

Artículo original

## Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*

Andrea Orué<sup>a</sup>, Nancy Y. De Abreu<sup>a</sup>, Clara Martínez<sup>b</sup>, Alexis Mendoza-León<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias

<sup>b</sup>Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina,  
Universidad Central de Venezuela  
Caracas - Venezuela

Recibido 10 de octubre de 2007; aceptado 13 de febrero de 2008

**Resumen:** *Leishmania* es el agente causante de la compleja enfermedad conocida como leishmaniasis. Las distintas especies de este parásito protozoario se encuentran agrupadas en dos subgéneros, *Viannia* y *Leishmania*, de acuerdo a su desarrollo en el mosquito vector. Un ensayo de PCR, β500-PCR, específico del subgénero *Viannia*, ha sido desarrollado utilizando la secuencia de ADN genómico denominada β500. En este trabajo se presenta el aislamiento e identificación de una secuencia genómica de 280 pb, L280, a partir del ADN genómico de *Leishmania (Leishmania) mexicana* luego de aplicar el ensayo β500-PCR en condiciones de baja rigurosidad. La secuenciación parcial de L280 permitió diseñar un ensayo de PCR (L280-PCR) que generó un producto de amplificación de 260 pb, en distintas condiciones de rigurosidad, cuando se utilizó el ADN genómico de distintas especies pertenecientes al subgénero *Leishmania*. El ensayo L280-PCR resultó negativo para el ADN genómico de distintas especies del subgénero *Viannia* al igual que para el ADN de otros organismos kinetoplastidos o humano. Los resultados sugieren que el ensayo L280-PCR es específico del subgénero *Leishmania*.

**Palabras clave:** *Leishmania*, identificación molecular, marcador molecular, leishmaniasis

## Identification of a genomic DNA sequence of *Leishmania*, specific of *Leishmania* subgenus

**Abstract:** *Leishmania* is the causal agent of the leishmaniasis disease. The different species of this protozoa parasite are grouped in two subgenera, *Viannia* and *Leishmania*, according to their development in the sandfly vector. A specific PCR assay, β500-PCR, has been developed for the *Viannia* subgenus using the genomic β500 DNA sequence. In the present work we present the isolation and identification of a genomic sequence of 280 bp, L280, obtained from genomic DNA of *Leishmania (Leishmania) mexicana* after application of the β500-PCR assay at low stringency. After partial sequencing of L280 a PCR assay was generated, L280-PCR, this yielded a product of 260 bp at different conditions of stringency, when genomic DNA of different species of *Leishmania* subgenus was used. The L280-PCR assay was negative to genomic DNA of species belonging to the *Viannia* subgenus and also to other kinetoplastid organisms and human. The results suggest specificity of the L280-PCR assay for the *Leishmania* subgenus.

**Keywords:** *Leishmania*, molecular identification, molecular marker, leishmaniasis

\* Correspondencia:  
E-mail: amendoza50@cantv.net

### Introducción

*Leishmania* es un protozoario, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, agente causal en humanos y en animales domésticos de la enfermedad conocida como leishmaniasis. La enfermedad se presenta con un amplio espectro de manifestaciones clínicas siendo las más frecuentes lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales de las cuales la última es la forma más severa [1-4]. Las manifestacio-

nes clínicas de leishmaniasis son complejas y entre otras cosas dependen de la especie responsable de la infección, de la interacción parásito-hospedador y de la correlación genética de tal interacción [5].

La identificación de estos parásitos es de suma importancia en términos epidemiológicos, de prevención y control de la enfermedad. De acuerdo a su desarrollo en el tracto digestivo del insecto vector, las distintas especies de *Leishmania* se agrupan en dos subgéneros, *Leishmania* y

*Viannia*, siendo este último autóctono de América [3,6]. Se han descrito varias especies en cada subgénero, incluidas aquellas patógenas en humanos, y varios han sido los métodos fenotípicos o genotípicos utilizados para la identificación y discriminación de las distintas especies de *Leishmania* [7-13]. En términos genotípicos, varias secuencias de ADN, fundamentalmente repetitivas, se han identificado y descrito como marcadores moleculares en la identificación de *Leishmania*, al igual que muchas de ellas han sido utilizadas en la estandarización de algunos ensayos específicos de PCR. Por ejemplo el ADN de kinetoplasto (kADN) [9,12,14], y secuencias de ADN nuclear como las secuencias del mini-exón [15], la región de los genes de tubulina [11] y la secuencia única del gen de la glucosa 6-P dehidrogenasa [16] entre otras. En estudios previos se identificó y demostró la especificidad para el subgénero *Viannia* de una de estas secuencias de ADN genómico,  $\beta$ 500, la cual es intergénica en la región de los genes de la  $\beta$  tubulina. Luego de su secuenciación se seleccionaron oligonucleótidos específicos que permitieron estandarizar

las condiciones de un ensayo de PCR ( $\beta$ 500-PCR) específico para la identificación de las especies de dicho subgénero [10,11]. En este trabajo se identifica una secuencia de ADN genómico de 280 pb (L280), aislada de *L. (L.) mexicana* mediante la aplicabilidad del ensayo  $\beta$ 500-PCR en condiciones de baja rigurosidad, la cual resultó ser específica de las especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Leishmania*. La secuenciación parcial de L280, permitió diseñar un ensayo de PCR, L280-PCR, el cual se evaluó exitosamente en la identificación específica de las especies de este subgénero.

