

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico de leishmaniasis cutánea por Reacción en Cadena de la Polimerasa, a partir de material genético obtenido de frotis de lesión teñidos con Giemsa

Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by Polymerase Chain Reaction, using genetic material derived from smears of lesions stained with Giemsa

Diego Bonifaz Pérez, Luis Fernando Sosa Tordoya, José Luis Choquehuanca Quispe

Instituto de Servicio de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

Dirección para correspondencia: Diego Bonifaz, Av. Saavedra 2224 (Edificio SELADIS, piso 6)

Telf: 2222436

E mail: thiagobp.13@hotmail.com

Recibido para publicación: 3/08/11

Aceptado en: 20/12/11

RESUMEN

En Leishmaniasis, la patogenicidad, abordaje terapéutico y los posibles métodos de control son determinados en gran parte, por la especie de *Leishmania* infectante identificada. En el presente estudio se evaluaron tres procedimientos de extracción de ADN de *Leishmania* a partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa. A partir de frotis que contenían suspensiones con concentración conocida de promastigotes de *Leishmania braziliensis* teñidos con Giemsa y frotis de lesión de pacientes con leishmaniasis cutánea, se evaluó la sensibilidad analítica y diagnóstica de los métodos basados en: Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK), Boiling y Kit Comercial Promega Wizard Genomic. Los datos obtenidos de la PCR fueron comparados frente a los resultados de una PCR convencional y examen parasitológico directo. De los tres protocolos evaluados, el método de SLPK presentó el mejor rendimiento con concentraciones de ADN en el rango de 19,77 a 38,18 ng/μL e índices de pureza entre 1,037 a 1,046; éste método presenta una sensibilidad diagnóstica de 93%, especificidad de 45%, valor predictivo positivo de 68% y valor predictivo negativo de 84%. El grado de correlación según el índice de Kappa del método SLPK frente al frotis fue Moderada de 0,403 ($p < 0,005$) y entre los dos métodos de PCR fue Buena de 0,700 ($p < 0,005$). Los resultados de muestran que obtener ADN a partir de frotis teñidos con Giemsa por el método SLPK es una buena alternativa al diagnóstico molecular de leishmaniasis y que además sería una herramienta útil para determinar polimorfismos genéticos del parásito.

Palabras Clave: *Leishmania*, frotis teñido con Giemsa, PCR, test diagnóstico

ABSTRACT

In Leishmaniasis pathogenicity, therapeutic approach and possible methods of control are largely determined by the infecting *Leishmania* species identified. The present study evaluates three methods for DNA isolation from Giemsa-stained smears of lesion. A smear from suspensions containing known concentration of *Leishmania braziliensis* promastigotes and Giemsa-Stained smears for lesion of patients with cutaneous leishmaniasis, was used to evaluate the analytical and diagnostic sensitivity methods based on K-Proteinase lysis solution (SLPK), Boiling and the commercial kit Promega Wizard Genomic DNA purification Kit, the obtained results from the PCR were compared against the results of conventional PCR and direct parasitological examination. From the three tested protocols, the SLPK method showed the best performance with range of DNA concentrations from 19.77 to 38.18 ng / uL and purity rates between 1.037 to 1.046, this method has a diagnostic sensitivity of 93% , specificity 45%, positive predictive value of 68% and negative predictive value of 84%. The degree of correlation measured by the Kappa index between SLPK and smears was moderate 0.403 ($p < 0.005$) and between the two PCR methods was good 0.700 ($p < 0.005$). The results show that DNA obtained from Giemsa-stained smears by the SLPK method is a good alternative for the molecular diagnosis of leishmaniasis and also be a

useful tool for determining genetic polymorphisms of the parasite.

Key Words: *Leishmania*, Giemsa-stained smears, PCR, Diagnostic test

INTRODUCCIÓN

En nuestro país la leishmaniasis constituye un problema de salud pública creciente¹, el incremento de casos en el área rural y periurbana implica para el sistema público de salud una importante inversión económica en lo referido a planes de contención, información, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las poblaciones en riesgo y afectadas respectivamente.

En Leishmaniasis la patogenicidad, abordaje terapéutico y los posibles métodos de control de la enfermedad son determinados en gran parte, por la especie de *Leishmania* infectante². Por lo tanto, en caso de sospecha de infección con leishmaniasis es importante identificar al agente etiológico y así administrar al paciente un tratamiento adecuado; para lo cual en varios países, las investigaciones van destinadas al desarrollo de métodos que asocien diagnóstico e identificación del agente patológico de manera simultánea. Siendo los métodos moleculares, los que mejor se ajustan a estas características.

Como resultado de lo antes mencionado, continuamente se van proponiendo nuevas líneas de desarrollo en este campo; para lo cual surge como propuesta efectiva la combinación de técnicas, como el frotis de lesión con el aislamiento de material genético y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En este proceso, se utiliza como fuente de material genético sangre venosa o frotis de lesión teñidos con Giemsa. En sus investigaciones Yokota en 1995 y Motazedian en 2002^{3,4} obtuvieron Ácido Desoxirribonucleico (ADN) a partir de frotis teñidos con Giemsa de cuatro años de antigüedad, si bien existía la posibilidad de que con el tiempo se produzca una degeneración del ADN, reportaron que la calidad de este material genético era lo suficientemente buena para realizar PCR.

