

Primer informe de *Leishmania naiffi* en Zamora Chinchipe (Ecuador) utilizando el gen que codifica la proteína HSP70

First report of Leishmania naiffi in Zamora Chinchipe (Ecuador) using the gene encoding the HSP70 protein

Luis Alberto Morocho-Yaguana^{1,*}, Gina Stefany Jaramillo-Balcázar¹, Franklin Román-Cárdenas² y Loidy Zamora-Gutiérrez²

¹ Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de la Salud Humana, Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador

² Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador

* Autor para correspondencia: luis.morochoy@unl.edu.ec

Fecha de recepción del manuscrito: 31/07/2020

Fecha de aceptación del manuscrito: 08/06/2021

Fecha de publicación: 15/07/2021

Resumen—En Ecuador se encuentran informadas algunas de las especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Viannia* (V), causante de enfermedades como leishmaniasis cutánea, cutánea difusa no curativa y mucocutánea. El objetivo de este trabajo fue diagnosticar molecularmente posibles casos de leishmaniasis cutánea, a partir de muestras obtenidas por raspado para microscopía y aspirado de linfa para cultivo, en los cantones Palanda y Chinchipe de la provincia Zamora Chinchipe. Se realizó la extracción de ADN de las muestras y la amplificación del gen que codifica la proteína HSP70 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se obtuvieron amplicones de 1422 pb, los cuales fueron purificados y enviados a Macrogen Inc., Korea del Sur, para su secuenciación. Las secuencias presentaron un 91 % de identidad con *Leishmania naiffi*, lo que constituye el primer reporte de esta especie para la provincia Zamora Chinchipe.

Palabras clave—*Leishmania naiffi*, HSP70, Leishmaniasis, Zamora Chinchipe, Ecuador.

Abstract—In Ecuador some of the *Leishmania* species belonging to the subgenus *Viannia* (V.) are found, causing diseases such as cutaneous, diffuse non-curative cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. The aim of this work was to molecularly diagnose possible cases of cutaneous leishmaniasis, from samples obtained by scraping for microscopy and lymph aspiration for culture, in Palanda and Chinchipe cantons of the Zamora Chinchipe province. Extraction of DNA from the samples and amplification of the gene encoding the HSP70 protein were performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR). 1422 bp amplicons were obtained, which were purified and sent to Macrogen Inc., South Korea, for sequencing. The sequences presented 91 % identity with *Leishmania naiffi*, which constitutes the first report of this species for the Zamora Chinchipe province.

Keywords—*Leishmania naiffi*, HSP70, Leishmaniasis, Zamora Chinchipe, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis es una enfermedad de piel, mucosas o vísceras causadas por protozoarios unicelulares del género *Leishmania*, transmitido al hombre mediante la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. El género *Leishmania* es digenético y se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebótomos: *Leishmania* en el intestino medio o anterior y *Viannia* en el intestino posterior, y está establecido por diferentes complejos y especies (Cárdenas Alegría *et al.*, 2012).

Alrededor de 20 especies de *Leishmania* son patógenas para los seres humanos (Kato *et al.*, 2013). Según las ma-

nifestaciones clínicas que se presenten se pueden clasificar de diferente manera: leishmaniasis cutánea leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis cutánea difusa no curativa y leishmaniasis visceral (Montalvo A. *et al.*, 2012). La sintomatología no solo depende del estado inmunológico del paciente, sino también de la especie parásita. Otros autores refieren que existe una predisposición genética del hospedero (Montalvo *et al.*, 2016).

Esta enfermedad es principalmente endémica en regiones tropicales y subtropicales, con 350 millones de personas en riesgo de padecerla (Alvar *et al.*, 2012). Se considera que cada año hay de 1,5 a 2 millones de nuevos casos, de los cuales 500.000 corresponden a la forma visceral; el resto a casos de leishmaniasis cutánea y, en un porcentaje

menor, a leishmaniasis mucocutánea (Montalvo *et al.*, 2016). En los países andinos, la enfermedad es prevalente desde Venezuela al norte de Argentina, a través de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Hashiguchi *et al.*, 2018).