## Materiales y Métodos

### Microorganismos

En la Tabla 1 se presentan las cepas de *Leishmania* empleadas en este estudio, las cuales en su mayoría son consideradas como cepas de referencia por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Tabla 1. Designación de las especies de *Leishmania* y otros organismos.

Subgénero	Especie <sup>a</sup>	Designación de cepa <sup>b</sup>	Abreviatura	Origen
<i>Leishmania (L.)</i>	<i>mexicana</i> ,	MHOM/BZ/82/BEL21	BEL21	Belize
		MNYC/BZ/62/M379	M379	Belize
		MHOM/VE/90/M9012	M9012	Venezuela
	<i>amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	PH8C5 <sup>c</sup>	Brasil
		MHOM/VE/80/NR	NR	Venezuela
	<i>garnhami</i>	MHOM/VE/76/JAP78	JAP	Venezuela
	<i>major</i>	MHOM/SU/59/P	P	USSR
	<i>tropica</i>	MHOM/SU/74/K27	K27	
	<i>donovani</i>	MHOM/IN/80/DD8	DD8	India
	<i>Viannia (V.)</i>	<i>braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903	M2903
<i>guyanensis</i>		MHOM/BR/75/M4147	M4147	Brasil
<i>panamensis</i>		MHOM/PA/71/LS94	LS94	Panamá
<i>lainsoni</i>		MHOM/BR/81/M6426	M6426	Brasil
Otras <i>Leishmania</i>	<i>enriettii</i>			
Otros <i>Kinetoplastidae</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>		EP	
	<i>Trypanosoma rangeli</i>			
	<i>Crithidia fasciculata</i>			
	<i>Leptomonas samueli</i>		ATCC12858	

<sup>a</sup>Se utilizó la nomenclatura propuesta por Lainson y Shaw [6] para la clasificación de *Leishmania* spp. <sup>b</sup>La OMS ha designado como cepas de referencia a la mayoría de las que se han utilizado en este estudio. <sup>c</sup>Corresponde a un clón derivado de *L. (L.) amazonensis* PH8.

Los promastigotes de *Leishmania* sp. se cultivaron en medio Schneider's *Drosophila* (SIGMA) suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SIGMA) y 50  $\mu$ g/ml de Kanamicina a temperatura ambiente [11].

### Aislamiento del ADN

El ADN total de las diferentes especies de *Leishmania* sp., fue aislado a partir de 100 ml de cultivos de promastigotes en fase logarítmica tardía de crecimiento siguiendo

la metodología previamente descrita [10,11]. Los promastigotes fueron centrifugados a 5000 g por 10 min., posteriormente el sobrenadante fue descartado y al precipitado se le añadieron 2 ml de buffer de lisis SDS (Tris HCl 0.01M, SDS 0.5%, NaCl 0.1M, EDTA 1mM). La mezcla se incubó por 30 min. a temperatura ambiente y seguidamente se añadió un volumen de fenol-cloroformo (1:1 v/v) con agitación suave; la mezcla se centrifugó a 5000 g por 10 min, la fase acuosa fue separada a un tubo estéril y a la misma se le añaden 2.5 vol de etanol. El ADN fue precipi-

tado mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min., el sobrenadante se descartó y el sedimento (ADN) se resuspendió en 0.20 ml de buffer TE 1X (Tris-HCl 10mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, pH 7).

#### Clonación y secuenciación

El ADN genómico de la cepa de referencia *L. (L.) mexicana* BEL21 fue utilizado en un ensayo  $\beta$ 500-PCR (específicos para el subgénero *Viannia* [10]), a una temperatura de hibridación de los oligonucleótidos A<sub>2</sub> y A<sub>10</sub> de 50°C, generando un producto de 280 pb (L280) y otro de 260 pb. Luego de la extracción del gel de agarosa y purificación, el fragmento de L280 fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Posteriormente, el clon fue purificado y parcialmente secuenciado mediante técnicas convencionales.

#### Ensayo de PCR

El ensayo de amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando el ADN total de las cepas descritas en la Tabla 1. Todas las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 0.025 ml, los cuales contenían 5 ng de ADN de *Leishmania* spp; 50 pmol de los oligonucleótidos requeridos (Tabla 2) y 0.018 ml de PCR SUPER MIX (Invitrogen). Las diferentes reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MJResearch PTC100, bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 4 min., seguido por cuarenta ciclos con las condiciones siguientes: 95°C por 1 min., 50°C (baja rigurosidad), 55°C (mediana rigurosidad) o 60°C (alta rigurosidad) por 2 min., 72°C por 3 min. y una extensión final a 72°C por 10 min. El ensayo de PCR para la amplificación de la secuencia de ADN  $\beta$ 500 ( $\beta$ 500-PCR), específica de subgénero *Viannia* fue descrito previamente [10].

