

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA COINFECCIÓN  
POR “LEISHMANIA”-VIH**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Miguel Ángel Morales Hernández

Bajo la dirección del doctor

Jorge Álvar Ezquerro

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1707-1**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Biología de <i>Leishmania</i></b> .....	1
1.1 Filogenia y taxonomía.....	1
1.2 Ciclo biológico.....	3
1.3 Morfología.....	5
1.4 Organización genómica.....	6
1.5 Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad.....	9
<b>2. Clínica y epidemiología</b> .....	9
2.1 Tratamiento de la enfermedad.....	11
2.2 Mecanismos de resistencia.....	16
2.3 Leishmaniasis y SIDA. Coinfección.....	16
<b>3. Caracterización de <i>Leishmania</i></b> .....	19
3.1 Técnicas fenotípicas de caracterización.....	19
3.2 Técnicas genotípicas de caracterización.....	21
3.2.1 RFLP.....	21
3.2.2 Hibridación con sondas de ADN.....	21
3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes.....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>1. Material biológico. Pacientes. Cepas</b> .....	26
1.1 Cepas de referencia utilizadas.....	26
1.2 Cepas para validar la técnica como marcador traza.....	27
1.3 Cepas para estudiar la estructura de poblaciones en un nicho ecológico cerrado.....	27
1.4 Pacientes, muestras biológicas y cepas para diferenciar recidivas y reinfecciones.....	28
1.5 Estudio de jeringuillas desechadas por ADVPs.....	31
<b>2. Métodos</b> .....	32
2.1 Aislamiento y cultivo.....	32
2.1.1 Cultivo en masa.....	32
2.1.2 Congelación.....	32
2.1.3 Descongelación.....	33
2.2 Preparación de ADN total genómico a partir de cultivos.....	33

2.3 Cuantificación de ADN .....	34
2.4 Extracción de ADN a partir de muestras biológicas y jeringuillas .....	34
2.5 Amplificación del ADNk de <i>Leishmania</i> mediante la técnica de PCR ....	35
2.5.1 PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk .....	35
2.5.2 RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ) .....	36
2.5.3 IRT ( <i>Intergenic Ribosomal Typing</i> ) .....	36
2.5.4 PCR <i>seminested</i> para amplificar minicírculos de ADNk .....	37
2.5.5 Diseño de cebadores .....	38
2.6 Detección y visualización de los productos de amplificación .....	38
2.7 Purificación y/o elución de productos amplificados .....	39
2.8 Subclonaje y secuenciación de los productos de PCR .....	39
2.9 Digestión de los productos de PCR (RFLP) .....	41
2.10 Estudios de clonalidad del parásito .....	42
2.11 Construcción de dendogramas a partir de los datos de PCR-RFLP ....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	44
<b>1. Técnicas genotípicas para la caracterización molecular de <i>Leishmania</i></b> .....	44
1.1 RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ) .....	44
1.2 IRT ( <i>Intergenic Ribosomal Typing</i> ) .....	44
1.3 Desarrollo y optimización de una PCR-RFLP para amplificar minicírculos de ADNk de <i>L. infantum</i> .....	46
1.3.1 Secuenciación de los productos de PCR .....	48
1.3.2 Optimización de las digestiones (RFLP) .....	49
1.4 Desarrollo y optimización de una PCR-RFLP <i>seminested</i> para amplificar minicírculos de ADNk de <i>L. infantum</i> (kDNA snPCR-RFLP) .....	50
1.4.1 Diseño de cebadores .....	51
<b>2. Aplicaciones clínico-epidemiológicas de las técnicas de PCR-RFLP en la coinfección por <i>Leishmania</i>/VIH</b> .....	53
2.1 Aplicación de la PCR-RFLP directa para confirmar un brote de leishmaniasis .....	53
2.1.1 Secuenciación de los aislados de Badalona .....	55
2.2 Aplicación de la PCR-RFLP directa para estudios epidemiológicos de <i>Leishmania infantum</i> en la isla de Mallorca .....	57
2.2.1 Construcción de un dendograma UPGMA a partir de los datos de PCR-RFLP .....	58
2.3 Aplicación de las técnicas de PCR-RFLP para la evaluación y seguimiento molecular de individuos coinfectados por <i>Leishmania infantum</i> /VIH .....	61

2.3.1 Estudios de clonalidad del parásito en placas de agar-sangre ....	66
2.3.2 Ausencia de selección en cultivos de <i>Leishmania</i> .....	68
2.4 Aplicación de la técnica de kDNA snPCR-RFLP para la detección y caracterización de <i>Leishmania</i> en jeringuillas desechadas por ADVPs .....	69
<b>DISCUSIÓN</b> .....	71
<b>1. Caracterización de <i>Leishmania</i> por técnicas moleculares basadas     en PCR</b> .....	71
<b>2. Estudios clínico-epidemiológicos de la coinfección por     <i>Leishmania</i>/VIH</b> .....	77
<b>CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	85
<b>ANEXO</b>	

---

ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ADNg	ADN genómico
ADNk	ADN de kinetoplasto
ADVP	Adictos a drogas por vía parenteral
ARN	Ácido ribonucleíco
ARNm	ARN mensajero
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrdU	Bromo-desoxyruidina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
CSB	<i>Conserved Sequence Blocks</i>
ddATP	2'-3' Di-deoxi adenina trifosfato
ddCTP	2'-3' Di-deoxi citosina trifosfato
ddGTP	2'-3' Di-deoxi guanina trifosfato
ddH <sub>2</sub> O	Agua bi-destilada
ddTTP	2'-3' Di-deoxi timina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleótidos
D. O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracetato sódico
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
IRT	<i>Intergenic Ribosomal Typing</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i>
LB	Medio <i>Luria-Bertani</i>
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
Lcan	Leishmaniasis canina
MO	Médula ósea
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NNN	Medio difásico de <i>Novy-McNeal-Nicolle</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

P	Piel
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKDL	Leishmaniasis difusa post-kala-azar
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato
sn	<i>Seminested</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
<i>Taq-pol</i>	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solución de Tris y EDTA
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminoetano
<i>Tth-pol</i>	Polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages</i>
URL	<i>Uniform Resource Locator</i>
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## 1. Biología de *Leishmania*

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades que afectan a vertebrados superiores entre los que se incluye el hombre. Están causadas por protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania* de la familia *Trypanosomatidae*. Los cuadros clínicos son muy diversos y dependen tanto del estado inmunológico del hospedador como de la especie causante de la infección, con al menos 20 especies patógenas para el humano (Handman, 2000).

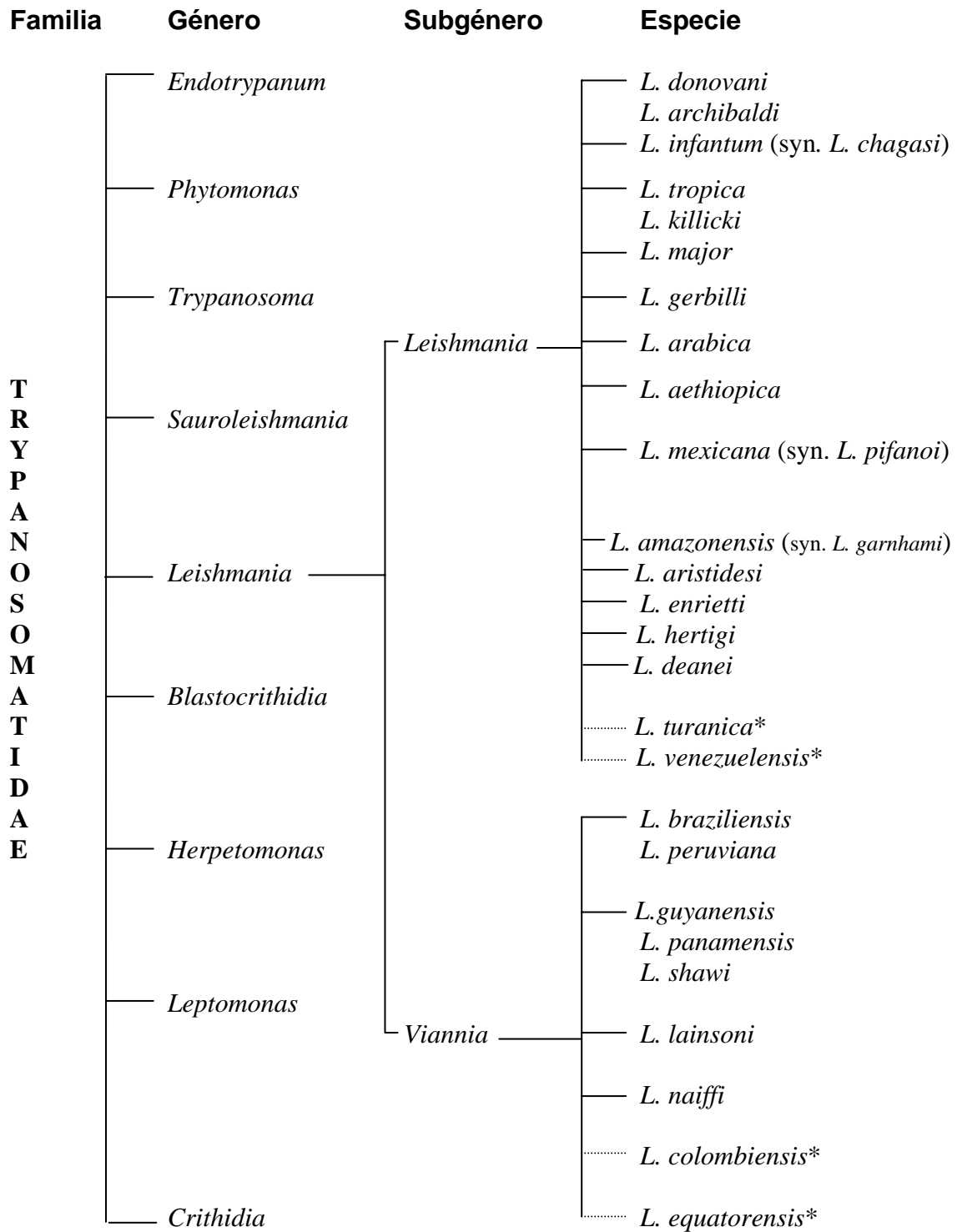
### 1.1 Filogenia y taxonomía

Este protozoo flagelado está encuadrado en el Reino de los Protistas ingestadores como sigue (Levine et al., 1980):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866  
Subreino: PROTOZOA Goldfuss, 1817  
Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg-Balamuth, 1963  
Subfilo: MASTIGOPHORA Deising, 1866  
Clase: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909  
Orden: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963; modificado por Vickerman, 1976  
Suborden: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880  
Familia: TRYPANOSOMATIDAE Doeflein, 1901  
Género: *Leishmania* Ross, 1903  
Subgénero: *Leishmania* Saf'janova, 1982

Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector (Lainson et al., 1979; 1987): subgénero *Leishmania* (Saf'janova, 1982) con desarrollo suprapilórico de los flagelados y subgénero *Viannia* (Lainson and Shaw, 1987) de multiplicación peripilórica. En la **Figura 1** se muestra un esquema con la taxonomía actualizada del género *Leishmania*.

Figura 1. Clasificación del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica. (Rioux et al., 1990; Dedet, 1993; Thomaz-Soccol et al., 1993a; 1993b)



\* Especies sometidas a reclasificación.



## 1.2 Ciclo biológico

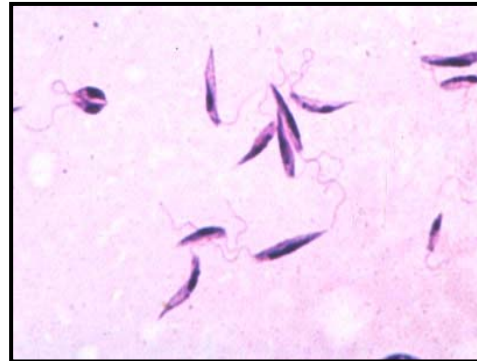
*Leishmania* es un parásito digénico, es decir, realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (numerosas especies del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) en forma flagelar o promastigote, **Figura 2**), y otra parte en el hospedador vertebrado (gran variedad de géneros) principalmente en los macrófagos, en forma aflagelar o amastigote (**Figura 3**).

Cuando el flebotomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocular, acompañado de su saliva, los promastigotes existentes en la probóscide. Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce una fagocitosis por parte del macrófago, que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre otros el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitófora. *Leishmania* evade estas reacciones inespecíficas del macrófago para sobrevivir y multiplicarse en su interior.

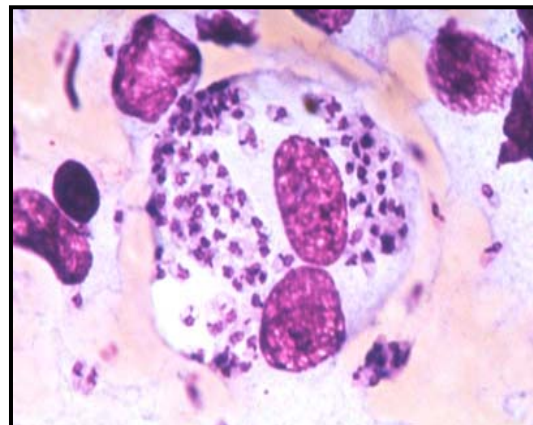
La progresión de la enfermedad dependerá de si los amastigotes sobreviven a estas reacciones por parte de los macrófagos, de la virulencia del protozoo y de la eficacia de la respuesta inmune.

Las células parasitadas circulantes pueden ser ingurgitadas por otros flebotomos, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes, para transformarse posteriormente en promastigotes. Pasados varios días alcanzan la capacidad infectiva (metaciclo); en este momento las leishmanias se encuentran ya en la probóscide del flebotomo, pudiendo ser inoculadas a otro hospedador vertebrado, cerrándose así el ciclo (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

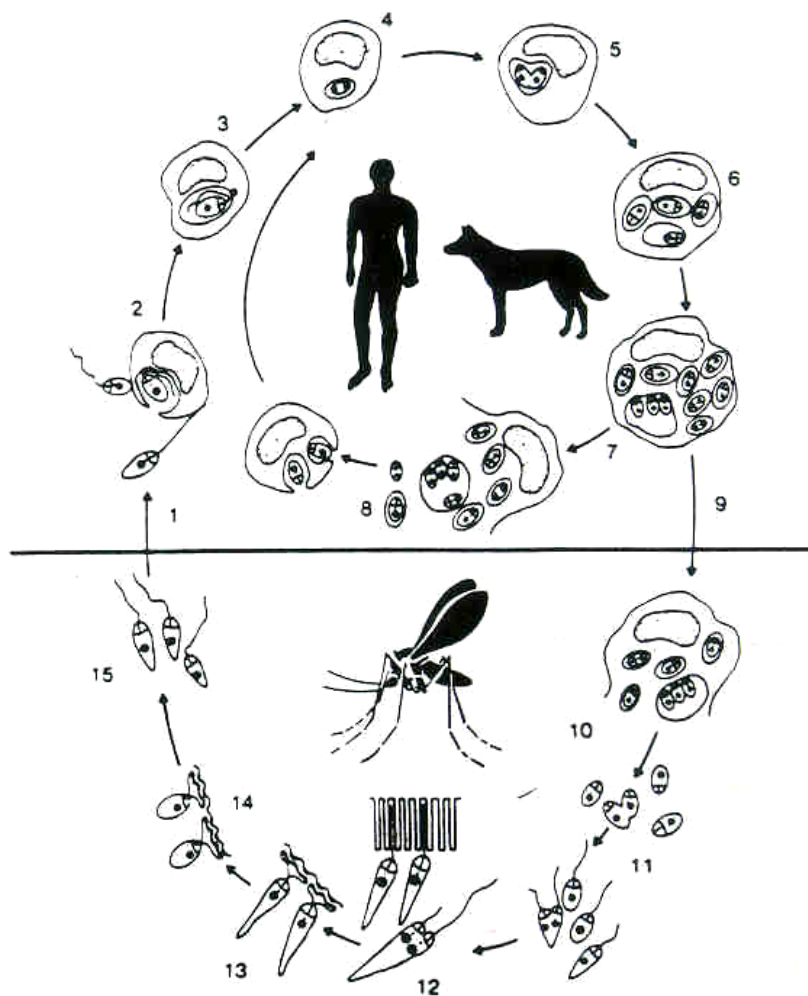
En la **Figura 4** se muestra un esquema detallado del ciclo biológico (modificado de Chang et al., 1985)



**Figura 2.** Formas promastigote. Tinción de Giemsa de un cultivo de leishmanias. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



**Figura 3 .** Formas amastigote. Tinción de Giemsa de un frotis de una biopsia esplénica. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



**Figura 4. Ciclo de *Leishmania* en los hospedadores vertebrado e invertebrado**

1.- Promastigotes en capilares sanguíneos después de la picadura del flebotomo. 2.- Fijación y fagocitación de los promastigotes en un macrófago. 3.- Fusión del fagosoma y lisosoma. 4.- Diferenciación del promastigote en amastigote. 5.- Multiplicación del amastigote en la vacuola parasitófora. 6.- Multiplicación intravacuolar de amastigotes. 7.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes. 8.- Fagocitosis de amastigotes libres por otros macrófagos. 9.- Ingestión de macrófagos parasitados cuando el flebotomo ingurgita sangre. 10.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes en el tracto digestivo del flebotomo. 11.- Multiplicación de amastigotes y diferenciación en promastigotes. 12.- Multiplicación de promastigotes e inserción de flagelos entre los microvilli del endotelio digestivo. 13.- Multiplicación en región pilórica e íleo con flagelos fijándose en la pared. 14.- Promastigotes con los flagelos unidos a la cutícula del intestino anterior. 15.- Promastigotes infectivos libres en la probóscide

### 1.3 Morfología

*Leishmania* fue descrito en 1903 por Leishman, Donovan y Wright y, como ya se ha visto en el ciclo biológico, pasa por una serie de etapas con diferente morfología. En el hospedador vertebrado, se encuentra la forma de amastigote, caracterizada por su forma oval, con un tamaño de 2-3  $\mu\text{m}$  y carente de flagelo. En el vector invertebrado se localiza la forma promastigote, con un tamaño de 15-24  $\mu\text{m}$  x 2-4  $\mu\text{m}$  y un único flagelo. Cuando el promastigote se encuentra anclado en las vellosidades del tubo digestivo del flebotomo se le denomina *promastigote nectomona* (Killick-Kendrick et al., 1974). Según va progresando hacia porciones anteriores del estómago el cuerpo se hace más redondeado y el flagelo se engrosa y acorta. En esta etapa carece de capacidad infectiva y se le conoce con el nombre de *promastigote haptomona* (Pimenta et al., 1992). Aproximadamente diez días después de haber entrado en el insecto, el promastigote pierde la adherencia y el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo. El promastigote ya no se multiplica, pero recupera el poder infectivo, y está situado en la hipofaringe del díptero, libre y en condiciones de poder ser inoculado; en este momento se le conoce con el nombre de *promastigote metacíclico* (Sacks and Perkins, 1984). Una vez que el promastigote ha sido inoculado en el hospedador vertebrado el cuerpo se ovala; en esta fase al parásito se le denomina *paramastigote* (Walters, 1993). Una vez en el macrófago, el amastigote adquiere la forma típica durante las primeras 24 horas.

Tanto el promastigote como el amastigote son células bien organizadas. La membrana plasmática es una bicapa lipídica y se encuentra tapizada por un glucocáliz formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI) (Englund, 1993), y relacionado con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocáliz son una glicoproteína de 63 kDa (gp63), otra de 46 kDa (gp 46) y el lipofosfoglicano (LPG). La glicoproteína de 63 kDa (gp63) es una metaloproteína polimórfica y conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Está presente en las dos formas del parásito, alcanzando las 500.000 copias por célula en el promastigote (McKerrow et al., 1993). En los amastigotes aparece en menor número y localizada en el interior de lisosomas (Ilg et al., 1993). La glicoproteína de 46 kDa (gp 46) presenta unas 400.000 copias por promastigote. Está presente en el Subgénero *Leishmania*, pero no así en *Viannia*, siendo su principal característica la resistencia a la proteólisis (Rivas et al., 1991). Por último, el lipofosfoglicano (LPG) es otro glucoconjugado,

implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago (Turco y Descoteaux, 1992). En el promastigote está presente en un número muy alto de copias, entre 1 y 1.5 millones por célula, sin embargo, en el amastigote es muy poco abundante.

Además de los orgánulos comunes a otros eucariotas, *Leishmania* posee ciertas particularidades que le diferencian. Debajo de la membrana citoplasmática encontramos una red de microtúbulos subpeliculares siguiendo una trayectoria helicoidal con respecto al eje longitudinal de la célula. Esta red de microtúbulos se extiende por todo el cuerpo celular dejando libre la porción correspondiente a la bolsa flagelar, donde quedan confinados los procesos de endo- y exocitosis. Esta red proporciona una morfología estable y cierta movilidad contráctil. El glucosoma es un orgánulo único en los Kinetoplastida que alberga las enzimas de las primeras etapas de la glucólisis y guarda semejanzas con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas (Opperdoes y Michels, 1993). El megasoma es un orgánulo lisosomal muy voluminoso que contiene, entre otras enzimas típicas de lisosomas, una alta proporción de cisteín-proteasas asociadas a la capacidad invasiva de los amastigotes del complejo *mexicana* (McKerrow *et al.*, 1993).

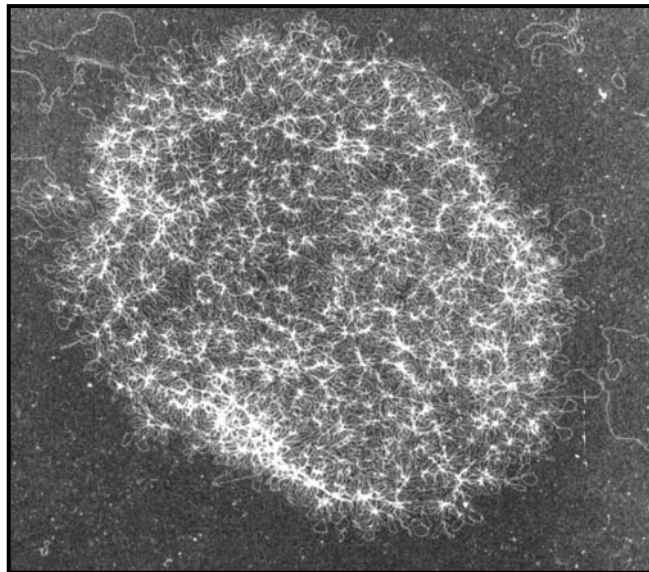
Se acepta de forma general que la multiplicación de *Leishmania* es asexual (agamogonia). Se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes, excepto en las formas metacíclicas que no se dividen. Primero lo hace el núcleo, luego el corpúsculo basal, a continuación se forma el flagelo para finalmente dividirse el citoplasma. Los amastigotes se dividen bien por bipartición o bien por división múltiple.

#### **1.4 Organización genómica**

Los protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* poseen un ADN genómico (ADNg) localizado en tres compartimentos: en el núcleo, como ADN cromosómico, en la mitocondria o kinetoplasto, formando una red de maxi- y minicírculos (ADNk) (Simpson *et al.*, 1980) que se replica independientemente y es inusual en la naturaleza, y en el citoplasma como ADN extracromosómico. El ADNk es rico en A+T (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico, rico en G+C (>60%) (Álvarez *et al.*, 1994).

El material genético de los protozoos del orden *Kinetoplastida* está organizado en cromosomas que, al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico (Vickerman y Preston, 1970), no pueden ser visualizados con el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional. La introducción de la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) ha permitido obtener un patrón del cariotipo de *Leishmania*, pero es extremadamente polimórfico y complejo. En general, se acepta que *Leishmania* posee un genoma constituido por 20-36 cromosomas con un tamaño de 150 kilobases en los minicromosomas y de 4 megabases en los de mayor tamaño (Van der Ploeg et al., 1984). Aunque no ha sido posible determinar con certeza el carácter diploide del genoma de *Leishmania*, en general existe un consenso sobre ello, además de aceptar que es funcionalmente asexual (Wong, 1995).

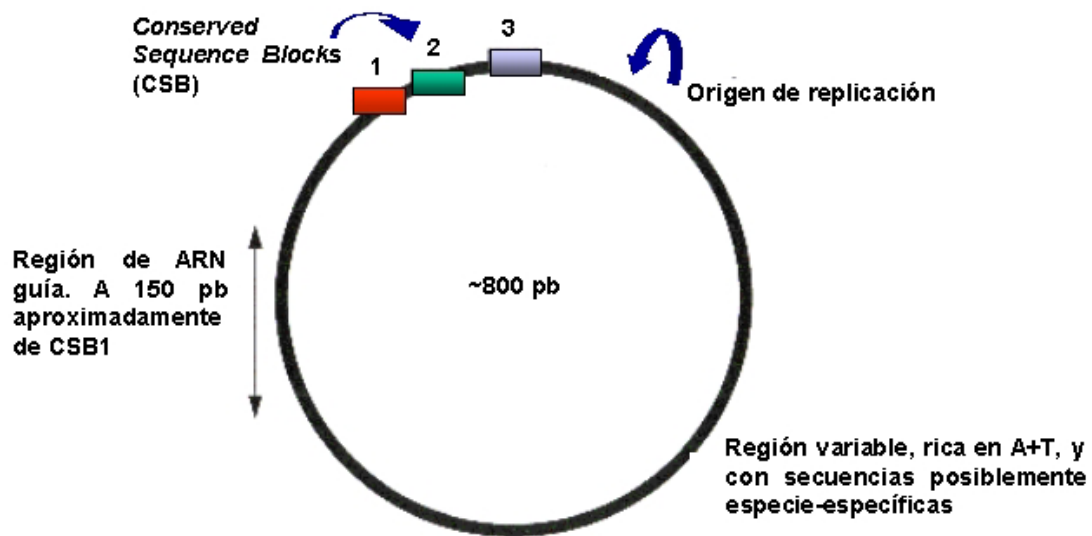
El kinetoplasto se encuentra dentro de la membrana mitocondrial y está presente en todos los protozoos del orden Kinetoplastida (Barker y Arnot, 1981). Es un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1-2  $\mu\text{m}$ . Contiene aproximadamente  $10^7$  pares de bases. Está situado dentro de la membrana mitocondrial, en la base del flagelo, y aparece en todos los kinetoplástidos. Representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxicírculos y minicírculos) concatenadas covalentemente (Simpson, 1979) (**Figura 5**). El ADNk contiene unos 50 maxicírculos (30-40 kilobases), que contienen los genes que codifican el ARN ribosomal y algunas proteínas mitocondriales



**Figura 5.** Microscopía electrónica del ADNk de *Leishmania*.  
Cedido por D.C. Barker

(Benne et al., 1983), y de 10.000 a 20.000 minicírculos, con un tamaño que oscila entre 400 y 2500 pares de bases, dependiendo de la especie. En cada minicírculo existe una región muy conservada de unos 120 pares de bases y una región variable de unos 700 pares de bases. Poseen los ARN guías, y forman parte de la estructura y la división del kinetoplasto (Arts y Benne, 1996) (**Figura 6**).

## Organización de un minicírculo de *Leishmania*



**Figura 6.** Esquema básico de la organización general de un minicírculo de *Leishmania*.

Recientemente ha sido descrito un marco abierto de lectura (ORF) en la región variable de una familia de minicírculos de *Leishmania donovani*. La proteína codificada presenta homología con proteínas transportadoras de membrana conocidas, TAP-1 y TAP-2 (Singh y Rastogi, 1999). En *Leishmania* existen entre 8 y 20 familias de minicírculos que presentan una serie de secuencias con un tamaño que oscila entre las 300 y las 600 pares de bases y que están altamente repetidas (CSB, *Conserved Sequence Blocks*), conocidas como CSB1, 2 y 3. Las leishmanias presentan un número limitado de familias de secuencias, cuyo número, entre 10 y 80, depende de la especie (Brewster y Barker, 2002), y algunas de las familias, entre 4 o 5, acaparan casi el 80% de los minicírculos. Esto significa que una gran cantidad de copias (más de 3.000) de unas pocas secuencias de entre 300-600 pares de bases estarán disponibles para estudios de secuenciación y diseño de cebadores (Barker, 1987; Desjeux et al., 2001). Las secuencias de los minicírculos pueden variar por mutación o recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes, lo que se traduce en una variabilidad relativamente alta (Rogers y Wirth, 1988). Sin embargo, se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de ciertas secuencias de minicírculos, pertenecientes a una misma clase, de leishmanias geográficamente muy distantes, así como dentro de la misma especie (Gutiérrez-Solar et al., 1995; Lambson et al., 1999; 2000).

Ciertos fármacos como la pentamidina interactúan directamente con el ADNk, interfiriendo en su replicación y transcripción, además de modificar su conformación estructural, es decir, la red concatenada sufre modificaciones apreciables (Basselin et al., 1998). El significado de estos cambios no está perfectamente claro, pero se ha propuesto el término “transkinetoplastidia”, para explicar cómo ante la presencia de ciertos fármacos (pentamidina, arsénicos y tunicamicina), se produce un cambio en la replicación de los minicírculos, que conduce a que las familias minoritarias, tras varios ciclos de replicación, sean las mayoritarias (Lee et al., 1993).

### **1.5 Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad**

Últimamente se ha ido sugiriendo la posibilidad de que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos, puede tener lugar un intercambio genético. Las dos consecuencias genéticas fundamentales de la reproducción sexual son segregación y recombinación; su ausencia en poblaciones naturales indicaría la inexistencia por tanto de este tipo de reproducción. Se ha podido demostrar que *Leishmania* sufre recombinación genética en el laboratorio y en poblaciones naturales (Lanotte y Rioux, 1990; Kelly et al., 1991). Sin embargo todos los intentos de cruzamiento experimental en el vector han fracasado (Panton et al., 1991). A principios de los 90 se propuso una teoría general de reproducción clonal para los protozoos parásitos (Tibayrenc et al., 1990; 1991). Se postula que una especie es clonal cuando sus descendientes son idénticos a los progenitores. Esta teoría clonal no contradice la aparición de recombinación genética en poblaciones naturales del parásito, simplemente que éstas no son lo suficientemente frecuentes para romper los patrones de prevalencia de la estructura de la población clonal. Es más, estudios de segregación genética en cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes coinfectados por el VIH, sugieren que en estos pacientes el parásito también sigue un patrón clonal, con las implicaciones epidemiológicas que de ello se derivan (Jiménez et al., 1997).

## **2. Clínica y epidemiología**

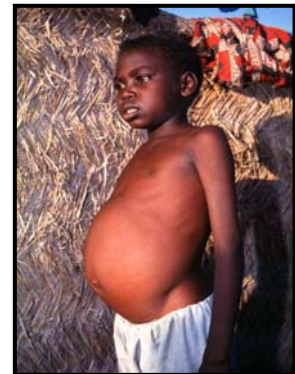
Los protozoos del género *Leishmania* causan las leishmaniasis, un grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o como graves afectaciones viscerales. Entre estos dos polos hay una amplia gama de posibilidades clínicas. De acuerdo a la OMS, la leishmaniasis es endémica en 88 países, de los cuales la mayor parte (82%) son considerados países menos avanzados (Desjeux et al., 2001). La prevalencia es de 12 millones de enfermos, con una incidencia de unos 2 millones de

casos nuevos anuales, de ellos 500.000 viscerales y casi 1.500.000 cutáneos. De estos últimos, sólo 600.000 son declarados oficialmente.

Unas 30 especies de flebotomos pueden ser infectados por el parásito cuando ingurgitan sangre de un hospedador que a su vez es reservorio. Éstos pueden ser humanos, animales de vida salvaje como roedores, o animales domésticos como el perro. La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis rurales o periurbanas, infectándose el humano de manera esporádica, mientras que las formas antroponóticas son de transmisión fundamentalmente urbana.

Las formas clínicas son:

✓ **Leishmaniasis visceral (LV).** Es la forma más severa de la enfermedad. Es producida por *L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* en América). Otras especies cutáneas, como *L. tropica*, pueden visceralizar ocasionalmente (Sacks et al., 1995). El periodo de incubación suele ser de unos dos meses, aunque puede llegar a los dos años, y la sintomatología es secundaria a la invasión de los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal, etc. (**Figura 7**). Además de fiebre, leucopenia y hepatoesplenomegalia, pueden aparecer diarrea, tos y pérdida de peso. Si no se trata, la mortalidad llega a alcanzar el 90%. Se distinguen la LV antroponótica o kala-azar producida por *L. donovani* y la LV zoonótica causada por *L. infantum*. Meses o años después de la forma antroponótica, aparentemente curada, pueden aparecer placas hipopigmentadas o nódulos indurados por la piel, conocida como leishmaniasis dérmica post-kala-azar, generalmente debida a un tratamiento ineficaz (**Figura 8**).



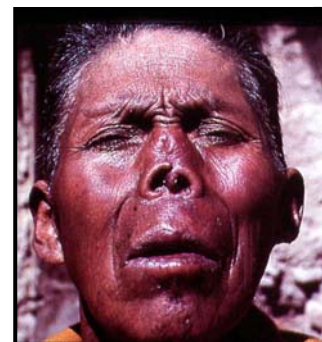
**Figura 7.** Leishmaniasis visceral con esplenomegalia y abdomen distendido. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



**Figura 8.** Post-kala-azar afectando severamente al rostro [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)

✓ **Leishmaniasis mucocutánea (LMC).** Después de una lesión cutánea en cualquier parte del cuerpo, las leishmaniasis pueden metastizar por vía linfática hacia la oronasofaringe produciendo perforación del tabique, llegando a afectar al paladar, dorso nasal, labio superior y pómulos (**Figura 9**).

Los agentes causales son *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L.*



**Figura 9.** Leishmaniasis mucocutánea, afectando al tabique nasal. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



*panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* (sólo causa LMC por contigüidad con la lesión inicial) y, excepcionalmente, *L. infantum* y *L. major*.

✓ **Leishmaniasis cutánea (LC).** Puede producir un gran número de úlceras en las partes expuestas de la piel, tales como el rostro (**Figura 10**) y extremidades, causando importantes discapacidades en los pacientes. Las lesiones tienden a curar de forma espontánea. Los agentes causales son *L. major*, *L. tropica* (algunas formas cutáneas por *L. tropica* se complican y la tendencia a recidivar y ulcerarse se repite a lo largo de la vida), *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* (esta última puede también producir la leishmaniasis cutánea difusa, que no cura espontáneamente y es muy complicada de tratar). Las LC son las más frecuentes y representan entre el 50-75 % de todos los casos.



**Figura 10.** Lesión facial en un niño por leishmaniasis cutánea. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)

## 2.1 Tratamiento de la enfermedad

El tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se lleva a cabo con los mismos fármacos, tales como los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina, aunque la posología y la vía de administración difiere según los casos. La toxicidad asociada a estos fármacos leishmanicidas de uso común, junto con la aparición de fenómenos de resistencia a los mismos, ha originado la necesidad de obtener nuevos fármacos de diverso origen, como alternativa terapéutica.

### Antimoniales pentavalentes.

Son los compuestos de primera elección y los más extensamente usados en la terapéutica de la enfermedad desde hace 40 años. El grupo consta de dos formas comerciales: Pentostam® (estibogluconato sódico) y Glucantime® (antimoniato de meglumina). El principal efecto es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos (Balaña-Fouce et al., 1998). La dosis de fármaco empleada depende del contenido en antimonio (Sb) de éste. La O.M.S. recomendó en 1982 la administración de 20 mg/Kg/día de Sb por vía venosa, con un máximo al día de 850 mg de Sb; sin embargo, la baja acumulación del fármaco en la piel, puede ocasionar variación en la posología

(Balaña-Fouce et al., 1998). Además, el uso generalizado de los antimoniales con dosis inadecuadas para el tratamiento de la leishmaniasis canina podría ser uno de los orígenes de la aparición de resistencias (Croft, 2001).

### **Anfotericina B.**

Es el fármaco de segunda elección después de los antimoniales pentavalentes. Se trata de un antibiótico macrocíclico de bajo espectro derivado de *Streptomyces nodosus*, cuyo modo de acción se basa en su unión al ergosterol de la membrana del parásito, produciendo alteraciones en la permeabilidad de la misma con pérdida de metabolitos (Ramos et al., 1994). Sus efectos colaterales adversos en el paciente han hecho de la anfotericina B un fármaco empleado principalmente en casos de leishmaniasis visceral recidivante y en áreas de alta resistencia a antimoniales. No obstante, en los últimos años se han desarrollado nuevas formulaciones del compuesto conjugado con lípidos, lo que ha mejorado su índice terapéutico, además de una disminución significativa de los efectos tóxicos en humanos (Balaña-Fouce et al., 1998). Estas moléculas lipídicas engloban medicamentos y liberan su contenido de manera retardada. El sistema utilizado más básico es el *ABLC*, formado por complejos lipídicos de 1600 a 6000 nm unidos a la anfotericina B en forma de madejas. Los liposomas son los sistemas de dispersión más utilizados. Son vesículas de un diámetro menor de 100 nm, con una gran estabilidad, una vida media larga y sus efectos colaterales son mínimos.

### **Pentamidina**

En los casos más resistentes a los antimoniales pentavalentes, se usa como sustituto a los mismos. Inhibe la síntesis de proteínas y fosfolípidos (Berman, 1988; 1997; Mesa-Valle et al., 1997), se une a regiones del ADN ricas en AT de forma reversible (Johnson et al., 1998), produce un descenso en los niveles de ornitina, arginina y putrescina, siendo uno de sus blancos terapéuticos la síntesis de poliaminas (Basselin et al., 1996; 1997a), y produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial (Vercesi y Docampo, 1992; Basselin y Robert-Gero, 1998). Sus efectos secundarios son más severos que los del grupo de los antimoniales, acumulándose en hígado, cerebro y otros tejidos.

### **Miltefosina**

Los análogos de la fosfocolina han sido utilizados como cancerostáticos para el tratamiento de las metástasis del cáncer de mama. La miltefosina es una molécula con buenas expectativas para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y del mal de

Chagas (Croft et al., 1996; Jha et al., 1999; Gangneux y Marty, 2001; Croft y Yardley, 2002). Su acción se basa en la estimulación tanto de los linfocitos T como de la acción microbicida de los macrófagos, pero a diferencia de los antimoniales, su actividad no es T-dependiente, por lo que podría ser un buen candidato para el tratamiento de enfermos coinfectados por *Leishmania*/VIH (Russo et al., 1996).

#### **Ketoconazol.**

Se trata de un azol que impide la formación de ergosterol a partir de lanosterol (Berman et al., 1984). El resultado es la alteración estructural de membranas subcelulares y la aparición de procesos autofágicos que acaban por producir la muerte de la célula (Balaña-Fouce et al., 1998).

#### **Alopurinol.**

Es otro de los compuestos alternativos en la terapéutica de la enfermedad. *Leishmania* es incapaz de sintetizar *de novo* las purinas (Hammond y Gutteridge, 1984), por lo que debe obtenerlas del hospedador. El alopurinol es un análogo de la adenosina que es captado activamente por la célula, que lo emplea para la formación de nucleótidos implicados en procesos energéticos en lugar de la adenosina, de esta forma, se produce un descenso rápido en los niveles de ATP intracelulares, afectando a los procesos metabólicos del parásito (Balaña-Fouce et al., 1998).