En Ecuador se han reportado siete especies del género *Leishmania*: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) major-like* (Olalla *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2016; Calvopina *et al.*, 2004). Sin embargo, existe información limitada sobre las especies presentes en la zona de estudio. Dada la relación existente entre la especie y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, su evolución, susceptibilidad al tratamiento y manejo epidemiológico, es necesario realizar la correcta identificación de la especie que se esté tratando (Akhoundi *et al.*, 2017).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el diagnóstico de la leishmaniasis se realiza mediante la combinación de un examen clínico con pruebas parasitológicas o serológicas. En áreas endémicas el examen microscópico sigue siendo un diagnóstico útil en los niveles de atención primaria de salud debido a su rentabilidad y simplicidad (Akhoundi *et al.*, 2017). Sin embargo, las pruebas serológicas tienen un valor limitado en las leishmaniasis cutánea y mucocutánea (OMS, 2020).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa es ampliamente utilizada en la identificación de especies de *Leishmania*. El gen que codifica para la proteína HSP70 ha resultado útil para el diagnóstico e identificación de especies, ya que es altamente conservado en numerosos organismos y no está sujeto a selección. Esta diana permite discriminar entre varias especies del subgénero *L. Viannia* y estudiar las relaciones filogenéticas de estas especies (Kato *et al.*, 2016). Se han realizado estudios basados en extracción de ADN de leishmanias a partir de cultivos *in vitro* en medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) y de placas fijadas teñidas con Giemsa provenientes de lesiones presentes en pacientes (Schönian *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue diagnosticar molecularmente posibles casos de leishmaniasis cutánea, a partir de muestras obtenidas por raspado para microscopía y aspirado de linfa para cultivo, en los cantones Palanda y Chinchipe de la provincia Zamora Chinchipe (región sur del Ecuador).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Para el muestreo se recopiló información del MSP y se aplicaron encuestas para ubicar posibles casos de leishmaniasis en zonas endémicas de los cantones Palanda y Chinchipe, en la provincia de Zamora Chinchipe. Como criterios de inclusión se consideraron a pacientes que presentaron úlceras que no cicatrizaban y eran compatibles con leishmaniasis, casos antiguos sin remisión de la enfermedad o casos que se encontraban en tratamiento y firmaron el consentimiento informado.

Durante la búsqueda se encontraron dos casos que cumplieron los criterios de inclusión, de los cuales se tomaron muestras de acuerdo a protocolos validados para microscopía y aspirado de linfa para cultivo, todo previa firma del consentimiento informado (Figura 1) (OMS y OPS, 2019).



Fig. 1: Obtención de linfa por aspirado de los bordes periféricos en paciente masculino con lesión en la mejilla derecha, del cantón Chinchipe, Ecuador.

Aislamientos clínicos y microscopía

Las muestras obtenidas del aspirado de linfa fueron cultivadas en medio NNN e incubadas a 27 °C, mientras que los raspados de las lesiones fueron colocados sobre portaobjetos, secados a temperatura ambiente, y teñidos con Giemsa para la microscopía (Microscopio Olympus 100X) según lo descrito en el Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (OPS, 2019).

Extracción y amplificación de ácidos nucleicos

La extracción de ADN a partir de muestras de raspado cutáneo y de cultivo se realizó utilizando el kit Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) de acuerdo con lo descrito por Motazedian *et al.* (2003). La amplificación de ácidos nucleicos se realizó a partir de la región de 1422 pb perteneciente al gen que codifica para la proteína de choque térmico del citoplasma HSP70, para lo que se emplearon los cebadores descritos por García *et al.* (2004), *hsp70*sen 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' y *hsp70*ant 5'CCGCCATGCTCTGGTACATC3' y descritos para la identificación específica de diferentes especies de *Leishmania*.

El volumen final de la reacción de amplificación fue de 50 μ l, con tampón de concentración 1 x (Invitrogen, USA),

MgCl₂ 1,5 mM, desoxinucleósido trifosfato de concentración 200 μM cada uno, dimetilsulfóxido al 5%, 20 pmol de cebadores y 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen, USA) (García *et al.*, 2004).

El programa de amplificación utilizado fue de una temperatura de 94 °C durante 5 min, seguido de 33 ciclos, cada uno de los cuales constaba de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 61 °C, 3 min a 72 °C y un paso de extensión final de 10 min a 72 °C (García *et al.*, 2004).

Los productos amplificados del gen que codifica la proteína HPS70 de ambas muestras se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE al 1x (Figura 2). Los geles fueron visualizados con fotodocumentador Enduro™ GDS Touch, marca Labnet, utilizando el colorante Sybr Safe (Invitrogen).

Como controles positivos se utilizó ADN extraído de cultivos de promastigotes de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. major-like*, gentilmente donados por el Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.

Análisis de secuencias

Los amplicones fueron enviados a secuenciar en el laboratorio MacroGen Inc. Korea del Sur. Las secuencias parciales obtenidas se analizaron con la herramienta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); posteriormente, fueron procesadas con el programa ChromasPro (versión 2.1.10) para obtener secuencias consenso, las cuales se alinearon mediante el análisis Clustal Wallis con diferentes aislados de referencia. Las secuencias fueron comparadas con las que se encuentran en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Zheng *et al.*, 2000).