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para los ensayos de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia(5'-3')	pb	%G-C	Tm (°C) <sup>d</sup>
<i>L. (Viannia)</i> <sup>a</sup>				
A <sub>2</sub>	ACACgCgCTTgCgCACTCgT	20	65	70
A <sub>10</sub>	CCCCCTgCCTCgCCTgC	17	82	69
<i>L. (Leishmania)</i> <sup>b</sup>				
F1	TgTgggTgTgggTgTgTgTATg	24	54	74
F2	TgCAgCAAgATgCACggATg	20	55	ND
B1	TCCgTgCATCTTgCTgCATC	20	55	ND
B2	CgTgAAgAACATACAAAgCCTCCC	24	50	72
Tub 1 <sup>c</sup>	ATgCgTgAgATCgTTTCC	18	50	54
Tub 6 <sup>c</sup>	ggCggCCTgCATCAT	15	66	40

<sup>a</sup>Estos oligonucleótidos fueron descritos previamente como específicos del subgénero *Viannia* [10,11].

<sup>b</sup>Fueron diseñados como parte del presente trabajo.

<sup>c</sup>Amplifican un producto de 900 pb en ambos subgéneros.

<sup>d</sup>El Tm fue calculado a NaCl 0.1 M. pb: pares de base. ND: no determinado.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 90 mM, pH 8.2, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM), a 80 V durante 2 horas y se visualizaron bajo luz ultravioleta luego de tinción del gel con bromuro de etidio una vez concluida la electroforesis.

## Resultados

### Identificación de una secuencia de ADN genómico específica del subgénero *Leishmania*

El ADN genómico de diferentes cepas de *Leishmania* del Nuevo Mundo representativas del subgénero *Leishmania*, fue utilizado para evaluar los productos generados de la aplicación del ensayo  $\beta$ 500-PCR, específico para el subgénero *Viannia* [10], a una baja rigurosidad (Figura 1). Dicho ensayo en condiciones de alta rigurosidad (60°C) produce un producto único de amplificación de 375 pb en

las especies del subgénero *Viannia*. Los resultados muestran que el ensayo a una temperatura de 50°C, utilizando el ADN de la cepa *L. (V.) braziliensis* (línea 1), representativa del subgénero *Viannia*, generó el fragmento esperado de 375 pb, mientras que el ADN genómico de diferentes especies representativas del subgénero *Leishmania*, mostraron un patrón de bandas homogéneo caracterizado por dos bandas principales de 280 y 260 pb respectivamente (líneas 2 a 6). Sin embargo, la cepa *L. (L.) tropica* (línea 7), representante de este último subgénero en el Viejo Mundo, al igual que la cepa *L. enriettii* (línea 8) no produjeron ningún producto de amplificación en las regiones indicadas.

El fragmento de 280 pb, el cual fue denominado L280, se purificó a partir de la cepa de referencia *Leishmania (Leishmania) mexicana* BEL21. Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-Teasy y parcialmente secuenciado, lo cual permitió diseñar diferentes pares de oligonucleótidos (Tabla 2) cuyo uso potencial en la identificación de las

distintas especies del subgénero *Leishmania* fue evaluado a través de ensayos de PCR (Figura 2).

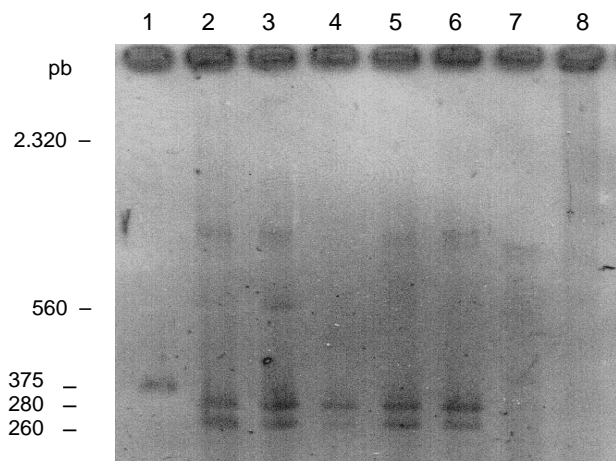


Figura 1. Identificación de la secuencia L280 en *Leishmania* spp. mediante el ensayo  $\beta$ 500-PCR, específico del subgénero *Viannia*. Temperatura: 50°C. Marcador de peso molecular: ADN- $\lambda$  Hind III. ADN genómico usado: subgénero *Viannia* y *Leishmania*. Línea 1: *L. (V.) braziliensis* M2903; Líneas 2 y 6: *L. (L.) mexicana* BEL 21; Línea 3: M379; línea 4: *L. (L.) amazonensis* PH8; línea 5: cepa venezolana JAP; línea 7: *L. (L.) tropica*; línea 8: *L. enriettii*.

La amplificación del ADN genómico de *L. (L.) mexicana* BEL21 utilizando las diferentes combinaciones de oligonucleótidos y una temperatura de 50°C, muestra que el par F<sub>1</sub>/B<sub>1</sub> genera un producto de 180 pb (línea 2), F<sub>2</sub>/B<sub>2</sub> uno de 110 pb (línea 3), F<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> un producto de 260 pb (línea 4), mientras que el par F<sub>2</sub>/B<sub>1</sub> no generó ningún producto de amplificación. Tomando en cuenta el tamaño del producto generado durante el proceso de amplificación, se seleccionó el par F<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> para llevar a cabo la evaluación de la secuencia L280 como un marcador molecular de las especies del subgénero *Leishmania*. La amplificación del mismo ADN con el par de oligonucleótidos del ensayo de PCR para  $\beta$ 500, A<sub>2</sub>/A<sub>10</sub>, fue utilizado como control de la reacción (línea 1).