#### **Inmunoterapia.**

En ratones resistentes a la enfermedad se ha comprobado el desarrollo de una respuesta Th1, con producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Scott et al., 1988). La respuesta Th2 conduce a la supresión de respuesta Th1 y a la activación de linfocitos B con producción de anticuerpos que son incapaces de eliminar al parásito intracelular. De esta forma, se ha observado que la administración conjunta de antimoniales pentavalentes e IFN- $\gamma$  acelera la eliminación de los parásitos, reduciendo por tanto los períodos de tratamiento (Sundar et al., 1995). No obstante, se ha comprobado que la mejora en los sujetos tratados con antimoniales e IFN- $\gamma$  va acompañada de un aumento en los niveles de IL-12 (Li et al., 1997). La combinación de Pentostam<sup>®</sup> e IL-12 ha dado buenos resultados en ratones infectados con *L. major*, observándose un cambio de una respuesta Th2 a una Th1 más efectiva (Nabors et al., 1995).

**Nuevas alternativas terapéuticas.**

El desarrollo en los últimos años de líneas de investigación orientadas a la obtención de nuevos compuestos con valor terapéutico frente a la leishmaniasis, se ve justificado ante la creciente aparición de problemas asociados al tratamiento clásico de la enfermedad. Entre éstos destaca la aparición de fenómenos de resistencia frente a los medicamentos tradicionales (Borst y Ouellette, 1995) seguido de la toxicidad asociada a los fármacos, la tolerancia a los mismos por parte del paciente dependiendo de su estado físico, la falta de un diagnóstico precoz que impida el aumento de la carga parasitaria, y el aumento del número de casos asociados a estados de inmunodepresión, especialmente en pacientes de SIDA.

**Tratamiento de las leishmaniasis asociadas al SIDA**

Como se ha indicado anteriormente, existe la necesidad de asociar los antimoniales y la respuesta inmune para eliminar el parásito. Esto significa que los enfermos coinfectados tienen difícil curación y explica, en parte, las frecuentes recaídas. Los antimoniales pentavalentes son los fármacos de primera elección en enfermos coinfectados, con una buena respuesta clínica (Medrano et al., 1992), pero no parasitológica. Se ha comparado la eficacia del antimonio de meglumina y de la anfotericina B libre en estos enfermos, concluyendo que la elección de uno u otro medicamento viene determinada por la situación clínica previa (Laguna et al., 1999). Hasta que se comenzó a utilizar la terapia HAART, un 20% de los enfermos moría durante el tratamiento o en el mes siguiente, debido a su estado de inmunodepresión (Ribera et al., 1995). Una vez que se ha superado este periodo, su supervivencia es igual a la de otros individuos VIH+, en los que la terapia HAART prolonga su vida casi de manera indefinida pero no logra prevenir las recaídas por leishmaniasis (Villanueva et al., 2000). La anfotericina B libre siempre ha sido el tratamiento de segunda elección, por sus graves efectos secundarios, aunque ha quedado probada su utilidad (Laguna et al., 1999). Ante esta situación se está utilizando la anfotericina B liposómica, que consigue una respuesta inmediata muy buena pero sin evitar las recaídas (Davidson et al., 1994; Russo et al., 1996). En otro estudio se ha visto que el *ABL*C tiene la misma eficacia que el Glucantime<sup>®</sup>, con menos efectos secundarios y distanciando más las recaídas (Laguna et al., 2001).

## 2.2 Mecanismos de resistencia

Los fenómenos de resistencia mencionados son posibles gracias a diversos mecanismos adaptativos del parásito:

**a) Amplificación génica.** En presencia del agente terapéutico se produce la amplificación de los genes codificantes de las proteínas blanco del fármaco, con la consiguiente sobreexpresión de proteína; pero también aparecen amplificadas regiones del ADN no relacionadas de forma directa con dichas proteínas, tales como la región H, amplificada en casos de resistencia frente a fármacos no relacionados estructural ni funcionalmente (Beverley, 1991). Los casos de amplificación génica más estudiados son aquellos implicados en la resistencia al metotrexato (MTX), potente inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS). En los estudios realizados en *L. major*, se produce la amplificación de una región de ADN, denominada región R, que contiene el gen estructural de la DHFR-TS, con sobreexpresión de la enzima (Beverley, 1991).

**b) Cambios estructurales en proteínas.** Otra de las vías para evadir la acción del fármaco consiste en la modificación de la proteína blanco sustituyendo los aminoácidos situados en el lugar de unión al compuesto (Berman et al., 1989). En la cepa de *L. major* D7BR1000, resistente al metotrexato, el cambio de la base 158 del gen de la DHFR-TS, resulta en la sustitución de una metionina por una arginina en la posición 58 de la enzima, lo que impide la unión del MTX a la proteína, esencial para la inhibición (Arrebola et al., 1994).

**c) Modificación del transporte de fármacos.** En muchos casos la resistencia viene dada por una entrada reducida del fármaco en el interior de la célula. Dicha reducción es consecuencia de un cambio producido en los transportadores de membrana del mismo (Basselin et al., 1997b; Chiquero et al., 1998), tal es el caso de la cepa MTXA5 de *L. donovani* resistente a MTX, cuyo transportador de folatos presenta una actividad deficiente comparándolo con el de la cepa salvaje (Kaur et al., 1988).

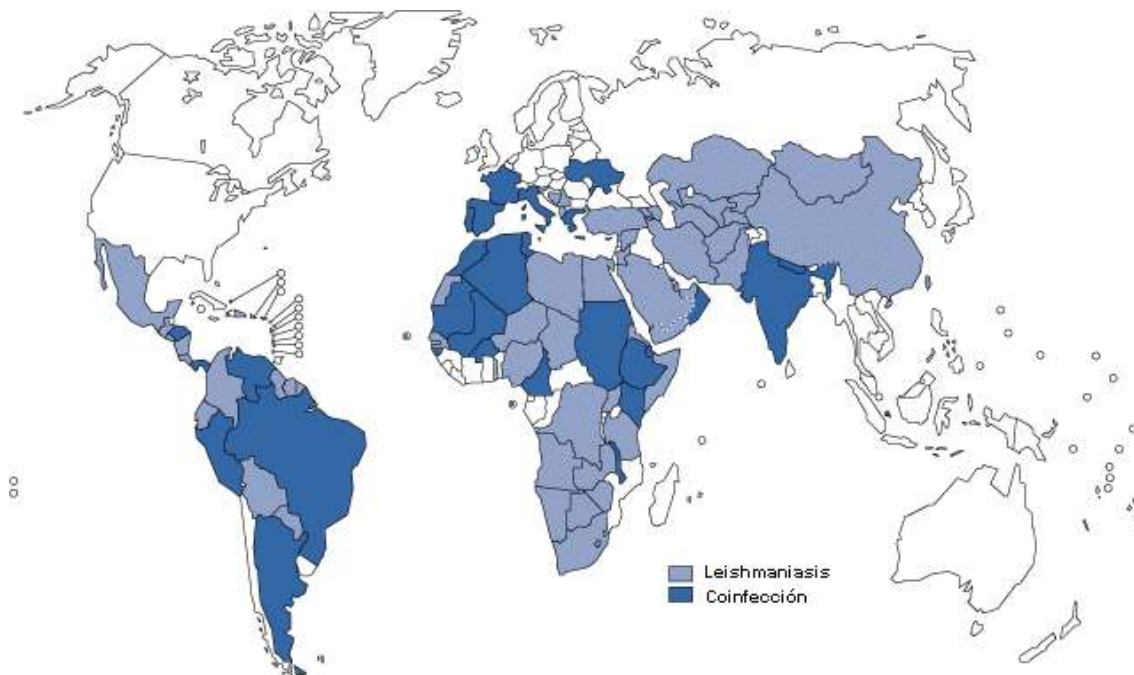
**d) Multirresistencia a fármacos.** En células tumorales multirresistentes se produce la sobreexpresión de una proteína de membrana de unos 170 kDa denominada glucoproteína P, que en un proceso dependiente de ATP expulsa el fármaco (Borst et al., 1995). Del mismo modo, en *Leishmania* también se produce una sobreexpresión

de una glucoproteína P (150-180 kDa), encargada del transporte al exterior del compuesto citotóxico en un proceso dependiente de ATP (Sánchez et al., 1994).

### 2.3 Leishmaniasis y SIDA. Coinfección

En 1985 se asoció por primera vez la leishmaniasis al SIDA (de la Loma et al., 1985). Desde entonces los casos se han incrementado, hasta tener registrados, de manera oficial 1781 casos según el Departamento de Vigilancia de Enfermedades transmisibles de la OMS (CDSR/WHO). De éstos, 1627 han sido notificados en el suroeste europeo, si bien se cree que la cifra es un 30% superior. Según las últimas estimaciones de UNAIDS y la OMS, 32 millones de adultos y 1.2 millones de niños vivían con el VIH en el año 2000, el 95% de ellos en países en vías de desarrollo (WHO, 2000). En los países industrializados, casi 6 millones de personas se infectaron con el virus durante 1999, y 2.5 millones murieron a pesar de contarse con la terapia antirretroviral.

La LV es la forma clínica más frecuentemente asociada con el VIH/SIDA. Esta coinfección se ha incrementado por la solapación entre la LV y el SIDA, debido a la introducción de la última en áreas rurales y de la primera en áreas suburbanas. Treinta y tres países han notificado hasta la fecha casos de coinfección (**Figura 11**)

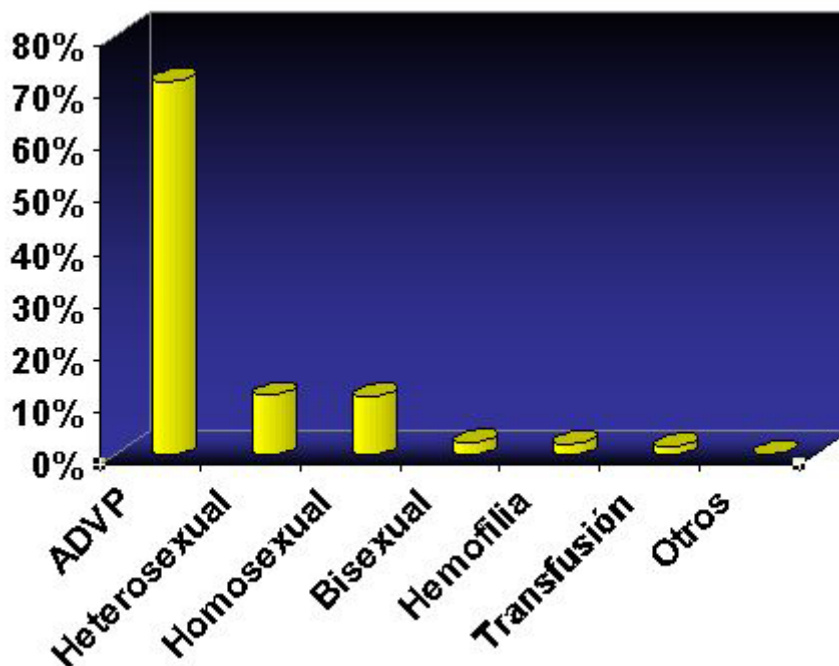


**Figura 11.** 33 países con casos declarados de coinfección *Leishmania*/VIH. Fuente: WHO/UNAIDS Surveillance Network, 2000

Es muy destacable el hecho de que los casos reportados en el suroeste europeo (Francia, Italia, Portugal y España) entre enero de 1996 y junio de 1998 representan casi el 50% del total. La coinfección también está incrementándose de manera notable en África (con brotes en Etiopía y Burkina Fasso) y en India, y se esperan cifras altísimas en los próximos años en estas regiones. España está a la cabeza en la notificación de casos de coinfección por *Leishmania*/VIH con el 58% de todos los casos declarados a la OMS.

Ha habido importantes cambios en los patrones epidemiológicos de la LV en Europa. Tradicionalmente era una enfermedad infantil, mientras que hoy la coinfección afecta sobre todo a adultos: el 77% de los pacientes coinfectados tienen edades comprendidas entre los 31-50 años. Esta distribución de edad coincide con la distribución de edad de los adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs).

En el suroeste de Europa, los ADVPs representan el mayor grupo de riesgo (71% de casos de coinfección), muy por encima de otros grupos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Distribución por grupos de riesgo de la coinfección por *Leishmania*/VIH, en el suroeste europeo.

En estos países del suroeste de Europa, hasta el 70% de los casos de LV en adultos están asociados con una infección por VIH y hasta el 9% de los pacientes con SIDA sufren de LV (primoinfección o reactivada) (Desjeux y UNAIDS, 1998). Además, *L. infantum* está considerado como el segundo o tercer parásito oportunista más importante en nuestro medio (Medrano et al., 1992).

La fuerte asociación entre el parásito y el virus hizo pensar que las infecciones asintomáticas pasarían a expresarse clínicamente al producirse la inmunodepresión. Una segunda hipótesis propone además que la transmisión del parásito se realiza a través de las jeringuillas compartidas por ADVPs (Alvar y Jiménez, 1994; Alvar et al., 1996; 1997), basándose en las siguientes observaciones experimentales y epidemiológicas:

i) En los países con mayores porcentajes de coinfección, (España, Francia, Italia y Portugal), el grupo de riesgo más frecuente para la transmisión del VIH es la ruta intravenosa entre ADVPs (WHO, 1995).

ii) Variantes bioquímicas (zimodemas) de *L. infantum* encontradas en pacientes coinfectados y ADVPs, nunca han sido aisladas ni en individuos inmunocompetentes ni en el reservorio natural en nuestro medio, el perro (Jiménez et al., 1995b).

iii) Al menos el 52% de los pacientes coinfectados presentan amastigotes en sangre periférica (Martínez et al., 1993).

iv) La información entomológica sugiere que esta transmisión es posible ya que mínimas cantidades de sangre infectada (0.3-0.5  $\mu$ L), cantidad habitualmente ingurgitada por los flebotomos, es suficiente para comenzar la parasitación en el 100% de los casos estudiados (Molina et al., 1994). Por lo tanto es lógico pensar que el volumen de sangre compartido a través de las jeringuillas (el promedio es 50  $\mu$ L) es más que suficiente para permitir la transmisión mecánica. Además, se han realizado infecciones experimentales desde pacientes coinfectados a ratones, con unas condiciones que simulan el intercambio de agujas (Morillas-Márquez et al., 2002).

A partir de todas estas evidencias mencionadas se ha propuesto un esquema de transmisión mixto de *L. infantum* en los países mediterráneos (Alvar et al., 1997). Como se observa en la **Figura 13**, existe un ciclo zoonótico mantenido entre perros y a través de la picadura del flebotomo y que de manera accidental infecta al humano, al que se asocia un ciclo antroponótico artificial, en el que el flebotomo ha sido sustituido por las jeringuillas compartidas entre ADVPs.



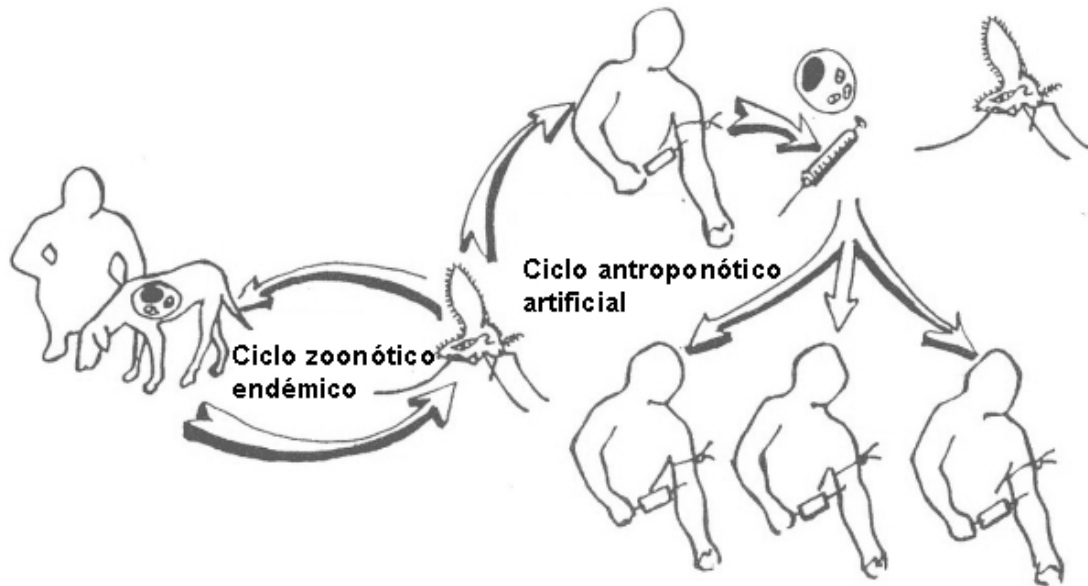


Figura 13. Tomado de Alvar et al , 1997

### 3. Caracterización de *Leishmania*.

Existe una necesidad real de diferenciar y caracterizar las poblaciones de los parásitos para mejorar el diagnóstico y tratamiento, evaluar las recaídas y reinfecciones, y establecer el pronóstico y control. La morfología de las distintas especies es indistinguible, pero su curso clínico es muy variado. Además, la taxonomía del género no está definitivamente cerrada, por los límites que impone la multiplicación clonal. En general se utilizan métodos extrínsecos (procedencia del sujeto infectado, lesión), es decir, métodos basados en el fenotipo, frente a métodos de caracterización intrínsecos, que analizan el genoma del parásito, y que son más sensibles y específicos en taxonomía.

#### 3.1 Técnicas fenotípicas de caracterización.

La caracterización mediante isoenzimas ha sido la técnica de caracterización fenotípica más ampliamente utilizada. Son enzimas con la misma función pero que presentan diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico (Marker y

Moller, 1959). El término “zimodema” hace referencia a las poblaciones de parásitos de una misma especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos (Lumsden, 1977). La caracterización enzimática se lleva a cabo en diferentes soportes, como son el acetato de celulosa, poliacrilamida y almidón, siendo este último el más utilizado, y el que tiene mejor rendimiento (revisado por Evans et al., 1989).

La caracterización enzimática es la herramienta de referencia para estudios taxonómicos y epidemiológicos en *Leishmania* además de ser ampliamente utilizada en otros protozoos. El protocolo para la realización de isoenzimas está unificado en el sur de Europa, utilizando los mismos 15 sistemas enzimáticos y el almidón como sustrato. Se emplea el acrónimo “ZM” para zimodema o “MON” (de Laboratoire d’Ecologie Médicale de Montpellier).

Mediante el uso de zimodemas, en el Nuevo Mundo se establecieron las diferencias bioquímicas entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Miles et al., 1980). Además el subgénero *Viannia* fue estudiado en profundidad (Evans et al., 1984) y el papel de reservorios y vectores en las especies americanas se resolvió aislando los parásitos de ellos y tipificándolos mediante isoenzimas. En el Viejo Mundo se aplicó esta técnica para la separación de *L. tropica* y *L. major* (Aljeboori y Evans, 1980).

La caracterización de cepas de *L. infantum* aisladas en la cuenca mediterránea, y más concretamente en España, ha puesto de manifiesto su presencia en el hombre, perro, zorro, rata y flebotomo. Hasta la fecha se han descrito 29 zimodemas en *L. infantum*, de los cuales 25 han sido encontrados en humanos. Algunos de estos zimodemas analizados y provenientes de sujetos inmunocompetentes son responsables de producir exclusivamente LV (MON-27, MON-28, MON-77 y MON-187) o LC por otra parte (MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-78 y MON-111). Otros zimodemas, sin embargo, causan tanto LV como LC (MON-1, MON-34, MON-80 y MON-190) (Alvar, 2001). Excepcionalmente se ha visto la coexistencia de dos zimodemas en el mismo hospedador humano, como MON-1 y MON-34 en un enfermo coinfectado con VIH (Dedet, 1990).

Los estudios de caracterización de cepas aisladas de pacientes inmunocompetentes han revelado que el zimodema MON-1 es responsable del 90% de los casos de LV y del 20% de LC; otros zimodemas como el MON-27, MON-72, MON-111, MON-187 y MON-189 aparecen esporádicamente en sujetos inmunocompetentes, y todavía no se han descrito en pacientes coinfectados con el VIH (Gállego et al., 2002)

La caracterización de cepas aisladas de pacientes coinfectados por *Leishmania*/VIH de diferentes países tiene varios aspectos destacables, tanto en la prevalencia de los zimodemas descritos como en su tropismo. En primer lugar, la variabilidad de *L. infantum* es mayor en los pacientes VIH+ que en los inmunocompetentes (Jiménez et al., 1995a). El zimodema MON-1 es responsable del 50% de los casos de coinfección y los zimodemas MON-24, MON-28, MON-29, MON-33, MON-34, MON-77 y MON-78 aparecen más frecuentemente que en pacientes inmunocompetentes (Alvar, 2001; Gállego et al., 2002). Algunos zimodemas, 10 hasta la fecha, sólo se han aislado de pacientes inmunodeprimidos (Dedet y Pratlong, 2000), lo que indicaría que estos pacientes podrían actuar como reservorios de esos zimodemas, siendo transmitidos por la sangre compartida en las jeringuillas (Alvar et al., 1994; 1996; 1997). De forma complementaria se postula que el sistema inmune de los sujetos inmunocompetentes es capaz de seleccionar y eliminar los zimodemas menos virulentos, encontrándose en estos individuos una menor variabilidad (Gradoni and Gramiccia, 1994). Además, algunos zimodemas cutáneos visceralizan, debido a la anergia de los individuos VIH+, lo que también contribuye a esta variabilidad (Gramiccia et al., 1992; Campino et al., 1994).

Si bien el análisis por zimodemas ha dado respuesta a problemas taxonómicos, su poder de resolución es limitado, de tal manera que cuando caracterizamos aislados del mismo paciente y que comparten un mismo zimodema, no es posible determinar si las infecciones son recaídas o reinfecciones, objetivo primordial en enfermos coinfectados por *Leishmania*/VIH, donde se imputan fallos terapéuticos a recidivas, que realmente son reinfecciones. Por lo tanto, para llegar a la diferenciación entre realizar individuos necesitamos recurrir a las herramientas genotípicas de caracterización.

### **3.2 Técnicas genotípicas de caracterización**

Son técnicas basadas en el análisis del genoma que, en principio, permanece invariable durante toda la vida del parásito; incluso cuando ocurren cambios morfológicos a lo largo de su ciclo biológico, y aún bajo presión del sistema inmune del hospedador, no se modifica (Blackwell, 1992).

Los métodos genotípicos de caracterización se pueden encuadrar en tres grandes grupos: a) análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP); b) hibridación con sondas de ADN; c) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes.

### 3.2.1 RFLP

Las endonucleasas de restricción son capaces de encontrar dianas específicas en la secuencia de ADN (de 4 a 6 nucleótidos), y cortar en tantos fragmentos como dianas existan. Estos fragmentos se separan mediante electroforesis y se visualizan en geles de agarosa, lo que se conoce como *fingerprinting*. En los tripanosomátidos en general, y en *Leishmania* en particular, la técnica de RFLP se ha venido realizando digiriendo el ADNk previamente separado del ADNg mediante gradiente de densidad en Cloruro de cesio (CsCl)/Bromuro de etidio (EtBr), y los fragmentos obtenidos se denominan de manera particular esquizodemas, los cuales presentan unos patrones útiles en estudios de caracterización del parásito (Morel et al., 1980; Angelici et al., 1989; Pacheco et al., 1995).

### 3.2.2 Hibridación con sondas de ADN

La región más utilizada para la hibridación con sondas han sido los minicírculos de ADNk, puesto que contienen una región conservada, y están altamente repetidos, como ya se indicó (ver apartado 1.4). En taxonomía, el uso de estas sondas de ADNk ha permitido la separación de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, y dentro del subgénero *Viannia* quedan incluidas las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Barker y Butcher, 1983). Las sondas de ADNk se siguen utilizando para comprobar que el producto amplificado corresponde a una determinada especie o en situaciones puntuales de diagnóstico, como la sonda B4 Rsa (Lambson et al., 2000).

Las sondas de ADNg, en concreto la pDK20, ha resuelto definitivamente la diferenciación entre *L. donovani* y *L. infantum*, que había sido señalada mediante tipificación isoenzimática pero no confirmada por técnicas genotípicas (Lanotte et al., 1981; van Eys et al., 1991). De forma similar se han empleado sondas de ADNg, concretamente la LbJ38, en leishmanias del Nuevo Mundo, más en concreto en la especie *L. braziliensis* (Rodríguez et al., 1997).

### 3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes.

De forma paralela al desarrollo de sondas de ADN, se describió un método que solucionaba el problema de la baja sensibilidad en las hibridaciones, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1986). Al comienzo se usaba una *Taq* DNA polimerasa, enzima termoestable aislada de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*, con la que es posible amplificar un fragmento de ADN hasta obtener millones de copias del mismo. También se emplean otras

polimerasas como la *Tth*, aislada de *Thermus thermophilus*. En la reacción de PCR, se repiten unos 30 ciclos con la siguiente secuencia: a) desnaturalización de la doble hebra de ADN a 94°C; b) unión de oligonucleótidos específicos (cebadores) y diseñados complementariamente en los extremos del fragmento de ADN que queremos amplificar. La temperatura a la que ocurre este paso (50-70°C, en general) es crítica para el éxito de la reacción y depende en gran medida de las propiedades físico-químicas de los cebadores. La especificidad de la PCR reside tanto en una buena elección de los cebadores como de las temperaturas a la cual se van a unir a las cadenas sencillas de ADN; c) síntesis de cadenas de ADN a 72°C, catalizado por la *Taq* polimerasa, y con la adición de nucleótidos presentes en exceso en la reacción. Es una técnica sencilla, sensible y específica, y permite la detección del parásito en todo tipo de muestras biológicas, en flebotomos y en cultivos.

La PCR descrita se conoce como PCR directa. Tiene una alta sensibilidad pero es posible mejorarla gracias a la realización de una PCR interna o *nested*, que consiste en la realización de dos PCR consecutivas, en la que el producto amplificado de la primera reacción sirve de molde para la segunda. Los primeros protocolos se desarrollaron a principios de los 90 para la detección del género *Plasmodium* (Goodyer et al., 1991; Snounou et al., 1993). En este caso los dos cebadores de la segunda reacción son distintos a los de la primera, pero puede ocurrir que uno de los cebadores de la primera reacción se use también en la segunda, entonces la PCR se conoce como semi-interna o *seminested*.

La PCR-hibridación es la primera de las variantes utilizada en estudios genotípicos de caracterización. El producto amplificado se transfiere a membranas de nylon o nitrocelulosa e hibridan con sondas específicas. Las condiciones de hibridación son muy astringentes para asegurar la especificidad del proceso. Así se han conseguido distinguir los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, importante ya que discriminamos especies que sólo causan lesiones cutáneas de aquellas que evolucionan hacia formas mucocutáneas (López et al., 1993; Rodríguez et al., 1994).

La PCR-múltiple se realiza en un solo paso en el que los productos amplificados tienen distinto tamaño según la especie. Utilizando como diana minixones es posible diferenciar las tres especies más frecuentes del Nuevo Mundo: *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. chagasi* (Harris et al., 1998).

Una variante de la PCR llamada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), tiene como principal novedad el hecho de que no es necesario conocer la región que

queremos amplificar (Williams et al., 1990). Se utilizan cebadores cortos (10-12 bases) diseñados al azar, que producen un patrón de bandas o *fingerprinting* útil para distinguir entre especies del género *Leishmania* (Noyes et al., 1996). También se ha descrito con el propósito de establecer cierta variabilidad intraespecífica, concretamente en *L.infantum* (Bañuls et al., 1999), pero tiene limitaciones evidentes en cuanto a su reproducibilidad y estandarización (Meunier y Grimont, 1993).

La PCR-IRT (*Intergenic Region Typing*) se basa en la amplificación de los ITS (*Internal Transcribed Spacers*) del gen que codifica el ARN ribosómico. Los productos amplificados se digieren con endonucleasas de restricción, proporcionando unos patrones claros y distinguibles para la diferenciación de especies del género *Leishmania* y también para la realización de estudios filogenéticos a partir de esta información (Cupolillo et al., 1995; 1998).

La PCR-RFLP, en general, detecta pequeñas variaciones en un gen concreto, ya que el producto amplificado es digerido con diferentes enzimas de restricción que reconocerán o no su diana dependiendo de estas variaciones nucleotídicas. El patrón de bandas que se visualiza tras la electroforesis es útil para distinguir especies del subgénero *Viannia*, usando como diana el gen gp63 (Victoir et al., 1998). Este gen, que codifica la metaloenzima con acción proteasa del mismo nombre y las regiones intergénicas adyacentes, ha sido el más empleado para técnicas de PCR-RFLP en *Leishmania*, tanto para caracterización como para filogenia, aunque no tan útil para estudiar variabilidad intraespecífica (Guerbouj et al., 2001; Mauricio et al., 2001). También se entiende por PCR-RFLP la digestión de cualquier producto amplificado y que, al digerirlo, ofrece un patrón distinguible y diferente para cada especie o individuo, como pueden ser los minicírculos de ADNk. Esta aproximación ha sido útil para la detección de *L. tropica* y posteriores estudios epidemiológicos (Noyes et al., 1998).

En esta Introducción se han examinado diversos aspectos de la caracterización tanto fenotípica como genotípica de *Leishmania*. En general, las técnicas descritas, si bien son válidas desde el punto de vista diagnóstico y taxonómico, tienen evidentes limitaciones como marcadores traza para seguir aislados de *Leishmania* de manera individual. El motivo de esta Tesis ha sido el desarrollo de técnicas moleculares que cumplan los requisitos de un marcador traza y que respondan a problemas clínico-epidemiológicos de la coinfección por *Leishmania infantum*/VIH.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aljeboori, T.I. and Evans, D.A. (1980). Leishmania spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 178-184.
- Alvar, J. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Laboratorios Intervet, Salamanca.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., and Moreno, J. (1997). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 298-319.
- Alvar, J., Gutierrez-Solar, B., Pachon, I., Calbacho, E., Ramirez, M., Valles, R., Guillen, J.L., Canavate, C., and Amela, C. (1996). AIDS and Leishmania infantum. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.*, **14**, 541-546.
- Alvar, J. and Jimenez, M. (1994). Could infected drug-users be potential Leishmania infantum reservoirs? *AIDS*, **8**, 854.
- Alvarez, F., Robello, C., and Vignali, M. (1994). Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 790-802.
- Angelici, M.C., Gramiccia, M., and Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of Leishmania infantum through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99 Pt 3**, 301-309.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E.P., Santi, D.V., Ruiz-Perez, L.M., and Gonzalez-Pacanowska, D. (1994). Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant Leishmania cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10590-10596.
- Arts, G.J. and Benne, R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 39-54.
- Balana-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubria, J.C., and Ordonez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.*, **30**, 435-443.
- Banuls, A.L., Brisse, S., Sidibe, I., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1999). A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the Leishmania genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitol. (Praha)*, **46**, 10-14.
- Barker, D.C. (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, **3**, 177-184.
- Barker, D.C. and Arnot, D.E. (1981). Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **3**, 33-46.
- Barker, D.C. and Butcher, J. (1983). The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the Leishmania mexicana and L. braziliensis complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**, 285-297.

- Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1997a). Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, **85**, 274-282.
- Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., and Robert-Gero,M. (1998). Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.*, **70**, 43-61.
- Basselin,M., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.*, **315 ( Pt 2)**, 631-634.
- Basselin,M., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1997b). Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitol. Res.*, **83**, 413-418.
- Basselin,M. and Robert-Gero,M. (1998). Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol. Res.*, **84**, 78-83.
- Benne,R., De Vries,B.F., Van den,B.J., and Klaver,B. (1983). The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6925-6941.
- Berman,J.D. (1988). Inhibition of leishmanial protein kinase by antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**, 298-303.
- Berman,J.D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, **24**, 684-703.
- Berman,J.D., Edwards,N., King,M., and Grogl,M. (1989). Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**, 159-164.
- Berman,J.D., Holz,G.G., Jr., and Beach,D.H. (1984). Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **12**, 1-13.
- Beverley,S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 417-444.
- Blackwell,J.M. (1992). Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, **104 Suppl**, S19-S34.
- Borst,P. and Ouellette,M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 427-460.
- Brewster,S. and Barker,D.C. (2002). Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S55-S63.
- Campino,L., Santos-Gomes,G., Pratloug,F., Dedet,J.P., and Abranches,P. (1994). HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **88**, 394.
- Chang,K.P., Fong,D., and Bray,R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. *Leishmaniasis*, ., pp. 1-30.
- Chiquero,M.J., Perez-Victoria,J.M., O'Valle,F., Gonzalez-Ros,J.M., del Moral,R.G., Ferragut,J.A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 131-139.



- Croft, S.L. (2001). Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, **6**, 899-905.
- Croft, S.L., Snowdon, D., and Yardley, V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **38**, 1041-1047.
- Croft, S.L. and Yardley, V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des*, **8**, 319-342.
- Cupolillo, E., Grimaldi, J.G., Momen, H., and Beverley, S.M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 145-155.
- Cupolillo, E., Pereira, L.O., Fernandes, O., Catanho, M.P., Pereira, J.C., Medina-Acosta, E., and Grimaldi, G., Jr. (1998). Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**, 677-683.
- Davidson, R.N., di Martino, L., Gradoni, L., Giacchino, R., Russo, R., Gaeta, G.B., Pempinello, R., Scott, S., Raimondi, F., Cascio, A., and . (1994). Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q. J. Med.*, **87**, 75-81.
- de la, L.A., Alvar, J., Martinez, G.E., Blazquez, J., Alcalá, M.A., and Najera, R. (1985). Leishmaniasis or AIDS? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 421-422.
- Dedet, J.P. (1990). Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**, 25-28.
- Dedet, J.P. (1993). *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de l'Institut Pasteur*, **4**, 3-25.
- Dedet, J.P. and Pratlong, F. (2000). *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**, 37-39.
- Desjeux, P., Piot, B., O'Neill, K., and Meert, J.P. (2001). [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med. Trop. (Mars.)*, **61**, 187-193.
- Desjeux, P. and UNAIDS (1998). *Leishmania* and HIV grid-lock. *WHO/CTD/LEISH/98. 9, UNAIDS/98. 23*.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 121-138.
- Evans, D.A., Godfrey, D., Lanham, S.M., Lanotte, G., Modabber, F., and Schnur, L.F. (1989). Characterization of *Leishmania*. In Evans, D.A. (Ed.), *Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania*, . Geneva, Switzerland, pp. 1-45.
- Evans, D.A., Lanham, S.M., Baldwin, C.I., and Peters, W. (1984). The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 35-42.
- Gallego, M., Pratlong, F., Riera, C., Muñoz, C., Ribera, E., Fisa, R., Rioux, J.A., Dedet, J.P., and Portus, M. (2002). Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96**, 45-47.
- Gangneux, J.P. and Marty, P. (2001). [Treatment of visceral leishmaniasis: efficacy and limits of miltefosine]. *Sante*, **11**, 257-258.
- Goodyer, I.D., Towner, P., and Hayes, D.J. (1991). The use of nested PCR and Southern blotting to confirm the presence of actin in *Plasmodium yoelli*. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 419S.

- Gradoni, L. and Gramiccia, M. (1994). Leishmania infantum tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitol Today*, **10**, 264-267.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., and Troiani, M. (1992). HIV-Leishmania co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of Leishmania causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 161-163.
- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ismail, R.B., Le Ray, D., and Dujardin, J.C. (2001). Gp63 gene polymorphism and population structure of Leishmania donovani complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology*, **122 Pt 1**, 25-35.
- Gutierrez-Solar, B., Smyth, A.J., Alvar, J., and Barker, D.C. (1995). Leishmania infantum: sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distance. *Exp. Parasitol.*, **81**, 416-419.
- Hammond, D.J. and Gutteridge, W.E. (1984). Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **13**, 243-261.
- Handman, E. (2000). Cell biology of Leishmania. *Adv. Parasitol.*, **44**, 1-39.
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., and Agabian, N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1989-1995.
- Ilg, T., Harbecke, D., and Overath, P. (1993). The lysosomal gp63-related protein in Leishmania mexicana amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett.*, **327**, 103-107.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A., and Berman, J. (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1795-1800.
- Jimenez, M., Alvar, J., and Tibayrenc, M. (1997). Leishmania infantum is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS*, **11**, 569-573.
- Jimenez, M., Ferrer-Dufol, M., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Molina, R., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Cercenado, E., Dauden, E., Blazquez, J., and . (1995a). Variability of Leishmania (Leishmania) infantum among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 197-204.
- Jimenez, M.I., Laguna, F., de la, T.F., Solis, F., Pratlong, F., and Alvar, J. (1995b). New Leishmania (Leishmania) infantum zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**, 33.
- Johnson, R., Cubria, J.C., Reguera, R.M., Balana-Fouce, R., and Ordonez, D. (1998). Interaction of cationic diamidines with Leishmania infantum DNA. *Biol. Chem.*, **379**, 925-930.
- Kaur, K., Coons, T., Emmett, K., and Ullman, B. (1988). Methotrexate-resistant Leishmania donovani genetically deficient in the folate-methotrexate transporter. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7020-7028.
- Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J., and Evans, D.A. (1991). Evidence of genetic recombination in Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **46**, 253-263.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., and Ashford, R.W. (1974). Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **187**, 409-419.

- Laguna, F., Lopez-Velez, R., Pulido, F., Salas, A., Torre-Cisneros, J., Torres, E., Medrano, F.J., Sanz, J., Pico, G., Gomez-Rodrigo, J., Pasquau, J., and Alvar, J. (1999). Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. *AIDS*, **13**, 1063-1069.
- Laguna, F., Videla, S., Jimenez-Mejias, E., Sirera, G., Torres-Cisneros, J., Ribera, E., and Alvar, J. Amphotericin B Lipid Complex vs Meglumine Antimoniate in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in HIV- Infected Patients: A Multicenter, Open Label, Blinded, Randomization, Parallel Controlled Clinical Trial. Abstract 33[8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections]. 2001. 4-2-2001.  
Ref Type: Generic
- Lainson, R., Ready, P.D., and Shaw, J.J. (1979). Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **206**, 307-318.
- Lainson, R., Ryan, L., and Shaw, J.J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**, 421-424.
- Lainson, R. and Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1., Academic Press, London, pp. 1-120.
- Lambson, B., Smyth, A., and Barker, D. (1999). Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **101**, 229-232.
- Lambson, B., Smyth, A., and Barker, D.C. (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.*, **94**, 15-22.
- Lanotte, G. and Rioux, J.A. (1990). [Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)]. *C. R. Acad. Sci. III*, **310**, 285-288.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Maazoun, R., Pasteur, N., Pralong, F., and Lepar, J. (1981). [The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903.--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author'transl)]. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, **56**, 575-591.
- Lee, S.T., Tarn, C., and Chang, K.P. (1993). Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 187-203.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, **27**, 37-58.
- Li, J., Sutterwala, S., and Farrell, J.P. (1997). Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. *Infect. Immun.*, **65**, 3225-3230.
- Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., and Arevalo, J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 348-356.
- Lumsden, W.H. (1977). Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **57**, 361-368.

