica. **(Montalvo et al., 2014).**

Implementación de las nuevas variantes en Cuba y en países endémicos.

La motivación fundamental de esta investigación fue responder a una necesidad de diagnóstico avanzado de leishmaniasis en el IPK, que adicionalmente, pudiera aplicarse en países endémicos con fines diagnósticos o investigativos. Una vez demostrada la superioridad de las variantes desarrolladas, mediante la evaluación en muestras clínicas de diversa procedencia, se incorporaron al algoritmo diagnóstico de nuestro laboratorio, que originalmente solo contaba con la aplicación de métodos parasitológicos clásicos. Los resultados descritos permitieron enriquecer el esquema diagnóstico con las exigencias más novedosas de la actualidad (detección de género *Leishmania* + identificación de especie infectante), posibilitando incorporar la identificación de la especie directamente en la muestra clínica, utilizando la variante de PCR-RFLP *hsp70* más adecuada en relación al área geográfica de donde proceda el paciente. Esto permite responder de la manera adecuada a colaboradores, viajeros, estudiantes que procedan de cualquiera área endémica de esta parasitosis y necesite el diagnóstico más preciso que garantice un tratamiento óptimo y un seguimiento adecuado **(Montalvo et al., 2012 a)**. Además, el trabajo con laboratorios de áreas endémicas posibilitó que los profesionales a cargo confirmaran las ventajas de estas nuevas variantes para atender a las necesidades diagnósticas y/o investigativas de sus respectivos países, quienes recomendaron e incorporaron estas nuevas metodologías a su quehacer, valorando las ventajas que le ofrecen **(Carta aval del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Medellín, Colombia; Carta aval de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú)**.

Conclusiones

En este trabajo se demostró la superioridad de tres nuevas variantes de PCR-RFLP desarrolladas, basadas en el polimorfismo del gen *hsp70*. Las mismas permiten detectar las 14 especies de mayor importancia médica a nivel global, con una sensibilidad muy superior en relación a versiones precedentes. Estas variantes mostraron un 100% de especificidad y distinguen especies individuales o complejos de especies de interés para el hombre. La evaluación realizada, que abarcó 10 tipos de muestras de todas las formas clínicas y de 8 países diferentes, demostró su validez. Se demostró además que estas herramientas son aplicables a todas las formas clínicas de la enfermedad y tipos de muestras, por lo que tienen gran aplicabilidad a diferentes contextos, tanto en áreas endémicas como en clínicas del viajero y centros de referencia, como el nuestro. Estas nuevas variantes fueron incorporadas al algoritmo diagnóstico de la leishmaniasis en el IPK, lo que permite ofrecer al paciente un servicio muy actualizado y de alta calidad. Otros laboratorios de países endémicos han asumido estos protocolos, para su aplicación diagnóstica e investigativa.

La novedad e impacto científico de los resultados

1. Se desarrollaron tres nuevas variantes de PCR-RFLP, basadas en el gen hsp70, útiles para el diagnóstico avanzado de la leishmaniasis.
2. Se demostró que estas nuevas herramientas son capaces de detectar e identificar las 14 especies de Leishmania de mayor importancia médica de todas las áreas geográficas.
3. Se demostró que estas tres variantes son más sensibles, específicas, aplicables a todas las formas clínicas y tipos de muestras, y adaptables a diferentes contextos geográficos, lo que confirma su aplicabilidad global.
4. El desarrollo de estas variantes sitúa al Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología entre los que cuentan con mayor nivel para la definición de esta parasitosis, al incorporar a su algoritmo diagnóstico estas capacidades para la atención a cooperantes y viajeros.
5. La superioridad de estas herramientas conllevó a la incorporación de las mismas en algunos laboratorios de áreas endémicas, con propósitos diagnósticos e investigativos.

Publicaciones

- ✓ Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 31:1453–1461. (Factor de impacto 2.54)
- ✓ Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia B, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 74: 142-150. (Factor de impacto 2.56)
- ✓ Fraga J, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. HindIII and SdI digests of heat-shock protein 70 PCR for Leishmania typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2013; 77: 245-247 (Factor de impacto 2.56)
- ✓ Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe C, Dujardin JC, et al. Direct Leishmania species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2014; 80:35-39. (Factor de impacto 2.56)
- ✓ Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2012; 64: 108-131.