#### Evaluación de la amplificación de ADN-L280 en *Leishmania* spp.

El ADN genómico de distintas cepas de referencia y el de aislados venezolanos de *Leishmania*, previamente caracterizados como pertenecientes al subgénero *Leishmania* [11], al igual que la combinación de oligonucleótidos F<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> y una temperatura de hibridación de los mismos de 50°C, fue utilizado en la evaluación del ensayo L280-PCR (Figura 3). Los resultados muestran que un producto principal de 260 pb se generó a partir del ADN de las cepas de referencia del subgénero perteneciente al Nuevo Mundo (líneas 2, 3, 7 y 14), al igual que en los aislados venezolanos (líneas 4, 8, 10 y 12). Por otro lado, ningún producto de tamaño similar se obtuvo cuando se utilizó el ADN de *L. enriettii* (línea 5), o representantes del subgénero *Leishmania* del Viejo Mundo como *L. (L.) tropica* (línea 6) y *L. (L.) major* (línea 9), o representantes del subgénero *Viannia* (línea 11), indicando una especificidad del ensayo para

las especies del Nuevo Mundo pertenecientes al subgénero *Leishmania*.

#### Especificidad del ensayo L280-PCR

A fin de evaluar la especificidad de los oligonucleótidos F1/B2 en la identificación de las especies del subgénero *Leishmania* se procedió a realizar el ensayo L280-PCR en diferentes condiciones de rigurosidad, empleando además de los ADNs previamente evaluados, el ADN de otros organismos kinetoplásticos (Figura 4). Los resultados muestran un producto principal de amplificación de 260 pb a la temperatura de 55°C (Figura 4A), al igual que a 60°C (Figura 4B) donde fue único, en las especies del subgénero *Leishmania* (Panel A, líneas 2 a 5 y 13; Panel B, líneas 2 a 5, 8, 13 y 19). Al igual que a 50°C, ningún producto del tamaño esperado se obtuvo a 55 o 60°C con el ADN de ninguna especie del subgénero *Leishmania* del Viejo Mundo utilizadas en este estudio (Panel A y B, línea 7), ni de las especies del subgénero *Viannia* (Panel A y B, líneas 9 a 12), como tampoco de otros kinetoplastidos (Panel A y B, líneas 14 a 17) o humano (Panel A y B, línea 18). Los resultados sugieren la ausencia de la secuencia L280 en el subgénero *Viannia* y en otros organismos kinetoplastidos, al igual que una gran especificidad del ensayo para especies del subgénero *Leishmania* con excepción de *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major*.

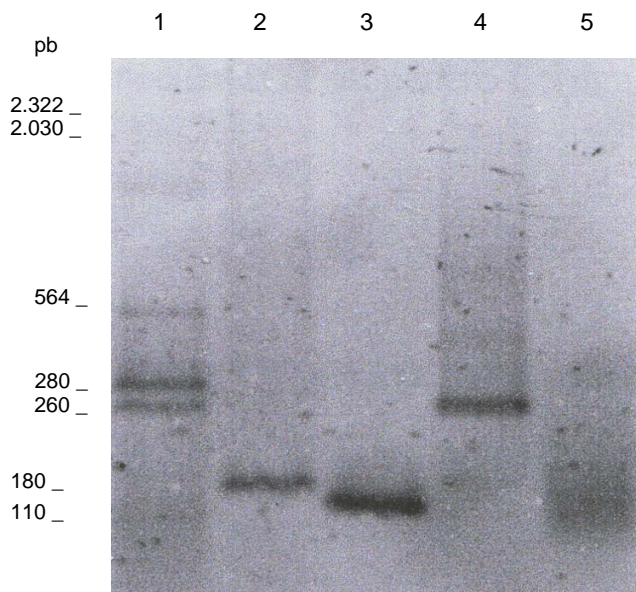


Figura 2. Evaluación de los diferentes productos de amplificación obtenidos a partir de los oligonucleótidos generados de la secuencia L280. El ADN genómico de *L. (L.) mexicana* BEL 21 fue sometido al ensayo  $\beta$ 500-PCR. El fragmento L280 fue aislado, purificado y parcialmente secuenciado, lo cual permitió el diseño de algunos oligonucleótidos para evaluar su amplificación. Ensayos independientes de PCR se llevaron a cabo a una temperatura de 50°C, utilizando el ADN genómico de BEL21 y diferentes combinaciones de pares de oligonucleótidos. Línea 1: oligonucleótidos A<sub>2</sub>/A<sub>10</sub> específicos del subgénero *Viannia*. Línea 2: F<sub>1</sub>/B<sub>1</sub>. Línea 3: F<sub>2</sub>/B<sub>2</sub>. Línea 4: F<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>; Línea 5: F<sub>2</sub>/B<sub>1</sub>. Los números a la izquierda de la figura indican la posición y tamaño (pb) de los productos de amplificación.