- Marker, C.L. and Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **45**, 753-763.
- Martinez, P., de, I., V., Laguna, F., Soriano, V., Puente, S., Moreno, V., Sentchordi, M.J., Garcia-Aguado, C., and Gonzalez-Lahoz, J. (1993). Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *AIDS*, **7**, 227-230.
- Mauricio, I.L., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., and Miles, M.A. (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*, **122**, 393-403.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 821-853.
- Medrano, F.J., Hernandez-Quero, J., Jimenez, E., Pineda, J.A., Rivero, A., Sanchez-Quijano, A., Velez, I.D., Viciano, P., Castillo, R., Reyes, M.J., and . (1992). Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS*, **6**, 1499-1503.
- Mesa-Valle, C.M., Moraleta, V., Lazuen, J., Craciunescu, D., and Osuna, A. (1997). Action of new organometallic complexes against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 47-57.
- Meunier, J.R. and Grimont, P.A. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, **144**, 373-379.
- Miles, M.A., Pova, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., and Shaw, J.J. (1980). Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 243-252.
- Molina, R., Canavate, C., Cercenado, E., Laguna, F., Lopez-Velez, R., and Alvar, J. (1994). Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS*, **8**, 277-279.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J., and Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 6810-6814.
- Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Acedo-Sanchez, C., Pineda, J.A., Macias, J., and Sanjuan-Garcia, J. (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from Infected Patients to Experimental Animal under Conditions That Simulate Needle-Sharing. *Exp. Parasitol.*, **100**, 71-74.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nabors, G.S., Afonso, L.C., Farrell, J.P., and Scott, P. (1995). Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 3142-3146.
- Noyes, H.A., Belli, A.A., and Maingon, R. (1996). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 98-105.
- Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W., and Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2877-2881.

- Opperdoes, F.R. and Michels, P.A. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie*, **75**, 231-234.
- Pacheco, R.S., Martinez, J.E., Valderrama, L., Momen, H., and Saravia, N.G. (1995). Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **69**, 197-209.
- Panton, L.J., Tesh, R.B., Nadeau, K.C., and Beverley, S.M. (1991). A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J. Protozool.*, **38**, 224-228.
- Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., and Sacks, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**, 1812-1815.
- Ramos, H., Saint-Pierre-Chazalet, M., Bolard, J., and Cohen, B.E. (1994). Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1079-1084.
- Ribera, E., Cucurull, E., Ocana, I., Vallespi, T., Gasser, I., and Juste, C. (1995). [Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **13**, 73-79.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., and Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, 111-125.
- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K., and McMahon-Pratt, D. (1991). Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **47**, 235-243.
- Rodriguez, N., De Lima, H., Rodriguez, A., Brewster, S., and Barker, D.C. (1997). Genomic DNA repeat from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology*, **115** ( Pt 4), 349-358.
- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R., and Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2246-2252.
- Rogers, W.O. and Wirth, D.F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**, 1-8.
- Russo, R., Nigro, L.C., Minniti, S., Montineri, A., Gradoni, L., Caldeira, L., and Davidson, R.N. (1996). Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J. Infect.*, **32**, 133-137.
- Sacks, D.L., Kenney, R.T., Kreutzer, R.D., Jaffe, C.L., Gupta, A.K., Sharma, M.C., Sinha, S.P., Neva, F.A., and Saran, R. (1995). Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet*, **345**, 959-961.
- Sacks, D.L. and Perkins, P.V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**, 1417-1419.
- Saf'janova, V.M. (1982). Classification of the genus *Leishmania*. *Protozoology, Part 7*, . URSS All Union Society of Protozoologists, Leningrad, pp. 219-220.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, **324**, 163-166.

- Sanchez,A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1994). Increased P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to methotrexate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 855-861.
- Scott,P., Natovitz,P., Coffman,R.L., Pearce,E., and Sher,A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, **168**, 1675-1684.
- Simpson,L. (1979). Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 1585-1588.
- Simpson,L., Simpson,A.M., Kidane,G., Livingston,L., and Spithill,T.W. (1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1053-1063.
- Singh,N. and Rastogi,A.K. (1999). Kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania donovani* express a protein product. *Biochim. Biophys. Acta*, **1444**, 263-268.
- Snounou,G., Viriyakosol,S., Zhu,X.P., Jarra,W., Pinheiro,L., do,R., V, Thaitong,S., and Brown,K.N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**, 315-320.
- Sundar,S., Rosenkaimer,F., Lesser,M.L., and Murray,H.W. (1995). Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **171**, 992-996.
- Thomaz-Soccol,V., Lanotte,G., Rioux,J.A., Pratlong,F., Martini-Dumas,A., and Serres,E. (1993a). Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **68**, 107-108.
- Thomaz-Soccol,V., Lanotte,G., Rioux,J.A., Pratlong,F., Martini-Dumas,A., and Serres,E. (1993b). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **68**, 104-106.
- Tibayrenc,M., Kjellberg,F., and Ayala,F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 2414-2418.
- Tibayrenc,M., Kjellberg,F., and Ayala,F.J. (1991). Clonal defence. *Nature*, **350**, 385-386.
- Turco,S.J. and Descoteaux,A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 65-94.
- Van der Ploeg,L.H., Cornelissen,A.W., Barry,J.D., and Borst,P. (1984). Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.*, **3**, 3109-3115.
- van Eys,G.J., Guizani,I., Ligthart,G.S., and Dellagi,K. (1991). A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Exp. Parasitol.*, **72**, 459-463.
- Vercesi,A.E. and Docampo,R. (1992). Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.*, **284 ( Pt 2)**, 463-467.
- Vickerman,K. and Preston,T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.*, **6**, 365-383.
- Victoir,K., Banuls,A.L., Arevalo,J., Llanos-Cuentas,A., Hamers,R., Noel,S., De Doncker,S., Le Ray,D., Tibayrenc,M., and Dujardin,J.C. (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology*, **117 ( Pt 1)**, 1-13.

Villanueva, J.L., Alarcon, A., Bernabeu-Wittel, M., Cordero, E., Prados, D., Regordan, C., and Alvar, J. (2000). Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **19**, 798-801.

Walters, L.L. (1993). Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 196-206.

WHO (1995). *Report on the consultative meeting on Leishmania/HIV coinfection*. WHO, Roma.

WHO (2000). *Leishmania/HIV coinfection: south-western Europe 1990-1998*. WHO, Geneva.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.

Wong, A.K. (1995). Molecular genetics of the parasitic protozoan Leishmania. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 235-240.

<b>1. BIOLOGÍA DE LEISHMANIA.....</b>	<b>1</b>
1.1 FILOGENIA Y TAXONOMÍA.....	1
1.2 CICLO BIOLÓGICO .....	3
1.3 MORFOLOGÍA .....	5
1.4 ORGANIZACIÓN GENÓMICA .....	6
1.5 REPRODUCCIÓN DEL PARÁSITO: CLONALIDAD O SEXUALIDAD .....	9
<b>2. CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA .....</b>	<b>9</b>
2.1 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.....	11
2.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	15
2.3 LEISHMANIASIS Y SIDA. COINFECCIÓN .....	16
<b>3. CARACTERIZACIÓN DE LEISHMANIA.....</b>	<b>19</b>
3.1 TÉCNICAS FENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN. ....	19
3.2 TÉCNICAS GENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	21
3.2.1 RFLP .....	22
3.2.2 Hibridación con sondas de ADN.....	22
3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. ....	22

✓ **Objetivo conceptual:** desarrollar un marcador traza que permita un mejor conocimiento de la epidemiología molecular de la coinfección por *Leishmania infantum*/VIH, basado en la amplificación del ADNk y digestiones enzimáticas (PCR-RFLP).

✓ **Objetivos experimentales:**

1. Determinar la validez de esta herramienta molecular para el seguimiento de brotes de leishmaniasis en individuos coinfectados.
2. Aplicar la técnica desarrollada al estudio de cepas procedentes de humanos, perros y flebotomos, obtenidas en un nicho ecológico cerrado, la Isla de Mallorca, para esclarecer la estructura de poblaciones de *Leishmania infantum*.
3. Diferenciar y evaluar entre recidivas y reinfecciones en enfermos coinfectados por *Leishmania*/VIH.
4. Determinar la presencia de *Leishmania* en jeringuillas desechadas por adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs), y caracterizar molecularmente las muestras positivas para confirmar la existencia del ciclo antroponótico.



## 1. Material biológico. Pacientes. Cepas.

### 1.1 Cepas de referencia utilizadas

Para el desarrollo y optimización de la sensibilidad y especificidad de los procesos de amplificación de ADN, se emplearon cepas de referencia de *L. infantum*, marcadores de especies del Viejo Mundo y Nuevo Mundo y otras especies de tripanosomátidos, como queda recogido en la **Tabla 1**.

**Tabla 1**

	<b>Código</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Origen</b>	<b>Zimodema</b>
<b>Cepas de referencia de <i>L. infantum</i></b>				
LEM-75	MHOM/FR/78/LEM-75	Humano	Francia	MON-1
<b>Cepas de referencia del Viejo Mundo</b>				
<i>L. donovani</i> (LRC-133)	MHOM7ET/67/HU3	Humano	Etiopía	MON-18
<i>L. donovani</i> (DD8)	MHOM/IN/80/DD8	Humano	India	MON-2
<i>L. aethiopica</i> (LRC-147)	MHOM/ET/72/I100	Humano	Etiopía	MON-14
<i>L. tropica</i> (LRC-32)	MHOM/IQ/65/AV-SINAI	Humano	Iraq	MON-39
<i>L. major</i> (LRC-137)	MHOM/IL/67/JERICHO	Humano	Israel	MON-26
<i>L. major</i> (5-ASKH)	MHOM/SU/73/5-ASKH	Humano	Sudán	MON-4
<i>L. infantum</i> (IPT-1)	MHOM/TN/80/IPT-1	Humano	Túnez	MON-1
<b>Cepas de referencia del Nuevo Mundo</b>				
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Humano	Brasil	MON-43
<i>L. guyanensis</i>	MON/BR/70/M-1176	Humano	Brasil	-
<i>L. mexicana</i>	MNYC/BZ/62/M-379	Nyctomys	Belize	MON-40
<i>L. amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	Lutzomyia	Brasil	MON-41
<i>L. chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP-75	Humano	Brasil	-
<b>Otros tripanosomátidos</b>				
<i>Leptomonas ctenocephali</i>	ITMAP 1905	Invertebrado		
<i>Endotrypanum schaudinni</i>		Invertebrado		
<i>Herpetomonas muscarum</i>	LRC-L130 ITMAP 1902	Invertebrado		
<i>Crithidia fasciculata</i>		Invertebrado		
<i>Sauroleishmania tarentolae</i>	WR-144	Invertebrado		

## 1.2 Cepas para validar la técnica como marcador traza

Para contestar al primer objetivo se estudiaron 10 cepas de *L. infantum* aisladas de médula ósea de 6 ADVPs y coinfectados por el VIH. Las características de estas cepas se resumen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2**

Nº	Código	Zimodema	Paciente	Origen	Mes, año de aislamiento
1	MHOM/ES/97/LLM-644	MON-34	A <sup>1</sup>	Sevilla	05/1997
2	MHOM/ES/98/LLM-743	MON-34	A <sup>2</sup>	Sevilla	04/1998
3	MHOM/ES/95/LLM-537	MON-1	B <sup>1</sup>	Mallorca	08/1995
4	MHOM/ES/98/LLM-745	MON-1	B <sup>2</sup>	Mallorca	04/1998
5	MHOM/ES/97/LLM-709	MON-24	C <sup>1</sup>	Madrid	10/1997
6	MHOM/ES/98/LLM-768	MON-24	C <sup>2</sup>	Madrid	06/1998
7	MHOM/ES/97/LLM-719	MON-253	D <sup>1</sup>	Badalona	12/1997
8	MHOM/ES/97/LLM-710	MON-253	D <sup>2</sup>	Badalona	12/1997
9	MHOM/ES/98/LLM-737	MON-253	E	Badalona	02/1998
10	MHOM/ES/98/LLM-735	MON-253	F	Badalona	03/1998

<sup>1</sup> Aislado antes del comienzo del tratamiento.

<sup>2</sup> Aislado al finalizar el tratamiento.

## 1.3 Cepas para estudiar la estructura de poblaciones en un nicho ecológico cerrado

Para contestar al segundo objetivo, se estudiaron 54 cepas de *L. infantum* aisladas de 22 pacientes de la isla de Mallorca. 52 aislados procedían de pacientes coinfectados con VIH y 2 aislados de pacientes inmunocompetentes, infectados por *L. infantum*. Los parásitos se aislaron a partir de aspirados de MO, sangre periférica y/o biopsias de piel. En algunos casos disponíamos de muestras de sangre periférica y de MO del mismo paciente; también, en algunos casos, disponíamos de un segundo aislado obtenido durante una recaída postratamiento.

Estudiamos 38 cepas aisladas de perros a partir de aspirados de MO y/o ganglios linfáticos de perros tanto sintomáticos como asintomáticos. Durante los veranos de 1997 a 1999 se llevaron a cabo estudios entomológicos para la captura de flebotomos en la isla de Mallorca, mediante el uso de trampas de luz tipo CDC en los alrededores de las casas donde previamente se habían detectado perros infectados. Los flebotomos se capturaron vivos y las hembras se diseccionaron al microscopio para buscar leishmanias. Las cepas se aislaron como está descrito en el apartado 2.1.

#### **1.4 Pacientes, muestras biológicas y cepas para diferenciar recidivas y reinfecciones**

Para contestar al tercer objetivo, se estudiaron 40 pacientes infectados por el VIH-1 y sospechosos (según los datos clínicos: fiebre, hepatoesplenomegalia y pancitopenia) de leishmaniasis. Dispusimos para el estudio de 256 muestras biológicas y 56 cultivos. Mediante ELISA y Western blot se confirmó la positividad a VIH. Todos los pacientes pertenecían a un ensayo clínico aleatorio y multicéntrico en el que se comparaba la eficacia de la anfotericina B complejo lipídico (Abelcet) frente a antimoniales. Todos los pacientes dieron por escrito su consentimiento para este ensayo, el cual cumplía con los criterios éticos de todos los hospitales involucrados. En 31 pacientes se confirmó que padecían leishmaniasis por cultivo de médula ósea (MO) y/o microscopía. Los otros 9 pacientes se confirmaron por PCR. Las características de las muestras quedan recogidas en la **Tabla 3**.

Se utilizaron también muestras de sangre de 20 donantes voluntarios y sanos y 20 muestras de pacientes con malaria o con toxoplasmosis para los controles negativos en las pruebas de PCR.

Para recoger las muestras biológicas se procedió como sigue: 200  $\mu$ L de aspirado de médula ósea y 10mL de sangre periférica, usando ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante, se recogieron antes del tratamiento (el día del diagnóstico), 1 mes después de finalizar el tratamiento y en las recaídas, entre 1-20 meses después de finalizar el tratamiento. Tanto los aspirados como la sangre periférica se cultivaron en medio NNN.

Tabla 3

Código del paciente	Muestra biológica <sup>1</sup>	Fecha de toma de muestra	Microscopía	Cultivo de MO	Zimodema (a partir de los cultivos de MO positivos)
RMP	1	20/08/97	+	+	MON-34
	4	14/10/97	-	-	
	65	19/01/98	+	+	MON-34
	116	18/03/98	+	+	MON-34
	223	20/05/98	-	-	
APB	38	07/10/97	+	+	MON-24
	17	28/10/97	+	+	MON-24
	235	10/06/98	+	+	MON-24
JJRM	64	22/01/98	+	+	MON-183
	120	24/02/98	+	-	
	173	06/05/98	-	-	
	395	29/03/99	-	-	
	563	27/04/00	+	-	
BGR	106	30/12/97	+	+	MON-1
	142	10/03/98	+	+	MON-1
	179	23/06/98	-	-	
	477	07/09/99	+	+	MON-1
	539	30/11/99	-	-	
	538	11/01/00	+	+	MON-1
JLSF	127	13/02/98	-	-	
	126	08/04/98	+	-	
	192	27/05/98	-	-	
RGR	101	25/02/98	+	+	MON-253
	168	06/04/98	-	-	
	198	05/06/98	+	-	
	274	31/07/98	-	-	
JMB	100	05/03/98	+	+	MON-1
	164	16/05/98	+	+	MON-1
	240	02/09/98	-	-	
	298	28/01/99	-	-	
	353	29/12/99	-	-	
	531	12/04/00	+	+	MON-1
FPN	148	15/04/98	-	-	
	151	13/05/98	-	-	
	304	02/09/98	-	-	
MPC	166	19/03/98	+	+	MON-253
	238	14/07/98	+	+	MON-253
	269	18/08/98	+	+	MON-253
	293	17/12/98	+	-	
	346	11/01/99	+	-	
	351	20/05/99	+	+	MON-253
	505	10/11/99	+	+	MON-253
CJS	122	24/03/98	-	-	

	190	11/05/98	-	-	
	182	24/09/98	-	-	
MTRM	155	21/04/98	+	-	
	156	18/05/98	+	-	
ACF	203	20/05/98	+	+	MON-253
	253	18/06/98	-	-	
	280	03/09/98	+	-	
	317	23/11/98	-	-	
JJAF	210	01/06/98	+	-	
	210bis	23/06/98	+	-	
	207	02/07/98	+	+	MON-24
FTC	241	10/07/98	+	+	MON-1
	272	27/08/98	+	+	MON-1
	344	18/12/98	+	+	MON-1
JMMR	249	16/07/98	+	+	MON-190
	279	14/09/98	-	-	
	366	01/02/99	+	-	
	367	16/03/99	-	-	
MAMV	186	24/09/98	-	-	
	123	30/10/98	-	-	
	328	06/04/99	-	-	
	290	29/10/98	-	-	
FDS	343	21/04/99	+	+	MON-1
	352	18/05/99	-	-	
DFF	327	01/12/98	-	-	
	385	18/04/99	+	-	
GRJ	321	26/10/98	+	+	MON-34
	320	01/12/98	+	+	MON-34
	1499	19/05/99	+	+	MON-34
EMC	324	10/12/98	-	-	
	384	27/04/99	-	-	
JMM	294	03/12/98	+	-	
	350	14/01/99	+	-	
	342	30/03/99	-	+	MON-1
JANB	329	16/02/99	-	-	
	386	22/07/99	-	-	
AGGN	1075	13/04/99	+	+	MON-1
	486	04/10/99	+	+	MON-1
AODH	309	12/04/99	+	-	
	404	31/05/99	-	-	
MRS	391	27/05/99	+	-	
	445	14/07/99	+	+	MON-1
	460	04/08/99	+	-	
	463	21/10/99	+	+	MON-1
JAG	473	17/08/99	+	+	MON-24
	467	25/08/99	+	+	MON-24
	469	06/09/99	-	-	

	474	22/09/99	-	-	
ASR	405	14/09/99	+	-	
	485	07/10/99	-	-	
	506	17/12/99	+	+	MON-1
	549	02/02/00		-	
JASS	493	30/09/99	+	+	MON-1
	490	11/10/99	+	+	MON-1
	503	10/11/99	-	-	
JDD	414	25/11/99	-	-	
	415	13/04/00	+	+	
ATT	464	02/11/99	+	-	MON-183
	521	02/12/99	-	-	
	544	10/04/00	+	+	
MCJ	482	27/10/99	+	-	
	483	24/11/99	-	-	
EPG	419	20/01/00	-	-	
	416	01/06/00	-		
JACN	518	02/12/99	+	+	MON-1
	520	22/12/99	+	+	MON-1
APG	124	27/02/98	+	-	
	49	30/03/98	-	-	
	189	21/07/98	-	-	
APJ	111	03/03/98	+	+	MON-24
	162	30/03/98	+	-	
	233	09/07/98	+	+	MON-24
JSP	204	12/06/98	+	+	MON-1
	281	30/07/98	+	-	
	315	18/01/99	+	+	MON-1
	370	03/03/99	-	-	
JGM	44	09/01/98	-	-	
	185	24/06/98	-	-	
GOG	160	20/04/98	-	-	
	232	27/04/99	-	-	
FGC	129	02/03/98	-	-	
	418	07/05/99	+	+	MON-27
JAE	183	16/04/98	+	+	MON-1
	191	24/06/98	+	+	MON-1
	387	13/10/99	+	+	MON-1

<sup>1</sup> El código de la muestra biológica hace referencia tanto al aspirado de médula ósea como a la muestra de sangre periférica.

### 1.5 Estudio de jeringuillas desechadas por ADVPs

Para contestar al cuarto objetivo y confirmar la presencia de leishmanias en jeringuillas compartidas por ADVPs, establecimos dos estudios, uno en 1998, donde se analizaron

125 jeringuillas (grupo A), procedentes de un programa de intercambio en el sur de Madrid, y otro, donde se analizaron 154 (grupo B), y obtenidas también a través de un programa de intercambio, pero en el suroeste de Madrid. A partir de la sangre coagulada de las jeringuillas se extrajo el ADN mediante un protocolo clásico de fenol-cloroformo. El estudio de los dos grupos no está estadísticamente diseñado y la confidencialidad de los programas de intercambio ha sido respetada en todo momento.

## 2. Métodos

### 2.1 Aislamiento y cultivo

Todos los parásitos fueron aislados en medio bifásico NNN (Novy-McNeal-Nicolle), en el caso de LV humana, a partir de aspirados de médula ósea y sangre periférica total, y en el caso de LC de biopsias de piel. Los cultivos se mantuvieron a 27°C y se examinaron semanalmente.

Medio NNN (Novy-McNeal-Nicolle)	
<b>Agar</b>	14 g bacto-agar, 6 g NaCl, 900 mL agua destilada. Llevar a ebullición y esterilizar en autoclave a 120°C y 1 atmósfera durante 20 min.
<b>Tubos</b>	Fundir el el agar y atemperar hasta 50°C, añadir: 100 µL solución antibióticos (20.000 UI/mL de penicilina, 20.000 µg/mL de estreptomycin), 1mL sangre conejo desfibrinada, agar 2 mL

#### 2.1.1 Cultivo en masa

Los promastigotes una vez aislados en medio NNN, se cultivaron en masa a 27°C en medio RPMI 1640, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado 1 h a 56°C y antibióticos, con el fin de conseguir leishmanias en cantidad suficiente.

Medio RPMI
10,4 g RPMI 1640, 960 mL agua destilada estéril, 5,95 g HEPES, 2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , ajustar pH a 7,4 y esterilizar por filtración (0,22 µm). A 500 mL del medio añadir 70 mL SBF, 2 mL solución antibióticos

#### 2.1.2 Congelación

Para su congelación los promastigotes se concentraron por centrifugación (1000g, 5 min), se retiró el sobrenadante y los parásitos se resuspendieron en 5 mL de

medio de congelación. A continuación se distribuyeron en alícuotas en criotubos, a razón de 1 mL/tubo, manteniéndose en N<sub>2</sub> líquido.

Medio de congelación
10,4 g RPMI 1640, 960 mL agua destilada estéril, 5,95 g HEPES, 2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , ajustar pH a 7,4 y esterilizar por filtración (0,22 μm). A 500 mL del medio añadir 70 mL SBF, 2 mL solución antibióticos

### 2.1.3 Descongelación

Los criotubos se descongelaron por inmersión en baño a 37°C, se centrifugaron (1000g, 5min) eliminándose a continuación el sobrenadante y añadiendo 0,1-0,2 mL de medio RPMI 1640 completo. Finalmente, el volumen final se repartió en dos tubos de medio NNN.

## 2.2 Preparación de ADN total genómico a partir de cultivos

Los promastigotes se cultivaron hasta alcanzar una fase estacionaria de crecimiento donde se concentraron por centrifugación (10 min, 4°C, 3000 g), y se lavaron usando una solución de NaCl al 0.3% y PBS.

PBS (Sambrook et al., 1989)
NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM, pH 7,5

A continuación se lisaron a 60°C durante 1 h en un volumen de 0,7 mL de NET-10 1x/10<sup>9</sup> promastigotes y 0,3 mL SDS 10%/10<sup>9</sup> promastigotes (el lisado de leishmanias, así preparado, se puede conservar a 20°C). Seguidamente, y con el fin de eliminar el ARN contaminante, se llevó a cabo una digestión a 37°C, durante 1 h, con una solución de ribonucleasa (RNAsa) a razón de 1mg/mL de lisado. Posteriormente se digirió a 37°C durante 2 h con una solución de proteinasa K a razón de 1mg/mL de lisado. Seguidamente se realizó una extracción con fenol-cloroformo según protocolo ya descrito (Sambrook et al., 1989). La fase acuosa fue precipitada con 0,1 volumen de acetato sódico 3M, pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío. Se incubó una hora a -20°C. A continuación la muestra se centrifugó 1 hora a 12.000 rpm y 4°C. Después de retirar el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol al 70% y el ADN seco se resuspendió en 400 μL de agua destilada estéril y se conservó a -20°C.



Reactivos y soluciones para la extracción de ADN (Sambrook et al., 1989)	
<b>NET-10 1x</b>	Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 50mM y NaCl 100 mM
<b>SDS 10%</b>	100 g SDS "grado electroforesis" en 900 mL de H <sub>2</sub> O. Calentar para disolver
<b>RNAasa 10 mg/mL</b>	Disolver en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y NaCl 15 mM. Calentar a 100°C 15 min. Enfriar a T <sup>a</sup> ambiente, alicuotar y almacenar a -20°C
<b>Proteinasa K 20mg/mL</b>	Calentar a 80°C durante 10 min. Enfriar a 37°C 1 h. Alicuotar y almacenar a -20°C
<b>Acetato sódico 3M</b>	24,6 g CH <sub>3</sub> -COONa en 100 mL de agua destilada.

### 2.3 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN en solución se estimó en un espectrofotómetro a 260 nm, sabiendo que 1 DO (densidad óptica) de ADN de doble cadena equivale a 50 µg/mL. La relación de pureza se obtuvo mediante el cociente de las lecturas a 260 nm y 280 nm (los valores comprendidos entre 1,8 y 2 se corresponden con ADN puro, teóricamente) (Sambrook et al., 1989).

### 2.4 Extracción de ADN a partir de muestras biológicas y jeringuillas

Las muestras de sangre, médula ósea y sangre coagulada se trataron según protocolo de Cruz et al. (2002). Se concentran las células nucleadas mediante gradiente de Ficoll, diluyendo la muestra en un volumen igual de PBS y posteriormente añadida sobre un volumen de linfoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) igual a 1,5 veces el volumen de sangre, evitando su mezcla. Se centrifugó (700 g, 30 min) y se recogió con pipeta Pasteur la fase del gradiente en la que se encuentran las células nucleadas y posibles leishmanias (*buffy coat*), y se procedió a su lavado dos veces con PBS a 1800 g durante 10 min y un tercero con agua destilada estéril para arrastrar los restos de hemoglobina.

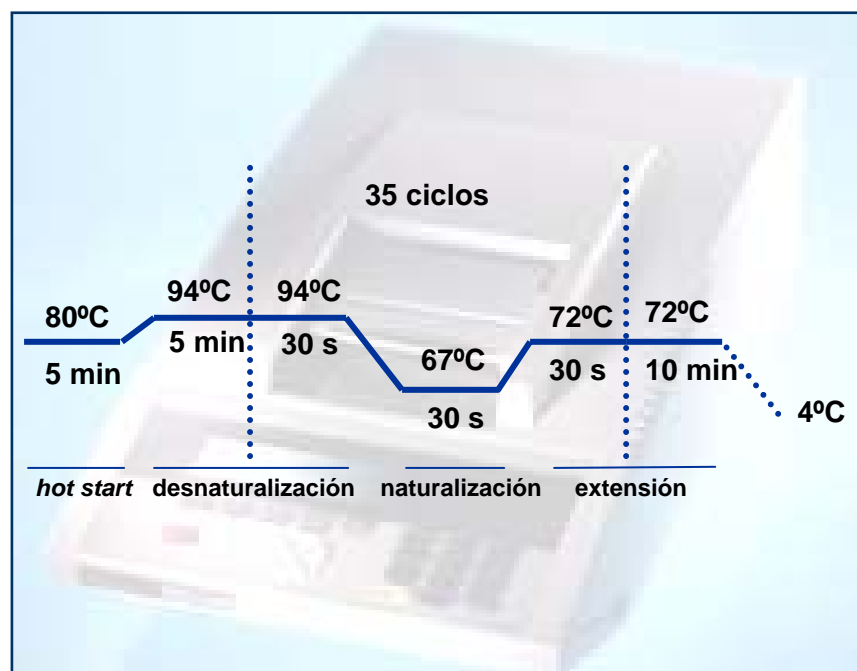
El sedimento se diluye en 100 µL NET-10 1x y 20 µL SDS 10%. 100 µL de esta muestra se incuban a 70°C durante 1 h y luego se realiza un protocolo de extracción de fenol/cloroformo idéntico al descrito en el apartado 2.2. Del aspirado de médula

ósea se trataron 100  $\mu\text{L}$  como se ha descrito anteriormente, así como 100  $\mu\text{L}$  de sangre coagulada del interior de las jeringuillas desechadas. El ADN obtenido se diluye en 100  $\mu\text{L}$  agua destilada estéril y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En todas las extracciones de ADN de muestras biológicas y jeringuillas se emplearon controles negativos de extracción (1 por cada 8 extracciones) para evitar la posibilidad de contaminaciones en este proceso.

## 2.5 Amplificación del ADNk de *Leishmania* mediante la técnica PCR

### 2.5.1 PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk

Se preparó la mezcla de reacción en una zona libre de ADN, manteniendo todas las medidas necesarias para evitar contaminaciones de distinto origen. La reacción de amplificación fue optimizada variando las condiciones de los diferentes componentes, hasta conseguir las condiciones más adecuadas que exponemmos a continuación. El volumen final de reacción para cada muestra fue de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo 10 ng de ADN total, 22,5 pmoles de cada cebador (AJS31 y DBY) , 0,2 mM de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl, 7,5 mM Tris-HCl (pH 9), 2 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,001% albúmina de suero bovino y 0,7 unidades de *Tth* ADN polimerasa (Biotools B&M Laboratories, Madrid, España). Las muestras se amplificaron en un termociclador modelo Gene Amp 2400 PCR System (Perkin-Elmer) con las siguientes condiciones:



Cebadores para PCR directa sobre ADNk		
<b>AJS31</b>	5'GGGGTTGGTGTAATAATAGGGCCGG 3'	(Smyth et al., 1992)
<b>DBY</b>	5' CCAGGTTCCCGCCCCGGAG 3'	

Destacamos la utilización de un paso pre-PCR o *hot start* a 80°C, en el cual se añade la mezcla de reacción al tubo eppendorf de 0,2 mL, en el que está el ADN que queremos amplificar. De esta forma evitamos que los pequeños volúmenes de ADN se puedan evaporar y además aseguramos que la polimerasa no comience a sintetizar cadenas de ADN inespecíficamente.

### 2.5.2 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Para procesar parte de las muestras procedentes de la isla de Mallorca, utilizamos el método de RAPD según el protocolo descrito por Williams et al. (1990). Se realizó en un termociclador modelo Gene Amp 2400 PCR System (Perkin-Elmer). 20 ng de ADN purificado se amplificaron en un volumen total de 100 µL conteniendo: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 0,5 µM de cebador y 1,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94.5°C durante 5 min, 45 ciclos de 94°C 1min, 36°C 1 min y 72°C 2 min, y, finalmente, una extensión a 72°C de 10 min.

Cebadores para RAPD	
<b>A1</b>	5' CAGGCCCTTCC 3'
<b>A5</b>	5' AGGGGTCTTG 3'
<b>A7</b>	5' GAAACGGGTG 3'
<b>A10</b>	5' GTGATCGCAG 3'
<b>A15</b>	5' TTCCGAACCC 3'

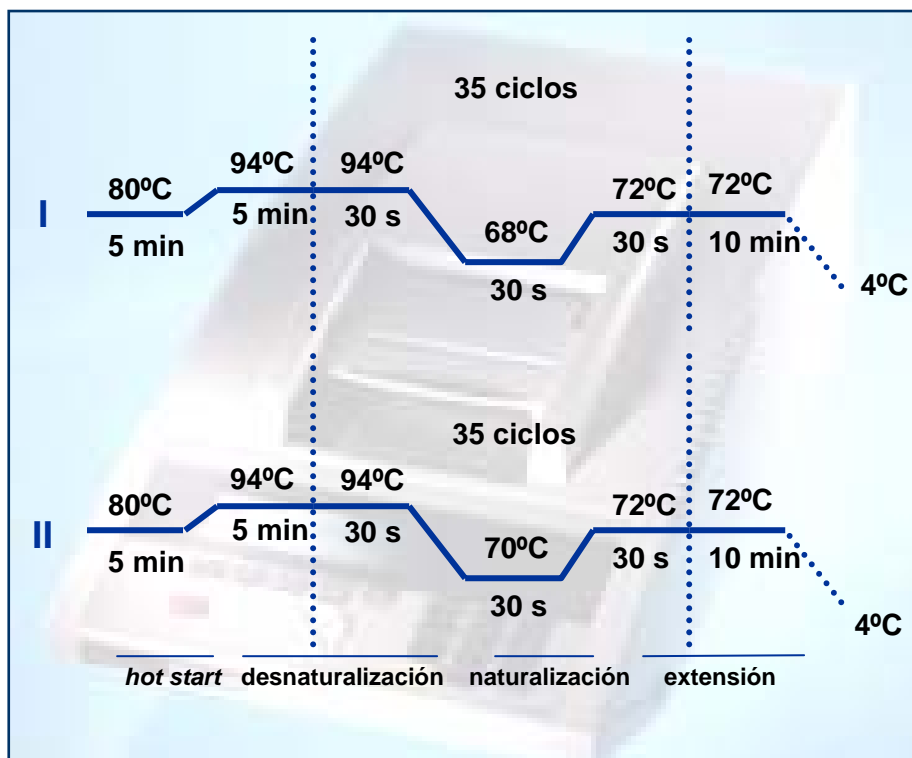
### 2.5.3 IRT (*Intergenic Ribosomal Typing*)

Los ITS (*Intergenic Transcribed Spacers*) de *Leishmania*, localizados entre los genes que codifican las subunidades ribosomales grande y pequeña, se amplificaron utilizando un protocolo ya descrito (Cupolillo et al., 1995).

Cebadores para IRT	
<b>IR1</b>	5' GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT 3'
<b>IR2</b>	5' GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG 3'

#### 2.5.4 PCR *seminested* para amplificar minicírculos de ADNk

Esta PCR consta de dos amplificaciones consecutivas, en las cuales se utiliza como molde el producto amplificado de la primera. De aquí en adelante nos referiremos a la técnica como kDNA snPCR. Aumenta la sensibilidad de la técnica, y su desarrollo es necesario para la amplificación de leishmanias directamente a partir de muestras biológicas. Una vez optimizada, el protocolo que se sigue es el descrito a continuación. La primera reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L conteniendo: 5  $\mu$ L de la solución de ADN, 15 pmoles de cada cebador (DRJ y KLK2), 0,2 mM de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM KCl, 7,5 mM Tris-HCl (pH 9), 2 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,001% albúmina de suero bovino y 0,7 unidades de *Tth* ADN polimerasa (Biotools B&M Laboratories, Madrid, España). En la segunda reacción se reamplificó el producto de la primera. Para ello se realizó una dilución 1:200 de este producto, y se utilizaron 5  $\mu$ L de la dilución. La mezcla de reacción es la misma que para la primera amplificación a excepción de de los cebadores, utilizando 7.5 pmoles de cada uno (DRJ y AJS31). Las muestras se amplificaron en un termociclador modelo Gene Amp 2400 PCR System (Perkin-Elmer) con las siguientes condiciones:



Cebadores utilizados en la kDNA snPCR	
<b>DRJ</b>	5' CGATTTTTGAACGGGATTTCTGCAC 3'
<b>KLK2</b>	5' CTCCGGGGCGGGAAACTGG 3'
<b>AJS31</b>	5' GGGGTTGGTGTAAATAGGGCCGG 3' (Smyth et al., 1992)

### 2.5.5 Diseño de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados en la kDNA snPCR fueron diseñados a partir de las secuencias de minicírculos que generamos y mediante el uso de los programas informático Lasergene Software (DNASTar, Madison, WI, USA) y Prima (EMBOSS, licencia pública). Para asegurarnos de su especificidad, los sometimos a la base de datos GenBank, mediante dos algoritmos distintos, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y FASTA, variando la rigurosidad de los métodos, en el primero eligiendo distintas matrices (BLOSUM30 a BLOSUM62), y el segundo variando el tamaño de los *ktup* (de 1 a 6) (Altschul et al., 1990; Pearson and Lipman, 1988).

### 2.6 Detección y visualización de los productos de amplificación

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa permite separar y visualizar los fragmentos de ADN, así como purificar fragmentos de ADN. Los geles para ADN se prepararon en TAE 1X al que se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, el porcentaje de agarosa osciló entre el 0,7% y el 2%. Las electroforesis se realizaron en tampón TAE 1X empleando un sistema horizontal Mini o Maxicell de TDI. Se aplicó un voltaje de 60 a 100 V, dependiendo del tamaño del gel. Las muestras se mezclaron con un tampón de carga y se añadieron al pocillo correspondiente. Los fragmentos de los ácidos nucleicos fueron visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta modelo Fotodyne 3-3002 y fotografiados con una película Polaroid 665 o bien con el sistema Gel Doc <sup>TM</sup> 1000 system (Bio-Rad Laboratories). El peso molecular de los fragmentos de ADN se estimó empleando el marcador PCR marker (50-2000 pares de bases) (Sigma).

Soluciones para electroforesis (Sambrook et al., 1989)	
<b>TAE 1X</b>	Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8
<b>Tampón de carga 6X</b>	0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol, 15% Ficoll, en agua destilada. Conservar a T <sup>a</sup> ambiente

<b>Bromuro de etidio (10mg/mL)</b>	1 g Bromuro de etidio en 100mL de agua destilada. Conservar en oscuridad
--	--

## 2.7 Purificación y/o elución de productos amplificados.

Tanto para la posterior secuenciación de los fragmentos amplificados como para proceder a su digestión con enzimas de restricción, los productos de PCR se purificaron, bien a partir de la solución de PCR, bien cortando las bandas seleccionadas con un bisturí estéril a partir del gel de agarosa. Para los dos procesos se emplearon dos kits comerciales: QIAquick-Gel Extraction kit (Qiagen) y GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech). En todo momento se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se eluyó en 50-100  $\mu$ L de agua destilada estéril.

## 2.8 Subclonaje y secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación de los productos de la PCR directa sobre minicírculos de ADNk y de la kDNA snPCR se realizó para comprobar el adecuado funcionamiento de las parejas de oligonucleótidos, crear una pequeña base de datos de secuencias de minicírculos para realizar mapas de restricción y diseñar nuevos cebadores.

El producto de las PCR, previamente sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.6%, fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta. Las bandas de interés fueron aisladas según se ha descrito en el apartado anterior. La elución del DNA se hizo en 50  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O.

