



DISEÑO DE UN MÉTODO DE PCR A TIEMPO REAL COMO HERRAMIENTA EN EL DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DE LEISHMANIOSIS CANINA

Andrés Antón Pagarolas¹, Ivonne Ávalos Redón¹, Montserrat Cabrero Niubò², Pablo Menéndez Alegría², Elena Vela Andrés³, Josep María Hilari Serra³, Mónica Carbonell Bros⁴, Lourdes Molina Igual⁴, Blanca Bermejo Barrera¹

¹Unidad Virología y Microbiología Molecular. ³Unidad I+D Genética Molecular. ⁴Unidad Veterinaria. Laboratorio Análisis Dr. Echevarne. Barcelona. www.echevarne.com

²Laboratorio Hospital Veterinari Molins. C/ B N-27 P.I. Molí dels frares. 08620 St. Vicenç dels Horts. www.hvmolins.com

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis canina (LC) es una enfermedad endémica en la cuenca mediterránea causada principalmente por un protozoo de la especie *Leishmania infantum*, siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes del perro doméstico (*Canis familiaris*) en nuestra área geográfica.



En zonas endémicas se pueden alcanzar valores de hasta 60-80% de perros infectados con leishmania, aunque es preciso tener en cuenta que menos del 10% desarrolla una enfermedad grave. Así los perros domésticos se convierten en un importante reservorio para algunas formas de leishmaniosis humana.

En general, la LC es una enfermedad lenta y progresiva dependiente del estado inmunológico del hospedador. En animales susceptibles la infección se extiende en pocas horas a los nódulos linfáticos, médula ósea y bazo. En los animales resistentes, los parásitos permanecen localizados en la piel, presentando nódulos cutáneos o "chancra de la inoculación" en el sitio de la infección.

Los signos clínicos de la LC son variables e inespecíficos: linfadenopatía, lesiones cutáneas, pérdida de peso, apatía, uñas anormales, esplenomegalia, azotemia, lesiones oculares, anorexia y epistaxis. Además el tratamiento (Antimoniales Pentavalente, Anfotericina B, Pentamidina y Aminosidina) para la resolución de los síntomas clínicos de la LC es caro, prolongado y en algunos casos con efectos adversos. El estado inmunodeprimido del perro favorece el desarrollo de infecciones oportunistas.

Los principales métodos de diagnóstico de la LC son parasitológico, serológico, molecular y xenodiagnóstico. Los signos clínicos variables y los efectos adversos del tratamiento terapéutico, así como las complicaciones por infecciones oportunistas exigen un diagnóstico rápido, sensible, específico y que permita hacer un seguimiento de la enfermedad antes y después del tratamiento.

OBJETIVO

Diseñar un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real que permita detectar de forma específica y sensible *Leishmania infantum* en muestras de médula ósea para el diagnóstico definitivo de LC.

MATERIALES y MÉTODOS

Se analizaron 53 muestras de aspirado de médula ósea (MO) de perros domésticos (18 hembras, 35 machos) atendidos en el Hospital Veterinari Molins, con o sin sintomatología clínica y analíticas (sangre/orina) compatibles con Leishmaniosis (ACL) (anemia, trombocitopenia, bicitopenia, hiperglobulinemia, hipalbuminemia, enfermedad renal, etc) en las que no se pudo demostrar la presencia del parásito mediante microscopía óptica.

La extracción del ADN presente en la muestra de médula ósea (200 µL) se realizó con QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) según las instrucciones del fabricante con alguna modificación. La incubación de la muestra con Proteinasa K a 56°C se prolongó durante el tiempo suficiente hasta su completo lisado, siempre con agitación. El ADN extraído se eluyó hasta un volumen final de 100 µL, siendo congelado hasta su utilización.

La reacción de amplificación se realizó en el Smart Cycler II (Cepheid®), empleando los oligonucleótidos (LIN-F/R) descritos previamente por Mary et al (2006) que amplifican de forma específica una secuencia del minicírculo del kinetoplasto (ADNk) de *Leishmania infantum*. Para preparar la mezcla de la reacción de amplificación se empleó QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen®). Los productos de amplificación se pueden reconocer estudiando la temperatura de disociación después del programa de amplificación. La temperatura de disociación o temperatura de melting (Tm) de nuestro amplicón específico es de 82.50°C aproximadamente.