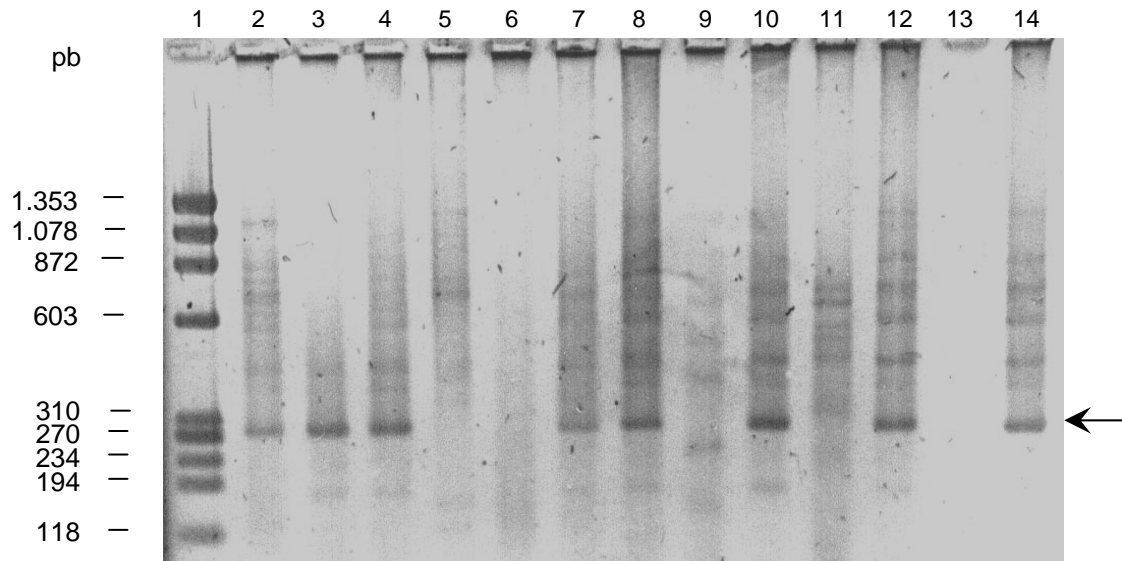


Figura 3. Amplificación de la secuencia L280 en el subgénero *Leishmania*. El ADN genómico de diferentes cepas de *Leishmania* pertenecientes a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* respectivamente, fue utilizado para evaluar el ensayo de amplificación de L280 a una temperatura de 50°C, utilizando los oligonucleótidos F<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>. Línea 1: ADN -ΦX174 RF *Hae* III. Línea 2 y 14: *L. (L.) mexicana* BEL 21. Línea 3: *L. (L.) mexicana* M379. Línea 4: cepa venezolana NR. Línea 5: *L. (L.) enriettii*. Línea 6: *L. (L.) tropica*. Línea 7: *L. (L.) amazonensis* PH8. Líneas 8 y 12: cepa venezolana JAP. Línea 9: *L. (L.) major*. Línea 10: cepa venezolana M9012. Línea 11: *L. (V.) guyanensis* M4147 (subgénero *Viannia*). Línea 13: control de reactivos. La flecha indica el producto esperado de 260 pb.