## Ensayos de subclonación

La realización de este trabajo ha requerido la subclonación de los productos de PCR en un vector comercial, ante la imposibilidad de secuenciar directamente estos productos, puesto que en una misma banda, es decir, para un mismo tamaño de ADN, encontramos unos cientos de minicírculos. Se eligió pGEM-T-easy (Promega). Este vector de 3018 pb proporciona resistencia a ampicilina y permite la selección de colonias recombinantes mediante reacción de color. En cualquier caso se siguieron las recomendaciones de la casa comercial. La clonación se realizó a razón molar de 1:3 (vector/inserto) en un volumen final de 10  $\mu$ L, con 3U/ $\mu$ L de enzima T4 ADN ligasa y 1  $\mu$ L de tampón 10x específico para la enzima (Tris-HCl 300mMpH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 100mM, DTT 10 mM, ATP 10mM). La reacción se incubó toda la noche a 4°C.

### **Preparación de células competentes y transformación con plásmidos**

Se prepararon células competentes de la cepa XL1 Blue de *E. coli*. Las soluciones utilizadas para preparar estas células competentes fueron TBF1 (100 mM RbCl, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 5,8) y TBF2 (10 mM MOPS, 10mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 6,8 ajustado con KOH). La eficiencia de la transformación fue de 10<sup>5</sup> transformantes por µg de ADN plasmídico. La transformación se realizó utilizando de 10 a 200 ng de ADN plasmídico, y entre 50 µL y 200 µL de células competentes, manteniéndose la mezcla 20 minutos en hielo y sometiéndola a continuación a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos. Inmediatamente después, la muestra se incubó en hielo 2 minutos, se le añadió 1 mL de medio LB y se mantuvo una hora a 37°C en ligera agitación. Finalmente, la mezcla fue extendida sobre placas de LB con el antibiótico de selección adecuado y 40 µl de X-gal (20 mg/µL en dimetilformamida) y 4 µL de IPTG (200 mg/µL). Se incubaron toda la noche a 37°C. Una vez crecidas las colonias se seleccionaron las de color blanco, descartando las azules.

### **Purificación de ADN plasmídico con el kit *Ultraclean™ Mini Plasmid Prep* (Mo Bio)**

Este método se empleó para aislar ADN plasmídico de forma rápida. La extracción se realizó a partir de las colonias recombinantes de *E. coli* crecidas en 5 ml de medio líquido LB, con 100 µg/ml de ampicilina, toda la noche a 37°C y constante agitación. Se siguieron las instrucciones recomendadas por la casa comercial. El ADN obtenido se utilizó para secuenciar.

### **Secuenciación**

La secuenciación se realizó usando un termociclador modelo Gene Amp 2400 PCR System (Perkin-Elmer) y el sistema comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer). A partir de un producto de PCR subclonado se prepararon dos reacciones de secuenciación: la primera utilizando el oligonucleótido de avance (SP6) y la segunda utilizando el oligonucleótido reverso (T7), oligonucleótidos complementarios a la secuencia del vector comercial. Siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial, el volumen final de la reacción de secuenciación fue de 10 µL de donde los componentes de cada reacción fueron: 1µL de oligonucleótido (3,2 pmol), 5 µL de DNA molde y 4 µL de la mezcla de reacción del sistema comercial:

Mezcla de reacción
DdATP- marcado con di-cloro[R6G]
DdCTP- marcado con di-cloro[ROX]
DdGTP- marcado con di-cloro[R110]
ddTTP- marcado con di-cloro[TAMRA]
dNTPs
AmplyTaq Gold DNA Polimerasa
MgCl <sub>2</sub>
Tris-HCl (pH 9,0)

A continuación las muestras fueron sometidas a electroforesis en el sistema ABI PRISM Modelo 377 de Applied Biosystems, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, este proceso fue realizado por la Unidad de Biopolímeros del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III).

## 2.9 Digestión de los productos de PCR (RFLP)

Una vez que los productos de PCR fueron purificados según se ha descrito en el apartado 2.6, entre 10 y 100 ng de ADN fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción: *Alu I*, *Rsa I*, *Hpa II*, *Taq I*, *Tru 9I*, *Hae III* o *Pst I*. Las digestiones se llevaron a cabo primeramente durante toda la noche, siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche Diagnostics, Barcelona). Además, para optimizar los tiempos de la realización de toda la técnica (PCR-RFLP), se realizaron baterías de digestiones desde un tiempo cero hasta 24 horas, inactivando la digestión (a 65°C u 80°C durante 20 min), cada 30 min, para comprobar que a partir de las 2 horas todo el ADN había sido completamente digerido. Por lo tanto, éste fue finalmente el tiempo elegido para realizar los análisis de restricción. A su vez, comprobamos con estos ensayos la no existencia de digestiones parciales, tanto con la cantidad de enzima recomendada por el fabricante como cuando los realizamos con un exceso de la misma.

A partir de las secuencias de minicírculos obtenidas en un primer momento, realizamos un mapa de restricción de los minicírculos de *L. infantum*, mediante el uso del programa y a la vez base de datos Remap (EMBOSS, licencia pública). De las posibles dianas, escogimos aquellas de entre 4 y 6 bases.

Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, a 85V y durante 2 horas. Los geles se prepararon en TAE 1X al que se añadió bromuro de etidio a una concentración de 10 µg/ml. Los fragmentos (patrones o *fingerprinting*) fueron visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta modelo Fotodyne 3-3002



y fotografiados con una película Polaroid 665 o bien con el sistema Gel Doc™ 1000 system (Bio-Rad Laboratories). Se empleó el marcador PCR Marker (Sigma) como referencia (50-2000 pares de bases).

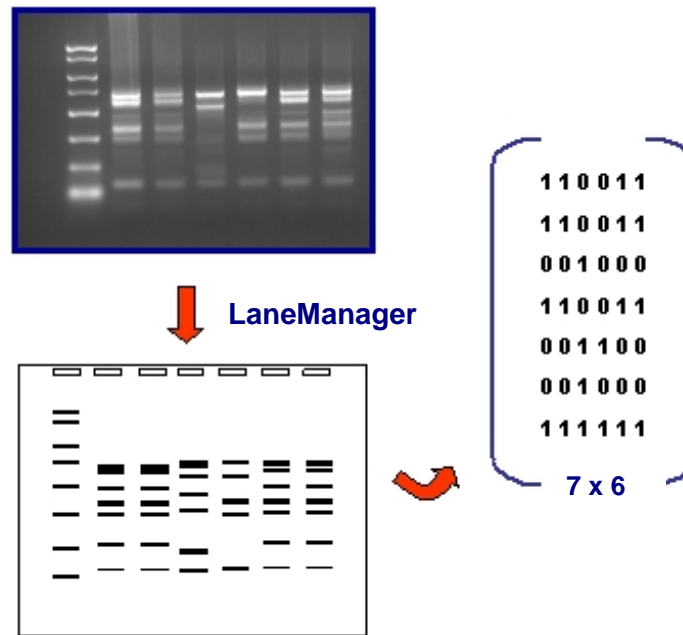
## 2.10 Estudios de clonalidad del parásito

El protocolo utilizado ha sido el descrito por Bastien y Wahba (1989). Con las cepas de interés, y a partir de su cultivo en RPMI, se realizaron diluciones límite en placas de 24 pocillos. Teóricamente se logra aislar un solo parásito. Puesto que es un dato teórico, se siembran en placas frescas de agar sangre las diluciones que contienen 1, 10 y 100 parásitos. La siembra se hace por extensión en condiciones estériles. A las dos semanas se observan colonias sobre la superficie del agar, que corresponden, cada una, a un mismo clon. Estos se pasan a tubos con medio NNN fresco, también en condiciones estériles. A partir de este momento se tratan con los protocolos clásicos previamente descritos para el cultivo de leishmanias. Estos clones de *L. infantum*, y por tanto su ADN, están disponibles para amplificación mediante PCR.

Medio agar-sangre para clonar leishmanias
0,78 g NaCl, 1,4 g bacto-agar. Disolver en 122.8 mL de dH <sub>2</sub> O Añadir 12,5 mL sange conejo desfibrinada, 2,64 mL antibiótico Sembrar en placa Petri

## 2.11 Construcción de dendogramas a partir de los datos de PCR-RFLP

Los patrones obtenidos mediante PCR-RFLP fueron traducidos a matrices binarias, que reflejan la ausencia o presencia de las bandas. Para ello se hizo uso del software LaneManager (TDI, España) que, a partir del procesado de la imagen de las digestiones en geles de agarosa, construye estas matrices binarias. Por ello es imprescindible que el proceso de digestión esté optimizado para así obtener unos patrones claros que el software pueda detectar. (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema representativo de la construcción de las matrices binarias a partir de los datos de PCR-RFLP con la ayuda de software específico

Los dendogramas se construyeron a partir de estas matrices mediante un algoritmo de *clustering* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) basado en distancias genéticas, y que está incorporado en el programa TreeCon (v1.3, Yves Van de Peer), que además permite la edición y visualización de los árboles.

REFERENCES

Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

Bastien,P. and Wahba,M.A. (1989). A simplification of the technique for cloning Leishmania. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **83**, 435-437.

Cruz,I., Canavate,C., Rubio,J.M., Morales,M.A., Chicharro,C., Laguna,F., Jimenez-Mejias,M., Sirera,G., Videla,S., and Alvar,J. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S185-S189.

Cupolillo,E., Grimaldi,J.G., Momen,H., and Beverley,S.M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 145-155.

Pearson,W.R. and Lipman,D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 2444-2448.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Smyth,A.J., Ghosh,A., Hassan,M.Q., Basu,D., De Bruijn,M.H., Adhya,S., Mallik,K.K., and Barker,D.C. (1992). Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105 ( Pt 2)**, 183-192.

Williams,J.G., Kubelik,A.R., Livak,K.J., Rafalski,J.A., and Tingey,S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.

---

1. Material biológico. Pacientes. Cepas.....	26
1.1 Cepas de referencia utilizadas.....	26
1.2 Cepas para validar la técnica como marcador traza .....	27
1.3 Cepas para estudiar la estructura de poblaciones en un nicho ecológico cerrado.....	27
1.4 Pacientes, muestras biológicas y cepas para diferenciar recidivas y reinfecciones.....	28
1.5 Estudio de jeringuillas desechadas por ADVPs .....	31
2. Métodos .....	32
2.1 Aislamiento y cultivo .....	32
2.1.1 Cultivo en masa .....	32
2.1.2 Congelación.....	32
2.1.3 Descongelación .....	33
2.2 Preparación de ADN total genómico a partir de cultivos.....	33
2.3 Cuantificación de ADN.....	34
2.4 Extracción de ADN a partir de muestras biológicas y jeringuillas .....	34
2.5 Amplificación del ADNk de <i>Leishmania</i> mediante la técnica PCR .....	35
2.5.1 PCR directa para amplificar minicírculos de ADNk.....	35
2.5.2 RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	36
2.5.3 IRT ( <i>Intergenic Ribosomal Typing</i> ) .....	36
2.5.4 PCR <i>seminested</i> para amplificar minicírculos de ADNk.....	37
2.5.5 Diseño de cebadores.....	38
2.6 Detección y visualización de los productos de amplificación .....	38
2.7 Purificación y/o elución de productos amplificados.....	39
2.8 Subclonaje y secuenciación de los productos de PCR.....	39
2.9 Digestión de los productos de PCR mediante enzimas de restricción (RFLP) .....	41
2.10 Estudios de clonalidad del parásito .....	42
2.11 Construcción de dendogramas a partir de los datos de PCR-RFLP .....	42

## 1. Técnicas genotípicas para la caracterización molecular de *Leishmania*

Con el fin de identificar un marcador molecular idóneo, analizamos varias técnicas basadas en PCR ya existentes que podrían cumplir los requisitos como marcadores traza de *Leishmania*.

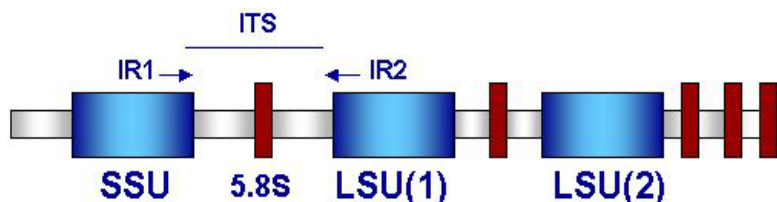
### 1.1 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Para la realización de amplificaciones mediante la técnica de RAPD seguimos el protocolo descrito por Williams et al. (1990). Del total de cepas de *L. infantum* que disponíamos procedentes de la isla de Mallorca, elegimos una representación de cepas aisladas de individuos tanto coinfectados como inmunocompetentes pertenecientes a distintos zimodemas (MON-1 y MON-34) y de perros (MON-1). El objetivo era poner de manifiesto la existencia de variabilidad intraespecífica entre los aislados por lo que se seleccionaron con distinto origen.

A pesar de que utilizamos los cebadores arbitrarios A1, A5, A7, A10 y A15 que teóricamente permitían buenas amplificaciones de las muestras, ninguno de ellos reveló ningún tipo de variabilidad, a pesar de que las cepas pertenecían a distintos sujetos y zimodemas (**Figura 15**).

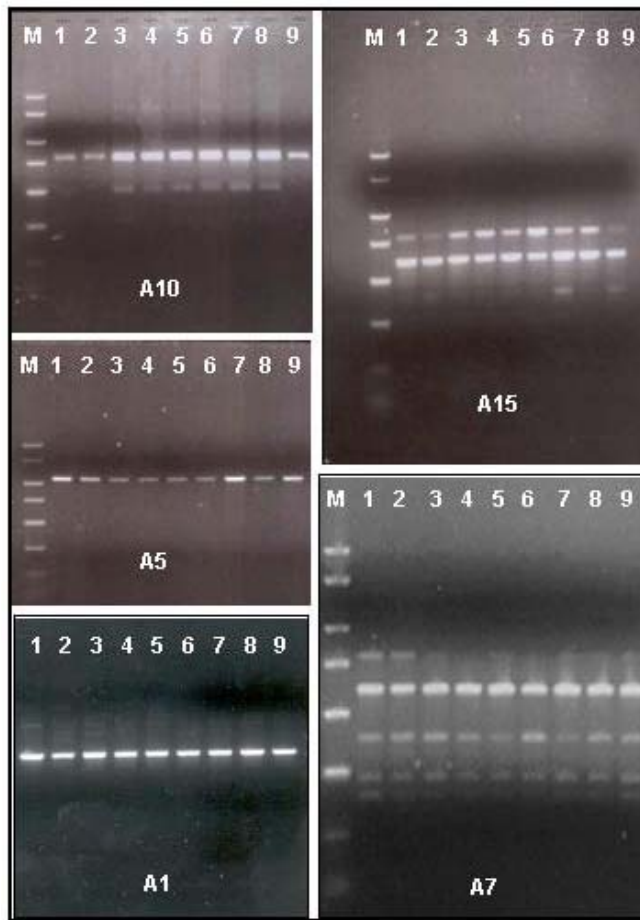
### 1.2 IRT (*Intergenic Ribosomal Typing*)

Los mismos aislados de *L. infantum* que habíamos caracterizado mediante RAPD fueron amplificados según el protocolo descrito por Cupolillo et al. (1995). En resumen, amplificamos la regiones intergénicas (ITS) localizadas entre los genes que codifican las subunidades ribosomales grande y pequeña mediante los cebadores IR1 e IR2 (**Figura 16**).

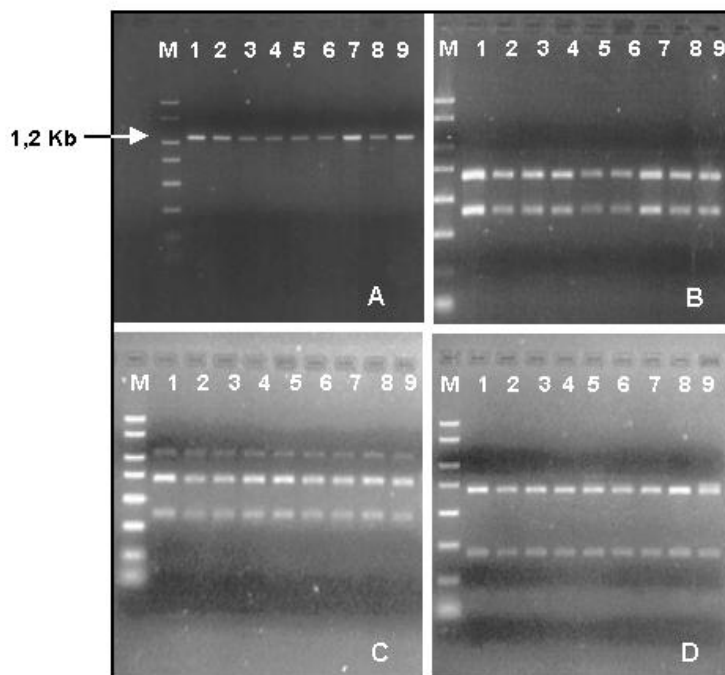


**Figura 16.** Organización del locus ARNr en *Leishmania*.

Posteriormente se digiere este producto con enzimas de restricción con la intención de obtener patrones distinguibles que revelen variabilidad intraespecífica. Las amplificaciones fueron correctas pero los patrones son indistinguibles para los aislados, con cualquiera de las 3 enzimas utilizadas (**Figura 17**), a pesar de que pertenecían a sujetos y zimodemas distintos.



**Figura 15.** Patrones obtenidos mediante RAPD de aislados de *L. infantum* de la isla de Mallorca, usando diferentes cebadores. M: marcador molecular PCR marker (Sigma). Calles 1 y 9: aislados de perro (MON1). Calle 2: aislado de un sujeto inmunocompetente (MON-1). Calles 3-8: aislados de pacientes coinfectados con VIH (calles 3, 6 y 7, MON-1; calles 4, 5 y 8, MON-34).



**Figura 17.** Caracterización de aislados de *L. infantum* mediante IRT. **A:** productos de amplificación, con un tamaño de 1,2 Kb. M: marcador molecular PCR marker (Sigma) Calles 1 y 9: aislados de perro (MON1). Calle 2: aislado de un sujeto inmunocompetente (MON-1). Calles 3-8: aislados de pacientes coinfectados con el VIH (calles 3, 6 y 7, MON-1; calles 4, 5 y 8, MON-34). **B:** digestión de los productos de PCR con la enzima *Alu* I. **C:** digestión con *Sph* I. **D:** digestión con *Hae* III

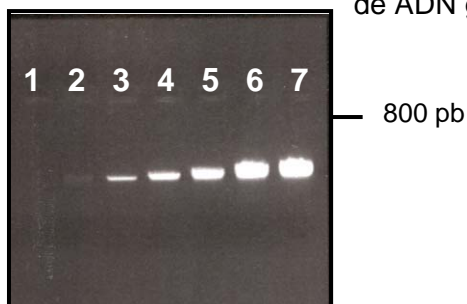
### 1.3 Desarrollo y optimización de una PCR-RFLP para amplificar y caracterizar minicírculos de ADNk de *Leishmania infantum*

Dado que no obtuvimos ningún tipo de variabilidad intraespecífica mediante el uso de las técnicas de RAPD e IRT, nos propusimos desarrollar y optimizar un método de PCR-RFLP para amplificar minicírculos de *Leishmania*. Nuestro objetivo era establecer una técnica capaz de diferenciar y seguir individuos con las propiedades de un marcador traza.

El ADN purificado, obtenido de promastigotes de la cepa de *L. infantum* LEM-75, fue utilizado para la optimización de la técnica de PCR. Se partió de las condiciones recomendadas de mezcla de reacción: 15 pmoles de cada cebador (AJS31 y DBY) (desarrollados por Smyth et al., 1992), 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 50 mM  $MgCl_2$ , 5 mM KCl, 75 mM tris HCl pH9, 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,001% albúmina de suero bovino y 1 unidad de *Tth* ADN polimerasa, para un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L.

El  $MgCl_2$  tiene un efecto importante sobre la especificidad y el rendimiento de la reacción, pero no tuvimos que modificar este parámetro, ya que el fabricante lo incorpora en el tampón de la ADN polimerasa, y la concentración resultó ser la adecuada. La concentración inicial de cebadores no resultó óptima, puesto que el rendimiento era menor de lo esperado, y tuvimos que aumentarla hasta llegar a 22,5 pmoles de cada cebador. Con 1 unidad de polimerasa obtuvimos buenos resultados, aunque, con la intención de economizar el producto, rebajamos la concentración hasta 0,7 unidades, sin variar el rendimiento. La eficacia, y sobre todo la especificidad, en la amplificación mejoraba notablemente si se añadía la enzima junto con la mezcla de reacción en un paso previo o pre-PCR a 80°C (*hot start*).

La sensibilidad de la técnica de PCR se observó tras el procesamiento de diluciones de ADN genómico de promastigotes de *L. infantum*, desde 100 ng hasta 1 pg, detectándose hasta 10 pg (**Figura 18**). Se estableció 10 ng como la cantidad óptima de ADN genómico para la realización de la amplificación.



**Figura 18.** Sensibilidad de la PCR directa. Resultado de la amplificación de ADN genómico de *L. infantum*. Calles 1-7: 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng y 100 ng respectivamente. En todos los casos, el fragmento tenía el tamaño esperado, 800 pares de bases.

Los cebadores utilizados, AJS31 y DBY (Smyth et al., 1992), son específicos del género *Leishmania*, y así queda comprobado cuando los sometemos a comparación con la base de de datos GenBank, mediante el algoritmo de alineamiento BLASTN, pues alinean siempre con secuencias de este género (**Figura 19**). El producto amplificado de 800 pb corresponde a un minicírculo completo de ADNk.

NCBI AJS31		results of BLAST	
BLASTN 2.2.3 [Apr-24-2002]			
Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
<a href="#">gi 7159915 emb AJ270139.1 LSP270139</a>	<i>Leishmania</i> sp. kinetopl...	48	1e-04
<a href="#">gi 7159882 emb AJ270119.1 LSP270119</a>	<i>Leishmania</i> sp. kinetopl...	48	1e-04
<a href="#">gi 7159881 emb AJ270118.1 LSP270118</a>	<i>Leishmania</i> sp. kinetopl...	48	1e-04
<a href="#">gi 7159879 emb AJ270116.1 LSP270116</a>	<i>Leishmania</i> sp. kinetopl...	48	1e-04
<a href="#">gi 7159867 emb AJ270104.1 LSP270104</a>	<i>Leishmania</i> sp. kinetopl...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363056 emb AJ275335.1 LIN275335</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363055 emb AJ275334.1 LIN275334</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363054 emb AJ275333.1 LIN275333</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363053 emb AJ275332.1 LIN275332</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363052 emb AJ275331.1 LIN275331</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7363051 emb AJ275330.1 LIN275330</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7339549 emb AJ275329.1 LIN275329</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7339547 emb AJ275327.1 LIN275327</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7339545 emb AJ275325.1 LIN275325</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7339543 emb AJ275323.1 LIN275323</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7339541 emb AJ275321.1 LIN275321</a>	<i>Leishmania</i> infantum kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7321223 emb AJ010082.2 Lp0010082</a>	<i>Leishmania</i> donovani kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7321222 emb AJ010080.2 Lp0010080</a>	<i>Leishmania</i> donovani kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7321220 emb AJ010076.2 Lp0010076</a>	<i>Leishmania</i> donovani kin...	48	1e-04
<a href="#">gi 7321219 emb AJ010074.2 Lp0010074</a>	<i>Leishmania</i> donovani kin...	48	1e-04

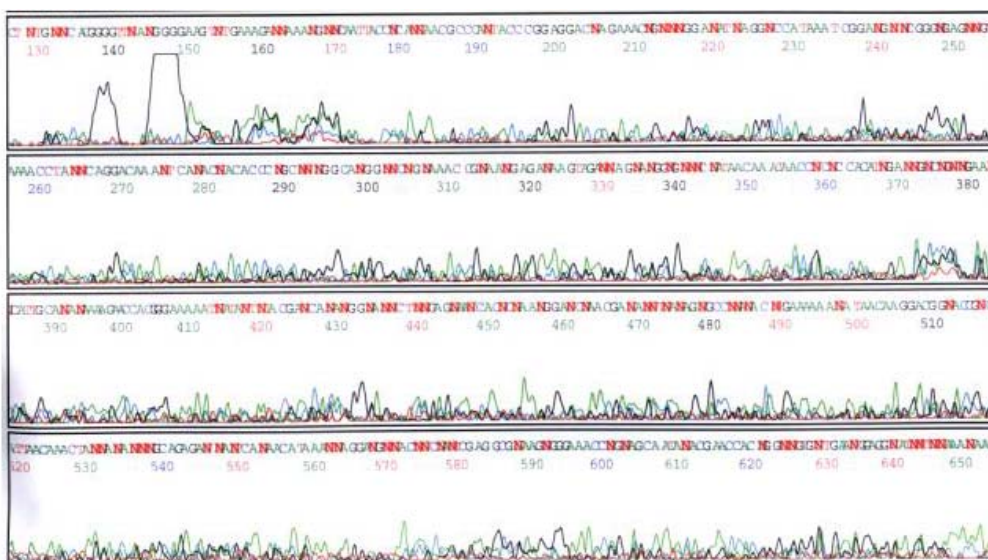
NCBI DBY		results of BLAST	
BLASTN 2.2.3 [Apr-24-2002]			
Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
<a href="#">gi 15865741 gb AF380717.1 AF380717</a>	<i>Leishmania</i> tarentolae cl...	48	1e-04
<a href="#">gi 15193195 gb AF399822.1 AF399822</a>	<i>Leishmania</i> donovani kine...	48	1e-04
<a href="#">gi 12018096 gb AF308688.1 AF308688</a>	<i>Leishmania</i> archibaldi K...	48	1e-04
<a href="#">gi 12018094 gb AF308686.1 AF308686</a>	<i>Leishmania</i> donovani stra...	48	1e-04
<a href="#">gi 12018093 gb AF308685.1 AF308685</a>	<i>Leishmania</i> major strain ...	48	1e-04
<a href="#">gi 12018092 gb AF308684.1 AF308684</a>	<i>Leishmania</i> donovani stra...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990509 gb AF168357.1 AF168357</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990508 gb AF168356.1 AF168356</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990507 gb AF167715.1 AF167715</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990506 gb AF167714.1 AF167714</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990505 gb AF167713.1 AF167713</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990504 gb AF167712.1 AF167712</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990503 gb AF167718.1 AF167718</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990502 gb AF167717.1 AF167717</a>	<i>Leishmania</i> donovani isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11990501 gb AF167716.1 AF167716</a>	<i>Leishmania</i> infantum isol...	48	1e-04
<a href="#">gi 11493599 gb AF169140.1 AF169140</a>	<i>Leishmania</i> infantum kine...	48	1e-04
<a href="#">gi 11493598 gb AF169139.1 AF169139</a>	<i>Leishmania</i> infantum kine...	48	1e-04
<a href="#">gi 11493597 gb AF169138.1 AF169138</a>	<i>Leishmania</i> chagasi kine...	48	1e-04
<a href="#">gi 11493596 gb AF169137.1 AF169137</a>	<i>Leishmania</i> chagasi strai...	48	1e-04
<a href="#">gi 11493595 gb AF169136.1 AF169136</a>	<i>Leishmania</i> donovani stra...	48	1e-04

**Figura 19.** Resultados de los 20 primeros alineamientos o *hits* de cada cebador (AJS31, arriba, DBY, abajo, respectivamente), mediante algoritmo BLASTN y frente a la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank (versión 129.0). Los alineamientos son específicos del género *Leishmania* en ambos caso al estar diseñados en la región conservada de los minicírculos de *Leishmania*. El algoritmo se realiza desde el servidor del NCBI, en la URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)



### 1.3.1 Secuenciación de los productos de PCR

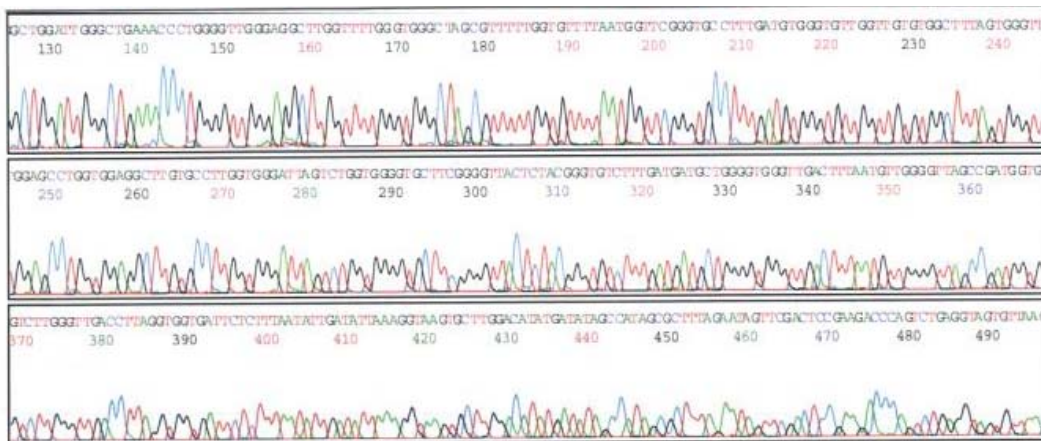
Con el fin de comprobar que los productos de la PCR directa, aún sabiendo por el análisis con BLAST que los cebadores eran específicos para el género *Leishmania*, se correspondían con la secuencia esperada de minicírculos de ADNk, se procedió a la realización de secuenciación automática de los productos de PCR. Se hicieron dos reacciones de secuenciación, una utilizando como cebador de la reacción el oligonucleótido directo de la PCR (AJS31) y otra con el oligonucleótido reverso (DBY). La secuenciación directa de los productos de amplificación obtenidos previamente no resultó correcta, puesto que, una vez aislado el fragmento de interés, la lectura del secuenciador contenía un altísimo número de indeterminaciones. (Figura 20)



**Figura 20.** Electroferogramas generados por el secuenciador automático AbiPrism 377 de Perkin Elmer, dónde se observa el alto número de indeterminaciones

Se procedió entonces al subclonaje de estos productos de PCR en un vector comercial. La utilización de estos cebadores hace que se amplifique una familia mayoritaria de minicírculos del mismo tamaño, es decir, en una misma banda visualizada en el gel de agarosa, existen miles de minicírculos con una secuencia muy similar, pero no idéntica. Al subclonar, nos aseguramos secuenciar un único minicírculo (un inserto por vector). Para ello, en la reacción de secuenciación, utilizamos los cebadores SP6 y T7, complementarios a la secuencia del vector en las zonas adyacentes al inserto.

Esta nueva aproximación permitió lecturas de secuenciación de mucha calidad. (Figura 21)



**Figura 21.** Electroferogramas generados por el secuenciador automático AbiPrism 377 de Perkin Elmer a partir de subclonar los productos de PCR.

De cada producto amplificado y subclonado se eligieron al azar 10 clones que se secuenciaron, y se comprobó mediante alineamiento BLAST en GenBank, que los productos amplificados eran minicírculos de *Leishmania*. Además, se creó una pequeña base de datos de secuencias para hacer, posteriormente, mapas de restricción. Alguna de las secuencias generadas de sometieron al GenBank con los números de acceso AJ275319 a AJ275335 (correlativos).

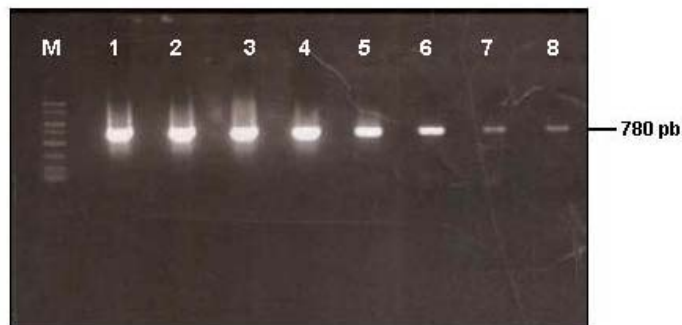
### 1.3.2 Optimización de las digestiones (RFLP)

Con las secuencias generadas en el apartado anterior, construimos unos mapas de restricción con el objeto de seleccionar endonucleasas de restricción capaces de cortar el producto de PCR y ofrecer unos patrones de digestión de tamaños variables capaces de diferenciar minicírculos.

Para la construcción de estos mapas de restricción utilizamos el programa Remap, dentro del paquete EMBOSS (licencia pública), que proporciona los sitios de corte para cada enzima y el número de cortes en cada secuencia (**Figura 22**). Posteriormente elegimos las enzimas que por frecuencia y disponibilidad comercial mejor se ajustaban a este mapa de restricción. Una ventaja añadida de utilizar *suites* públicas como EMBOSS es que la base de datos de endonucleasas de restricción es actualizada semanalmente.



amplificaciones de diluciones crecientes de promastigotes de *L. infantum* en presencia de 200 ng de ADN genómico humano, detectando hasta 0,01 parásitos (**Figura 23**).



**Figura 23.** Segunda reacción de amplificación de ADN de promastigotes de *L. infantum*, en presencia de 200 ng de ADN humano. **M:** marcador molecular PCR marker (Sigma). **Calles 1-8:** productos de amplificación,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ , 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 promastigotes respectivamente.

Para comprobar la especificidad de la reacción usamos ADN procedentes de flagelados no patógenos (de los géneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, y *Endotrypanum*), así como ADN de 20 donantes voluntarios sanos y 20 muestras de ADN de pacientes con malaria o con toxoplasmosis. En ninguno de los casos hubo amplificación.

#### 1.4.1 Diseño de cebadores

A partir de la base de datos de secuencias de minicírculos que generamos como se apuntó en el Apartado 1.3.1, diseñamos dos cebadores nuevos, KLK2 y DRJ, localizados en la región conservada del minicírculo, y que como en la PCR directa, amplifican todo el minicírculo, obteniendo un fragmento de 800 pb. Los criterios que debían cumplir los cebadores eran los siguientes:

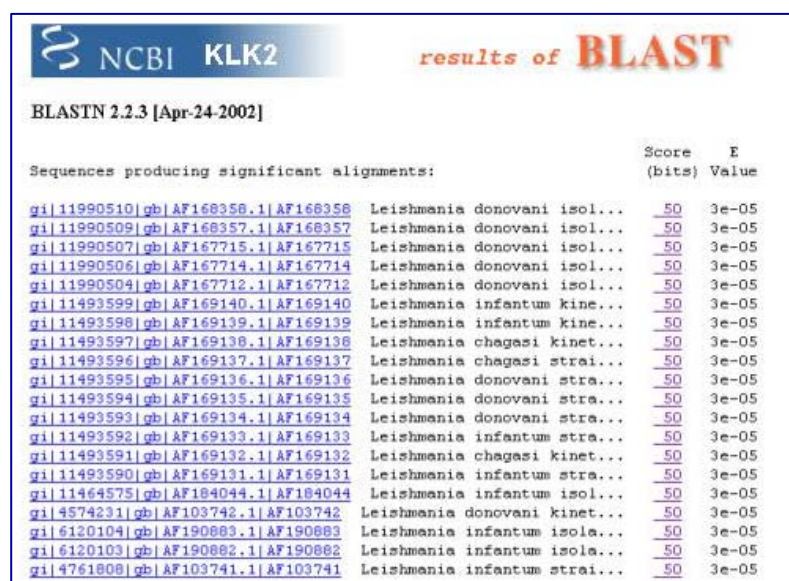
- ✓ El tamaño del cebador debe ser de 18 a 25 nucleótidos de longitud.
- ✓ La composición de los cebadores debe tener una proporción óptima de A/T:G/C, para que la proporción de bases púricas sea inferior al 65% y para que las temperaturas teóricas de naturalización estén situadas en un intervalo de 54°C-68°C
- ✓ Los extremos 5' y 3' de cada cebador deben estar formados por una guanina (G) o por una citosina (C), dado que las uniones C:G son más fuertes que las uniones A:T; de esta forma la unión de los extremos del cebador a la hebra molde es más estable.
- ✓ El más estable de los dímeros de oligonucleótidos formados por una misma secuencia (*self-dimer*) debe tener como máximo 5 pares de bases apareadas, no

siendo este apareamiento una consecución de G/C. Igualmente se aplicó esta condición a los dímeros formados por dos secuencias distintas, es decir, apareamientos entre el oligonucleótido reverso y el oligonucleótido directo (*dimer-primer*).

✓ La formación de bucles internos (*hairpins*) debidos a la complementariedad de bases dentro de una misma secuencia, debe dejar al menos cuatro bases libres en el extremo 3' y no estar formados por una consecución de apareamientos entre G:C, de esta forma, aunque se formen estos bucles, no está impedida la polimerización pues el extremo 3' está libre siendo capaz de unirse al molde, incluso a temperaturas subóptimas a la teórica de naturalización.

Para aumentar la sensibilidad de la técnica utilizamos dos cebadores internos, DRJ (al utilizar de nuevo un cebador de la primera reacción denominamos a la técnica *seminested*) y AJS31. Nuestro objetivo fue conseguir un fragmento de amplificación en esta segunda reacción del mayor tamaño posible, puesto que posteriormente lo íbamos a digerir con endonucleasas de restricción, para observar la mayor variabilidad posible. El fragmento amplificado era de 780 pb. Además, los mapas de restricción generados permitieron utilizar las mismas enzimas de restricción que en la PCR-RFLP directa,

También sometimos los nuevos cebadores diseñados a la base del GenBank, y, mediante el algoritmo de alineamiento BLASTN, comprobamos que alinean siempre con secuencias del género *Leishmania* (Figura 24).