Si bien, mediante el empleo de técnicas moleculares, se ha incrementado la eficiencia de la pruebas de diagnóstico para leishmaniasis y para el diagnóstico de otras patologías;^{5,6} a la fecha se sigue tropezando con el inconveniente de que cuando se hace trabajo de campo en poblaciones endémicas para *Leishmania*, muchos de los PCR resultan inhibidos por fallas en la toma y conservación de las muestras, ya sea por problemas en la preparación de los reactivos o contaminación de los mismos entre otros, lo cual representa un serio perjuicio al paciente quien debe esperar una nueva toma de muestra para que le den el resultado e inicie tratamiento para la enfermedad.

En base a estos antecedentes y la necesidad para realizar un diagnóstico e identificación de las leishmaniasis, en

el presente trabajo se pretende brindar una alternativa al diagnóstico molecular de leishmaniasis, evaluando tres métodos de extracción de ADN de *Leishmania sp.* a partir de los frotis de lesión previamente teñidos con Giemsa y evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método que obtenga ADN en mayor concentración y pureza, de esta manera se pretende aportar con una nueva alternativa para mejorar el diagnóstico molecular de esta patología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Para la determinación de la sensibilidad analítica de los tres protocolos de extracción se trabajó con 57 frotis preparados a partir de suspensiones de parásitos de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, usando como diluyente sangre de donantes voluntarios de la ciudad de La Paz aparentemente sanos, anticoagulada con ácido cítrico-dextrosa, a distintas concentraciones de parásitos (200, 20, 10, 5, 2 parásitos/ 10 μ L sangre).

También se trabajó con 25 frotis de lesión de personas provenientes de regiones endémicas de *Leishmania* en los Yungas, que acudieron al Instituto SELADIS para la realización de exámenes de laboratorio para el diagnóstico o descarte de leishmaniasis. Este grupo fue dividido en dos subgrupos: Subgrupo A, que estaba formado por 15 frotis de lesión de pacientes que solicitaron diagnóstico de laboratorio por PCR y examen directo por microscopía; y el Subgrupo B, que estaba formado por 10 frotis de lesión de pacientes que sólo solicitaban examen directo por microscopía. Todos los pacientes participantes dieron su consentimiento para el uso de su muestra biológica en el presente estudio.

Cultivo de parásitos de *Leishmania braziliensis*. Se utilizó una cepa de referencia de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, los promastigotes de esta cepa fueron mantenidos en medio líquido de cultivo Schneider, suplementado con suero fetal bovino 10% y antibióticos (estreptomycin y penicilina), los cuales fueron incubados en cajas de cultivo de 50 mL a 26°C en una estufa BINDER (BD-53). Para los cambios de medio se verificó el estado de los promastigotes en las cajas de cultivo con ayuda de un microscopio de luz invertida OLYMPUS (CK-2), lo cual se realizó cada 72 horas cuando las células alcanzaban la fase estacionaria de crecimiento.

Preparación de suspensiones de parásitos con sangre anticoagulada. Para determinar la sensibilidad de los tres métodos de extracción de ADN, a partir del cultivo celular de *Leishmania* con medio de cultivo Schneider, se prepararon suspensiones del parásito utilizando como diluyente sangre anticoagulada con ACD, a las

concentraciones de 200 parásitos/10 μL , 20 parásitos /10 μL , 10 parásitos/10 μL , 5 parásitos/10 μL y 2 parásitos/10 μL . Luego, se colocó 10 μL de cada una de estas suspensiones sobre portaobjetos para realizar la extensión y su posterior tinción con el colorante Giemsa.

Tinción de frotis con colorante Giemsa. Para la tinción de frotis de las diluciones de cultivo de *Leishmania* y los frotis de lesión de pacientes, se siguieron las siguientes instrucciones: Se fijó el frotis con metanol p.a. durante 3 minutos, se secó al aire y se sumergió en una solución diluida al 1/10 de colorante Giemsa (SIGMA ALDRICH) con tampón PBS (3.6 mM KH_2PO_4 , 6.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [pH 7,4]) durante 25 minutos, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Examen parasitológico directo de los frotis de lesión.

Todos los frotis teñidos de lesión colectados han sido examinados en un microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100x; los amastigotes encontrados en los frotis fueron clasificados en cuatro grupos según su número: Mayor a 50 amastigotes (+++), de 21 a 50 amastigotes (++) , de 1 a 20 amastigotes (+) y Cero amastigotes (-).⁽³⁾

Extracción de DNA de *Leishmania*. Luego del análisis por observación directa al microscopio óptico de los frotis teñidos con Giemsa, se eliminó el excedente del aceite de inmersión con papel absorbente y luego fue mantenido a temperatura ambiente hasta su utilización. Para obtener el material genético de las muestras de frotis se evaluaron tres métodos:

1) Solución de lisis con Proteinasa K (SLPK). El material biológico de los frotis teñidos, fue cubierto con 250 μL de buffer de lisis (50 mM NaCl, 50 mM Tris [pH 7,4], 10 mM EDTA, 1% [vol/vol] Tritón 100X, Proteinasa K 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), luego de 5 minutos el buffer de lisis que reaccionó con la superficie del frotis fue retirado del portaobjetos conjuntamente con el material biológico mediante un raspado con hojas de bisturí, el producto fue colectado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL e incubado por 3 horas a 60°C en un Bloque calentador (Microtube Thermal Mixer, Fisher Scientific), se adicionó 30 μL de SDS 10% y fue incubado 30 minutos a 60°C en el Bloque calentador, se terminó este proceso incubando 10 minutos más a 94°C en el bloque calentador. Se adicionó 130 μL de solución precipitante de proteínas (PROMEGA), se mezcló por inversión y fue llevado a centrifugación a 21910 g por 10 minutos en una centrifugadora Mikro 22 (HETTICH ZENTRIFUGEN), el sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora. El ADN fue concentrado por centrifugación a 11180 g por