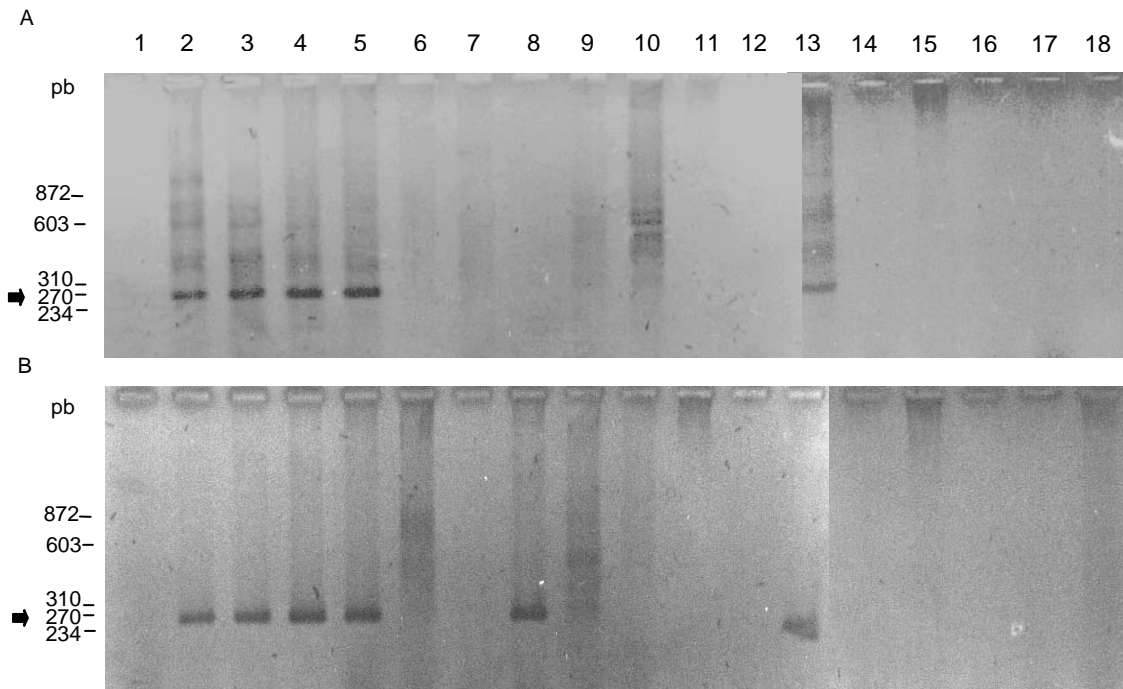


Figura 4. Especificidad del ensayo L280-PCR. El mismo ensayo de amplificación para la secuencia de ADN L280 descrito en la Figura 3, fue evaluado a una temperatura de 55°C (A) y 60°C (B), utilizando el ADN genómico de *Leishmania* spp. y otros organismos que incluyeron otros kinetoplastidos y humano. Las especies del subgénero *Leishmania* están representada por *L. (L.) mexicana* BEL 21 (A y B, líneas 2 y 13), *L. (L.) mexicana* M379 (A y B, línea 3) y la cepa venezolana M9012 (A y B, línea 5; B, línea 8), *L. (L.) amazonensis* NR (A y B, línea 4), *L. (L.) enriettii* (A y B, línea 5), y *L. (L.) tropica* (A y B, línea 7); las del subgénero *Viannia* por *L. (V.) braziliensis* M2903 (A, línea 8; A y B, línea 9), y (línea 6), *L. (V.) guyanensis* M4147 (A y B, línea 10), *L. (V.) lainsoni* M6426 (A y B, línea 11), y *L. (V.) panamensis* LS94 (A y B, línea 12). Otros kinetoplastidos: *Trypanosoma cruzi* (A y B, línea 14), *T. rangeli* (A y B, línea 15), *Leptomonas* spp. (A y B, línea 16), *Crithidia* spp. (A y B, línea 17); humano (A y B, línea 18). El ADN-ΦX174 RF *Hae* III fue utilizado como marcador de peso molecular (no indicado) y una muestra sin ADN representó el control de reactivos (A y B, línea 1). La flecha indica el producto esperado de 260 pb.