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
<a href="#">gi 11990510 gb AF168358.1 AF168358</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11990509 gb AF168357.1 AF168357</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11990507 gb AF167715.1 AF167715</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11990506 gb AF167714.1 AF167714</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11990504 gb AF167712.1 AF167712</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493599 gb AF169140.1 AF169140</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493598 gb AF169139.1 AF169139</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493597 gb AF169138.1 AF169138</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493596 gb AF169137.1 AF169137</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493595 gb AF169136.1 AF169136</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493594 gb AF169135.1 AF169135</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493593 gb AF169134.1 AF169134</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493592 gb AF169133.1 AF169133</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493591 gb AF169132.1 AF169132</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11493590 gb AF169131.1 AF169131</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 11464575 gb AF184044.1 AF184044</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 4574231 gb AF103742.1 AF103742</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 6120104 gb AF190883.1 AF190883</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 6120103 gb AF190882.1 AF190882</a>	50	3e-05
<a href="#">gi 4761808 gb AF103741.1 AF103741</a>	50	3e-05



NCBI DRJ results of BLAST

BLASTN 2.2.3 [Apr-24-2002]

Sequences producing significant alignments:

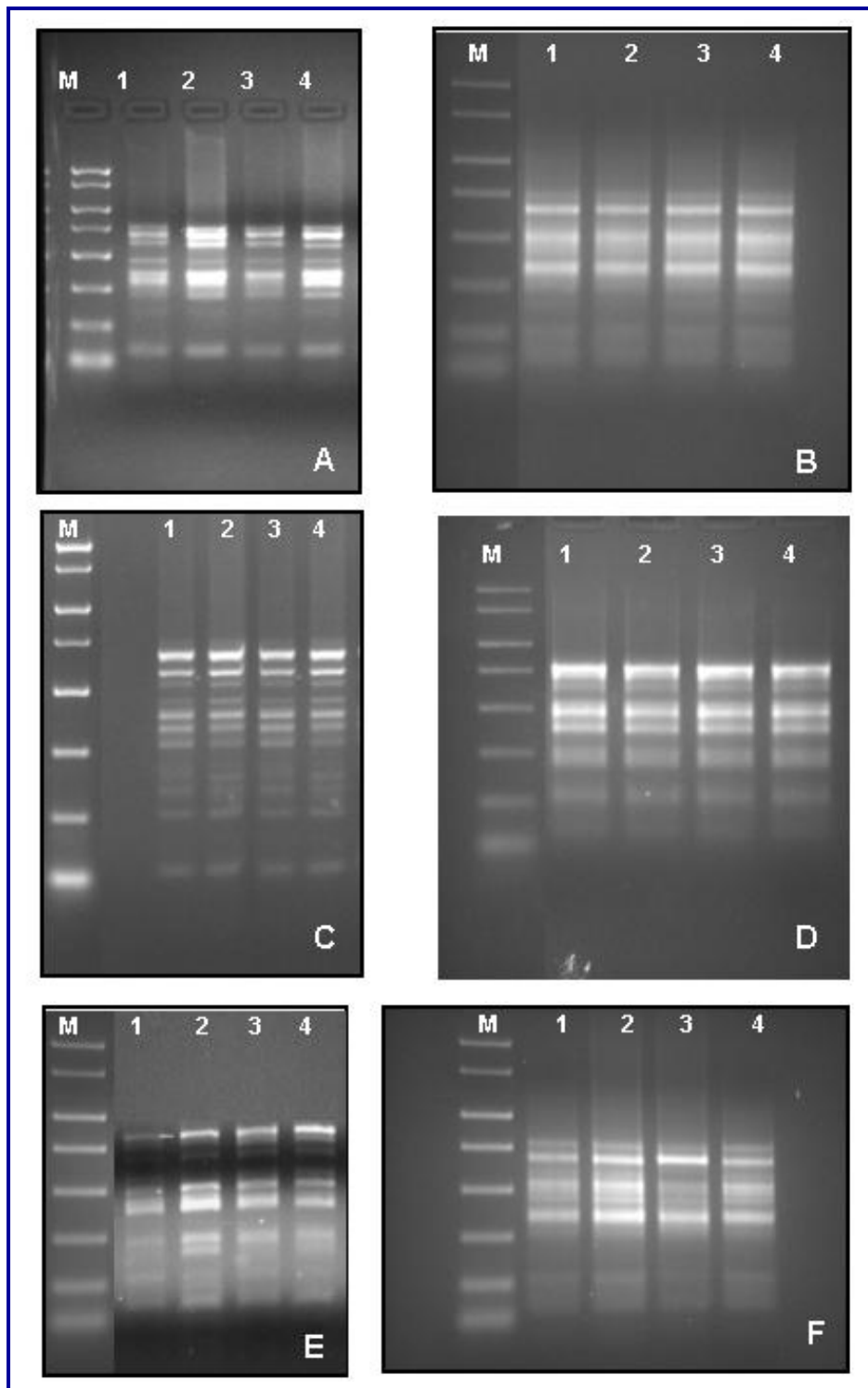
	score	e
	(bits)	Value
<a href="#">gi 9885804 gb AF291093.1 AF291093</a> Leishmania infantum kinet...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7363054 emb AJ275333.1 LIN275333</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7363053 emb AJ275332.1 LIN275332</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7363052 emb AJ275331.1 LIN275331</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7363051 emb AJ275330.1 LIN275330</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7339549 emb AJ275329.1 LIN275329</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7339548 emb AJ275328.1 LIN275328</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7339547 emb AJ275327.1 LIN275327</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7339546 emb AJ275326.1 LIN275326</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 7339541 emb AJ275321.1 LIN275321</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 4150876 emb AJ131633.1 LIN131633</a> Leishmania infantum kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 861418 gb S75667.1 S75667</a> (minicircle DNA) [Leishmania d...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 514441 emb Z35274.1 LIKINETD7</a> L.infantum (AJS-IPTRS) kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 514438 emb Z35272.1 LIKINETD5</a> L.infantum (AJS-IPTRF) kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 515001 emb Z35292.1 LIKINETD1</a> L.infantum (AJS-D2PST) kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 3296825 emb Z35500.1 LIKINET15</a> L.infantum (MCAN/ES/97/LL...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 3702594 emb AJ010081.1 LDOO10081</a> Leishmania donovani kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 516182 emb Z35275.1 LDKINETD8</a> L.donovani (AJS-PEKIN) kin...	<u>36</u>	0.019
<a href="#">gi 11990510 gb AF168358.1 AF168358</a> Leishmania donovani isol...	<u>36</u>	0.075
<a href="#">gi 11990509 gb AF168357.1 AF168357</a> Leishmania donovani isol...	<u>36</u>	0.075

**Figura 24.** Resultados de los 20 primeros alineamientos o *hits* de cada cebador (KLK2, arriba, DRJ, abajo, respectivamente), mediante algoritmo BLASTN y frente a la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank (versión 129.0). Los alineamientos son específicos del género *Leishmania* en ambos casos, al estar diseñados en la región conservada de los minicírculos de *Leishmania*. El algoritmo se realiza desde el servidor del NCBI, en la URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

## 2. Aplicaciones clínico-epidemiológicas de las técnicas de PCR-RFLP en la coinfección por *Leishmania*/VIH

### 2.1 Aplicación de la PCR-RFLP directa para confirmar un brote de leishmaniasis

En un intervalo de 3 meses dispusimos de 4 aislados de *Leishmania infantum* procedentes de Badalona (Barcelona) que pertenecían a 3 pacientes distintos, coinfectados por VIH y ADVPs (N<sup>o</sup>s 7-10, pacientes D, E y F en la **Tabla 2**, ver pág. 27). Previamente, se habían analizado por isoenzimas correspondiendo al zimodema MON-253, que nunca había sido reportado en España (Chicharro et al., 1999). Amplificamos el ADN de estas cepas mediante PCR-RFLP (de 3 pacientes coinfectados distintos) y después de la digestión con las endonucleasas (una por digestión) *Alu* I, *Rsa* I, *Hpa* II, *Taq* I, *Tru* 9I, *Hae* III y *Pst* I, comprobamos que los 4 aislados presentaban un mismo patrón de restricción para cada una de las enzimas, y a su vez distinto al resto de aislados de *L. infantum* incluidos en el estudio. (**Figura 25**)

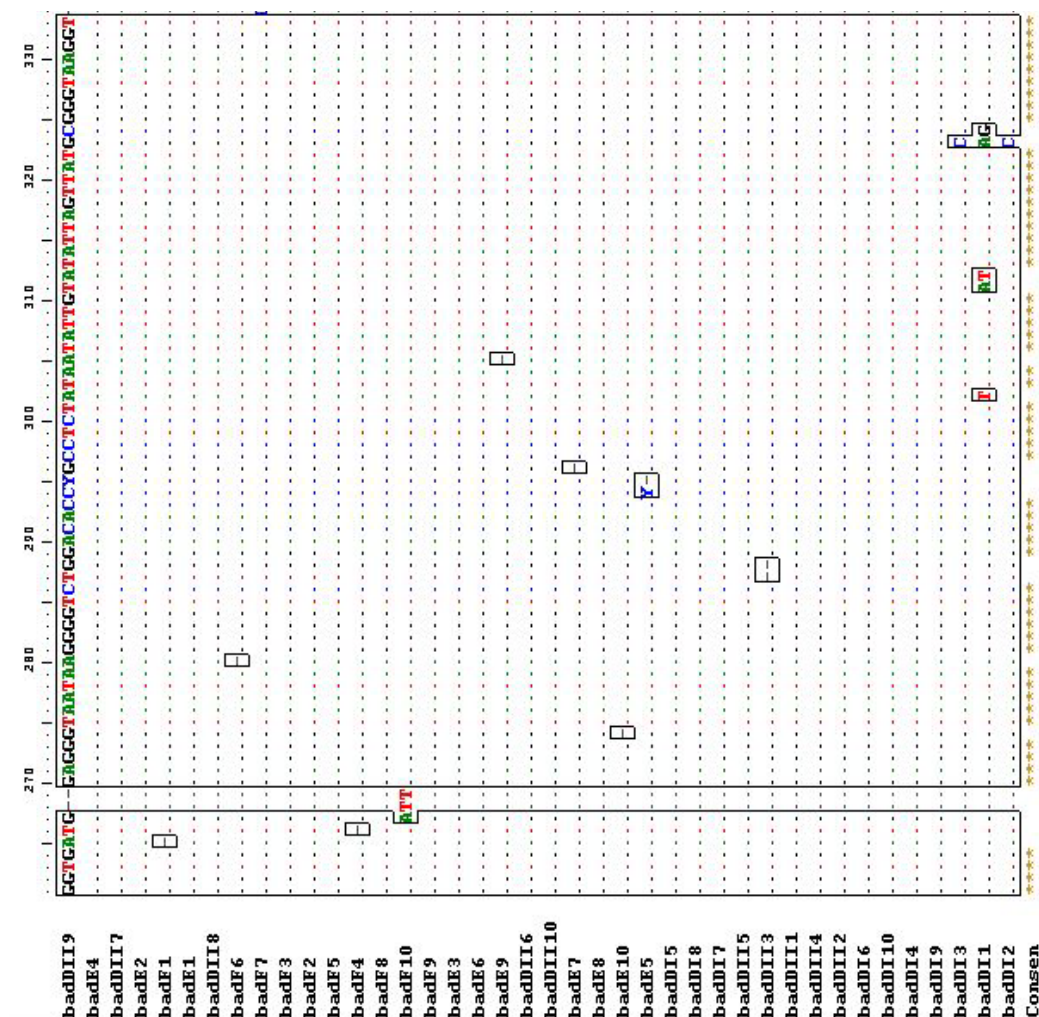


**Figura 25.** Patrones de restricción (RFLP) de los aislados de Badalona con distintas enzimas. **A:** digestión con *Rsa* I, M: marcador molecular PCR Marker (Sigma) de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 150 y 50 pb respectivamente. Calles 1-4: aislados de Badalona, 1 y 2 del mismo paciente, 3 y 4 de dos pacientes distintos. **B:** digestión con *Taq* I. M: PCR Marker. Calles 1-4: aislados de Badalona. **C:** digestión con *Hae* III. M: PCR Marker. Calles 1-4: aislados de Badalona. **D:** digestión con *Hpa* II. M: PCR Marker. Calles 1-4: aislados de Badalona. **E:** digestión con *Tru* 9I. M: PCR Marker. Calles 1-4: aislados de Badalona. **F:** digestión con *Pst* I. M: PCR Marker. Calles 1-4: aislados de Badalona.

### 2.1.1 Secuenciación de los aislados de Badalona

Con el objetivo de confirmar que la similitud de los patrones de restricción entre los aislados de Badalona era un reflejo de sus secuencias, y a la vez demostrar la reproducibilidad y fiabilidad de la técnica, procedimos a su secuenciación. Como se ha descrito anteriormente, subclonamos los 4 productos de PCR, y elegimos 10 clones de cada uno para secuenciar. Las secuencias se estudiaron y se eliminó la parte correspondiente al vector. Se sometieron al GenBank y mediante BLAST se confirmó que eran secuencias de minicírculos. Así preparadas, se procedió a un alineamiento múltiple mediante ClustalX (versión 1.8, licencia pública) y se vió que todas poseen un altísimo grado de similitud, lo cual confirma que los patrones son iguales puesto que las dianas de restricción se conservan (**Figura 26**).

**Figura 26.** Alineamiento múltiple mediante Clustal de las secuencias de 40 clones elegidos al azar de los aislados de Badalona. Sólo se señalan las regiones dónde los nucleótidos difieren, del total de 800 pb.





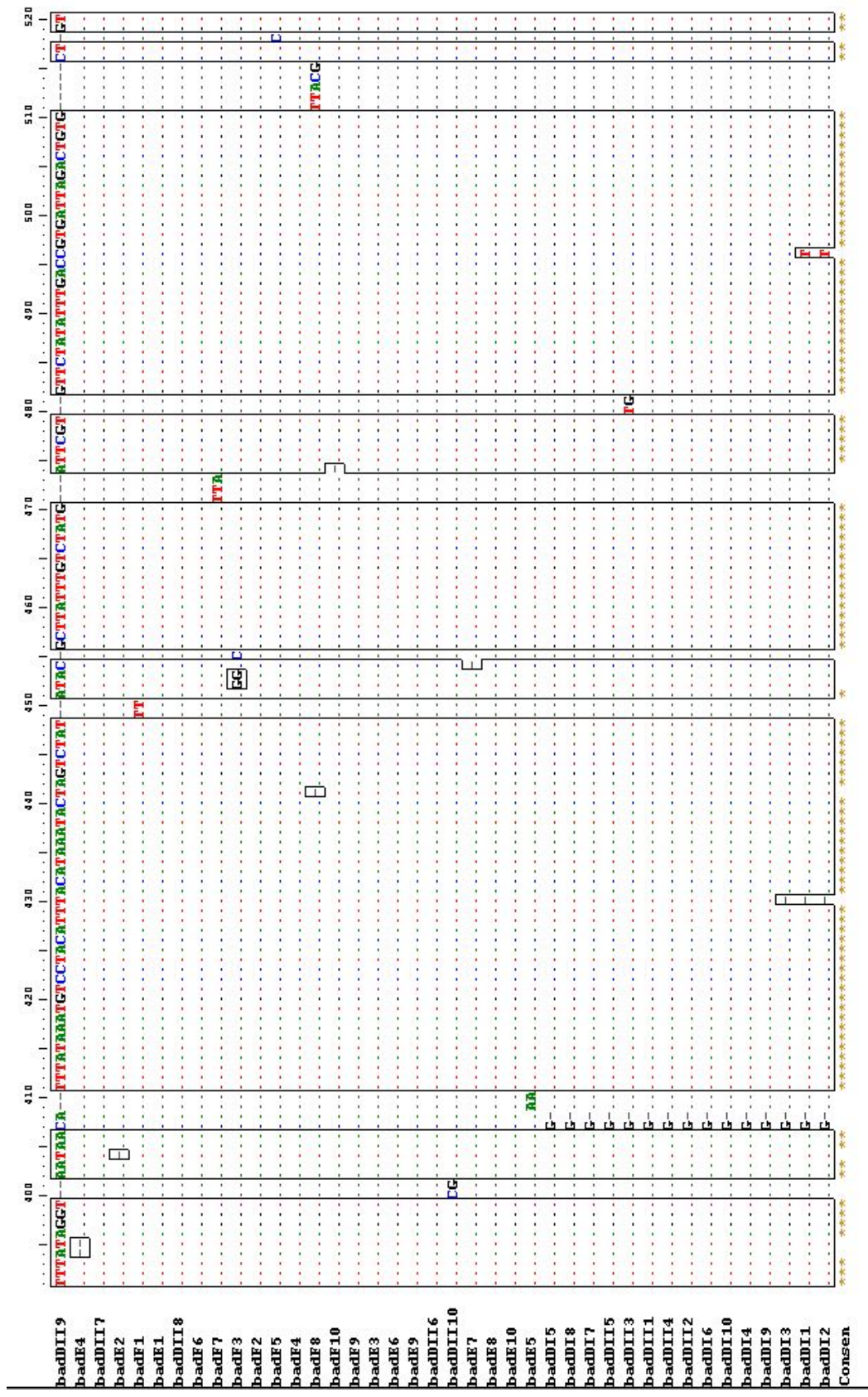
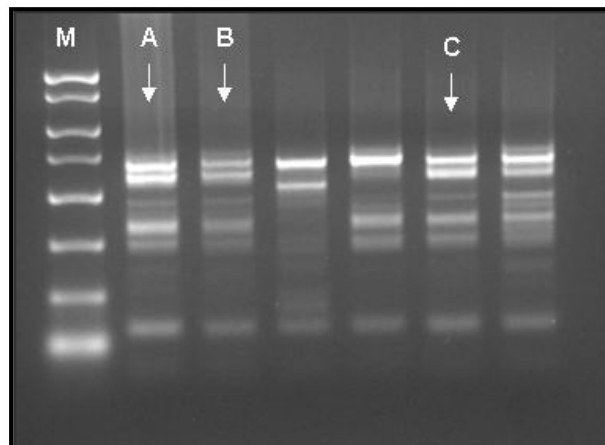


Figura 26 (cont.). Alineamiento múltiple.

## 2.2 Aplicación de la PCR-RFLP directa para estudios epidemiológicos de *Leishmania infantum* en la isla de Mallorca

Puesto que la isla de Mallorca puede considerarse un nicho ecológico cerrado, nos propusimos estudiar la estructura de poblaciones de *L. infantum* en esta zona. Para ello amplificamos, mediante la PCR-RFLP directa descrita en apartados anteriores, 54 cepas de *L. infantum* aisladas de 22 pacientes de la isla (52 cepas de 20 sujetos coinfectados con VIH y 2 cepas aisladas de 2 individuos inmunocompetentes). Así mismo incluimos 30 cepas aisladas de perros procedentes de la misma zona. También caracterizamos una cepa aislada de un total de 1826 flebotomos capturados a lo largo de 3 ensayos entomológicos realizados en la isla de Mallorca en los veranos de 1997, 1998 y 1999 respectivamente.

La cepa aislada de un flebotomo presentó un patrón de restricción idéntico al de una de un perro de la misma casa donde se había capturado el flebotomo (**Figura 27**).

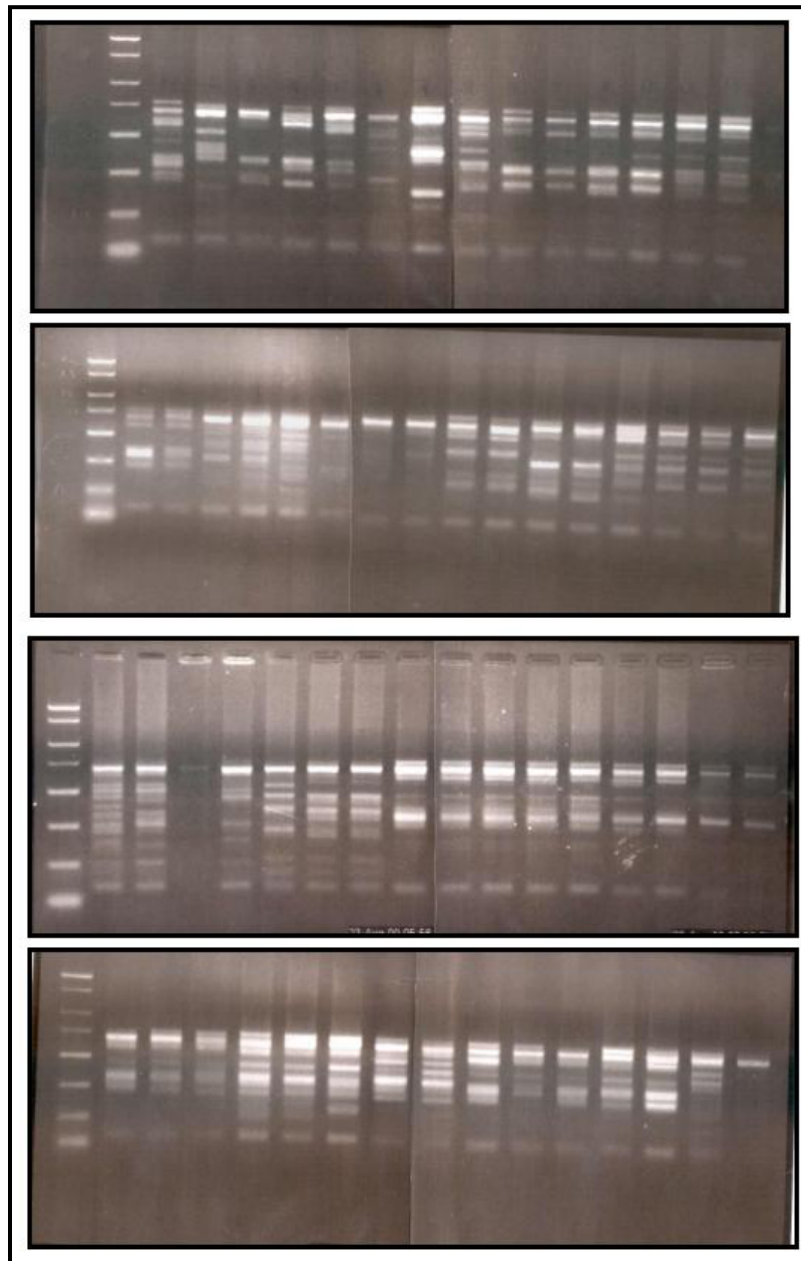


**Figura 27.** Patrones de restricción de minicírculos de *L. infantum* amplificados y digeridos con *Taq* I. **M:** Marcador molecular PCR marker (Sigma). **Calles A y B:** aislados de un mismo flebotomo caracterizados después de una semana de cultivo (A) y después de 3 meses de subpases semanales (B). **Calle C:** aislado de un perro. Las calles sin señalar son otros aislados caninos de la Isla.

### 2.2.1 Construcción de un dendograma UPGMA a partir de los datos de PCR-RFLP

Con los patrones de restricción generados mediante PCR-RFLP de las 93 cepas de *L. infantum* aisladas en la isla de Mallorca (52 aisladas de enfermos coinfectados por VIH, 2 cepas de enfermos inmunocompetentes (IC), 38 aisladas de perro 1 cepa aislada de flebotomo) construimos un dendograma por el método de UPGMA.

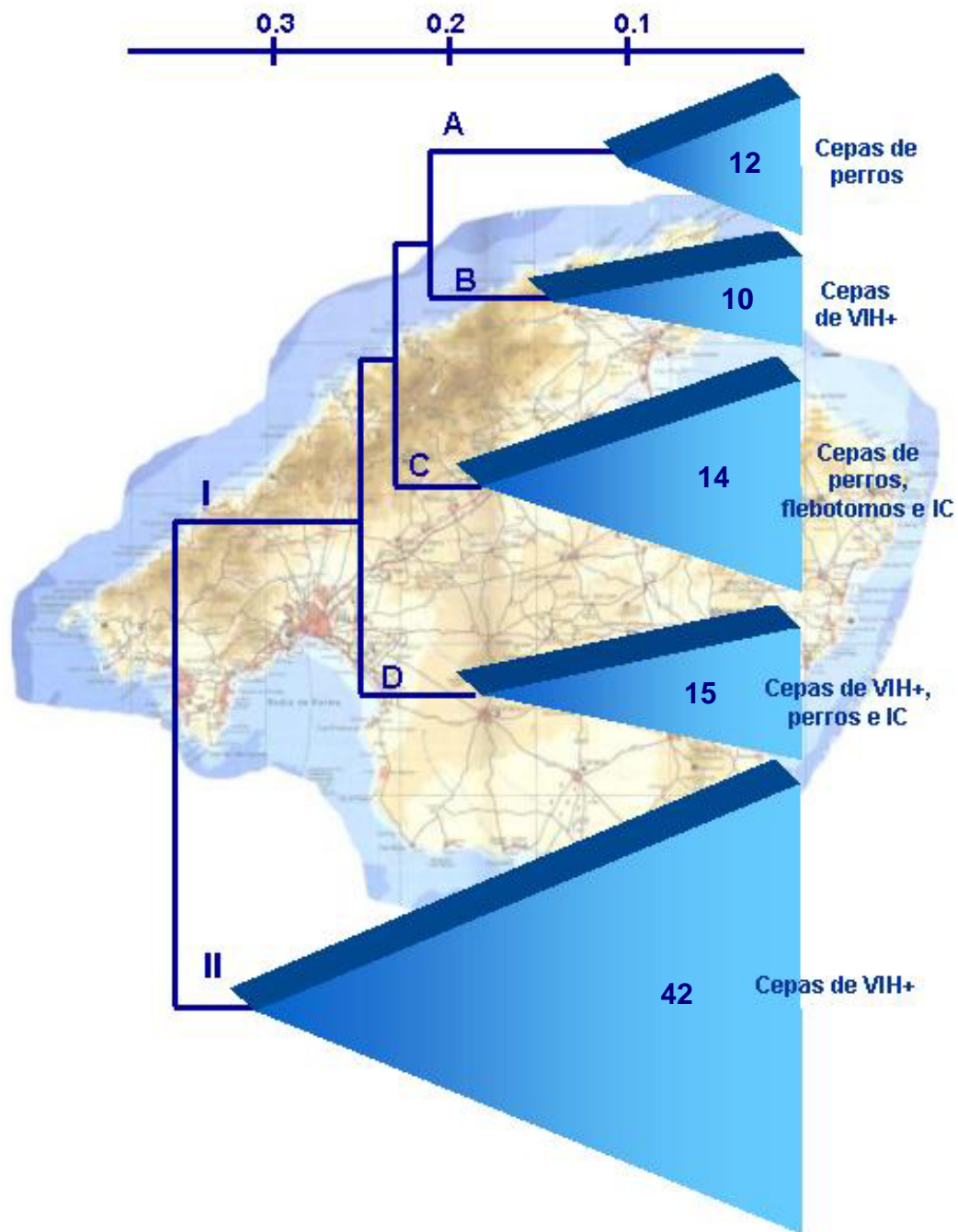
Utilizamos únicamente los perfiles obtenidos mediante digestión con la endonucleasa de restricción *Hpa*II, puesto que es la que proporciona unos fragmentos más adecuados para un tratamiento informático con LaneManager (**Figura 28**)



**Figura 28.** Digestiones con *Hpa*II de las cepas de *L. infantum* aisladas de humanos, tanto coinfectados con VIH como IC, de la Isla de Mallorca, y utilizadas para el análisis mediante LaneManger.

Como ya se explicó en Material y Métodos, el software LaneManager “codifica” las bandas obtenidas y construye una matriz binaria según la ausencia (0) o presencia (1) de éstas. Esta matriz binaria es la que se introduce en el programa TreeCon que, mediante UPGMA calcula las distancias genéticas para construir el dendograma (**Figura 29**).

En el dendograma se observan dos agrupamientos o *clusters* principales (I y II). El *cluster* I agrupa a su vez 4 *clusters* (A,B,C y D). El cluster A sólo reúne cepas de perro. El B agrupa cepas aisladas de enfermos coinfectados por VIH. En el cluster C se integraron cepas aisladas de perro, flebotomo y pacientes inmunocompetentes. En el D se observan cepas procedentes de perro, pacientes coinfectados y sujetos inmunocompetentes. El *cluster* II agrupa exclusivamente cepas aisladas de enfermos coinfectados por el VIH.

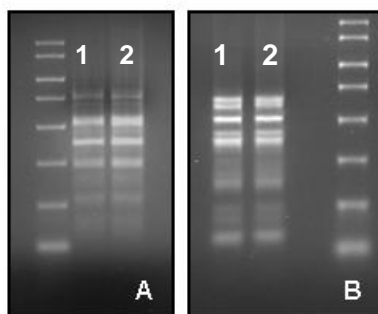


**Figura 29.** Dendrograma UPGMA construido a partir de las distancias genéticas generadas de los datos de PCR-RFLP de 93 cepas de la isla de Mallorca. Los números indican el número de cepas que conforman cada *cluster*.

### 2.3 Aplicación de las técnicas de PCR-RFLP para la evaluación y seguimiento molecular de individuos coinfectados por *Leishmania infantum*/VIH

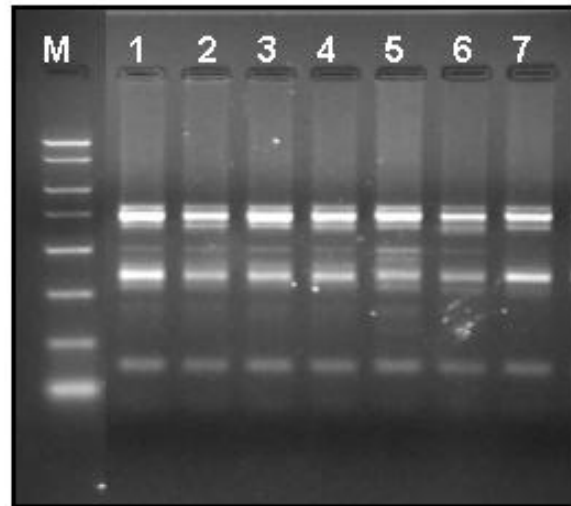
Como se ha comentado, el análisis isoenzimático, aún siendo la técnica taxonómica de referencia en *Leishmania*, tiene evidentes limitaciones a la hora de seguir individualmente los aislados secuenciales de un paciente coinfectado. Por ello nos propusimos utilizar las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas como marcadores traza para el análisis de individuos coinfectados por sus frecuentes recaídas.

En la **Tabla 2** (ver pág. 27) aparecen las características de los aislados 1-4 de los pacientes coinfectados A y B. Estos aislados de médula ósea fueron obtenidos antes y después del tratamiento; el zimodema se conserva (MON-34 en el paciente A y MON-1 en el B), y en este caso los patrones de restricción también se conservan (**Figura 30**), confirmando que los pacientes sufrieron una recaída, concordando ambas técnicas. Es destacable el período de tiempo existente entre los 2 aislados del paciente B (3 años).



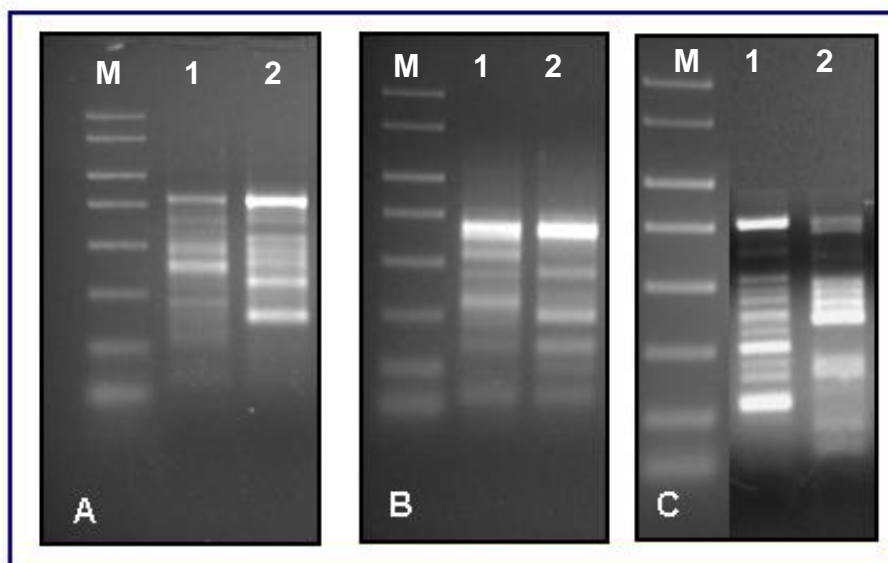
**Figura 30. A:** Marcador PCR Marker. Calles 1-2, patrón de restricción usando *Hpa* II, de los aislados obtenidos antes y después del tratamiento del paciente coinfectado A (MON-34). **B:** Marcador PCR Marker. Calles 1-2, patrón de restricción usando *Hpa* II, de los aislados obtenidos antes y después del tratamiento del paciente coinfectado B (MON-1).

También, los distintos aislados obtenidos del mismo paciente coinfectado a lo largo del tiempo presentaron los mismos patrones de restricción, con independencia del origen de las muestras de biológicas (sangre periférica y MO) obtenidas antes y después del tratamiento. Todos los aislados fueron caracterizados como MON-1, y la PCR-RFLP, de nuevo, confirma las recaídas (**Figura 31**).



**Figura 31.** Patrones de restricción obtenidos de diferentes aislados de *L. infantum* del mismo individuo coinfectado con VIH digiriendo los productos de la PCR-RFLP con la enzima *Hpa* II. **M:** Marcador molecular PCR marker (Sigma). Calles 1, 2 y 7: aislados a partir de sangre periférica antes (1,2) y después (7) del tratamiento. Calles 3, 4 y 6: aislados de médula ósea antes (3) y después (4 y 6) del tratamiento. Calle 5: aislado de piel después del tratamiento.

Sin embargo, los aislados 6 y 7 pertenecientes a un paciente C coinfectado obtenidos antes y después del tratamiento, y tipados como MON-24 ofrecieron patrones de restricción claramente distintos, sugiriendo la posibilidad de que este paciente coinfectado se hubiese re infectado (**Figura 32**). En la **Tabla 2** (ver pág. 27) aparecen las características de dichos aislados.

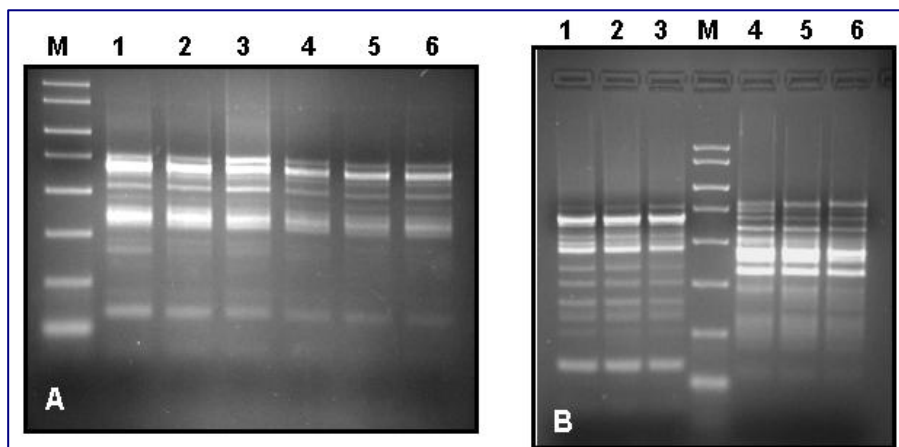


**Figura 32.** Patrones de restricción de las muestras obtenidas antes (calles 1) y después (calles 2) del tratamiento del paciente coinfectado C, digiriendo los productos de PCR con *Hpa*II (A), *Rsa*I (B) y *Taq*I (C).

Los resultados preliminares por los que se podía diferenciar entre reinfecciones y recidivas, se siguió de un estudio a gran escala. Así analizamos las muestras y los aislados en cultivo de 40 pacientes coinfectados por *Leishmania infantum* y VIH. Para ello dispusimos de 256 muestras biológicas y 56 cepas aisladas de éstas, como queda resumido en la **Tabla 3** (ver pág. 29).

Todos los aislados en cultivo se caracterizaron isoenzimáticamente, y siempre tuvimos dos o más muestras biológicas secuenciales obtenidas antes y después del tratamiento de cada paciente.

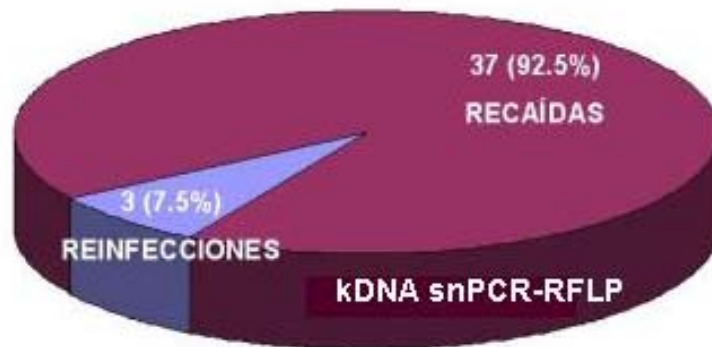
En este estudio también confirmamos recidivas previamente caracterizadas mediante análisis isoenzimático. En la **Figura 34** (A) se muestran 6 aislados secuenciales del mismo paciente coinfectado. La PCR se realizó sobre muestras de médula ósea, y los productos se digirieron con la endonucleasa de restricción *Hpa* II. Como se puede observar, los patrones de restricción son idénticos, confirmando una recaída. Todos los aislados se caracterizaron como MON-1 y es destacable la estabilidad del patrón de restricción a pesar del tiempo transcurrido entre el primer y último aislado (2 años). En la **Figura 34** (B) se observa otra recaída, con resultados idénticos independientemente de la enzima con la que se digieran los productos de PCR; en este caso *Hpa* II y *Rsa* I.



**Figura 34.** Análisis mediante sn kDNA PCR-RFLP de muestras biológicas de pacientes coinfectados. **A:** aislados secuenciales de médula ósea a lo largo de 2 años. M: marcador molecular PCR marker (Sigma). Calles 1-6: patrones de restricción después de la digestión con *Hpa* II de los productos de la segunda reacción de PCR. **B:** Ejemplo de recaída usando dos enzimas diferentes. Calles 1-3: aislados de MO, digeridos con *Hpa* II. Calles 4-6: patrones obtenidos tras digestión con *Rsa* I. M: marcador molecular PCR marker (Sigma)

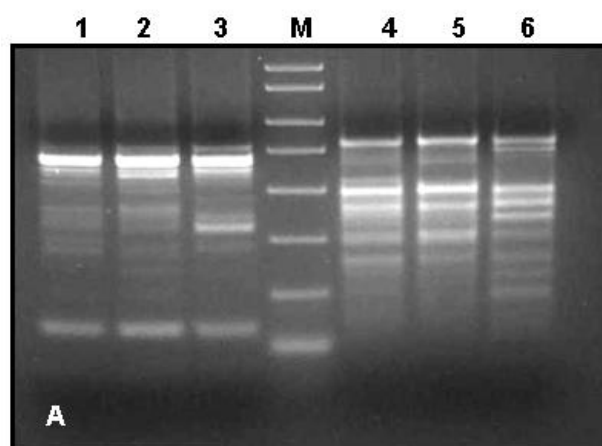


Después de aplicar la técnica kDNA snPCR-RFLP encontramos que en 3 (7.5%) de los 40 pacientes se producía un cambio de patrón en la/s muestras postratamiento, sugiriendo que el paciente se había re infectado con una cepa de nueva adquisición (**Figura 33**).

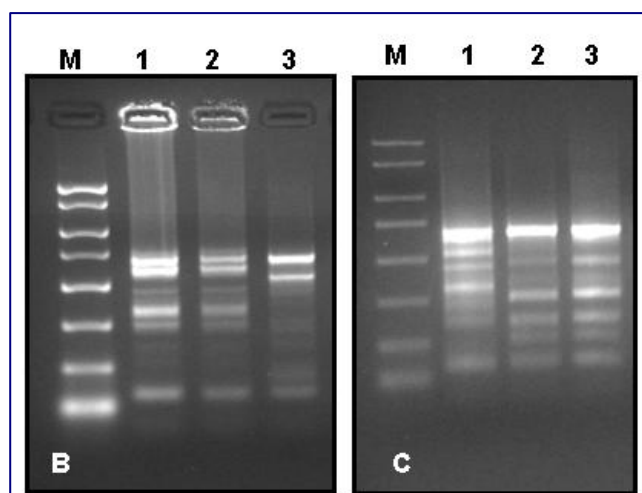


**Figura 33.** Porcentaje de reinfecciones observado en los 40 pacientes coinfectados analizados mediante kDNA snPCR-RFLP.

Sin embargo, el análisis isoenzimático revelaba el mismo zimodema en los aislados antes y después del tratamiento de los 3 pacientes, MON-1, MON-34 y MON-24 respectivamente, pero los patrones de restricción antes y después del tratamiento son distintos (**Figura 34**). Las características clínicas de estos 3 pacientes coinfectados quedan reflejadas en la **Tabla 4** (ver pág. 65).