REACTIVO (1x)	[] _{final}	PROGRAMA LEISHMANIA SMART CYCLER II
SYBR Green Master Mix (2x)	1x	95°C 15'
Primer LIN-F 5'-CTTTCTGGTCTCCGGTAGG-3'	0.4 pmols/µL	95°C 20"
Primer LIN-R 5'-CCACCCGCCCTATTATACACCA-3'	0.4 pmols/µL	60°C 30"
ADN	26-40 ng/µL	72°C 30"
		60°C→90°C, 0.1°C/s) Tm = 82,50 °C

Para evaluar el rendimiento del proceso de extracción y asegurar una calidad óptima del ADN obtenido excluyendo posibles inhibiciones de la PCR, se han diseñado una pareja de oligonucleótidos específicos (PBA-F/R) que amplifican una secuencia conservada del gen de la beta actina (gen constitutivo) del perro doméstico. Para preparar la reacción de amplificación se empleó PCR Master Mix (Promega Corp.®). La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9700 o 2700. La visualización del producto de amplificación (127 pb) se realizó mediante electroforesis con un gel de agarosa al 3%.

REACTIVO (1x)	[] _{final}	PROGRAMA BETA-ACTINA PE 9700/2700		
PCR Master Mix (2x)	1x	95°C	5'	45 ciclos
Primer PBA-F 5'-CCTCTGTCTCTGGGCTC-3'	0.4 pmols/µL	95°C	20"	
Primer PBA-R 5'-CTTTCGGGTGGCTCTCTG-3'	0.4 pmols/µL	60°C	30"	
ADN	26-40 ng/µL	72°C	30"	
		72°C	10'	
		20°C	∞	
		127 pb		

RESULTADOS

- La sensibilidad de la PCR se ha estimado en 0.09 parásitos/mL de MO (90 copias/mL de MO).
- Se obtuvo un resultado de PCR positivo para el 65.22% de las MO con ACL y negativo para el 96.43% de las MO sin ACL.

ANALÍTICA	RESULTADO		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
COMPATIBLE	8 (34,78%)	15 (65,22%)	23
NO COMPATIBLE	27 (96,43%)	1 (3,57%)	28
NO DISPONIBLE	1 (50,00%)	1 (50,00%)	2
Total	36 (67,92%)	17 (32,08%)	53

- En un 94.4% de las muestras con diagnóstico definitivo de LC el resultado de la PCR fue positivo, mientras que en el 100% de las muestras con otro diagnóstico el resultado de la PCR fue negativo.

DIAGNÓSTICO FINAL	RESULTADO		Total	SENSIBILIDAD	94,44 %
	NEGATIVO	POSITIVO			
LEISHMANIOSIS	1 (5,56%)	17 (94,44%)	18	ESPECIFICIDAD	100 %
NO LEISHMANIOSIS	24 (100%)	0 (0%)	24	VPP	100 %
SIN RESOLVER	11 (100%)	0 (0%)	11	VPN	96 %
Total	36 (67,92%)	17 (32,08%)	53		

DISCUSIÓN

La región del minicírculo del kinetoplasto (ADNk) que fue seleccionada como diana para la reacción de amplificación se caracteriza por ser multicopia (10.000 copias/célula), de forma que incrementa sustancialmente la sensibilidad del método en comparación a si utilizáramos cualquier otra región del ADN genómico. Es por ello que esta misma región está siendo utilizada por muchos autores como diana de amplificación (Lachaud L et al, 2002; Mary C et al, 2006).

Con unos valores de sensibilidad (94,44%), especificidad (100%), valor predictivo positivo (100%) y valor predictivo negativo (96%) óptimos, podemos considerar el método de PCR a tiempo real diseñado, utilizando SYBRGreen como fluoróforo para la monitorización de la reacción de amplificación, una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico definitivo de LC. Como ventajas adicionales también destacar la sencillez, la rápida interpretación de los resultados y su bajo coste.

Ya que el producto de amplificación de la PCR del gen constitutivo (beta actina) presenta un tamaño (127 pb) muy similar al tamaño (140 pb) del amplicón de la PCR específica de *Leishmania infantum* (ADNk), permite además utilizarlo como control de integridad del ADN extraído, por ejemplo con muestras tan problemáticas como las biopsias de piel incluidas en parafina, como paso previo a la PCR específica de *Leishmania infantum*.

CONCLUSIÓN

El método de PCR diseñado es de gran sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste proporcionando un resultado fiable para el diagnóstico definitivo de LC.

REFERENCIAS

Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. Am J Trop Med Hyg. 2006 Nov;75(5):858-63.

Lachaud, L., E. Chabbert, P. Dubessay, J. Dereure, J. Lamothe, J. P. Dedet, and P. Bastien. 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology 125:197-207.