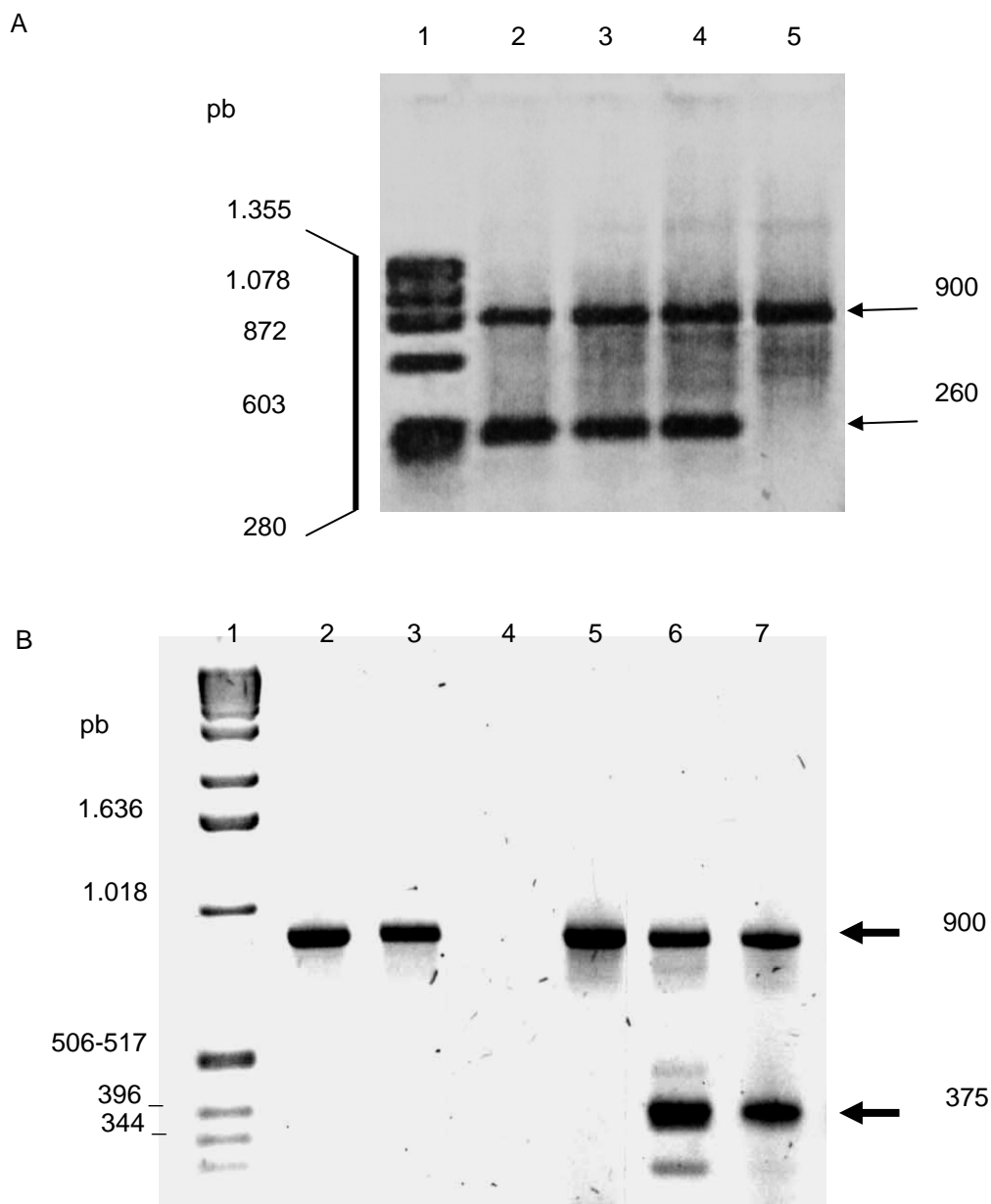


Figura 5. Ensayo de PCR múltiple en la identificación de *Leishmania* spp. El ADN genómico de especies representativas del subgénero *Viannia* y *Leishmania* fue sometido en forma independiente, a los ensayos L280-PCR (A) y  $\beta$ 500-PCR (B) a una alta rigurosidad (60°C), incluyendo en cada caso un segundo par de oligonucleótidos (Tub1 y Tub 6) que amplifica en forma específica un fragmento de 900 pb de la región de codificación del gen de la  $\beta$  tubulina. Las muestras corresponden a las amplificaciones de *L. (L.) mexicana* BEL 21 (A y B, línea 2), *L. (L.) amazonensis* NR (A y B, línea 3), *L. (L.) donovani* DD8 (A, línea 4; y B, línea 5), *L. (V.) braziliensis* M2903 (A, línea 5; y B, línea 6), y una muestra de una biopsia (B, línea 7). El ADN- $\Phi$ X174 RF Hae III fue utilizado como marcador de peso molecular en el ensayo L280-PCR (A, línea 1), mientras que 1 kb ADN ladder fue utilizado como marcador de peso molecular en el ensayo  $\beta$ 500-PCR (B, línea 1) y una muestra sin ADN representó el control de reactivos (B, línea 4). Las flechas y números de la derecha representan la ubicación y tamaño (pb) de los productos del ensayo de PCR.

#### Ensayo de PCR múltiple en la identificación de *Leishmania* spp.

Una evaluación adicional de la especificidad de la secuencia L280, se llevó a cabo a través de la amplificación de un segundo marcador genérico para las distintas especies de *Leishmania* en el ensayo L280-PCR. Para ello se procedió a incorporar un segundo par de oligonucleótidos

que amplifica una región de 900 pb del gen de la beta tubulina, el cual es común tanto para el subgénero *Leishmania* como para el subgénero *Viannia* (Figura 5). Los resultados muestran que cuando el ADN utilizado en el ensayo múltiple de PCR correspondía a especie de *Leishmania* del subgénero *Leishmania* (Figura 5A), se produjeron dos productos de amplificación con un tamaño de 900 y 260 pb (líneas 2, 3 y 4), mientras que un único producto

de 900 pb fue obtenido para especies del subgénero *Viannia* (línea 5). Comparativamente, se llevó a cabo un ensayo similar utilizando la amplificación de la secuencia  $\beta$ 500, específica del subgénero *Viannia* [10] (Figura 5B), demostrándose un producto único de amplificación de 900 pb en las cepas pertenecientes al subgénero *Leishmania* (líneas 2, 3 y 5), y dos productos de 900 y 375 pb en cepas pertenecientes al subgénero *Viannia* (línea 6 y 7). Es de hacer notar que el ADN genómico de la especie del Viejo Mundo *L. (L.) donovani* fue positivo en la amplificación de L280. Los resultados confirman la especificidad de las secuencias L280 y  $\beta$ 500.

## Discusión

La identificación precisa de un organismo patógeno, representa un punto clave en el diagnóstico temprano de la enfermedad, siendo de suma importancia en la implementación y evaluación de programas de tratamiento y control de la misma. La leishmaniasis es una enfermedad compleja causada por diferentes especies del protozoario perteneciente al género *Leishmania*; muchas han sido las aproximaciones realizadas en pro del desarrollo de técnicas moleculares que puedan ser utilizadas en la identificación de estos parásitos, para luego ser aplicadas en estudios epidemiológicos. Estudios previos, han puesto de manifiesto la utilidad de metodologías moleculares como el análisis del polimorfismo de restricción (RFLP) [17] y la técnica de PCR [12,13], además del uso de secuencias de ADN repetitivo como los mini-círculos del kADN o secuencias de ADN genómico como el mini-exón, la región de los genes de la  $\beta$  tubulina ej. ADN  $\beta$ 500, entre otras, en la identificación específica de las distintas especies del género *Leishmania*. En el caso particular del subgénero *Viannia* un ensayo de PCR,  $\beta$ 500-PCR, ha sido implementado para la detección e identificación específica de las especies que conforman este subgénero, donde condiciones de alta rigurosidad (60°C) produce un producto de amplificación de 375 pb que tipifica a las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* [10,17].