**Figura 34.** Cambio en los patrones de restricción de 3 pacientes coinfectados que indican una reinfección. **A**, paciente GRJ, calles 1-3: aislados digeridos con *Hpa* II, M: marcador molecular PCR marker (Sigma), calles 4-6: idénticos aislados digeridos con *Taq* I. A pesar de que el zimodema es el mismo, las calles 3 y 6 muestran un patrón claramente distinto.



**Figura 34 (cont.). B**, paciente JAE, patrones obtenidos mediante digestión *Hpa* II, mostrando un perfil diferente en la calle 3. **C**, paciente APB, cambio en el patrón de restricción (calle 2 y 3) al digerir con *Hpa* II.

Código del paciente	Toma de muestras*	Análisis por kDNA snPCR-RFLP	Tratamiento	Observaciones	Zimodema
GRJ	26/10/98 A		Anfotericina B complejo lipídico, Abelcet™, 3mg/kg/d administrados por vía parenteral una vez al día durante 5 d		MON- 34
	01/12/98 B				
	19/05/99 C	Cambio en el patrón de restricción (REINFECCIÓN)		Fallo terapéutico	
JAE	16/04/98 A		Anfotericina B complejo lipídico, Abelcet™, 3mg/kg/d administrados por vía parenteral una vez al día durante 10 d		MON-1
	24/06/98 B				
	13/10/99 C	Cambio en el patrón de restricción (REINFECCIÓN)		Fallo terapéutico	
APB	07/10/97 A		Anfotericina B complejo lipídico, Abelcet™, 3mg/kg/d administrados por vía parenteral una vez al día durante 5d		MON-24
	28/10/97 B	Cambio en el patrón de restricción (REINFECCIÓN)			
	10/06/98 C			Fallo terapéutico	

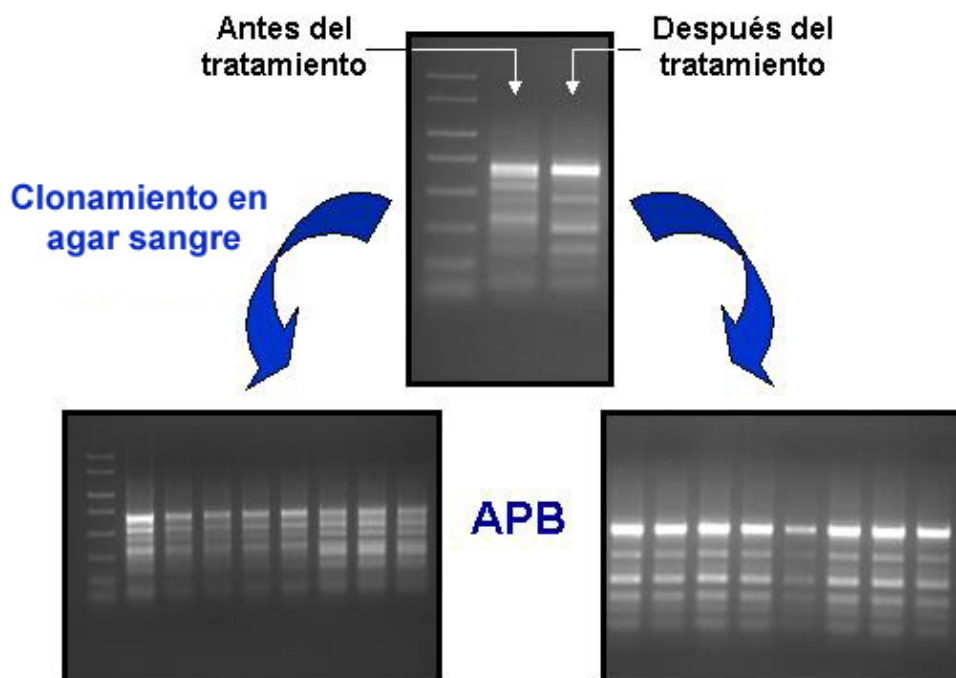
**Tabla 4.** Datos de los 3 pacientes reinfectados. \* A: muestra obtenida antes del tratamiento (el día del diagnóstico). B: muestra obtenida un mes después de finalizar el tratamiento. C: muestra obtenida durante el seguimiento por una supuesta recaída.

Además, el criterio clínico de “fallo terapéutico” es erróneo al comprobarse con el trazador molecular que son re infecciones y, por tanto, no imputables al medicamento.

### 2.3.1 Estudios de clonalidad del parásito en placas de agar-sangre

Con el objetivo de confirmar que las diferencias que observábamos en los patrones de restricción no eran debidas a la detección de diferentes poblaciones mosaico presentes inicialmente en la muestra, procedimos al clonaje de las cepas de los pacientes re infectados en placas de agar-sangre. Partiendo de las cepas parentales, se siembran en las placas diluciones límite del parásito. Las colonias que crecen se cultivan en las mismas condiciones y se realiza la técnica de kDNA snPCR-RFLP sobre los clones.

En el caso del paciente APB, obtuvimos 8 clones de cada cepa antes y después del tratamiento, que eran idénticos entre sí e idénticos a la cepa parental. Para el paciente JAE, obtuvimos 4 y 3 clones, cuyo patrones eran iguales entre sí e idénticos a los de las cepas parentales. En el caso del paciente GRJ, dispusimos de 5 clones antes y después del tratamiento, y como en los dos casos anteriores, los patrones son idénticos (**Figura 35**), descartándose la existencia de poblaciones mosaico que pudieran haberse seleccionado con la medicación.



**Figura 35.** Patrones de restricción, tras la aplicación de la sn kDNA PCR-RFLP, de las cepas parentales antes y después del tratamiento, así como de los clones que de ellas se derivan, de los 3 pacientes re infectados: APB, JAE y GRJ. Las digestiones se realizaron con la endonucleasa de restricción *Hpa* II. En los 3 pacientes se confirma que no existía una población mosaico previa puesto que los patrones son idénticos entre los clones y respecto a las cepas parentales.

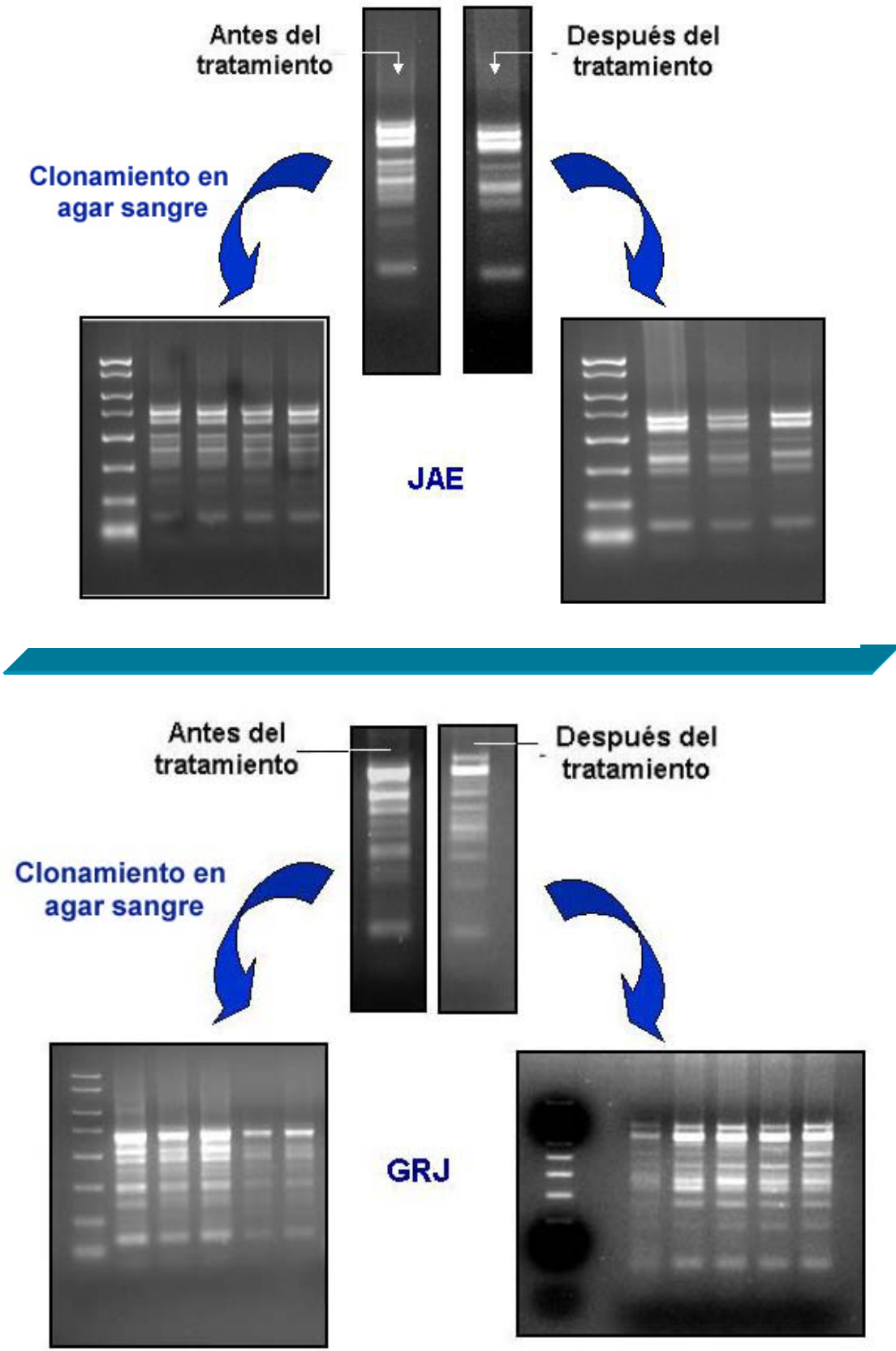
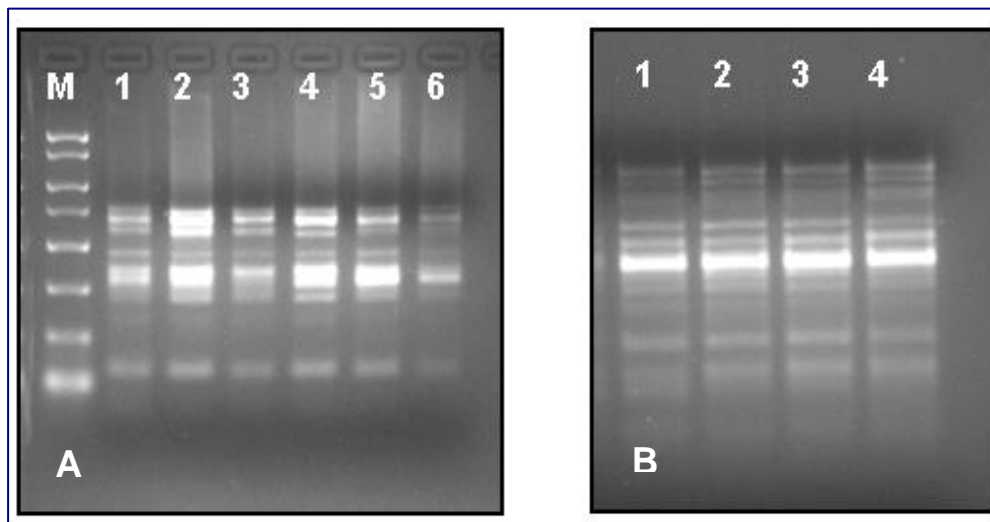


Figura 35 (cont.).

### 2.3.2 Ausencia de selección en cultivos de *Leishmania*

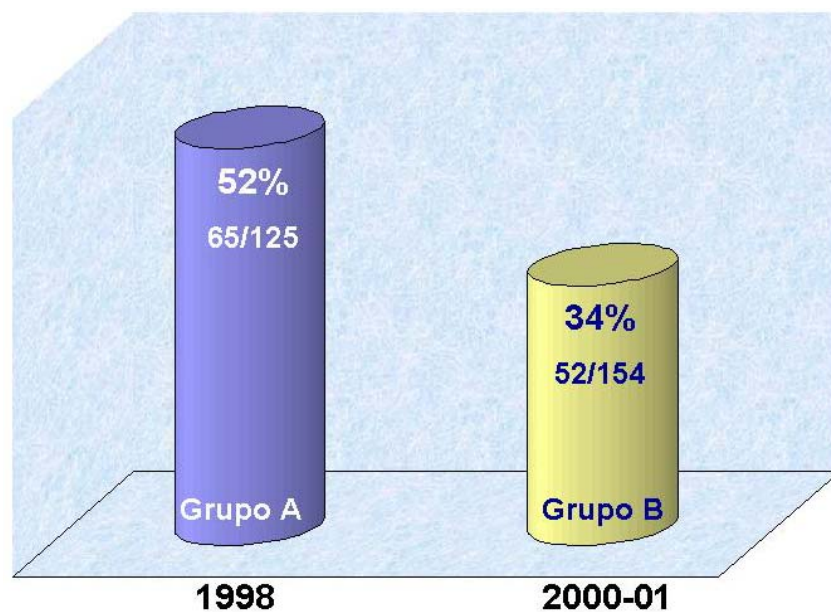
Cuando fue posible, aislamos y cultivamos el parásito a partir de las muestras clínicas analizadas en el apartado anterior como queda reflejado en la **Tabla 3** (ver pág. 29). Así cultivamos 56 cepas de *Leishmania infantum* aisladas de médula ósea. En todos estos casos, los patrones de restricción eran idénticos cuando realizábamos la técnica de kDNA snPCR-RFLP directamente sobre la muestra biológica o cuando trabajábamos con la cepa aislada y cultivada a partir de esa misma muestra clínica (**Figura 36**), lo que indica que el cultivo y los subpases que éste conlleva no seleccionan ninguna población o clon preexistente en la muestra aislada.



**Figura 36.** Patrones de restricción obtenidos mediante kDNA sn PCR-RFLP de muestras clínicas y de los aislados cultivados a partir de ellas en 2 pacientes coinfectados del estudio. **A:** digestiones con la enzima *Hpa* II. M: marcador molecular PCR marker (Sigma). Calles 1-3: aspirados de médula ósea. Calles 4-6: cepas cultivadas y aisladas a partir de las mismas muestras clínicas, dónde no se aprecia ninguna diferencia en los patrones. **B:** digestiones con *Hpa* II de 2 médulas óseas (calles 1 y 2) y los cultivos a partir de ellas (calles 3 y 4). Tampoco se aprecia ninguna diferencia entre los patrones.

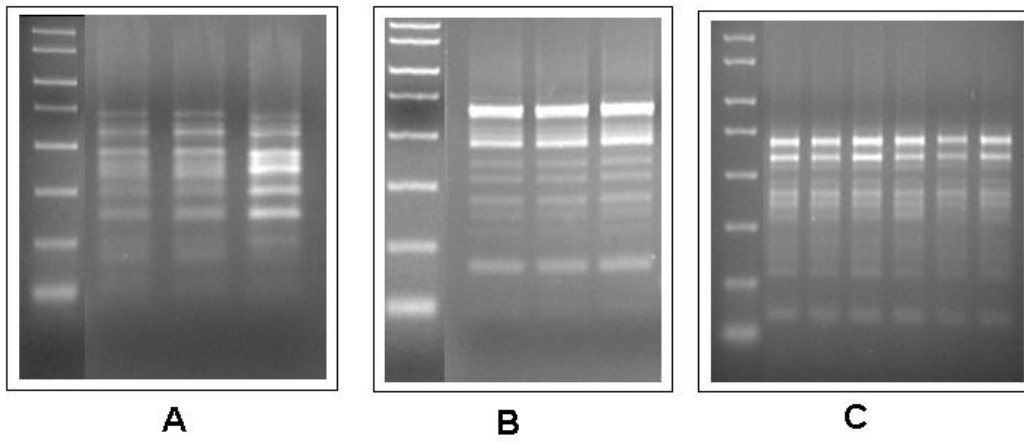
## 2.4 Aplicación de la técnica de kDNA snPCR-RFLP para la detección y caracterización de *Leishmania* en jeringuillas desechadas por ADVPs

Nos propusimos establecer el papel que juegan las jeringuillas compartidas entre ADVPs en la transmisión de *Leishmania* en España. Para ello, dispusimos de 125 jeringuillas (grupo A) obtenidas en 1998 y 154 (grupo B) obtenidas en el periodo 2000-01. Tras realizar la técnica de kDNA snPCR-RFLP detectamos ADN de *Leishmania* en un porcentaje muy significativo de las jeringuillas (**Figura 36**).



**Figura 36.** Porcentajes de detección de *Leishmania* en las jeringuillas compartidas por ADVPs en 2 periodos de tiempo. Las del grupo A se recogieron en el sur de Madrid, mientras que las jeringuillas del grupo B se recogieron en el suroeste.

Aplicando la técnica de kDNA snPCR-RFLP a las jeringuillas del grupo A pudimos observar que 53 muestras presentaban un patrón único y distinto entre sí, pero que 12 de las muestras pertenecían a 3 genotipos distintos: 3 muestras pertenecían a un genotipo, otras 3 pertenecían a otro y otras 6 muestras pertenecían al tercero (**Figura 37**).



**Figura 37.** Caracterización mediante kDNA snPCR-RFLP del ADN de *Leishmania* detectado en las jeringuillas desechadas por ADVPs. De las 65 jeringuillas positivas a *Leishmania*, observamos 3 genotipos (A, B y C), cada uno con 3, 3 y 6 muestras, respectivamente.

## 1. Técnicas genotípicas para la caracterización molecular de

### ***Leishmania* ..... 44**

- 1.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)..... 44
- 1.2 IRT (Intergenic Ribosomal Typing) ..... 44
- 1.3 Desarrollo y optimización de una PCR-RFLP para amplificar y caracterizar minicírculos de ADNk de *Leishmania infantum* ..... 46
  - 1.3.1 Secuenciación de los productos de PCR ..... 48
  - 1.3.2 Optimización de las digestiones con endonucleasas de restricción (RFLPs).. 49
- 1.4 Desarrollo y optimización de una PCR-RFLP seminested para amplificar y caracterizar minicírculos de ADNk de *Leishmania infantum* (kDNA snPCR-RFLP) . 50
  - 1.4.1 Diseño de cebadores ..... 51

## 2. Aplicaciones clínico-epidemiológicas de las técnicas de

### **PCR-RFLP en la coinfección por *Leishmania infantum*/VIH ..... 53**

- 2.1 Aplicación de la PCR-RFLP directa para confirmar un brote de leishmaniasis .. 53
  - 2.1.1 Secuenciación de los aislados de Badalona ..... 55
- 2.2 Aplicación de la PCR-RFLP directa para estudios epidemiológicos de *Leishmania infantum* en la Isla de Mallorca..... 57
  - 2.2.1 Construcción de un dendograma UPGMA a partir de los datos de PCR-RFLP ..... 58
- 2.3 Aplicación de las técnicas de PCR-RFLP para la evaluación y seguimiento molecular de individuos coinfectados por *Leishmania infantum*/VIH..... 61
  - 2.3.1 Estudios de clonalidad del parásito en placas de agar-sangre..... 66
  - 2.3.2 Ausencia de selección en cultivos de *Leishmania*..... 68
- 2.4 Aplicación de la técnica de kDNA sn PCR-RFLP para la detección y caracterización de *Leishmania* en jeringuillas desechadas por ADVPs ..... 69



## REFERENCES

Chicharro,C., Sirera,G., Ares,M., Sans,A., Videla,S., and Alvar,J. (1999). Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253 involved in an outbreak among intravenous drug users? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **93**, 385-386.

Cupolillo,E., Grimaldi,J.G., Momen,H., and Beverley,S.M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 145-155.

Smyth,A.J., Ghosh,A., Hassan,M.Q., Basu,D., De Bruijn,M.H., Adhya,S., Mallik,K.K., and Barker,D.C. (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105 ( Pt 2)**, 183-192.

Williams,J.G., Kubelik,A.R., Livak,K.J., Rafalski,J.A., and Tingey,S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535

## 1. Caracterización de *Leishmania* por técnicas moleculares basadas en PCR

La aplicación de la técnica de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD) en *Leishmania* ha demostrado valor en el análisis de genética de poblaciones (Tibayrenc et al., 1993; Bañuls et al., 1999). Otros autores han planteado la posibilidad de diferenciar entre especies del género *Leishmania*, básicamente como respuesta al problema de solapamiento de distintas especies circulantes en la misma región, como en el caso de las especies del Nuevo Mundo (Noyes et al., 1996). En nuestro caso, la técnica de RAPD no fue capaz de establecer ningún tipo de variabilidad entre las cepas de *L. infantum* aisladas de perros y humanos, tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, y procedentes de la isla de Mallorca que analizamos (**Figura 15**, ver pág. 45). Los protocolos de amplificación fueron rigurosamente comprobados así como la reproducibilidad de nuestros resultados que coinciden, en parte, con los obtenidos por Hide et al. (2001), y que tampoco encuentran variabilidad entre los aislados de *L. infantum*, si bien sí son capaces de distinguir esta especie de *L. major* y *L. tropica*. Cabe pensar que la ausencia de variabilidad se debiera a que las cepas analizadas por RAPD pertenecen todas a un nicho ecológico cerrado, como es la isla de Mallorca, pero pudimos comprobar mediante otras técnicas (PCR-RFLP) la existencia de una alta variabilidad entre todos los aislados.

Toledo et al. (2002) describen variabilidad intraespecífica en *L. infantum* mediante RAPD y ponen de manifiesto que dentro de un mismo zimodema (principalmente MON-1) existe una alta heterogeneidad genética, y por lo tanto, concluyen que no hay ninguna relación entre los genotipos encontrados y la estructura de zimodemas ya establecida para *L. infantum*.

Sin embargo la técnica tiene evidentes limitaciones, puesto que es sensible al termociclador que se utiliza (incluso siendo del mismo fabricante), a la polimerasa y otros factores (Meunier y Grimont, 1993; Singh, 1997; Hanafi et al., 2001). Además, el ADN tiene que estar libre de cualquier otro ADN, puesto que los cebadores, al ser inespecíficos pueden reconocer esta secuencia extraña y los patrones obtenidos no serían representativos del organismo en estudio. Por lo tanto, siempre es necesario cultivar el parásito, no pudiendo trabajar directamente con muestras biológicas. Por último, con una técnica tan poco reproducible es muy difícil asegurar la estabilidad temporal de los patrones obtenidos, característica y objetivo primordial a la hora de definir un marcador microbiológico.

Los genes que codifican las subunidades pequeña y grande de ARN ribosomal (SSU y LSU rRNA) están muy conservados y se han mostrado muy útiles en estudios filogenéticos entre tripanosomátidos (Sogin et al., 1986; Briones et al., 1992; Cupolillo et al., 1998). Entre estos genes existen regiones que no se transcriben, conocidas como ITS (*Internal Transcribed Spacers*) y que tienen tasas de mutación más altas que los propios genes, lo que se traduce en una mayor variabilidad. La amplificación de estas regiones en *Leishmania* mediante PCR y posterior digestión con endonucleasas de restricción fue desarrollado por Cupolillo et al. (1995), denominando al método IRT (*Intergenic Ribosomal Typing*); con esta técnica fueron capaces de diferenciar *L. equatorensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, y *L. braziliensis*.

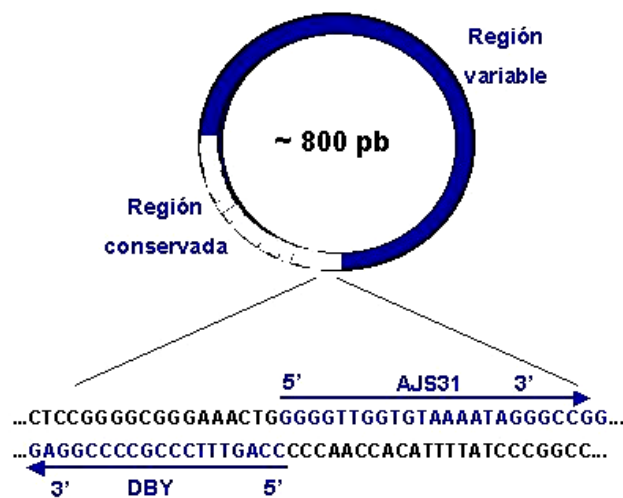
Sin embargo, tras aplicar la técnica de IRT sobre los aislados de *L. infantum* procedentes de la isla de Mallorca, no encontramos variabilidad entre ellos, con ninguna de las enzimas empleadas (*Alu I*, *Sph I*, *Hae III*) como se aprecia en la **Figura 17** (ver pág. 45). Las cepas empleadas fueron las mismas que utilizamos para RAPD. La técnica es más reproducible que ésta última, principalmente porque los cebadores son más específicos, pero para obtener un rendimiento aceptable en las amplificaciones se necesita partir de una gran cantidad de ADN, lo que se traduce en la práctica en que sólo es aplicable a cepas previamente cultivadas. Si perseguimos unos objetivos taxonómicos o filogenéticos, esta herramienta puede ser relativamente útil, pero en ningún caso es capaz de poner de manifiesto variaciones intraespecíficas.

Es necesario desarrollar técnicas moleculares basadas en PCR que sean capaces de discriminar entre aislados de *Leishmania*, a diferencia de la RAPD y la IRT, como alternativa a la caracterización mediante isoenzimas. El estudio de aislados secuenciales del mismo individuo coinfectado por *Leishmania*/VIH pone de manifiesto que cuando se conserva el zimodema en las muestras antes y después del tratamiento, no es posible saber si se trata de una recaída o una reinfección, más teniendo en cuenta que la mitad de los aislados de *Leishmania* que se caracterizan (antes o después del tratamiento) en pacientes coinfectados pertenecen al zimodema MON-1 (Pratlong et al., 1995; Gállego et al., 2002).

La técnica PCR para la amplificación de secuencias diana de los minicírculos del ADN del kinetoplasto de *Leishmania* ha sido ampliamente utilizada sobre todo con fines diagnósticos (Smyth et al., 1992; Bhattacharyya et al., 1993; Eresh et al., 1994; Breniere et al., 1999; Salotra et al., 2001; Weigle et al., 2002). Una vez amplificada la secuencia diana del kinetoplasto, se hibrida con sondas específicas, generalmente de la región variable del minicírculo, para la identificación específica de la especie.

Por otra parte, se ha empleado a lo largo de los últimos 20 años el análisis por RFLP del ADN del kinetoplasto de varios tripanosomátidos, incluida *Leishmania*, separado previamente del ADN genómico mediante gradiente en cloruro de cesio, ofreciendo patrones distinguibles conocidos como esquizodemas (Morel y Simpson, 1980; Spithill y Grumont, 1984; Jackson et al., 1986; Saravia et al., 1990; Pacheco et al., 1995). El análisis clásico de esquizodemas tiene el principal inconveniente de que es obligatorio cultivar el parásito y el proceso de separación del ADNk es muy laborioso. Además, la variabilidad intraespecífica encontrada, por ejemplo en *L. infantum*, es muy limitada (Angelici et al., 1989). Estos autores realizan un análisis multifactorial de los esquizodemas para concluir que es posible agrupar patrones específicos según el zimodema, es más, concluyen que las cepas de *L. infantum* viscerotrópicas y dermatrópicas se diferencian claramente por este tipo de análisis.

La PCR-RFLP directa (un solo proceso de amplificación) sobre los minicírculos del ADNk de *Leishmania infantum* solventa la limitación del análisis isoenzimático cuando queremos hacer un seguimiento secuencial de los aislados de un mismo paciente coinfectado. En principio, no es necesario cultivar el parásito ya que la técnica de PCR tiene suficiente sensibilidad como para detectar ADN de *Leishmania* en cantidades mínimas. Además, ya no es necesario separar el ADNk del ADNg, como se hace en el análisis tradicional de esquizodemas, puesto que la especificidad de los cebadores hace posible trabajar con ADN total y sólo se amplifican los minicírculos de *Leishmania*. Estos cebadores están diseñados en la región conservada del minicírculo de tal forma que aseguran la amplificación de todo el minicírculo linearizado (**Figura 38**).



**Figura 38.** Esquema de un minicírculo de ADNk de *Leishmania*, mostrando la posición de los cebadores utilizados.

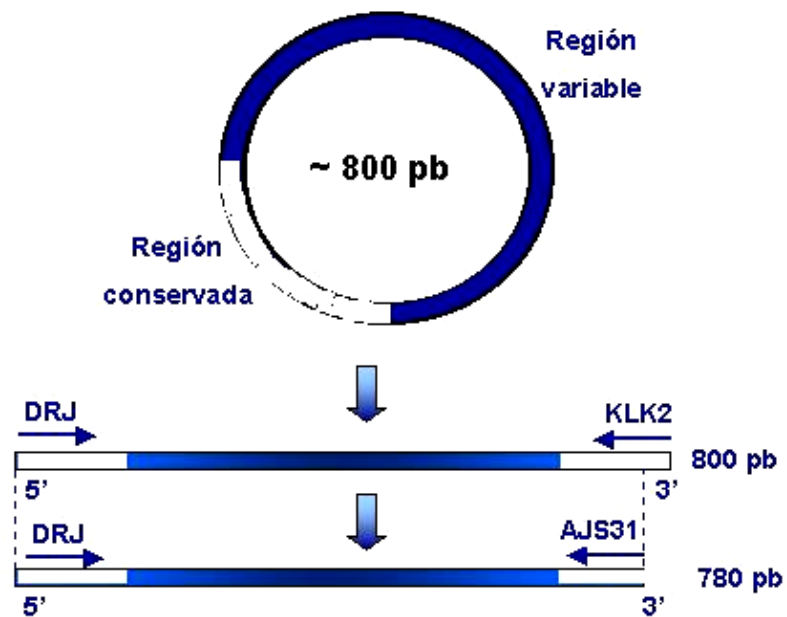
Los productos amplificados tienen un tamaño de 800 pb, si partimos de ADN de *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. braziliensis* o *L. mexicana* mientras que la PCR presenta un fragmento de 680 pb para *L. major*, con lo que su capacidad para diferenciar especies está muy limitada. Varios autores han comprobado en los últimos años que utilizando cebadores específicos para la región conservada de los minicírculos se amplifica siempre un fragmento del mismo tamaño (800 pb para *L. infantum*) que corresponde a la familia o clase mayoritaria de minicírculos, es decir, las secuencias más representadas en el ADN del kinetoplasto (Rodgers et al., 1990; De Bruijn y Barker, 1992; Smyth et al., 1992; Eresh et al., 1994; Noyes et al., 1998; Lambson y Barker, 2002). Otra evidencia experimental de este hecho es la imposibilidad de secuenciar directamente los productos amplificados ya que no se corresponden con minicírculos individuales, sino con la clase mayoritaria, formada por un gran número de minicírculos con secuencias altamente similares pero no idénticas. Sólo subclonando en vectores (comerciales) es posible tener la secuencia individual de cada minicírculo.

Este producto amplificado se somete a una digestión con endonucleasas de restricción para obtener unos patrones distinguibles (PCR-RFLP). Para ello es necesario purificar el producto de PCR puesto que determinados componentes de la reacción anterior, como el  $MgCl_2$  o el tampón de la ADN polimerasa puede afectar el proceso de corte enzimático. Las seis enzimas de restricción empleadas proporcionaron un número suficiente de bandas como para poder observar variabilidad entre los aislados estudiados, según los datos de los mapas de restricción generados. En la optimización experimental se comprobó que las digestiones eran reproducibles y que todas las enzimas funcionaban correctamente. Además, se hicieron pruebas con exceso de enzima para evitar la posibilidad de que se estuviesen produciendo digestiones parciales. El uso de seis enzimas de restricción (una por digestión) asegura en un altísimo porcentaje la similitud o no de los patrones observados entre dos aislados de *L. infantum*, teniendo en cuenta el número de pares de bases del producto amplificado, 800, y las 6 dianas distintas que reconocen las enzimas utilizadas.

Otros autores han analizado las secuencias de ADN de cientos de minicírculos de *Leishmania* concluyendo que las dianas para las enzimas de restricción empleadas en los estudios de PCR-RFLP se conservan a lo largo de un tiempo considerable, incluso más de 2 años, y se conservan entre minicírculos de cepas de la misma especie aisladas en zonas distanciadas geográficamente, proporcionando a la técnica la estabilidad suficiente como para asegurar la reproducibilidad y fidelidad de los datos

(Gutiérrez-Solar et al., 1995; Brewster y Barker, 1999; Lambson et al., 1999; Brewster y Barker, 2002). No obstante, ha sido propuesto que las secuencias de los minicírculos evolucionan muy rápidamente, principalmente en la región variable (Rogers y Wirth, 1988). Nuestros resultados, sin embargo, confirman la estabilidad anteriormente mencionada cuando analizamos los aislados secuenciales de *L. infantum* de dos pacientes coinfectados que sufren recaídas, y en los que observamos cómo se mantienen los patrones de restricción idénticos en todas las muestras, a lo largo de 3 y 2 años respectivamente, tiempo suficiente para que se hubiese producido algún tipo de divergencia en las secuencias.

Con la sensibilidad teórica de esta PCR somos capaces de detectar el ADN correspondiente a un parásito, pero en la práctica esta sensibilidad se puede ver afectada por la presencia de ADN exógeno, bien humano, de perro o de flebotomo, cuando trabajamos directamente con muestras clínicas. Por lo tanto, es fundamental el desarrollo de una técnica con la suficiente sensibilidad como para poder trabajar con muestras biológicas, ya que en bastantes ocasiones no es posible cultivar el parásito, los cultivos sufren contaminaciones o la carga parasitaria en la muestra es muy baja. Para ello diseñamos y optimizamos una PCR *seminested*, con dos procesos de amplificación, lo que aumenta enormemente la sensibilidad (kDNA snPCR-RFLP). Nuestro objetivo se centraba en que el producto final amplificado fuese del mayor tamaño posible para realizar posteriormente el análisis de RFLP, por lo que los cebadores de la primera reacción se diseñaron en la región conservada de minicírculos de *L. infantum*, de tal manera que amplificamos todo un minicírculo linearizado (800 pb). Los cebadores de la segunda reacción se diseñaron contiguos a los primeros ofreciendo un fragmento de 780 pb, correspondiente a casi toda la longitud de un minicírculo (**Figura 39**).



**Figura 39.** Esquema de los productos de amplificación y posición de los cebadores en la kDNA snPCR-RFLP.

Es destacable en nuestros resultados el hecho de que al analizar mediante la kDNA snPCR-RFLP 56 cepas de *Leishmania infantum* aisladas y cultivadas a partir de aspirados de médula ósea de pacientes coinfectados y comparar los resultados con la técnica realizada directamente sobre esas mismas muestras biológicas, nunca observamos ninguna diferencia en los patrones de restricción. Es decir, nuestros resultados indican que el cultivo en medio NNN no selecciona de manera alguna posibles subpoblaciones presentes en los aislados originales, más teniendo en cuenta que los cultivos se subpasaron semanalmente a medio fresco durante por lo menos cuatro meses. Lo cual apoya el uso de este tipo de herramientas moleculares más rápidas y que evitan el cultivo, obligatorio, en el análisis por isoenzimas.

## 2. Estudios clínico-epidemiológicos de la coinfección por *Leishmania*/VIH

Disponíamos de 4 cepas de *Leishmania infantum* aisladas de 3 pacientes coinfectados por VIH adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs) que vivían en la misma ciudad (Badalona) y nunca habían viajado fuera de España (**Tabla 2**, pág. 27). El zimodema encontrado en los 4 aislados, MON-253, sólo había sido descrito en un paciente sueco, con una lesión cutánea (Montelius et al., 1998). Los enfermos fueron diagnosticados por el mismo médico entre diciembre de 1997 y marzo de 1998 (tres meses) lo que sugería que se trataba de un brote de leishmaniasis. Los datos de PCR-RFLP confirman este brote ya que los patrones de restricción son idénticos entre los 4 aislados, independientemente de la enzima de digestión que utilizamos, como observamos en la **Figura 25** (ver pág. 54).

Era fundamental comprobar que la identidad de los patrones de restricción era un reflejo de su secuencia nucleotídica, ya que ésto nos permitiría establecer la reproducibilidad y validez de la técnica, tanto para el brote de leishmaniasis estudiado como para futuras aplicaciones. Todas las secuencias alineadas pertenecientes a las cepas de Badalona presentan un altísimo grado de similaridad, con lo que adicionalmente queda demostrado la homología entre los minicírculos (**Figura 26**, pág. 55).

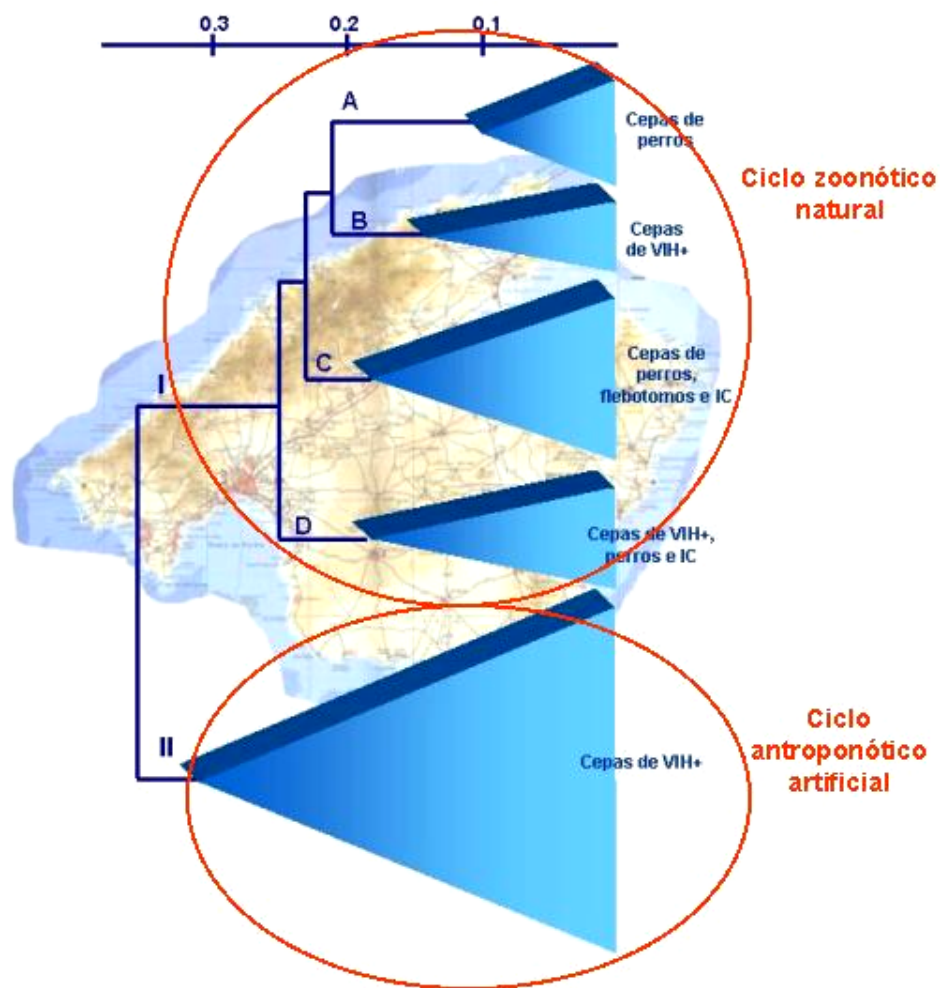
Los datos obtenidos sugieren la posibilidad de que las jeringuillas compartidas entre los tres pacientes ADVPs y residentes en la misma ciudad hayan sustituido al vector natural, el flebotomo, para transmitir las cepas responsables del brote de leishmaniasis detectado. La relación final entre los tres pacientes no puede ser corroborada en toda su extensión debido a la confidencialidad de los datos, lo que confirmaría la transmisión mecánica y antroponótica del parásito.