15 minutos; el sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70%, luego se llevó a centrifugación a 21910 g por 1,5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

2) Kit de extracción de ADN Promega Wizard

Genomic (Promega). Los frotis fueron cubiertos con 250 μL de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)], y el material biológico es retirado con un hojas de bisturí en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se adicionó 900 μL del Buffer de lisis celular, se mezcló 20 segundos por inversión y fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente, luego fue llevado a centrifugación a 21910 g por 1,5 minutos en una centrifugadora Mikro 22, el sobrenadante fue desechado y se agregó nuevamente al precipitado 900 μL de Buffer de lisis celular repitiendo el paso anterior de este protocolo. Al precipitado se le agregó 400 μL de Buffer de lisis de núcleos y 1,5 μL de RNAasa, luego fue incubado a 37°C por 30 minutos en un Bloque calentador, después de la incubación se atemperó los tubos Eppendorf por dos minutos y se le agregó 130 μL de Buffer de lisis de proteínas, fue mezclado por inversión y llevado a centrifugación a 21910 g por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL previamente etiquetado y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora. El ADN fue precipitado por centrifugación a 11180 g por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70% y se llevó a centrifugación a 21910 g por 1,5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

3) Boiling.

Para el raspado de los frotis se adicionó 250 μL de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)] y fue raspado con hojas de bisturí para su colección en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y es incubado por 20 minutos a 97°C en un bloque calentador. Se dejó enfriar 10 minutos, se adicionó 130 μL de solución precipitante de proteínas y fue llevado a centrifugación a 21910 g por 10 minutos en una centrifugadora MIKRO 22, el sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20°C por 1 hora. El ADN fue precipitado por centrifugación a 11180 g por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70% y se centrifugó a 21910 g por 1,5

minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por incubación a 60°C por 20 minutos en el bloque calentador, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Para los tres protocolos de extracción el material genético obtenido fue debidamente etiquetado y separado en dos alícuotas, uno para el proceso de cuantificación y la otra guardada a -20°C hasta la realización de los PCR.

Cuantificación y determinación de la pureza de DNA por Espectrofotometría. Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1/10 del ADN extraído para un volumen final de 200 μ L, se usó como diluyente el buffer TE, debido a que había sido utilizado para resuspender el ADN extraído en los tres protocolos de extracción. Los 200 μ L de muestra fueron colocadas en cubetas de cuarzo para su lectura en el Espectrofotómetro Shimadzu (UV-1800) a longitudes de onda de 260 y 280 nm; como blanco se utilizó el buffer TE.

PCR para *Leishmania*. Los primers que se utilizaron fueron los oligonucleotidos 13A (GTG GGG GAG GGG CGT TCT) y 13B (ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT) cuyo producto de amplificación esperado es de 120 bp, correspondiente a una la región conservada del minicirculo kinetoplasto *Leishmania* (ADNk)..^{7,8} La reacción de amplificación se realizó utilizando un volumen de 2,5 μ L del material genético, el cual fue adicionado a un Master Mix que contenía 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 μ M de cada uno de los primers, 0.025 UI/mL Taq Polimerasa y 1 mM DTT. La mezcla de reacción fue cubierta con 30 μ L de aceite mineral pesado y transferido a un termociclador Px2-ThermalCycler (THERMO ELECTRÓN CORPORATION) para su amplificación, el cual estaba programado de la siguiente manera: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1min y 72°C por 1 min. El producto final fue conservado a 4°C hasta el momento de la realización de la electroforesis en geles de agarosa.

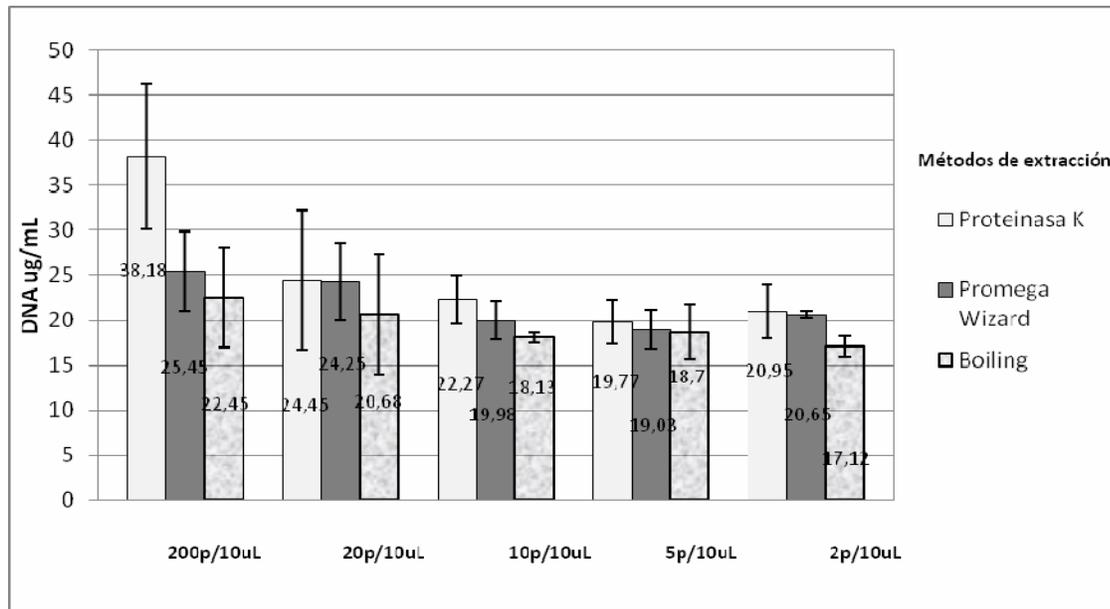
Electroforesis en geles de agarosa. La visualización de los amplicones fue realizada mediante su siembra en geles de agarosa (SIGMA ALDRICH) al 1,5% y diluido con 50 mL de tampón TBE 1X [89 mM Tris base, 89