En este trabajo se identificó y evaluó, mediante técnicas de biología molecular, la utilidad de una nueva secuencia de ADN genómico de 280 pb (L280), como un marcador molecular en la identificación de especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Leishmania*. Inicialmente, la secuencia L280 fue obtenida del ADN genómico de la cepa de referencia *L. (L.) mexicana* BEL21 luego de aplicar el ensayo  $\beta$ 500-PCR en condiciones de baja rigurosidad (50°C) donde se generaron dos fragmentos, uno de 280 (L280) y otro de 260 pb [10,11,17]. La secuenciación parcial del fragmento L280 aislado de la cepa de referencia, permitió la selección del par de oligonucleótidos F1/B2 y establecer las condiciones de un ensayo de amplificación L280-PCR, cuyo producto principal, a las distintas condiciones de rigurosidad evaluadas, fue de 260 pb. Dicho ensayo fue específico en la identificación a nivel de subgénero de las especies representativas del subgénero *Leishmania* tanto del Nuevo como del Viejo Mundo. La

excepción, en nuestro estudio, dentro del subgénero *Leishmania* fue *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major*, lo cual nos obliga a ampliar la evaluación del ensayo en otros aislados de estas cepas a fin de determinar la presencia o ausencia de L280. Los resultados apoyan la idea de que la secuencia L280 es específica del subgénero *Leishmania*, lo cual se evidencia al no observarse ninguna señal de 260 pb en las especies del subgénero *Viannia*, ni en otros organismos kinetoplásticos. Estudios preliminares de hibridación molecular (no mostrados), utilizando como sonda el fragmento generado en el ensayo L280-PCR, sugieren que todos los productos de PCR de las especies del subgénero *Leishmania*, utilizadas en este estudio, guardan homología con la secuencia L280; mientras que las reacciones de hibridación realizadas con el fragmento de 375 pb generado del ensayo  $\beta$ 500-PCR específico de especies del subgénero *Viannia*, fueron negativas para aislados pertenecientes al subgénero *Leishmania*. El estudio comparativo entre los ensayos L280-PCR y  $\beta$ 500-PCR, utilizando una alta rigurosidad (60°C), pone en evidencia que cada secuencia, L280 y  $\beta$ 500, es específica para el subgénero de donde fue aislada. Actualmente, se adelantan protocolos de secuenciación del producto originado por cada una de las especies en estudio, a fin de establecer entre ellos el grado de homología de la secuencia L280. Igualmente, es necesario llevar a cabo la evaluación de la sensibilidad del ensayo L280-PCR, así como su implementación en muestras clínicas.

Estudios previos demuestran la potencialidad de identificar estos parásitos a través de un ensayo de PCR múltiple, utilizando los genes del mini-exón [15]. Tomando en cuenta la especificidad señalada anteriormente, queda por determinar si es posible estandarizar el mismo ensayo con una combinación entre los oligonucleótidos de las secuencias  $\beta$ 500 y L280, permitiendo la identificación de las especies de ambos subgéneros dentro de una misma prueba (PCR múltiple), lo cual reviste particular importancia en el desarrollo de estudios epidemiológicos de la enfermedad.

Resumiendo, podemos concluir que la secuencia de ADN L280 es específica de las especies del subgénero *Leishmania* y no parece estar presente en las especies del subgénero *Viannia* como tampoco en otros kinetoplásticos. Un ensayo de PCR establecido a partir de la secuencia L280 (L280-PCR), permitió la identificación de las especies del subgénero *Leishmania*, del Nuevo Mundo al igual que la especie *L. (L.) donovani* del Viejo Mundo.

## Agradecimientos

Al CDCH-UCV; Proyectos A030069912007 y PG 030070002007. Andrea Orué es becaria del FONACIT.

## Referencias

1. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol 2006; 22:552-7.
2. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:239-43.

3. Mendoza-León A, Shaw JJ, Tapia FJ. A guide for the cutaneous leishmaniasis connoisseur. En: Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, editores. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis. RG Landes Company 1996. pp. 1-23.
4. World Health Organization. World Health Report, 2002. Leishmaniasis. En: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Acceso: Noviembre 2007.
5. Lambrechts L, Fellous S, Koella JC. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. Trends Parasitol 2006; 22:12-6.
6. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The Leishmaniasis in Biology and Medicine vol 1 London: Academic Press 1987. pp. 1-120.
7. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89: 17-23.
8. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology Today 2000; 16:142-4.
9. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropical 1992; 52: 45-58.
10. Mendoza-León A, Luis L, Fernández O, Cupolillo E, García L. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96: 65-70.
11. Mendoza-León A, Luis L, Martínez C. The  $\beta$ -Tubulin gene region as a molecular marker to distinguish *Leishmania* parasites. En: Methods in Molecular Biology. Gene probes: Principles and Protocols. Aquino, M. Rapley, R. (Eds). Vol. 179 Humana Press Inc. New Jersey 2002. pp. 61-83.
12. Lachaud L, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40:210-5.
13. Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Thompson RCA. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. Trends Parasitol 2005; 21:340-6.
14. Mary Ch, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol 2004; 42:5249-55.
15. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodríguez B, Agabian N. Single Step Multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol 1998; 36:1989-95.
16. Castillo TM, Shaw J J, Floeter-Winter L M. New PCR assay using glucosa-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol 2003; 41:540-6.
17. Luis L, Ramírez AH, Ramírez R, Vélez ID, Mendoza-León A. Nuclear DNA sequence specific to *Leishmania* (*Viannia*) subgenus: a molecular marker for species identification. Parasitology 2001; 122:405-14.