Ha habido estudios bastante extensos de caracterización isoenzimática de pacientes coinfectados en toda la cuenca mediterránea (Gramiccia et al., 1995; Pratlong et al., 1995; Jiménez et al., 1995a; Jiménez et al., 1995b; Gállego et al., 2002). Las conclusiones principales de estos trabajos son la mayor variabilidad del parásito en estos pacientes, la detección de nuevos zimodemas y la visceralización de zimodemas normalmente cutáneos. Sin embargo, hay escasez de estudios epidemiológicos con herramientas moleculares en nichos ecológicos cerrados, dónde el comportamiento epidemiológico del parásito podría ser distinto, cómo la isla de Mallorca. Sí se disponen de datos fiables respecto a los índices de prevalencia de la leishmaniasis canina en la isla de Mallorca, llegando hasta el 67%, y que reflejan la endemicidad de la enfermedad en esta zona (Solano-Gállego et al., 2001).



La aplicación de la técnica de PCR-RFLP puso de manifiesto la identidad de patrones de restricción entre una cepa aislada de flebotomo y una cepa aislada de perro, con la particularidad de que el flebotomo fue capturado en una trampa colocada en la misma casa donde se encontraba el perro, lo que encaja con el ciclo zoonótico clásico del parásito.

El agrupamiento de cepas de *L. infantum* aisladas de enfermos coinfectados por VIH en un único *cluster* (**Figura 40**), en el que todas las cepas estudiadas procedían de ADVPs, refuerza la idea de la existencia de un ciclo antroponótico y artificial en el que, como ya se ha señalado, las jeringuillas sustituyen a los flebotomos como vectores, y ciertos clones, como en el caso del brote en Badalona, se propagan entre los ADVPs. A diferencia del otro *cluster* (**Figura 40**), que a su vez agrupa a los *clusters* A, B, C y D, que representa el ciclo zoonótico natural, implicando cepas aisladas de perros, flebotomos y humanos (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos por VIH, quienes también están expuestos a la picadura de *Phlebotomus*).



**Figura 40.** Dendrograma construido a partir de los datos de PCR-RFLP poniendo de manifiesto la existencia de dos ciclos de *Leishmania*, uno natural y otro artificial a través de las jeringuillas compartidas.

La técnica de PCR-RFLP también ha revelado una gran variabilidad entre las cepas estudiadas, tanto de perro como humanas, lo que encaja con una posible estructura clonal del parásito en la isla, donde los clones parecen ser estables a lo largo del tiempo. No obstante, para poner de manifiesto con total certeza que *L. infantum* presenta una estructura clonal en Mallorca, necesitaríamos datos de la segregación y recombinación, las dos características fundamentales de la reproducción sexual, y así determinar su ausencia o presencia en la población del parásito (Tibayrenc et al., 1990). Al no disponer de estos datos no se puede concluir si se trata de una estructura clonal o no, pero ésta no es incompatible con la existencia de recombinación genética (Kelly et al., 1991). Se ha sugerido que la reproducción sexual se produce en tan baja frecuencia que no es capaz de alterar el patrón clásico de población clonal. Es más, esta hipótesis no implica que las cepas caracterizadas con el mismo zimodema sean un grupo o unidad heterogénea, sino que están formadas por clones más o menos relacionados, como en el caso del zimodema MON-1, donde la PCR-RFLP pone de manifiesto un gran número de clones distintos.

Si se hubiese producido recombinación genética en la población de *Leishmania infantum* en la isla de Mallorca, como norma general deberíamos haber detectado una mayor variabilidad y un mayor número de *clusters*. Además, la técnica de PCR-RFLP ha puesto de manifiesto la estabilidad temporal de los clones (2-3 años), a pesar de que ha sido descrita una alta tasa de mutación de los minicírculos, situación que sólo es compatible con una estructura clonal de *Leishmania*. La compleja discusión sobre la definición estricta de una población clonal ha llevado a definir nuevos términos como "clonalidad epidémica" (Tibayrenc y Ayala, 1999), en la que hay propagación clonal en especies con reproducción sexual de manera esporádica, en contraste con las definiciones extremas de estructura clonal o sexual, y que podría encajar con el comportamiento observado, a la vista de los resultados, de *Leishmania infantum* en la isla de Mallorca, y que concuerdan con la estructura clonal del parásito descrita por otros autores con cepas aisladas de enfermos coinfectados y de diversa procedencia geográfica (Jiménez et al., 1997).

Como ya se ha apuntado, *L. infantum* es muy variable en individuos coinfectados por VIH, y la caracterización isoenzimática, aunque útil, tiene evidentes limitaciones a la hora de seguir los aislados secuenciales del mismo paciente, ya que la conservación del zimodema antes y después del tratamiento no implica necesariamente que el paciente haya sufrido una recaída.

La PCR-RFLP directa es capaz de confirmar recidivas, previamente caracterizadas isoenzimáticamente, como en el caso de los aislados 1-4 (1 y 2 del paciente A; 3 y 4

del paciente B) de la **Tabla 2** (ver pág. 27), dónde los patrones de restricción se conservan en las muestras tomadas antes y después del tratamiento (**Figura 30**, A y B, pág. 61). Es muy destacable el período de tiempo existente entre los dos aislados del paciente B (3 años) y que confirma la estabilidad ya discutida de los minicírculos. Por otra parte la técnica reveló en los aislados 6 y 7 del paciente coinfectado C (**Tabla 2**), y caracterizados como MON-24, que los patrones de restricción diferían claramente en las muestras tomadas antes y después del tratamiento (**Figura 32**, pág. 62), lo que sugería que el paciente podría haberse reinfectado.

No obstante, para validar este trazador molecular necesitábamos un estudio más amplio y con muchas más muestras para poder confirmar la fiabilidad de la técnica. Además, como ya se discutió, nunca alcanzamos la sensibilidad teórica de la PCR cuando trabajamos con muestras clínicas directamente.

Una vez desarrollada y optimizada una nueva PCR entre 100 y 1000 veces más sensible que la anterior (kDNA sn PCR-RFLP), abordamos el estudio de 256 muestras clínicas (aspirados de médula ósea y sangre periférica) y 56 cepas cultivadas a partir de éstas, aisladas de 40 pacientes coinfectados, y que pertenecían a un ensayo clínico aleatorio y multicéntrico en el que se comparaba la eficacia de la anfotericina B complejo lipídico (Abelcet) frente a antimoniales.

Como esperábamos, la técnica fue mucho más sensible, llegando a detectar y amplificar el ADN correspondiente a 0,01 parásitos. Además, la especificidad probada aseguraba que no se podía amplificar ADN de flagelados no patógenos, que pueden estar presentes en las muestras procedentes de enfermos inmunodeprimidos por VIH y ADVPs, como consecuencia de sus hábitos de inyección de la droga, (Jiménez et al., 1996; Noyes et al., 2002)

Como en el caso de la PCR directa, sólo la clase mayoritaria de minicírculos se encuentra en el producto amplificado y la fiabilidad de los datos queda asegurada también por el uso de las 6 mismas enzimas de restricción (una por digestión). Aún más, la estabilidad de la técnica fue confirmada con el mantenimiento de perfiles en recaídas sucesivas de pacientes coinfectados (**Figura 34**, pág. 63), a lo largo de 2 años.

En este estudio se detectó un cambio en los patrones de restricción en las muestras obtenidas después del tratamiento en 3 pacientes (7.5%) coinfectados por *Leishmania infantum* y VIH como se observa en la **Figura 33** (ver pág. 64), a pesar de que la caracterización isoenzimática predecía una recaída, ya que el zimodema (MON-34, MON-1 y MON-24) se mantenía en todos los aislados. En los tres casos se había determinado erróneamente un fallo terapéutico (**Tabla 4**, pág. 65). Los zimodemas

caracterizados corresponden a aquellos de mayor frecuencia en enfermos inmunodeprimidos (Alvar, 2001), lo que hace más evidente el uso de herramientas discriminatorias y que pongan de manifiesto la variabilidad existente dentro de cada zimodema, que, a su vez, no es una unidad heterogénea como ya ha sido discutido.

El cambio de patrón observado podría ser consecuencia de la detección de poblaciones minoritarias con resistencia innata y que sobreviven tras la quimioterapia, pero, aunque se han descrito infecciones mixtas por distintas especies y por distintos zimodemas dentro de la misma especie, éstas son poco probables. También podríamos especular con la posibilidad de que aunque no ocurran estas infecciones mixtas, sí exista una estructura “mosaico” en la población original, en la que distintos clones, con pequeñas diferencias en su material genético, causan la infección primaria (Bastien et al., 1990). Si este fuese el caso, detectaríamos un cambio en el patrón de restricción que no implicaría una infección de nueva adquisición, sino la detección de un clon específico y cuyo ADN kinetoplastídico es diferente, en cuanto a su secuencia nucleotídica, al clon detectado en la muestra antes del tratamiento. Sin embargo, los estudios de clonalidad del parásito en el caso de los tres pacientes con cambio de patrón demuestran que los clones son idénticos entre sí e idénticos a la cepa parental (**Figura 35**, pág. 66). En total analizamos 33 clones de 3 pacientes (16, 7 y 10 respectivamente), un número significativo para haber detectado algún tipo de estructura mosaico en las muestras iniciales. Por lo tanto, podemos afirmar que los nuevos patrones observados corresponden a la presencia de una nueva cepa de *Leishmania infantum*, es decir que se trata de reinfecciones que han pasado inadvertidas debido a las limitaciones del análisis isoenzimático.

Aunque los pacientes coinfectados por *Leishmania*/VIH tienden a sufrir recidivas después del tratamiento (López-Vélez et al., 1998), el hecho de que la mayoría de estos enfermos sean ADVPs, incrementa el riesgo de reinfección al compartir las jeringuillas, hábito que repiten sucesivamente.

Por lo tanto, la técnica de kDNA snPCR-RFLP se ha mostrado útil, fiable y reproducible para la detección de reinfecciones en pacientes coinfectados, lo que proporcionará mucha más información a los clínicos para determinar si determinadas leishmaniasis que no responden al tratamiento y que se pensaba, por la caracterización isoenzimática, que eran recaídas son, de hecho, reinfecciones.

Puesto que parece evidente la participación de las jeringuillas compartidas entre ADVPs como vector mecánico para la transmisión de la leishmaniasis entre enfermos coinfectados, nos propusimos el objetivo de detectar ADN de *Leishmania* en

estas jeringuillas desechadas. Este análisis sólo era posible una vez que disponíamos de las herramientas de detección y caracterización con la suficiente sensibilidad y reproducibilidad como lo era la kDNA snPCR-RFLP.

El ADN de *Leishmania* fue detectado en 65 jeringuillas (52%) del grupo A y en 52 (34%) del grupo B. Se tomaron todas las medidas para trabajar en condiciones que eviten cualquier tipo de contaminación desde el análisis de blancos de extracción del ADN de la sangre coagulada en las jeringuillas (1 blanco de extracción por cada 8 extracciones) hasta los controles negativos propios de la PCR. Además, el número de muestras positivas obtenidas por esta PCR coincide con los positivos obtenidos por otro miembro del laboratorio, utilizando una diana para la amplificación distinta, en la región ribosomal.

El descenso en los porcentajes desde el 52% (grupo A, año 1998) hasta el 34% (grupo B, período 2000-2001), a pesar de que el estudio no fue estadísticamente diseñado, podría ser consecuencia de la introducción de los programas de intercambio de jeringuillas en España, y más en concreto en la Comunidad de Madrid. En otros países, los programas de intercambio han sido eficaces para reducir la prevalencia del VIH entre ADVPs (Des et al., 1996; Frischer et al., 1996; Henman et al., 1998; Bastos y Strathdee, 2000), por lo que el ejemplo español podría ser válido también para la leishmaniasis, aunque para confirmar en su totalidad esta presunción deberíamos diseñar un estudio epidemiológico riguroso en el que contrastar los datos de prevalencia entre los grupos de jeringuillas.

Otro factor que quizás ha influido directamente en el descenso de los porcentajes ha sido la disminución de los nuevos casos de coinfección en España desde la introducción, en 1997, de la terapia antirretroviral HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*).

La caracterización molecular mediante el uso de kDNA snPCR-RFLP de las jeringuillas del grupo A (**Figura 37**, pág. 70), reveló la presencia de 53 genotipos distintos y únicos, mientras que 12 de las muestras pertenecían a 3 genotipos distintos: 3 pertenecían a un genotipo, otras 3 a otro y las 6 últimas pertenecían al tercero. La presencia de 53 genotipos distintos evidencia que los positivos de PCR no parten de una contaminación de laboratorio, en la cual encontraríamos, invariablemente, un único genotipo. Por otra parte, los genotipos compartidos sugieren la propagación de ciertos clones entre los ADVPs a través de las jeringuillas compartidas. Podemos excluir la posibilidad de que un mismo individuo utilizase secuencialmente varias jeringuillas pues la entrada en el estudio se hizo de forma nominal.

Por último, el análisis de RFLP no se pudo realizar en las jeringuillas del grupo B, debido a sus condiciones de almacenamiento: aunque fuimos capaces de amplificar el

ADN, los productos no tenían el rendimiento suficiente como para obtener unas buenas digestiones.

La alta prevalencia de jeringuillas positivas demostrada en el estudio evidencia, concluyentemente, su papel en la transmisión del parásito. Queda por discutir si la detección de este ADN de *Leishmania* implica también la viabilidad de la infección. Estudios recientes (Morillas-Márquez et al., 2002), apuntan a que es posible la infección, ya que usando jeringuillas para extraer sangre en pacientes coinfectados e inoculando su contenido en animales de laboratorio (ratones Balb/c), han sido capaces de reproducir la infección.

## REFERENCES

- Alvar, J. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Laboratorios Intervet, Salamanca.
- Angelici, M.C., Gramiccia, M., and Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99 Pt 3**, 301-309.
- Banuls, A.L., Brisse, S., Sidibe, I., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1999). A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitol. (Praha)*, **46**, 10-14.
- Bastien, P., Blaineau, C., Taminh, M., Rioux, J.A., Roizes, G., and Pages, M. (1990). Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a 'mosaic' strain structure. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **40**, 53-61.
- Bastos, F.I. and Strathdee, S.A. (2000). Evaluating effectiveness of syringe exchange programmes: current issues and future prospects. *Soc. Sci. Med.*, **51**, 1771-1782.
- Bhattacharyya, R., Singh, R., Hazra, T.K., and Majumder, H.K. (1993). Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *FEMS Microbiol. Lett.*, **114**, 99-104.
- Breniere, S.F., Telleria, J., Bosseno, M.F., Buitrago, R., Bastrenta, B., Cuny, G., Banuls, A.L., Brewster, S., and Barker, D.C. (1999). Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop.*, **73**, 283-293.
- Brewster, S. and Barker, D.C. (1999). The ATPase subunit 6 gene sequence predicts that RNA editing is conserved between lizard- and human-infecting *Leishmania*. *Gene*, **235**, 77-84.
- Brewster, S. and Barker, D.C. (2002). Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S55-S63.
- Briones, M.R., Nelson, K., Beverley, S.M., Affonso, H.T., Camargo, E.P., and Floeter-Winter, L.M. (1992). *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **53**, 121-127.
- Cupolillo, E., Grimaldi, J.G., Momen, H., and Beverley, S.M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 145-155.
- Cupolillo, E., Pereira, L.O., Fernandes, O., Catanho, M.P., Pereira, J.C., Medina-Acosta, E., and Grimaldi, G., Jr. (1998). Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**, 677-683.
- De Bruijn, M.H. and Barker, D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, **52**, 45-58.
- Des, J., Marmor, M., Paone, D., Titus, S., Shi, Q., Perlis, T., Jose, B., and Friedman, S.R. (1996). HIV incidence among injecting drug users in New York City syringe-exchange programmes. *Lancet*, **348**, 987-991.
- Eresh, S., McCallum, S.M., and Barker, D.C. (1994). Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, **109 ( Pt 4)**, 423-433.
- Frischer, M., Taylor, A., Goldberg, D., and Elliott, L. (1996). Direct evaluation of needle and syringe exchange programmes. *Lancet*, **347**, 768.

Gallego,M., Pratlong,F., Riera,C., Munoz,C., Ribera,E., Fisa,R., Rioux,J.A., Dedet,J.P., and Portus,M. (2002). Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96**, 45-47.

Gramiccia,M., Gradoni,L., and Troiani,M. (1995). Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 33-38.

Gutierrez-Solar,B., Smyth,A.J., Alvar,J., and Barker,D.C. (1995). *Leishmania infantum*: sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distance. *Exp. Parasitol.*, **81**, 416-419.

Hanafi,R., Barhoumi,M., Ali,S.B., and Guizani,I. (2001). Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp. Parasitol.*, **98**, 90-99.

Henman,A.R., Paone,D., Des,J., Kochems,L.M., and Friedman,S.R. (1998). Injection drug users as social actors: a stigmatized community's participation in the syringe exchange programmes of New York City. *AIDS Care*, **10**, 397-408.

Hide,M., Banuls,A.L., and Tibayrenc,M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, **123**, 425-432.

Jackson,P.R., Lawrie,J.M., Stiteler,J.M., Hawkins,D.W., Wohlhieter,J.A., and Rowton,E.D. (1986). Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet. Parasitol.*, **20**, 195-215.

Jimenez,M., Alvar,J., and Tibayrenc,M. (1997). *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS*, **11**, 569-573.

Jimenez,M., Ferrer-Dufol,M., Canavate,C., Gutierrez-Solar,B., Molina,R., Laguna,F., Lopez-Velez,R., Cercenado,E., Dauden,E., Blazquez,J., and . (1995a). Variability of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 197-204.

Jimenez,M.I., Laguna,F., de la,T.F., Solis,F., Pratlong,F., and Alvar,J. (1995b). New *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**, 33.

Jimenez,M.I., Lopez-Velez,R., Molina,R., Canavate,C., and Alvar,J. (1996). HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet*, **347**, 264-265.

Kelly,J.M., Law,J.M., Chapman,C.J., Van Eys,G.J., and Evans,D.A. (1991). Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **46**, 253-263.

Lambson,B. and Barker,D.C. (2002). Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S75-S80.

Lambson,B., Smyth,A., and Barker,D. (1999). Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **101**, 229-232.

Lopez-Velez,R., Perez-Molina,J.A., Guerrero,A., Baquero,F., Villarrubia,J., Escribano,L., Bellas,C., Perez-Corral,F., and Alvar,J. (1998). Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**, 436-443.

Meunier,J.R. and Grimont,P.A. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, **144**, 373-379.



- Montelius,S., Maasho,K., Pratlong,F., Lebbad,M., Gregory,L., and Akuffo,H. (1998). Skin rash for 15 years. *Lancet*, **352**, 1438.
- Morel,C. and Simpson,L. (1980). Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1070-1074.
- Morillas-Marquez,F., Martin-Sanchez,J., Acedo-Sanchez,C., Pineda,J.A., Macias,J., and Sanjuan-Garcia,J. (2002). Leishmania infantum (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from Infected Patients to Experimental Animal under Conditions That Simulate Needle-Sharing. *Exp. Parasitol.*, **100**, 71-74.
- Noyes,H., Pratlong,F., Chance,M., Ellis,J., Lanotte,G., and Dedet,J.P. (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus Leishmania ss. *Parasitology*, **124**, 17-24.
- Noyes,H.A., Belli,A.A., and Maingon,R. (1996). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for Leishmania identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 98-105.
- Noyes,H.A., Reyburn,H., Bailey,J.W., and Smith,D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2877-2881.
- Pacheco,R.S., Martinez,J.E., Valderrama,L., Momen,H., and Saravia,N.G. (1995). Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **69**, 197-209.
- Pratlong,F., Dedet,J.P., Marty,P., Portus,M., Deniau,M., Dereure,J., Abranches,P., Reynes,J., Martini,A., Lefebvre,M., and . (1995). Leishmania-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the Leishmania infantum complex. *J. Infect. Dis.*, **172**, 323-326.
- Rodgers,M.R., Popper,S.J., and Wirth,D.F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Exp. Parasitol.*, **71**, 267-275.
- Rogers,W.O. and Wirth,D.F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of Leishmania mexicana amazonensis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**, 1-8.
- Salotra,P., Sreenivas,G., Pogue,G.P., Lee,N., Nakhasi,H.L., Ramesh,V., and Negi,N.S. (2001). Development of a species-specific PCR assay for detection of Leishmania donovani in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 849-854.
- Saravia,N.G., Weigle,K., Segura,I., Giannini,S.H., Pacheco,R., Labrada,L.A., and Goncalves,A. (1990). Recurrent lesions in human Leishmania braziliensis infection--reactivation or reinfection? *Lancet*, **336**, 398-402.
- Singh,B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int. J. Parasitol.*, **27**, 1135-1145.
- Smyth,A.J., Ghosh,A., Hassan,M.Q., Basu,D., De Bruijn,M.H., Adhya,S., Mallik,K.K., and Barker,D.C. (1992). Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105 ( Pt 2)**, 183-192.
- Sogin,M.L., Elwood,H.J., and Gunderson,J.H. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 1383-1387.

Solano-Gallego,L., Morell,P., Arboix,M., Alberola,J., and Ferrer,L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 560-563.

Spithill,T.W. and Grumont,R.J. (1984). Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **12**, 217-236.

Tibayrenc,M. and Ayala,F.J. (1999). Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes. Infect.*, **1**, 465-472.

Tibayrenc,M., Kjellberg,F., and Ayala,F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 2414-2418.

Tibayrenc,M., Neubauer,K., Barnabe,C., Guerrini,F., Skarecky,D., and Ayala,F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 1335-1339.

Toledo,A., Martin-Sanchez,J., Pesson,B., Sanchiz-Marin,C., and Morillas-Marquez,F. (2002). Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **119**, 257-264.

Weigle,K.A., Labrada,L.A., Lozano,C., Santrich,C., and Barker,D.C. (2002). PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 601-606.

1. La técnica de PCR-RFLP directa permite, con un alto grado de especificidad, seguir aislados secuenciales de *Leishmania infantum* en enfermos coinfectados por el VIH, solventando las limitaciones del análisis isoenzimático.
2. La PCR-RFLP es una técnica altamente fiable y reproducible, ya que el uso de seis enzimas de restricción con dianas distintas asegura la identidad de los perfiles obtenidos, es decir, de los aislados.
3. La técnica de PCR-RFLP directa se ha mostrado útil para la confirmación de un brote de leishmaniasis entre ADVPs.
4. Un marcador traza como éste es válido para contestar a cuestiones epidemiológicas, como aquellas derivadas del estudio en la isla de Mallorca donde, a partir de los patrones de restricción obtenidos, hemos sido capaces de establecer *clusters* específicos con clones de *Leishmania infantum*, que han revelado la coexistencia de un ciclo antroponótico con el zoonótico convencional.
5. La técnica de kDNA snPCR-RFLP, además de las ventajas que tiene la técnica directa, añade su alta sensibilidad, lo que permite trabajar directamente con muestras clínicas de pacientes coinfectados por *Leishmania*/VIH.
6. La aplicación de la técnica de kDNA snPCR-RFLP ha permitido distinguir claramente entre reinfecciones y recidivas en un estudio amplio (40 pacientes coinfectados, 256 muestras clínicas y 56 cepas cultivadas), mostrándose como una herramienta de elección y complementaria al análisis isoenzimático. Esto proporciona más información a los clínicos para determinar si determinadas leishmaniasis que no responden al tratamiento no son recaídas, sino reinfecciones.
7. La técnica de kDNA snPCR-RFLP ha sido muy útil para la detección de *Leishmania* en jeringuillas desechadas por ADVPs, poniendo de manifiesto la alta prevalencia del parásito en estas poblaciones, hallazgo que culmina la idea de la coexistencia de un ciclo antroponótico artificial, dónde las jeringuillas sustituyen al flebotomo como vector mecánico, con el ciclo zoonótico natural.

- Aljeboori,T.I. and Evans,D.A. (1980). *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 178-184.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Alvar,J. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Laboratorios Intervet, Salamanca.
- Alvar,J., Cañavate,C., Gutiérrez-Solar,B., Jiménez,M., Laguna,F., López-Vélez,R., Molina,R., and Moreno,J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 298-319.
- Alvar,J., Gutiérrez-Solar,B., Pachón,I., Calbacho,E., Ramírez,M., Vallés,R., Guillén,J.L., Cañavate,C., and Amela,C. (1996). AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.*, **14**, 541-546.
- Alvar,J. and Jiménez,M. (1994). Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS*, **8**, 854.
- Álvarez,F., Robello,C., and Vignali,M. (1994). Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 790-802.
- Angelici,M.C., Gramiccia,M., and Gradoni,L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99 Pt 3**, 301-309.
- Arrébola,R., Olmo,A., Reche,P., Garvey,E.P., Santi,D.V., Ruiz-Pérez,L.M., and González-Pacanowska,D. (1994). Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10590-10596.
- Arts,G.J. and Benne,R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 39-54.
- Balana-Fouce,R., Reguera,R.M., Cubría,J.C., and Ordóñez,D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.*, **30**, 435-443.
- Banuls,A.L., Brisse,S., Sidibé,I., Noël,S., and Tibayrenc,M. (1999). A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitol. (Praha)*, **46**, 10-14.
- Barker,D.C. (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, **3**, 177-184.
- Barker,D.C. and Arnot,D.E. (1981). Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **3**, 33-46.
- Barker,D.C. and Butcher,J. (1983). The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**, 285-297.
- Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1997a). Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, **85**, 274-282.
- Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., and Robert-Gero,M. (1998). Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.*, **70**, 43-61.

- Basselin,M., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.*, **315** ( Pt 2), 631-634.
- Basselin,M., Lawrence,F., and Robert-Gero,M. (1997b). Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitol. Res.*, **83**, 413-418.
- Basselin,M. and Robert-Gero,M. (1998). Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol. Res.*, **84**, 78-83.
- Bastien,P., Blaineau,C., Taminh,M., Rioux,J.A., Roizès,G., and Pagès,M. (1990). Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a 'mosaic' strain structure. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **40**, 53-61.
- Bastien,P. and Wahba,M.A. (1989). A simplification of the technique for cloning *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **83**, 435-437.
- Bastos,F.I. and Strathdee,S.A. (2000). Evaluating effectiveness of syringe exchange programmes: current issues and future prospects. *Soc. Sci. Med.*, **51**, 1771-1782.
- Benne,R., De Vries,B.F., Van den,B.J., and Klaver,B. (1983). The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6925-6941.
- Berman,J.D. (1988). Inhibition of leishmanial protein kinase by antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**, 298-303.
- Berman,J.D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, **24**, 684-703.
- Berman,J.D., Edwards,N., King,M., and Grogl,M. (1989). Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**, 159-164.
- Berman,J.D., Holz,G.G., Jr., and Beach,D.H. (1984). Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **12**, 1-13.
- Beverley,S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 417-444.
- Bhattacharyya,R., Singh,R., Hazra,T.K., and Majumder,H.K. (1993). Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *FEMS Microbiol. Lett.*, **114**, 99-104.
- Blackwell,J.M. (1992). Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, **104** Suppl, S19-S34.
- Borst,P. and Ouellette,M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 427-460.
- Brenière,S.F., Telleria,J., Bosseno,M.F., Buitrago,R., Bastrenta,B., Cuny,G., Bañuls,A.L., Brewster,S., and Barker,D.C. (1999). Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop.*, **73**, 283-293.
- Brewster,S. and Barker,D.C. (1999). The ATPase subunit 6 gene sequence predicts that RNA editing is conserved between lizard- and human-infecting *Leishmania*. *Gene*, **235**, 77-84.

- Brewster,S. and Barker,D.C. (2002). Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S55-S63.
- Briones,M.R., Nelson,K., Beverley,S.M., Affonso,H.T., Camargo,E.P., and Floeter-Winter,L.M. (1992). *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **53**, 121-127.
- Campino,L., Santos-Gomes,G., Pratlong,F., Dedet,J.P., and Abranches,P. (1994). HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **88**, 394.
- Chang,K.P., Fong,D., and Bray,R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. *Leishmaniasis*, ., pp. 1-30.
- Chicharro,C., Sirera,G., Ares,M., Sans,A., Videla,S., and Alvar,J. (1999). Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253 involved in an outbreak among intravenous drug users? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **93**, 385-386.
- Chiquero,M.J., Pérez-Victoria,J.M., O'Valle,F., González-Ros,J.M., del Moral,R.G., Ferragut,J.A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 131-139.
- Croft,S.L. (2001). Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, **6**, 899-905.
- Croft,S.L., Snowdon,D., and Yardley,V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **38**, 1041-1047.
- Croft,S.L. and Yardley,V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des*, **8**, 319-342.
- Cruz,I., Cañavate,C., Rubio,J.M., Morales,M.A., Chicharro,C., Laguna,F., Jiménez-Mejías,M., Sirera,G., Videla,S., and Alvar,J. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S185-S189.
- Cupolillo,E., Grimaldi,J.G., Momen,H., and Beverley,S.M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 145-155.
- Cupolillo,E., Pereira,L.O., Fernandes,O., Catanho,M.P., Pereira,J.C., Medina-Acosta,E., and Grimaldi,G., Jr. (1998). Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**, 677-683.
- Davidson,R.N., di Martino,L., Gradoni,L., Giacchino,R., Russo,R., Gaeta,G.B., Pempinello,R., Scott,S., Raimondi,F., Cascio,A., and . (1994). Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q. J. Med.*, **87**, 75-81.
- De Bruijn,M.H. and Barker,D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, **52**, 45-58.
- de la Loma ,L.A., Alvar,J., Martínez,G.E., Blázquez,J., Alcalá,M.A., and Nájera,R. (1985). Leishmaniasis or AIDS? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 421-422.
- Dedet,J.P. (1990). Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**, 25-28.

- Dedet, J.P. (1993). *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de l'Institut Pasteur*, **4**, 3-25.
- Dedet, J.P. and Pratlong, F. (2000). *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**, 37-39.
- Des, J., Marmor, M., Paone, D., Titus, S., Shi, Q., Perlis, T., Jose, B., and Friedman, S.R. (1996). HIV incidence among injecting drug users in New York City syringe-exchange programmes. *Lancet*, **348**, 987-991.
- Desjeux, P., Piot, B., O'Neill, K., and Meert, J.P. (2001). [Co-infections of *leishmania*/HIV in south Europe]. *Med. Trop. (Mars.)*, **61**, 187-193.
- Desjeux, P. and UNAIDS (1998). *Leishmania* and HIV grid-lock. *WHO/CTD/LEISH/98*. 9, *UNAIDS/98*. 23.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 121-138.
- Eresh, S., McCallum, S.M., and Barker, D.C. (1994). Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, **109 ( Pt 4)**, 423-433.
- Evans, D.A., Godfrey, D., Lanham, S.M., Lanotte, G., Modabber, F., and Schnur, L.F. (1989). Characterization of *Leishmania*. In Evans, D.A. (Ed.), *Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania*, Geneva, Switzerland, pp. 1-45.
- Evans, D.A., Lanham, S.M., Baldwin, C.I., and Peters, W. (1984). The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 35-42.
- Frischer, M., Taylor, A., Goldberg, D., and Elliott, L. (1996). Direct evaluation of needle and syringe exchange programmes. *Lancet*, **347**, 768.
- Gllago, M., Pratlong, F., Riera, C., Muñoz, C., Ribera, E., Fisa, R., Rioux, J.A., Dedet, J.P., and Portus, M. (2002). Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96**, 45-47.
- Gangneux, J.P. and Marty, P. (2001). [Treatment of visceral leishmaniasis: efficacy and limits of miltefosine]. *Sante*, **11**, 257-258.
- Goodyer, I.D., Towner, P., and Hayes, D.J. (1991). The use of nested PCR and Southern blotting to confirm the presence of actin in *Plasmodium yoelli*. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 419S.
- Gradoni, L. and Gramiccia, M. (1994). *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitol Today*, **10**, 264-267.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., and Troiani, M. (1992). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 161-163.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., and Troiani, M. (1995). Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 33-38.
- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ismail, R.B., Le Ray, D., and Dujardin, J.C. (2001). Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology*, **122 Pt 1**, 25-35.

- Gutiérrez-Solar, B., Smyth, A.J., Alvar, J., and Barker, D.C. (1995). *Leishmania infantum*: sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distance. *Exp. Parasitol.*, **81**, 416-419.
- Hammond, D.J. and Gutteridge, W.E. (1984). Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **13**, 243-261.
- Hanafi, R., Barhoumi, M., Ali, S.B., and Guizani, I. (2001). Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp. Parasitol.*, **98**, 90-99.
- Handman, E. (2000). Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.*, **44**, 1-39.
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodríguez, B., and Agabian, N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1989-1995.
- Henman, A.R., Paone, D., Des, J., Kochems, L.M., and Friedman, S.R. (1998). Injection drug users as social actors: a stigmatized community's participation in the syringe exchange programmes of New York City. *AIDS Care*, **10**, 397-408.
- Hide, M., Banuls, A.L., and Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, **123**, 425-432.
- Ilg, T., Harbecke, D., and Overath, P. (1993). The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett.*, **327**, 103-107.
- Jackson, P.R., Lawrie, J.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohlhieter, J.A., and Rowton, E.D. (1986). Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet. Parasitol.*, **20**, 195-215.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A., and Berman, J. (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1795-1800.
- Jiménez, M., Alvar, J., and Tibayrenc, M. (1997). *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS*, **11**, 569-573.
- Jiménez, M., Ferrer-Dufol, M., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Molina, R., Laguna, F., López-Vélez, R., Cercenado, E., Dauden, E., Blázquez, J., and . (1995a). Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 197-204.
- Jiménez, M.I., Laguna, F., de la, T.F., Solís, F., Pratlong, F., and Alvar, J. (1995b). New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**, 33.
- Jiménez, M.I., López-Vélez, R., Molina, R., Cañavate, C., and Alvar, J. (1996). HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet*, **347**, 264-265.
- Johnson, R., Cubría, J.C., Reguera, R.M., Balana-Fouce, R., and Ordóñez, D. (1998). Interaction of cationic diamidines with *Leishmania infantum* DNA. *Biol. Chem.*, **379**, 925-930.
- Kaur, K., Coons, T., Emmett, K., and Ullman, B. (1988). Methotrexate-resistant *Leishmania donovani* genetically deficient in the folate-methotrexate transporter. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7020-7028.



Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J., and Evans, D.A. (1991). Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **46**, 253-263.

Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., and Ashford, R.W. (1974). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **187**, 409-419.

Laguna, F., López-Vélez, R., Pulido, F., Salas, A., Torre-Cisneros, J., Torres, E., Medrano, F.J., Sanz, J., Pico, G., Gómez-Rodrigo, J., Pasquau, J., and Alvar, J. (1999). Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. *AIDS*, **13**, 1063-1069.

Laguna, F., Videla, S., Jiménez-Mejías, E., Sirera, G., Torres-Cisneros, J., Ribera, E., and Alvar, J. Amphotericin B Lipid Complex vs Meglumine Antimoniate in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in HIV- Infected Patients: A Multicenter, Open Label, Blinded, Randomization, Parallel Controlled Clinical Trial. Abstract 33[8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections]. 2001. 4-2-2001.

Ref Type: Generic

Lainson, R., Ready, P.D., and Shaw, J.J. (1979). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **206**, 307-318.

Lainson, R., Ryan, L., and Shaw, J.J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**, 421-424.

Lainson, R. and Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1., Academic Press, London, pp. 1-120.

Lambson, B. and Barker, D.C. (2002). Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96 Suppl 1**, S75-S80.

Lambson, B., Smyth, A., and Barker, D. (1999). Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **101**, 229-232.

Lambson, B., Smyth, A., and Barker, D.C. (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.*, **94**, 15-22.

Lanotte, G. and Rioux, J.A. (1990). [Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)]. *C. R. Acad. Sci. III*, **310**, 285-288.

Lanotte, G., Rioux, J.A., Maazoun, R., Pasteur, N., Pratlong, F., and Lepart, J. (1981). [The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author'transl)]. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, **56**, 575-591.

Lee, S.T., Tarn, C., and Chang, K.P. (1993). Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 187-203.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, **27**, 37-58.

- Li, J., Sutterwala, S., and Farrell, J.P. (1997). Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. *Infect. Immun.*, **65**, 3225-3230.
- López, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarría, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., and Arévalo, J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 348-356.
- López-Vélez, R., Pérez-Molina, J.A., Guerrero, A., Baquero, F., Villarrubia, J., Escribano, L., Bellas, C., Pérez-Corral, F., and Alvar, J. (1998). Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**, 436-443.
- Lumsden, W.H. (1977). Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **57**, 361-368.
- Marker, C.L. and Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **45**, 753-763.
- Martínez, P., de, I., V., Laguna, F., Soriano, V., Puente, S., Moreno, V., Sentchordi, M.J., García-Aguado, C., and González-Lahoz, J. (1993). Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *AIDS*, **7**, 227-230.
- Mauricio, I.L., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., and Miles, M.A. (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*, **122**, 393-403.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 821-853.
- Medrano, F.J., Hernández-Quero, J., Jiménez, E., Pineda, J.A., Rivero, A., Sánchez-Quijano, A., Vélez, I.D., Viciano, P., Castillo, R., Reyes, M.J., and . (1992). Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS*, **6**, 1499-1503.
- Mesa-Valle, C.M., Moraleta, V., Lazuen, J., Craciunescu, D., and Osuna, A. (1997). Action of new organometallic complexes against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 47-57.
- Meunier, J.R. and Grimont, P.A. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, **144**, 373-379.
- Miles, M.A., Pova, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., and Shaw, J.J. (1980). Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 243-252.
- Molina, R., Cañavate, C., Cercenado, E., Laguna, F., López-Vélez, R., and Alvar, J. (1994). Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS*, **8**, 277-279.
- Montelius, S., Maasho, K., Pratlong, F., Lebbad, M., Gregory, L., and Akuffo, H. (1998). Skin rash for 15 years. *Lancet*, **352**, 1438.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J., and Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 6810-6814.
- Morel, C. and Simpson, L. (1980). Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1070-1074.

- Morillas-Márquez,F., Martín-Sánchez,J., Acedo-Sánchez,C., Pineda,J.A., Macías,J., and Sanjuan-García,J. (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from Infected Patients to Experimental Animal under Conditions That Simulate Needle-Sharing. *Exp. Parasitol.*, **100**, 71-74.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nabors,G.S., Afonso,L.C., Farrell,J.P., and Scott,P. (1995). Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **92**, 3142-3146.
- Noyes,H., Pratlong,F., Chance,M., Ellis,J., Lanotte,G., and Dedet,J.P. (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitology*, **124**, 17-24.
- Noyes,H.A., Belli,A.A., and Maingon,R. (1996). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 98-105.
- Noyes,H.A., Reyburn,H., Bailey,J.W., and Smith,D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2877-2881.
- Opperdoes,F.R. and Michels,P.A. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie*, **75**, 231-234.
- Pacheco,R.S., Martínez,J.E., Valderrama,L., Momen,H., and Saravia,N.G. (1995). Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **69**, 197-209.
- Panton,L.J., Tesh,R.B., Nadeau,K.C., and Beverley,S.M. (1991). A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J. Protozool.*, **38**, 224-228.
- Pearson,W.R. and Lipman,D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **85**, 2444-2448.
- Pimenta,P.F., Turco,S.J., McConville,M.J., Lawyer,P.G., Perkins,P.V., and Sacks,D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**, 1812-1815.
- Pratlong,F., Dedet,J.P., Marty,P., Portus,M., Deniau,M., Dereure,J., Abranches,P., Reynes,J., Martini,A., Lefebvre,M., and . (1995). *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J. Infect. Dis.*, **172**, 323-326.
- Ramos,H., Saint-Pierre-Chazalet,M., Bolard,J., and Cohen,B.E. (1994). Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1079-1084.
- Ribera,E., Cucurull,E., Ocana,I., Vallespi,T., Gasser,I., and Juste,C. (1995). [Visceral leishmaniasis in patients with HIV infection]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **13**, 73-79.