mM Ácido bórico, 1 mM EDTA (pH 8)] que fue calentado en un horno microondas por 2 minutos (aproximadamente 86 \pm 2.0°C) hasta que la solución de agarosa quede disuelta, pasado este tiempo se dejó enfriar la solución aproximadamente hasta 50°C y se adicionó 2 μ L de SYBR green (SIGMA ALDRICH) diluido 1:10000; posteriormente la solución de agarosa fue vertida en un molde de cámara electroforética con peines MicroSSP TM Gel System (ONE LAMBDA, INC) para la formación de los pocillos de siembra para las muestras.

El gel de agarosa fue transferido a una cámara electroforética OWL D3-14 (Termo Scientific) cubierta con tampón TBE 1X, donde la siembra de los productos de la PCR se la realizó mezclando 7 μ L de la muestra con 3 μ L de colorante 5X Green Go Taq Reaction Buffer (PROMEGA). Una vez realizada la siembra de todas las muestras, se realizó la corrida electroforética con ayuda de una Fuente de poder EC 300XL Power Supply (THERMO SCIENTIFIC) a 150 voltios, 350 mAmp por 7 minutos; transcurrido este tiempo se observó la corrida de las muestras en el transiluminador de luz UV Spectroline® (SELECT TM SERIES) a una longitud de onda de 312 nm.

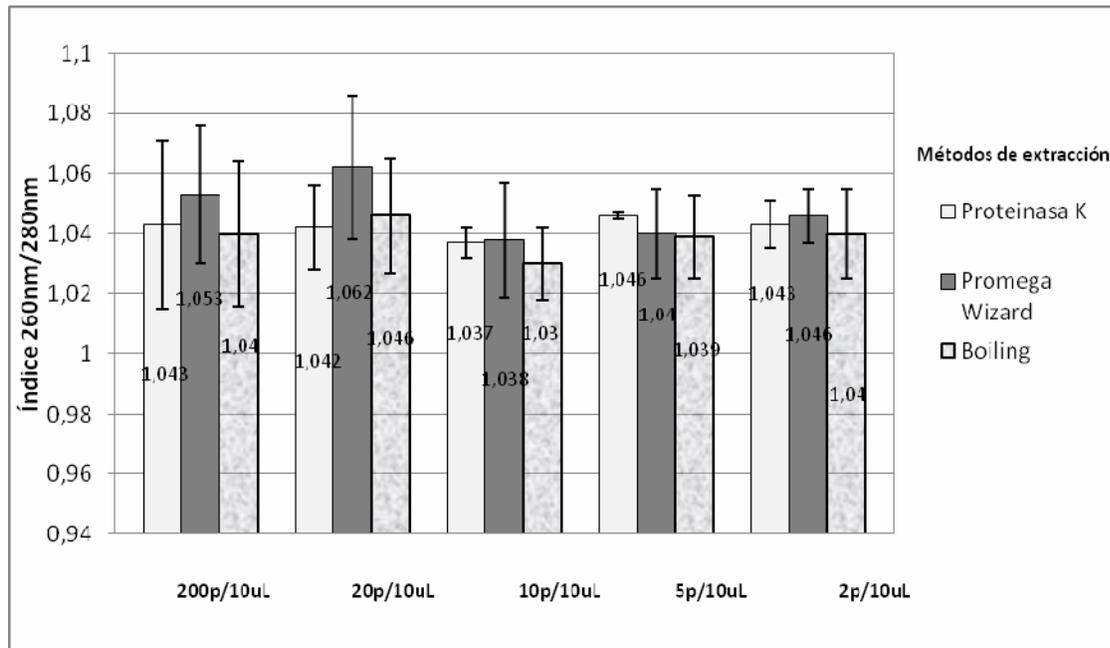
RESULTADOS

En la etapa de estandarización de los tres métodos propuestos para la extracción de ADN se determinó la concentración en (ng/ μ L) del material genético obtenido y la pureza del mismo en base al índice de absorbancia 260 nm/280 nm. Las concentraciones de ADN determinadas por espectrofotometría (Figura 1) muestran que mediante los tres protocolos de extracción los valores se encuentran entre los rangos de 17,12 y 38,18 ng/ μ L, el método de SLPK es el que sistemáticamente genera mayor concentración de ADN. También, se muestra que a concentraciones entre 20 a 2 parásitos por frotis no existe diferencia significativa en la concentración de ADN obtenido por los tres métodos evaluados. Los valores de pureza obtenidos de las muestras de ADN, oscilan entre 1,030 y 1,062 (figura 2), lo que nos indica la contaminación proteica en las muestras. A concentraciones entre 200 y 20 parásitos/frotis el método Promega mostró obtener ADN de mayor pureza con respecto a los otros métodos evaluados.