RESULTADOS

Dos pacientes menores de un año, de los cantones Chinchipe y Palanda, presentaron lesiones compatibles con leishmaniasis; las lesiones se ubicaron en la mejilla derecha de cada paciente. La madre del paciente 2 refirió que el niño había recibido cuatro dosis del medicamento Glucantime®.

Aislamientos clínicos y microscopía

El análisis microscópico mostró la presencia de amastigotes en ambas muestras. El cultivo de la muestra 1 fue positivo, observándose la presencia de promastigotes característicos del género *Leishmania*, mientras que el aislamiento *in vitro* para la muestra número 2 resultó negativo.

Amplificación de ácidos nucleicos

De los productos amplificados del gen que codifica la proteína HPS70 para ambas muestras, se obtuvieron bandas de aproximadamente 1422 pb (Figura 2), correspondientes al género *Leishmania*, y fueron coincidentes con los controles positivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.

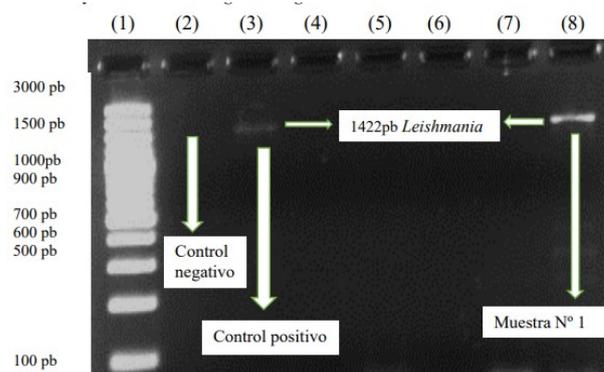


Figura 2. Análisis electroforético de productos de PCR de *Leishmania* en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR, amplificando la proteína hsp70.

Línea 1: Marcador de tamaño de ADN-ladder 100 - 3000 pb.

Línea 2: Control negativo

Línea 3: Control positivo

Línea 8: Muestra aislada de pacientes *L.(V) naiffi*

Fig. 2: Análisis electroforético de productos de PCR de muestra N° 1 en geles de agarosa amplificando la proteína HSP70. Línea 1: Marcador de tamaño de ADN-ladder 100-3000 pb; Línea 2: Control negativo, agua ultrapura; Línea 3: Control positivo, ADN de *L. guyanensis*; Línea 8: Muestra aislada de paciente.

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, utilizando el programa BLAST, se determinó que las muestras 1 y 2 presentan un 91% de identidad con las secuencias de *L. naiffi* publicadas en la base de datos del NCBI.

DISCUSIÓN

El método por microscopía resultó ser sensible, ya que ambas muestras mostraron la presencia de amastigotes. A pesar de ser muy económico no proporciona la discriminación entre especie y su sensibilidad depende en gran medida del número y dispersión de parásitos de la muestra. Muchos autores creen necesario la experticia del personal para un diagnóstico. En áreas endémicas sigue siendo un método útil a nivel primario de atención de salud debido a su rentabilidad (Akhoundi *et al.*, 2017).

En cuanto al cultivo, este tiene mucha importancia para el diagnóstico de rutina. Lamentablemente, la recuperación de parásitos en cultivo rara vez supera el 70%, incluso para cepas que se mantienen fácilmente *in vitro*. El cultivo requiere medios especializados y costosos; además, resulta lento y requiere de un laboratorio equipado y de elevada complejidad (Berman, 1997).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica altamente sensible y específica, a diferencia de métodos microscópicos y de cultivo (Montalvo A. *et al.*, 2012). En estudios similares se ha utilizado como diana principal el gen HSP70 seguido de la secuenciación de los productos de PCR (García *et al.*, 2004; Montalvo *et al.*, 2016; Montalvo Ana *et al.*, 2014) para la caracterización de la especie a partir de raspados cutáneos (Torres *et al.*, 2018) para un diagnóstico eficaz que aporte a la epidemiología y tratamiento oportuno.

Según informes de la OMS, la epidemiología de la leishmaniasis cutánea en las Américas es muy compleja,

pues se observan variaciones en los ciclos de transmisión, los reservorios, los flebótomos vectores, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento. Además, hay varias especies de *Leishmania* en la misma zona geográfica (OMS, 2020). El primer reporte de esta enfermedad fue realizado por Valenzuela en Ecuador en 1920, en Esmeraldas (Hashiguchi *et al.*, 2018).

Posteriormente Calvopina *et al.* (2004) y colaboradores informan de la presencia de las especies *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. major* like y de los híbridos *L. panamensis/guyanensis* y *L. guyanensis/braziliensis*. Los primeros reportes de *Leishmania naiffi* en Ecuador según Kato *et al.* (2013) fueron en el norte de la selva amazónica, en militares de edad adulta, y fue identificada usando como diana el gen que codifica para la proteína citocromo b (Kato *et al.*, 2013). En la amazonía se identificaron *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni* y *L. naiffi*, y en la provincia de Zamora Chinchipe únicamente se ha reportado la presencia de *L. braziliensis* (Kato *et al.*, 2016), por lo que este estudio constituye el primer informe de la presencia de *L. naiffi* para esta provincia.