Los valores son promedios de las concentraciones de ADN en ng/uL.

Figura 1. Comparación de la concentración de ADN de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de ADN.



Los valores son promedios de los cocientes 260 nm/280 nm.

Figura 2. Comparación de la pureza de las muestras de ADN de los frotis preparadas con cultivos de *Leishmania* y sangre, obtenidos por los tres protocolos de extracción de ADN.

Con las muestras de ADN de concentración y pureza conocida para cada uno de los métodos evaluados se realizaron los PCR. En la Tabla 1, se muestran los resultados positivos y negativos de la PCR, se observa que por los tres métodos se detectan casos positivos hasta la dilución de 5 parásitos/frotis. También se

observa que los tres métodos a la concentración de 2 parásitos/frotis dan resultados falsos negativos y que de los tres métodos evaluados el Kit Comercial Promega Wizard es el que más resultados falsos negativos produjo. Los tres métodos dieron resultados falsos negativos en dos de los ensayos. La sensibilidad

diagnóstica encontrada para cada uno de los métodos de extracción de ADN fueron de 89% para el método de

SLPK, 58% para el método Promega Wizard Genomic y 84% para el método basado en el Boiling.

Tabla 1. Resultados de la PCR obtenidos con material genético a partir de las diluciones de parásitos con sangre.

	SLPK	Kit Extracción	Boiling
200 parásitos/10 uL sangre	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
20 parásitos/10 uL sangre	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
10 parásitos/10 uL sangre	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
5 parásitos/10 uL sangre	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
2 parásitos/10 uL sangre	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)

Una vez definido que el método de Solución de lisis con Proteinasa K era el que daba un mayor rendimiento de ADN y menor cantidad de resultados falsos negativos, se lo utilizó para extraer ADN a partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa. De los 25 frotis de lesión de pacientes se realizó el Examen Parasitológico Directo en

los cuales se realizó el recuento de amastigotes de *Leishmania*, resultados que se resumen en la Tabla 2. Con el material genético obtenido se realizó la PCR (Figura 3 y 4), cuyos resultados obtenidos se compararon con los resultados del PCR convencional y con los del frotis (Gold Standard), ver Tabla 3.

Tabla 2. Número de amastigotes detectados por examinación microscópica directa en los frotis de lesión teñidos con Giemsa

Recuento de Amastigotes	Recuento de				Total
	> 50 (+++)	21-50 (++)	1-20 (+)	0 (-)	
Subgrupo A*	0	5	2	8	15
Subgrupo B**	2	0	2	6	10
Total	2 (8%)	5 (20%)	4 (16%)	14 (56%)	25 (100%)

* Pacientes que solicitaron diagnóstico de leishmaniasis por PCR y examen directo por microscopia

** Pacientes que solicitaron diagnóstico de leishmaniasis por examen directo por microscopia

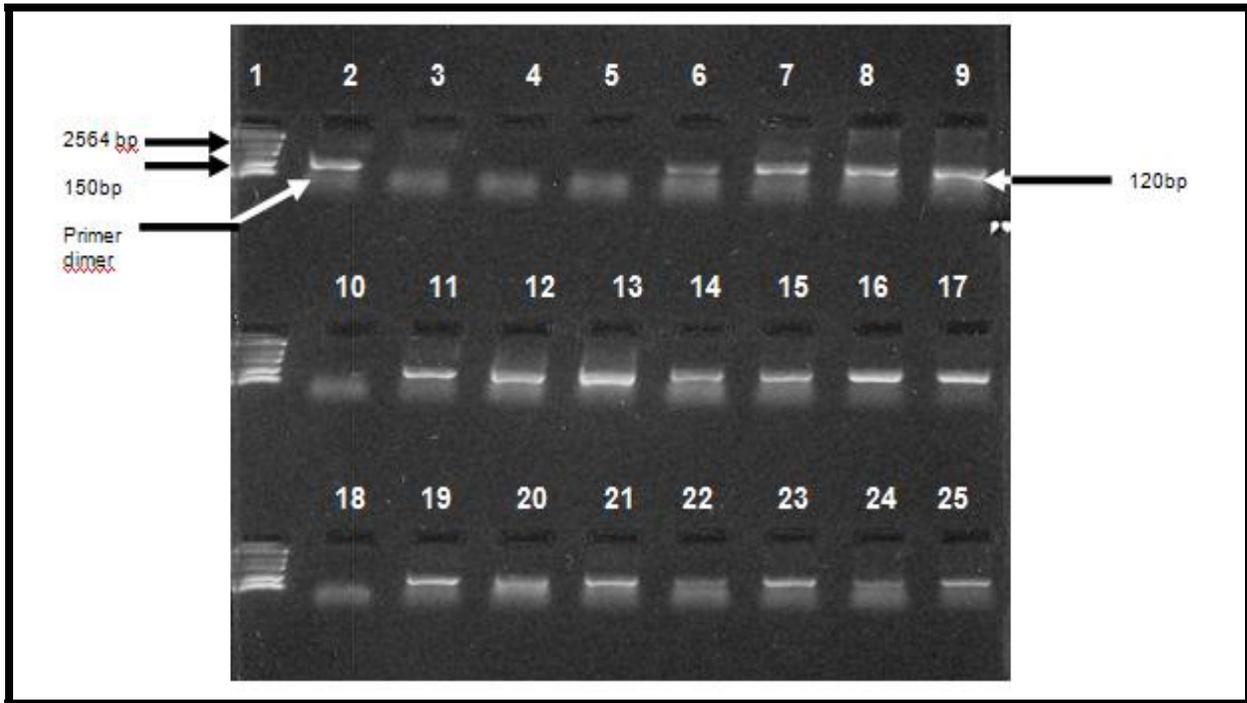


Figura 3. Resultados de PCR basados en la amplificación de ADN extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo A.

Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestras de los diez primeros pacientes del subgrupo A, cada muestra presenta su inhibidor correspondiente (6 – 25). Las bandas

amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania ssp.* Las muestras 10 y 18 correspondientes a los pacientes 3 y 7 presentan reacción negativa a la PCR SLPK.

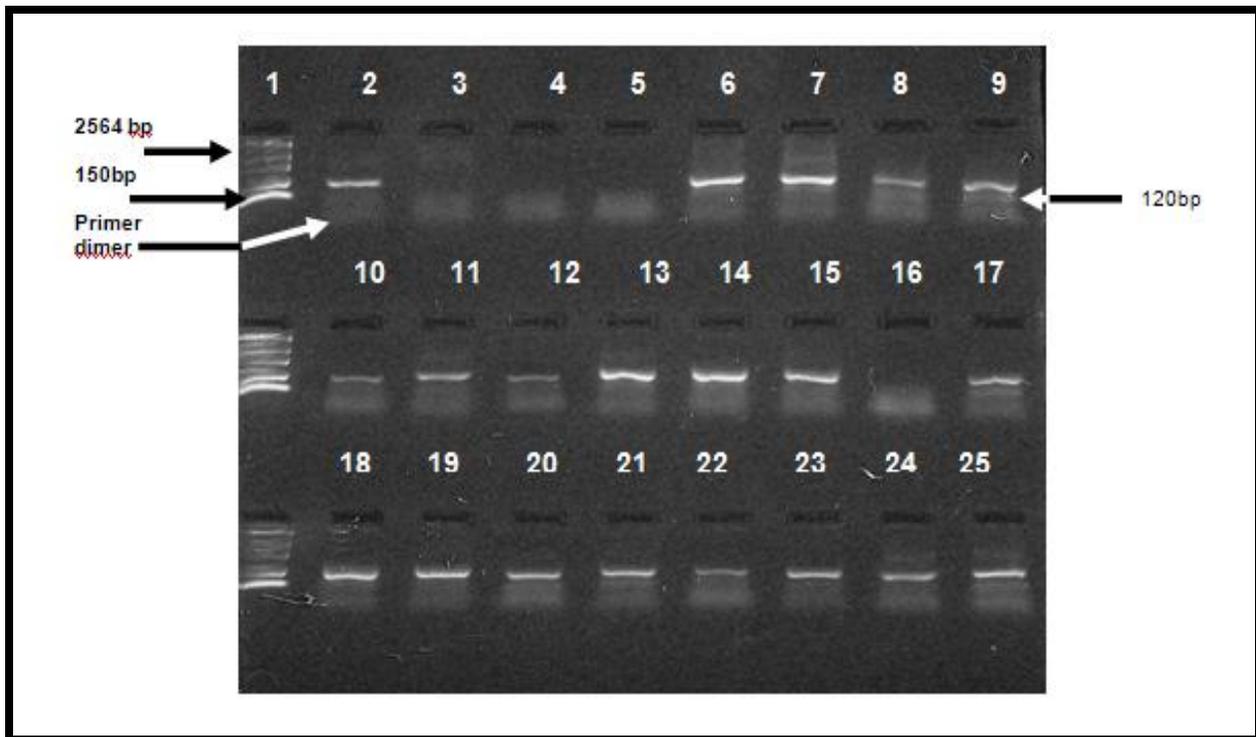


Figura 4. Resultados de PCR basados en la amplificación de ADN extraído por el Método con Solución de lisis con Proteinasa K de los frotis de lesión de pacientes del subgrupo B.

Las bandas corresponden a: Marcador de peso molecular (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Controles internos ddH₂O (4 y 5), Muestras de los pacientes del subgrupo B, cada muestra presenta su inhibidor correspondiente (6 – 25). Las bandas amplificadas en las muestras representan a un producto de 120 bp indicativo de *Leishmania ssp.* La muestra 24 correspondiente al paciente 21 presenta reacción negativa a la PCR SLPK.

En el análisis de los resultados de PCR del método SLPK (Tabla 3), los resultados de los quince pacientes

con frotis y PCR convencional muestra que el método evaluado reportó un resultado falso positivo y un resultado falso negativo (pacientes 12 y 15 respectivamente), por su parte el PCR convencional mostró dos falsos positivos y un falso negativo (pacientes 4, 7 y 6 respectivamente). Otro hallazgo interesante, fueron los pacientes 7, 8 y 11 en los cuales ambos métodos de PCR dieron resultados positivos cuando el frotis era negativo, estos pacientes para fines de análisis de sensibilidad fueron considerados como positivos.