La metodología usada permitió la identificación de *L. naiffi* a pesar de que una de las muestras provino de un paciente al cual ya se le había administrado 4 dosis de Glucantime®. Así y todo, la técnica permitió el diagnóstico e identificación de especies de *leishmania*, lo que concuerda con lo descrito por Muñoz en 2015.

CONCLUSIONES

Se confirmó a través de diagnóstico molecular la presencia de *L. naiffi* en la provincia de Zamora Chinchipe usando como diana la secuencia parcial del gen que codifica para la proteína de choque térmico HPS70. Se cuenta con una metodología de diagnóstico que facilita el pronóstico de lesiones cutáneas que puedan evolucionar a lesiones mucocutáneas siendo muy importante para casos de pacientes inmunocomprometidos.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización: LMY, GJB, LZG; metodología: LMY, FRC y GJB; análisis formal: LMY, GJB y LZG.; investigación: LMY, GJB, LZG y FRC; recursos: GJB y UNL; curación de datos: LMY, FRC y LZG; redacción — preparación del borrador: LZG y LMY; redacción — revisión y edición: LZG y LMY; visualización: LMY y LZG; supervisión: LMY; administración de proyecto: LMY; adquisición de financiamiento para la investigación: LMY y GJB. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación ha sido financiada por la Universidad Nacional de Loja a través del proyecto 20-DI-FSH-2019.

REFERENCIAS

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... Sereno, D. (2017). *Leishma-*

nia infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0035671

Berman, J. D. (1997). Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*, 24(4), 684–703. doi: 10.1093/clind/24.4.684

Calvopina, M., Armijos, R. X., y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663–672. doi: 10.1590/S0074-02762004000700001

Cárdenas Alegría, Ó. V., Romero Calle, D., Salamanca Capusiri, E., Santalla Vargas, J. A., Oporto Portugal, P., Arteaga Voigt, D., ... Giménez Turba, A. (2012). Analysis of molecular markers for typing of *Leishmania* spp. parasites circulating in La Paz department, Bolivia. *Biofarbo*, 20(1), 8–21.

García, L., Kindt, A., Bermúdez, H., Llanos Cuentas, A., Doncker, S. D., Arevalo, J., ... Dujardin, J.-c. (2004). Culture-Independent Species Typing of Neotropical. *Society*, 42(5), 2294–2297. doi: 10.1128/JCM.42.5.2294

Hashiguchi, Y., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Velez, L. N., Villegas, N. V., Hashiguchi, K., ... Kato, H. (2018). Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the causative *Leishmania* parasites and clinico-epidemiological features. *Acta Tropica*, 177(December), 135–145. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.028

Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., y Hashiguchi, Y. (2013, dec). First human cases of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*, 128(3), 710–713. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.001

Kato, H., Gomez, E. A., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., ... Hashiguchi, Y. (2016). Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7). doi: 10.1371/journal.pntd.0004844

Montalvo, A. M., Fraga, J., Montano, I., y Monzote, L. (2016). V36S1a06. , 36, 37–44.

Montalvo A., A. M., Fraga, J., y Monzote, C. L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis : de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN *Leishmaniasis* diagnosis : going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(2), 108–131. doi: 10.1007/s10096-011-1463-z

Montalvo Ana, Jorge, F., Rodríguez, O., Blanco, O., Llanos-Cuentas, A., y García, A. L. (2014). Artículo Original ON THE GENE ENCODING HSP20. , 31(4), 635–643.

Olalla, H. R., Velez, L. N., Kato, H., Hashiguchi, K., Cáceres, A. G., Gomez, E. A., ... Hashiguchi, Y. (2015). An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986-2012. *Acta Tropica*, 146(October 2017), 119–126. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.015

OMS. (2020, mar). *Leishmaniasis. Datos y cifras.*

OMS, y OPS. (2019). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de la Leishmaniasis en las Américas* (Vol. 53) (n.º 9). Washington D.C..

Schönian, G., Kuhls, K., y Mauricio, I. L. (2010). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*, 138(4), 405-425. doi: 10.1017/

S0031182010001538

Torres, L., Rodríguez, G., Sosa Ochoa, W., Ortiz, J. J., y Martínez, D. (2018). Implementación de un PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar especies de Leishmania en una zona endémica a Leishmaniasis Cutánea Atípica en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*(23), 81-89. doi: 10.5377/rct.v0i23.6862