Tabla 3. Comparación de los resultados de PCR provenientes de las muestras de frotis de lesión de pacientes, con exámenes de laboratorios para el diagnóstico de leishmaniasis

	Muestra	PCR SLPK	Frotis	PCR Convencional
Subgrupo A	Paciente 1	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+) (S y L)
	Paciente 2	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+) (S y L)
	Paciente 3	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+) (S)
	Paciente 4	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+) (S)
	Paciente 5	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+) (S)
	Paciente 6	Positivo (+)	Positivo (++)	Negativo (-) (S)
	Paciente 7	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+) (S)
	Paciente 8	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+) (S)
	Paciente 9	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+) (S)
	Paciente 10	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+) (S y L)
	Paciente 11	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+) (S y L)
	Paciente 12	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-) (L)
	Paciente 13	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-) (S)
	Paciente 14	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-) (L)
	Paciente 15	Negativo (-)	Positivo (++)	Positivo (+) (S)
Subgrupo B	Paciente 16	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Paciente 17	Positivo (+)	Positivo (+)	
	Paciente 18	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Paciente 19	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Paciente 20	Positivo (+)	Positivo (+++)	
	Paciente 21	Negativo (-)	Negativo (-)	
	Paciente 22	Positivo (+)	Positivo (+++)	
	Paciente 23	Positivo (+)	Positivo (+)	
	Paciente 24	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Paciente 25	Positivo (+)	Negativo (-)	

(S) Sangre. (L) Lesión.

Para la evaluación estadística se analizó por un lado el total de resultados positivos y negativos del examen parasitológico directo, encontrando que ambos métodos de PCR evaluados mostraron ser positivos cuando el frotis era negativo (falso negativo), para el análisis de sensibilidad se consideró estas muestras de frotis como positivas, por lo tanto la sensibilidad encontrada para el método de PCR Solución de lisis con Proteinasa K fue del 93%. La especificidad diagnóstica encontrada fue del 45% con Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo del 68% y 84% respectivamente. El grado de correlación encontrado para el método SLPK frente al frotis según el índice de Kappa fue Moderado de 0,403 ($p < 0,005$) y el índice de Kappa entre los dos métodos de PCR fue Buena del 0,700 ($p < 0,005$).

DISCUSIÓN

Para elegir el mejor método de extracción de ADN, se evaluaron los criterios de concentración y pureza del ADN obtenido. De los tres métodos estandarizados, el método basado en SLPK mostró ser el más eficiente.

Al trabajar con los métodos de extracción de ADN basados en calentamiento (Boiling) y por el Kit Comercial Wizard Genomic, se evidenció que al cubrir la muestra con el tampón TE y realizar el raspado con las hojas de bisturí, no se llega a arrastrar la totalidad de la muestra del frotis al tubo Eppendorf, siempre quedó muestra remanente en el portaobjetos, en las hojas de bisturí y en las paredes del tubo Eppendorf. Por lo tanto, no se llega a trabajar con el 100% de la muestra, esto pudo incidir en el resultado de la PCR especialmente en casos de carga parasitaria pequeña (1–2 parásitos/frotis). El método SLPK no tiene el problema antes mencionado, ya que la solución de lisis que se utiliza

para el raspado contiene el detergente Tritón 100X que solubiliza todo el contenido del frotis, permitiendo transferir la totalidad de la muestra al tubo Eppendorf donde se realizará la extracción del ADN.

Las concentraciones de ADN determinadas por espectrofotometría (Figura 1) muestran que el método de SLPK es el que sistemáticamente genera mayor concentración de ADN, también se notó que en casos de muestras que contienen entre 20 y 2 parásitos por frotis la concentración o no es significativamente superior a los otros métodos evaluados. En 1995, Yokota,² al trabajar con volúmenes de muestra de frotis de sangre de 4 a 7 μL obtuvo concentraciones de ADN humano entre 20 y 120 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en un total de 407 muestras; los protocolos que evaluamos mostraron rangos de rendimiento de ADN a partir de 10 μL de sangre de 17,12 y 38,18 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en un total de 57 muestras.

Los valores de pureza obtenidos de las muestras de ADN, mostraron estar muy por debajo del rango del índice de pureza aceptado es de 1,8 – 2,0⁹, los valores de pureza que obtuvimos oscilan entre 1,030 y 1,062 (Figura 2), lo cual es indicativo de muestras contaminadas con proteínas, también se evidenció que este aspecto no influyó en la realización de la PCR.

Una vez conocidas las ventajas y desventajas que tienen los tres métodos de extracción en cuanto a criterios de concentración y pureza obtenida se realizó la prueba de PCR (Tabla 1), nuevamente el método SLPK mostró que gasta la dilución de 5 parásitos/frotis tiene 100% de sensibilidad y a la concentración de 2 parásitos/frotis tiene un 40% de sensibilidad. Analizando los resultados de esta fase experimental y tomando en cuenta la concentración de ADN obtenida, y la ventaja de poder tomar la totalidad de la muestra del frotis se definió que el método de SLPK era el método más adecuado para obtener ADN a partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa.

El promedio de ADN total obtenido a partir de los frotis de lesión fue de 20,8 $\text{ng}/\mu\text{L}$, concentración menor a la que se obtuvo en el ensayo de dilución de parásitos con sangre, esto se debe a que en la punción con el escarbadiantes no se toman muchas células sanguíneas, y en su mayoría corresponden a células epiteliales, macrófagos residentes y fibroblastos. El promedio de pureza de ADN obtenido a partir de estas muestras fue de 1,078, este valor fue superior a los encontrados en los frotis de sangre (promedio de 1,042 para SLPK), esto se debe al hecho de que en los frotis de lesión existe menor cantidad de células sanguíneas y por lo tanto menor cantidad de proteínas y hemoglobina durante el proceso de extracción de ADN.

En el análisis de concordancia de los resultados de PCR utilizando primers que amplifican el kADN y método SLPK en los quince pacientes con frotis y PCR convencional, mostró datos interesantes (tabla 3), los pacientes 7, 8 y 11 por PCR dieron resultados positivos

cuando el frotis era negativo, por lo que podemos asumir que esos frotis eran en realidad positivos y que tenían una baja cantidad de parásitos, también se atribuye al hecho de que el frotis presenta una sensibilidad promedio del 43%.¹⁰ La sensibilidad encontrada para el método SLPK fue del 93%, este parámetro es similar al reportado en el 2006 por Al Jawabreh¹¹ con sensibilidad de 87%; en el 2006, Volpini¹² utilizando primers específicos para el ADN kinetoplastidae reportó sensibilidad en el rango de 70% a 94%, y el 2008 Kazemi – Rad¹³ utilizando primers correspondientes a regiones del rRNA determinó una sensibilidad del 90%. Estos estudios demuestran que indistintamente de los primers y la región del ADN a amplificar,^{14,15} los métodos de extracción de ADN a partir de frotis teñido tienen una sensibilidad aproximada del 90%.

Contrariamente, la Especificidad diagnóstica del método SLPK es baja 45%, ya que de once pacientes negativos por frotis seis fueron positivos por PCR SLPK. La Especificidad encontrada usando como Gold Standard resultados de frotis negativos puede ser objeto de duda debido a que como antes se mencionó, en pacientes con carga parasitaria baja el frotis puede dar resultados falsos negativos; como ejemplo se destaca que en el análisis de los nueve pacientes del subgrupo A con PCR positivo por dos métodos, tres mostraron ser falsos positivos (Sensibilidad del frotis = 66%). Hallazgos similares fueron encontrados el 2002 por Motazedian³, quien atribuyo este tipo de resultados a formas inusuales o crónicas de las lesiones, en cuyos frotis la observación de amastigotes se hace dificultosa, afectando en la lectura de los resultados la presencia de una gran cantidad de otros microorganismos contaminantes, tejido de cicatrización y gran cantidad de células del sistema inmunitario que hacen difícil el reconocimiento de protozoarios de *Leishmania*, siendo en estos casos de gran ayuda el diagnóstico de PCR a partir de los frotis de lesión.

Si bien los resultados obtenidos por el método SLPK son muestran ser útiles para confirmar el diagnóstico clínico de pacientes con leishmaniasis con resultados de frotis negativo, es necesario realizar un nuevo estudio con un mayor número de muestras positivas y negativas. Sería importante también, comprobar la capacidad de este nuevo método de diagnóstico para caracterizar especies de *Leishmania* a partir de frotis recientes e históricos. Volpini el 2006¹⁰ reportó que se puede obtener material genético en frotis históricos guardados por más de 36 años. También, este nuevo método de extracción de ADN sería de utilidad en estudios retrospectivos epidemiológico-moleculares que caractericen las especies y sus polimorfismos genéticos de los parásitos de *Leishmania* que circulan y han estado circulando en las diferentes zonas endémicas de Bolivia.

REFERENCIAS

1. Cuba C. Diagnóstico parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Rev Med Exp.* 2000; 17(1-4): 39-52.
2. Yokota M, Tatsumi N, Tsuda I, Yano I. DNA extraction and amplification from giemsa-stained blood smears. *J Clin Lab Anal.* 1995; 9(6): 387-91.
3. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96(1): 31-34.
4. Zerpa O, Borges R, Loyo N, Galindo W, Belisario D, Rodriguez N et al. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermat Venez.* 2002; 40(4): 106-10.
5. Kamble R, Shinde V, Madhale S, Kamble A, Ravikumar B, Jadhav R. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF – stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J Med Microbiol.* 2010; 28(1): 57-59.
6. Scopel K, Fontes C, Nunes A, Horta M, Braga E. Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Mal J.* 2004; 3(8).
7. Laskay T, Miko T, Negesse Y, Solbach W, Rollingho V, 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(3): 273-75.
8. Rodgers M, Popper S, Wirth D. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990; 71(3): 267-75.
9. Somma M. Organización Mundial de la Salud. Oficina Regional para Europa. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos Sesión N° 4 Extracción y Purificación de ADN. Institute for Health and Consumer Protection; 2010.
10. Morales J. Aspectos dermatológicos de la leishmaniasis. Jujuy: Área Epidemiología Departamento de Control de vectores; 2008 [actualizada el 11 de marzo de 2008; acceso 7 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.fcm.uncu.edu.ar/medicina/posgrado/dermatologia/teoricos/Leishmaniasis.pdf>
11. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Trop.* 2006; 99(1): 55-61.
12. Volpini A, Marques M, Lopes Dos Santos S, machado-Coelho G, Mayrink W, Romanha A. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(8): 815-18.
13. Kazemi-Rad E, Mohebbi M, Hajjarian H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health.* 2008; 37(1): 54-60.
14. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur L, Jaffe C. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4): 1435-39.
15. Córdoba E, Piñero E, Gonzalez A, Valladares B, Lizarralde M, Salomón O. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(2): 187-92.