- Rioux,J.A., Lanotte,G., Serres,E., Pratlong,F., Bastien,P., and Perieres,J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, 111-125.
- Rivas,L., Kahl,L., Manson,K., and McMahon-Pratt,D. (1991). Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **47**, 235-243.
- Rodgers,M.R., Popper,S.J., and Wirth,D.F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, **71**, 267-275.
- Rodríguez,N., De Lima,H., Rodríguez,A., Brewster,S., and Barker,D.C. (1997). Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology*, **115 ( Pt 4)**, 349-358.
- Rodríguez,N., Guzmán,B., Rodas,A., Takiff,H., Bloom,B.R., and Convit,J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2246-2252.
- Rogers,W.O. and Wirth,D.F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**, 1-8.
- Russo,R., Nigro,L.C., Minniti,S., Montineri,A., Gradoni,L., Caldeira,L., and Davidson,R.N. (1996). Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J. Infect.*, **32**, 133-137.
- Sacks,D.L., Kenney,R.T., Kreutzer,R.D., Jaffe,C.L., Gupta,A.K., Sharma,M.C., Sinha,S.P., Neva,F.A., and Saran,R. (1995). Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet*, **345**, 959-961.
- Sacks,D.L. and Perkins,P.V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**, 1417-1419.
- Saf'janova,V.M. (1982). Classification of the genus *Leishmania*. *Protozoology, Part 7*, . URSS All Union Society of Protozoologists, Leningrad, pp. 219-220.
- Saiki,R.K., Bugawan,T.L., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, **324**, 163-166.
- Salotra,P., Sreenivas,G., Pogue,G.P., Lee,N., Nakhasi,H.L., Ramesh,V., and Negi,N.S. (2001). Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 849-854.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez,A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1994). Increased P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to methotrexate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 855-861.
- Saravia,N.G., Weigle,K., Segura,I., Giannini,S.H., Pacheco,R., Labrada,L.A., and Gonçalves,A. (1990). Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? *Lancet*, **336**, 398-402.
- Scott,P., Natovitz,P., Coffman,R.L., Pearce,E., and Sher,A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, **168**, 1675-1684.

- Simpson, L. (1979). Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **76**, 1585-1588.
- Simpson, L., Simpson, A.M., Kidane, G., Livingston, L., and Spithill, T.W. (1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1053-1063.
- Singh, B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int. J. Parasitol.*, **27**, 1135-1145.
- Singh, N. and Rastogi, A.K. (1999). Kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania donovani* express a protein product. *Biochim. Biophys. Acta*, **1444**, 263-268.
- Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., Basu, D., De Bruijn, M.H., Adhya, S., Mallik, K.K., and Barker, D.C. (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105 ( Pt 2)**, 183-192.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., do, R., V, Thaithong, S., and Brown, K.N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**, 315-320.
- Sogin, M.L., Elwood, H.J., and Gunderson, J.H. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **83**, 1383-1387.
- Solano-Gállego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 560-563.
- Spithill, T.W. and Grumont, R.J. (1984). Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **12**, 217-236.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Lesser, M.L., and Murray, H.W. (1995). Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **171**, 992-996.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., and Serres, E. (1993a). Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **68**, 107-108.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., and Serres, E. (1993b). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **68**, 104-106.
- Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. (1999). Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes. Infect.*, **1**, 465-472.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., and Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **87**, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., and Ayala, F.J. (1991). Clonal defence. *Nature*, **350**, 385-386.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D., and Ayala, F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **90**, 1335-1339.
- Toledo, A., Martín-Sánchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marín, C., and Morillas-Márquez, F. (2002). Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **119**, 257-264.

- Turco,S.J. and Descoteaux,A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 65-94.
- Van der Ploeg,L.H., Cornelissen,A.W., Barry,J.D., and Borst,P. (1984). Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.*, **3**, 3109-3115.
- van Eys,G.J., Guizani,I., Ligthart,G.S., and Dellagi,K. (1991). A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Exp. Parasitol.*, **72**, 459-463.
- Vercesi,A.E. and Docampo,R. (1992). Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.*, **284 ( Pt 2)**, 463-467.
- Vickerman,K. and Preston,T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.*, **6**, 365-383.
- Victoir,K., Bañuls,A.L., Arévalo,J., Llanos-Cuentas,A., Hamers,R., Noël,S., De Doncker,S., Le Ray,D., Tibayrenc,M., and Dujardin,J.C. (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology*, **117 ( Pt 1)**, 1-13.
- Villanueva,J.L., Alarcón,A., Bernabeu-Wittel,M., Cordero,E., Prados,D., Regordán,C., and Alvar,J. (2000). Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **19**, 798-801.
- Walters,L.L. (1993). *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 196-206.
- Weigle,K.A., Labrada,L.A., Lozano,C., Santrich,C., and Barker,D.C. (2002). PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 601-606.
- WHO (1995). *Report on the consultative meeting on Leishmania/HIV coinfection*. WHO, Roma.
- WHO (2000). *Leishmania/HIV coinfection: south-western Europe 1990-1998*. WHO, Geneva.
- Williams,J.G., Kubelik,A.R., Livak,K.J., Rafalski,J.A., and Tingey,S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
- Wong,A.K. (1995). Molecular genetics of the parasitic protozoan *Leishmania*. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 235-240.

**Anexo**

## Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*

M. A. Morales<sup>1</sup>, C. Chicharro<sup>1</sup>, M. Ares<sup>1</sup>, C. Cañavate<sup>1</sup>, D. C. Barker<sup>2</sup> and J. Alvar<sup>1</sup> <sup>1</sup>WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Research Unit in Tropical Medicine and International Health (FIS-ISCIII), Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Molteno Laboratories, Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QP, UK

### Abstract

*Leishmania infantum* is a major opportunistic parasite in patients with acquired immune deficiency syndrome and is very variable in these subjects. Isoenzyme characterization is not able to explain this variability, since half of the stocks isolated from patients co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania* belong to zymodeme MON-1. Amplification of *L. infantum* minicircles by the polymerase chain reaction (PCR) and digestion of the amplified product to reveal restriction fragment length polymorphisms (RFLP) has proved very useful in distinguishing between relapses and reinfections in co-infected, treated patients. We have confirmed the existence of a leishmaniasis outbreak among intravenous drug users in north-east Spain, previously detected by isoenzymatic analysis. We have documented persistence of the same strain of *Leishmania* in 2 treated co-infected patients throughout several years, regardless of the theoretical rapid evolution ascribed to kinetoplast deoxyribonucleic acid minicircle sequences. We suggest using this PCR-RFLP technique to detect reinfections in treated co-infected subjects.

**Keywords:** leishmaniasis, *Leishmania infantum*, zymodeme, isoenzyme classification, restriction fragment length polymorphism, human immunodeficiency virus, Spain

### Introduction

*Leishmania infantum* is responsible for both cutaneous and visceral forms of leishmaniasis in the Mediterranean basin and has been shown to be a major opportunistic parasite in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In these countries, up to 70% of adult cases of visceral leishmaniasis are associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection, and up to 9% of people with AIDS suffer from newly acquired or reactivated visceral leishmaniasis (ALVAR *et al.*, 1997).

Enzymatic characterization of *Leishmania* isolates from individuals infected with HIV has shown the high variability of *L. infantum* in such patients (JIMÉNEZ *et al.*, 1995). Isoenzyme characterization of sequential isolates from the same individual has shown that they belong to the same zymodeme, but this does not reveal whether infections are due to relapses or reinfections, since half of the isolates belong to a single zymodeme, MON-1. However, molecular characterization of isolates would overcome this limitation, making it possible to evaluate the efficacy of a given drug and to gain a better understanding of the epidemiology of *Leishmania*/HIV co-infection. Analysis of kinetoplast deoxyribonucleic acid (kDNA) with the aid of restriction endonucleases has been previously described (ARNOT & BARKER, 1981; ANGELICI *et al.*, 1989) and it yields 'fingerprint' patterns useful in identifying strains, and grouping them into schizodemes, but this method necessitates mass culturing to get enough kDNA, which is expensive and time-consuming.

The kinetoplast contains approximately 10 000 minicircles of DNA, which are between 600 and 800 base pairs (bp) in size in the genus *Leishmania*. These minicircles are distributed among about 10 different sequence classes. The number of minicircles in each class is variable (BARKER, 1987). The minicircle is divided into a conserved region of c. 120 bp and a variable region of c. 600 bp. This conserved region is an ideal target for the polymerase chain reaction (PCR), which can be performed on total DNA, circumventing the need to

separate kDNA from nuclear DNA which is time-consuming, expensive and uses some reagents which are carcinogenic.

We describe a useful molecular technique that permits us to distinguish between relapses and reinfections in co-infected patients, as well as determining the genotypes of strains isolated from humans. The technique is based on the high specificity of 2 primers, AJS31 and DBY (SMYTH *et al.*, 1992), for the conserved region of *L. infantum* minicircles, the amplification of the whole minicircle, and a later restriction enzyme digestion of the amplified product to produce restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles.

The results have important epidemiological implications, and we have confirmed an outbreak of leishmaniasis among intravenous drug users in north-east Spain (Badalona, near Barcelona), previously detected by isoenzymatic analysis (CHICHARRO *et al.*, 1999). We have observed the presence of strains maintaining similar, if not identical, genotypes throughout several years in treated, co-infected patients, indicating the inadequacy of the treatment used. We also report a patient co-infected with *Leishmania* and HIV, whose isolates before and after chemotherapy exhibited a different restriction pattern (despite both belonging to the same zymodeme), suggesting the possibility of reinfection rather than a relapse.

### Materials and methods

#### Parasite stocks

Ten isolates of *L. infantum* were obtained from bone marrow of 6 intravenous drug users (A–F) co-infected with HIV from different regions of Spain (Table). Two isolates were obtained from each of 4 patients (A–D), before and after treatment in the case of patients A–C. Isolates 7–10, from patients D, E and F, all originated from the outbreak in Badalona within a period of 4 months (CHICHARRO *et al.*, 1999).

All stocks were isolated in NNN medium and maintained at 27°C in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum.

#### Preparation of total genomic DNA

Promastigotes were harvested in stationary phase by centrifugation (3000 g for 10 min at 4°C) and washed using 0.3% NaCl and phosphate-buffered saline. Total DNA was extracted as previously described (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Address for correspondence: Jorge Alvar, WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain; phone +34 91 5097901, fax +34 91 5097034, e-mail jalvar@isciii.es

The sequences reported in this paper have been submitted to Gene Bank with access numbers AJ275319 to AJ275335.



**Table.** Characteristics of *Leishmania infantum* stocks

No.	International code	Zymodeme	Source <sup>a</sup>	Patient's residence	Month/year of isolation
1	MHOM/ES/97/LLM-644	MON-34	Patient A <sup>b</sup>	Seville	5/1997
2	MHOM/ES/98/LLM-743	MON-34	Patient A <sup>c</sup>	Seville	4/1998
3	MHOM/ES/95/LLM-537	MON-1	Patient B <sup>b</sup>	Mallorca	8/1995
4	MHOM/ES/98/LLM-745	MON-1	Patient B <sup>c</sup>	Mallorca	4/1998
5	MHOM/ES/97/LLM-709	MON-24	Patient C <sup>b</sup>	Madrid	10/1997
6	MHOM/ES/98/LLM-768	MON-24	Patient C <sup>c</sup>	Madrid	6/1998
7	MHOM/ES/97/LLM-719	MON-253	Patient D <sup>b</sup>	Badalona	12/1997
8	MHOM/ES/97/LLM-710	MON-253	Patient D <sup>c</sup>	Badalona	12/1997
9	MHOM/ES/98/LLM-737	MON-253	Patient E	Badalona	2/1998
10	MHOM/ES/98/LLM-735	MON-253	Patient F	Badalona	3/1998

<sup>a</sup>All stocks were isolated from bone marrow of patients who were intravenous drug users infected with human immunodeficiency virus.

<sup>b</sup>Before treatment.

<sup>c</sup>After treatment.

#### Primers and PCR conditions

We used the extended *Leishmania* kDNA primers AJS31 (GGGGTTGGTGTAAAATAGGGCCGG) and DBY (CCAGGTTCCCCCGCCGGAG) (SMYTH *et al.*, 1992; LAMBSON *et al.*, 2000). Amplification reactions were performed in 25  $\mu$ L containing 10 ng of total genomic DNA, 22.5 pmol of each primer, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 75 mM Tris HCl pH 9.0, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001% bovine serum albumin and 0.7 units of *Tth* DNA polymerase (Biotools B&M Laboratories, Madrid, Spain). The cycle conditions were 94.5°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 67°C for 30 s and 72°C for 30 s in a Perkin Elmer GenAmp System 2400™ thermocycler.

#### Restriction analysis

PCR products were purified using a silica matrix-based purification system (Biotools B&M Laboratories). Recoveries and PCR efficiencies were estimated following electrophoresis in agarose gels. 100 ng DNA were digested with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII* and *PstI*. Digestions were carried out overnight and performed under the conditions suggested by the manufacturer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The digested DNA samples were subjected to electrophoresis at 85 V for 2 h, on 2.5% agarose gel in TAE (1  $\times$  Tris-acetic acid-ethylenediaminetetraacetic acid) buffer containing 10  $\mu$ g/mL ethidium bromide. The gel was visualized and photographed in a Gel Doc™ 1000 system (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain).

#### Cloning and DNA sequencing

PCR products from the stocks from Badalona (nos. 7–10) were subcloned in the pGEM™-T vector system (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Ten clones from the amplified product of each strain were randomly chosen and sequenced on an ABI Prism™ Model 377 cycle sequencer.

#### Results

The PCR using total DNA from *L. infantum* resulted in a single product of 800 bp. Ten-fold dilutions from 100 pg to 100 ng showed 10 ng to be the ideal amount of DNA to use in the PCR. Cloning the product revealed that a major minicircle class was always amplified (data not shown), indicating that restriction patterns were not randomly represented in the samples.

The isolates from Badalona (nos. 7–10) all belonged to zymodeme MON-253, an unusual zymodeme never before reported in Spain (CHICHARRO *et al.*, 1999). The RFLP patterns of these 4 stocks (from 3 patients, D, E and F) obtained with the restriction endonuclease *HpaII* are shown in the Figure. The patterns obtained were very

similar. Using different restriction endonucleases *RsaI*, *HaeIII*, *PstI*, *TaqI* and *Tru9I*, the patterns were again almost identical for each enzyme (data not shown). Ten clones from the amplified product of each stock were randomly chosen and sequenced; thus, the complete sequence of the amplified minicircles was available. Using Lasergene™ software (DNASar, Madison, Wisconsin, USA), the targets for restriction endonucleases and the high degree of homology among all the clones were checked (data not shown), confirming by DNA sequencing the restriction patterns shown in Fig. 1 (D1, D2, E and F).

We also examined pre- and post-treatment isolates from 3 additional patients from different geographical areas (A, B, C; Table). The 2 isolates from patient C, after digestion with *HpaII* (lanes C1 and C2 in Fig. 1), produced quite different patterns. Several bands between 500 and 300 bp in lane C1 were clearly not present in lane C2. Digestion with the 5 other enzymes listed above confirmed this observation. The time interval between the 2 isolations was 10 months.

On the other hand, the pre- and post-treatment samples from the 2 remaining patients (A and B; Table) did not show any major difference in their respective restriction patterns. Stocks 1 and 3 (lanes A1 and B1 in Fig. 2) were isolated before the beginning of treatment, whereas stocks 2 and 4 (lanes A2 and B2) were obtained after treatment. The period of time between the isolations from patient B was 3 years.

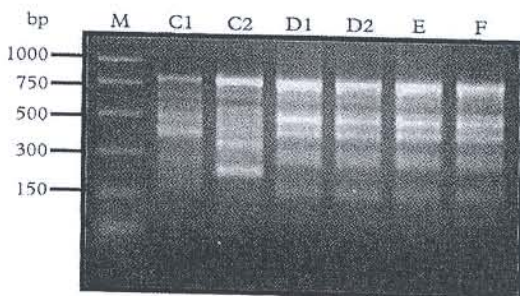


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles obtained by digestion with the endonuclease *HpaII* of the 800 bp product obtained by the polymerase chain reaction from the DNA of 6 Badalona isolates of *Leishmania infantum*. M = molecular mass marker. Isolates D1, D2, E and F, from 3 patients (D, E, F) all have closely similar RFLP patterns. C1 and C2 are isolates from the same patient taken before and after treatment; the patterns are clearly different. C2 is similar, but not quite identical, to D1, D2, E and F whereas the C1 pattern is clearly unique; bp = base pairs. All the patients were co-infected with HIV.

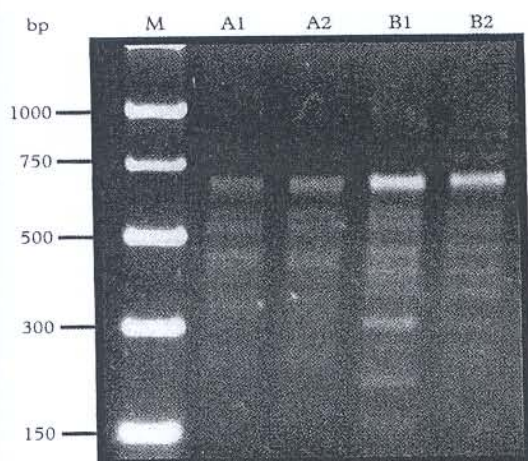


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles obtained by digestion with the endonuclease *Hpa*II of the 800 bp product obtained by the polymerase chain reaction from DNA of 4 isolates of *Leishmania infantum* from 2 patients (A and B). M = molecular mass marker. Isolates A1 and B1 were isolated at the start of treatment, A2 shortly after treatment and B2 3 years after treatment. All 4 experimental tracks have very similar RFLP patterns with minor variations in the intensity of ethidium bromide staining of the bands due to slight differences in the amount of DNA in each track; bp = base pairs. All the patients were co-infected with HIV.

## Discussion

*L. infantum* is known to be extremely variable in subjects co-infected with HIV. When attempting to characterize such infections, zymodeme classification and genotyping are complementary. Isoenzyme characterization is an extremely useful taxonomic tool for epidemiological purposes, but it has certain limitations when attempting to track 1 individual stock through time. We have studied sequential pairs of isolates from 4 patients and shown that the members of each pair belonged to the same zymodeme. The later infections, were, therefore, initially thought to be due to relapses. However, we found different minicircle restriction patterns in the 2 isolates from 1 subject (C), suggesting instead a possible reinfection. Use of the PCR-RFLP technique could provide additional information for physicians to help to determine whether some apparent treatment failures are possibly reinfections.

We selected the PCR-RFLP technique because of its long history of successful application to identification. Schizodeme analysis of the major minicircle classes in *Leishmania* and trypanosomes has been used reliably for over 20 years (BRACK *et al.*, 1976; CHANCE, 1976; STEINERT *et al.*, 1976; MOREL & SIMPSON, 1980; ANGELICI *et al.*, 1989). It has been shown repeatedly over the last 10 years that PCR, using specific oligonucleotide primers especially designed for that purpose, invariably gives a product of the same size as the major classes of minicircle (RODGERS *et al.*, 1990; DE BRUIJN & BARKER, 1992; SMYTH *et al.*, 1992; ERESH *et al.*, 1994; NOYES *et al.*, 1998). This DNA product is then amenable to RFLP analysis.

DNA sequence analysis of several hundred minicircles in an extensive database (BREWSTER *et al.*, 1998) has confirmed that the restriction enzyme sites used in PCR-RFLP analysis of the major minicircle classes of many species, including *L. infantum*, are usually conserved over a considerable time (GUTIÉRREZ-SOLAR *et al.*, 1995; BREWSTER *et al.*, 1998; NOYES *et al.*, 1998; LAMBSON *et al.*, 1999). The endonuclease-digested fragments of minor minicircle classes are present in such

low quantities that they are not visible in ethidium bromide stained gels such as those used in this and many other studies.

This PCR-RFLP technique has shown excellent reproducibility, as well as a high degree of reliability. The use of at least 6 restriction endonucleases in each assay allows the similarity between 2 strains to be assessed quite accurately. The method is also remarkably simple and rapid compared with isoenzyme typing; once we have extracted the total DNA it takes only some hours to obtain the final results.

We first used this PCR-RFLP method to study stocks from the Badalona leishmaniasis outbreak. The presence of an undescribed zymodeme in the 3 HIV co-infected patients was complemented by the observation of identical restriction patterns among the isolates. In order to corroborate the restriction profiles, subcloning and sequencing were performed, revealing extremely high homology among all the minicircles. We believe that these techniques make it possible to explain and analyse any outbreak of leishmaniasis. In this particular case, the results strongly suggest that syringes have been substituted for sandflies in the transmission of the parasite among these intravenous drug users.

It has been proposed that minicircle sequences evolve rapidly (ROGERS & WIRTH, 1988). Recent evidence has shown that the same DNA sequence of whole minicircles does not vary within certain classes, despite great geographical differences (GUTIÉRREZ-SOLAR *et al.*, 1995; BREWSTER *et al.*, 1998; LAMBSON *et al.*, 1999). We found great homogeneity among the minicircles of all the stocks from Badalona. Moreover, although the 2 isolates from patient B were obtained 3 years apart, their minicircle restriction profiles remained unchanged. The PCR-RFLP technique allowed us to confirm that the same stock may persist throughout a long period of time.

## Acknowledgements

This study was supported in part by DGCYT (Ref. PB95-0033), by Laboratorios Dr Esteve S. A., Barcelona, Spain (Grupo Pensa, Ensayo Clínico Protocolo no. 97/154), and by FIPSE (ref. 3056/99). J. A. received a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (BAE no. 99/5038), and J. A. and D. C. B. obtained financial support from Christ's College, University of Cambridge, UK. We thank Drs S. Videla and A. Sans (Laboratorios Dr Esteve, S. A.), Dr M. Jiménez-Mejías (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla), and Drs A. Salas and T. Serra (Hospital Son Dureta, Majorca) for providing samples of bone marrow from which we isolated *L. infantum*.

## References

- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R. & Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 298–319.
- Angelici, M. C., Gramiccia, M. & Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99**, 301–309.
- Arnot, D. E. & Barker, D. C. (1981). Biochemical identification of cutaneous *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **3**, 47–56.
- Barker, D. C. (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, **3**, 177–184.
- Brack, C. H., Bickle, T. A., Yuan, R., Barker, D. C., Foulkes, M., Newton, B. A. & Jenni, L. (1976). The use of restriction enzymes for the investigation of kinetoplast DNA. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*, Van Den Bossche, H. (editor). Amsterdam: North-Holland, pp. 211–218.
- Brewster, S., Barker, D. C. & Aslett, M. (1998). Kinetoplast DNA minicircle sequence database. *Parasitology Today*, **14**, 437–438.
- Chance, M. L. (1976). DNA relationships in the genus *Leishmania*. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*, Van Den Bossche, H. (editor). Amsterdam: North-Holland, pp. 229–235.
- Chicharro, C., Sirera, G., Ares, M., Sans, A., Videla, S. & Alvar, J. (1999). Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253

- involved in an outbreak among intravenous drug users? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**, 385–386.
- De Bruijn, M. H. L. & Barker, D. C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, **52**, 45–58.
- Eresh, S., McCallum, S. M. & Barker, D. C. (1994). Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, **109**, 423–433.
- Gutiérrez-Solar, B., Smyth, A. J., Alvar, J. & Barker, D. C. (1995). Sequence homology within minicircle classes of *Leishmania infantum* regardless of geographical distance. *Experimental Parasitology*, **81**, 416–419.
- Jiménez, M. I., Ferrer-Dufol, M., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, Molina, R., Laguna, F., López-Vélez, R., Cercenado, E., Daudén, E., Blázquez, C., Ladrón de Guevara, J., Gómez, J., De la Torre, J., Barros, C., Altés, J., Serra, T. & Alvar, J. (1995). Variability of *Leishmania infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, **131**, 197–204.
- Lambson, B., Smyth, A. J. & Barker, D. C. (1999). Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **101**, 229–232.
- Lambson, B., Smyth, A. J. & Barker, D. C. (2000). *Leishmania donovani*: development and characterization of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*, **94**, 15–22.
- Morel, C. & Simpson, L. (1980). Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **29**, supplement, 1070–1074.
- Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W. & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 2877–2881.
- Rodgers, M. R., Popper, S. J. & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, **71**, 267–275.
- Rogers, W. O. & Wirth, D. F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **30**, 1–8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Steinert, M., Van Assel, S., Borst, P. & Newton, B. A. (1976). Evolution of kinetoplast DNA. In: *The Genetic Function of Mitochondrial DNA*, Saccone, C. & Kroon, A. M. (editors). Amsterdam: North-Holland, pp. 71–81.
- Smyth, A. J., Ghosh, A., Hassan, M. D. Q., Basu, D., De Bruijn, M. H. L., Adhya, S., Mallick, K. K. & Barker, D. C. (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105**, 183–192.

Received 10 December 1999; revised 16 June 2000; accepted for publication 21 June 2000

## Announcement

### ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE Prizes

#### Undergraduate Project Prize

The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene offers an annual prize of £500 for an account of work carried out of relevance to a tropical or developing country by a non-medical student of any nationality. The work (which may be laboratory-based and not necessarily carried out in a tropical or developing country) will add to the knowledge of human or veterinary health or hygiene in the tropics. Particular attention will be directed towards originality and quality in the award of the prize. It is anticipated that the prize will act as a stimulus for the pursuit of excellence in research carried out by undergraduates.

#### Medical Student Elective Prize

The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene offers an annual prize of £500 for an account of work carried out by a medical student of any nationality during an elective period spent in a tropical or developing country. In awarding this prize emphasis will be laid on the originality of the work and on its contribution to knowledge or understanding of tropical diseases. Particular weight will be given to projects which have been developed and carried out by the students themselves.

#### Rules

1. Two prizes of £500 may be awarded annually in recognition of outstanding projects which increase knowledge of tropical medicine and hygiene in the broadest sense. Abstracts of the winning reports will be published in the *Transactions*.
2. Candidates shall be nominated by their head of department, supervisor or Dean, with a supporting statement of up to 500 words.
3. The closing date for receipt of project reports is 31 December. The project should have been done or completed in the previous twelve months.
4. A committee of three shall choose the prize winners.
5. The announcement of the prize winners will be made at the March meeting of the Society.
6. The prizes will be presented by the President of the Society at the Annual General Meeting in June or July.

Please note that the Society cannot provide funds to cover students' elective travel expenses.

Application forms may be obtained from the Administrator, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Manson House, 26 Portland Place, London, W1B 1EY, UK; fax +44 (0)20 7436 1389, e-mail mail@rstmh.org

## Field epidemiology

### Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools

C. Chicharro<sup>1</sup>, M. A. Morales<sup>1</sup>, T. Serra<sup>2</sup>, M. Ares<sup>1</sup>, A. Salas<sup>2</sup> and J. Alvar<sup>1</sup> <sup>1</sup>World Health Organization Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain; <sup>2</sup>Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

#### Abstract

In the Mediterranean basin, *Leishmania infantum* is the causative agent of both visceral and cutaneous leishmaniasis, and is an important opportunistic parasite in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). The commonest method used to study the variability of *Leishmania* spp. is isoenzyme analysis. In addition to this, we employed 3 assays based on the polymerase chain reaction (PCR): random amplified polymorphic deoxyribonucleic acid (RAPD), intergenic region typing (IRT), based on the amplification of ribosomal ribonucleic acid internal transcribed spacers and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). We used 54 *L. infantum* stocks isolated from HIV co-infected patients, 38 isolated from dogs, 3 isolated from immunocompetent patients and 3 isolated from 1826 sand flies in the island of Majorca (Spain), a closed ecological niche. Zymodemes MON-1 (70%), MON-24 (11%) and MON-34 (18%) were found among the human isolates, and MON-1 (95%) and MON-108 (5%) among those from dogs. RAPD and IRT could not discriminate among the strains as they all gave the same pattern, even when different zymodemes were examined. In contrast, PCR-RFLP was able to distinguish the strains and, furthermore, a dendrogram (unweighted pair group method with arithmetic average [UPGMA]) was constructed from the genetic distances derived from RFLP data. The *Leishmania* isolates from HIV-infected subjects formed a single cluster, supporting the existence of an artificial anthroponotic cycle previously proposed by our group, in which syringes have been substituted for sand flies, and in which certain clones have been spread among intravenous drug users. This contrasts with the clusters representing a zoonotic cycle, involving dogs, sand flies and both immunocompetent and immunocompromised humans.

**Keywords:** leishmaniasis, *Leishmania infantum*, epidemiology, characterization, human immunodeficiency virus co-infection, Majorca (Spain)

#### Introduction

In the Mediterranean basin, *Leishmania infantum* is the causative agent of both visceral and cutaneous leishmaniasis (VL and CL, respectively), and it has been shown to be an important opportunistic parasite in patients co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) (ALVAR *et al.*, 1997; DEDET & PRATLONG, 2000). In this area, VL was traditionally a childhood disease, whereas today adults form 80% of all infected patients, most of them aged between 31 and 50 years (WHO, 1999). Cases of co-infection have so far been reported in 28 countries world-wide, most of them in south-western Europe. In these countries, up to 70% of adult cases of VL are associated with HIV infection and up to 9% of people with acquired immune deficiency syndrome suffer from newly acquired or reactivated VL (DESJEUX, 1998).

The dog constitutes the main domestic reservoir of *L. infantum* and plays a central role in the transmission cycle of the parasite to humans via the bite of phlebotomine sand flies. Therapeutic failure in dogs has important epidemiological implications, as dogs remain asymptomatic but become infective to sand flies early after treatment with a level of infectivity comparable to that of symptomatic dogs (ALVAR *et al.*, 1994; MOLINA *et al.*, 1994). In both co-infected patients and dogs with leishmaniasis, the infectivity to sand flies is associated with the CD4 cell count (MOLINA *et al.*, 1999; GUARGA *et al.*, 2000).

The most common method used to study the variability of *Leishmania* spp. is isoenzyme analysis. This has permitted the establishment of strain groups (zymo-

demes) and it is an extremely useful taxonomic tool that has contributed in large measure to our understanding of the epidemiology of leishmaniasis (LE BLANCO, 1986).

The *L. infantum* complex is characterized by considerable enzymatic polymorphism and at present includes at least 29 zymodemes, of which 25 have been found in humans. Enzymatic characterization of *L. infantum* strains isolated from immunocompetent patients has shown that some zymodemes are responsible exclusively for VL (MON-27, MON-28, MON-72, MON-77 and MON-187) or for CL (MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-78 and MON-111), and other zymodemes cause both VL and CL (MON-1, MON-34, MON-80, MON-190). MON-1 is responsible for VL in 90% of cases and for CL in 20%. Other zymodemes such as MON-27, MON-72, MON-111, MON-187, and MON-189 have been found very rarely in immunocompetent patients and have not yet been found in those co-infected with HIV (reviewed by ALVAR *et al.*, 1997).

Characterization of strains isolated from HIV/VL co-infected patients in different countries has shown significant differences in both the prevalence of different zymodemes and their tropism. MON-1 alone is responsible for 50% of co-infected cases, and MON-24, MON-28, MON-29, MON-33, MON-34, MON-77 and MON-78 are found more frequently than in immunocompetent patients. MON-136, MON-183, MON-185, MON-188, MON-198, MON-199 and MON-201 have to date been found only in HIV-infected individuals. On the other hand, it is common to isolate both visceral and cutaneous zymodemes from the bone marrow of co-infected patients (JIMÉNEZ *et al.*, 1991; MARTY *et al.*, 1991; GRAMICCIA *et al.*, 1992; CAMPINO *et al.*, 1994). Genotypic variation has been proven within a given zymodeme, which reduces the value of isoenzyme typing for molecular 'tracking', up

Address for correspondence: Jorge Alvar, WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda (Madrid), Spain; fax +34 915 097034, e-mail jalvar@isciii.es

to 18 genotypic variants have been found in zymodeme MON-1 (MORALES *et al.*, 2001).

Isoenzyme characterization of sequential isolates from the same individual has shown that they belong to the same zymodeme but, for the reasons given above, this does not reveal whether infections are due to relapses or reinfections, since half of them are produced by a single zymodeme, MON-1. Molecular characterization of isolates would overcome fact problem, which is of highest priority to evaluate the efficacy of a given drug and for a better understanding of the epidemiology of co-infection with *Leishmania* and HIV.

Extraction and analysis of kinetoplast deoxyribonucleic acid (kDNA) restriction endonuclease profiles (schizodemes) have been previously described (ANGELICI *et al.*, 1989). The technique yields 'fingerprint' patterns useful to identify strains, but it requires expanding cultures *in vitro* to get enough kDNA, which is expensive and time consuming.

The kinetoplast contains approximately 10 000 DNA minicircles, which are between 600 and 800 bp in size in members of the genus *Leishmania*. These minicircles are distributed among about 10 different sequence classes. The number of minicircles in each class is variable (BARKER, 1987). The minicircle is divided into a conserved region of approximately 120 bp and a variable region of about 600 bp. This conserved region is an ideal target for designing primers, and the polymerase chain reaction (PCR) can be performed on parasite total DNA, circumventing the need to separate kDNA from nuclear DNA, which is time-consuming and expensive, and involves the use of some carcinogenic reagents.

In order to identify *Leishmania* species and strains, and to study their variability, other PCR-based assays have been used. One of these techniques is the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, in which knowledge of the DNA sequence is not required. Only one relatively short oligonucleotide of randomly chosen sequence is used in the PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990), and the banding pattern of the PCR products can be used to identify the different organisms. RAPD has been used to discriminate among different genera of the order Kinetoplastida (TIBAYRENC *et al.*, 1993; MOTAZEDIAN *et al.*, 1996), to identify different species of *Leishmania* (see NOYES *et al.*, 1996; BANULS *et al.*, 1999), and to study intraspecific variability (ANDRESEN *et al.*, 1996).

Another PCR-based assay is intergenic region typing (IRT), based on amplification of the internal transcribed spacers (ITS) of the ribosomal ribonucleic acid gene (*rRNA*) by PCR, followed by the digestion of the PCR product with various restriction enzymes (CUPOLILLO *et al.*, 1995). This technique has been used to differentiate several species of the *Leishmania* subgenus *Viannia* and to carry out phylogenetic studies among these parasites (CUPOLILLO *et al.*, 1995, 1998); these authors have also studied intraspecific polymorphism.

In the present paper we report on the usefulness of both phenotypic and genotypic characterization tools for molecular tracking of *L. infantum*, by studying isolates from the same patient. With the aim of better understanding the propagation of given genotypes, we studied isolates from dogs, sand flies and humans from a closed ecological niche, the island of Majorca.

## Material and Methods

### Parasite stocks

We studied 54 *L. infantum* stocks isolated from 22 patients on the island of Majorca (Spain); 52 isolates were obtained from patients co-infected with HIV, and 2 from immunocompetent individuals with *L. infantum* infection only. Isolates were obtained from bone marrow, blood or skin. In a few cases, samples of bone marrow and blood were obtained from the same pa-

tient. A second isolate was obtained from some patients during a post-treatment relapse.

We also studied 38 canine strains isolated from bone marrow and/or lymph nodes of symptomatic and asymptomatic dogs giving a positive result in the rK39 dipstick serological test.

In June 1997, June 1998 and June 1999 we conducted 3 entomological surveys in Majorca. Sand flies were collected overnight using a CDC light trap outside houses in which we had previously detected *Leishmania*-infected dogs. The sand flies were taken alive to the laboratory and the females were dissected and examined for parasites under a light microscope.

Parasite were isolated in NNN medium, and cultured on a large scale at 27°C in RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum.

### Isoenzyme characterization

Electrophoresis was carried out in a thick starch gel according to previous protocols (RIOUX *et al.*, 1990), using a panel of 13 enzymes (15 enzymatic loci): malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, EC 1.1.1.44), isocitrate dehydrogenase (ICD, EC 1.1.1.42), purine nucleoside phosphorylase (NP1 and NP2, EC 2.4.2.1), phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1), diaphorase (DIA, EC 1.6.2.2), glutamate oxalacetate transaminase (GOT1 and GOT2, EC 2.6.1.1), mannose phosphate isomerase (MPI, EC 5.3.1.8), glucose phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9), fumarate hydratase (FH, EC 4.2.1.2), and glutamate dehydrogenase (GLUD, EC 1.4.1.3). Four reference strains of *L. infantum* zymodemes were used: MHOM/FR/78/LEM-75 (MON-1), MHOM/ES/81/LEM-307 (MON-29), MHOM/DZ/82/LIPA-59 (MON-24), and MHOM/FR/91/LEM-2298 (MON-183).

### Molecular characterization

**Preparation of total genomic DNA.** Promastigotes were harvested in stationary phase by centrifugation (3000 g for 10 min at 4°C) and washed using 0.3% NaCl and phosphate-buffered saline. Total DNA was extracted as previously described (SAMBROOK *et al.*, 1989).

**Random amplified polymorphic DNA.** The following 5 arbitrary primers to generate random DNA markers were used. A1: CAGGCCCTTC; A5: AGGGG TCTTG; A7: GAAACGGGTG; A10: GTGATC GCAG; A15: TTCCGAACCC.

Amplification reactions were performed following the protocol described by WILLIAMS *et al.* (1990). 20 ng of purified DNA were amplified in 100 µL of a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 0.5 µM primer and 1.5 units of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey, USA). The cycling conditions were 94.5°C for 5 min, followed by 45 cycles of 94°C for 1 min, 36°C for 1 min, and 72°C for 2 min, in a Perkin-Elmer GenAmp System™ 2400 thermocycler. 25 µL of amplification products were resolved by electrophoresis on 1.6% agarose gels in TAE (Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid) buffer and visualized after ethidium bromide staining.

**Intergenic ribosomal typing.** The *L. infantum* ITS located between the SSU and LSU *rRNA* genes were amplified using the protocol described by Cupolillo *et al.* (1995). The primers used were IR1 (GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCA TT) and IR2 (GCGGGTAGTCCTGCCAAACACT CAGGTCTG). Amplification reactions were performed in 100 µL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125 µM of each

dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 0.2  $\mu$ M of each primer, 10 ng of genomic DNA and 0.5 units of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer). Amplification was performed with 30 cycles, each of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 2 min at 72°C.

PCR products were purified using a silica matrix-based purification system (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) and 100 ng were digested with *Alu*I, *Eco*RII, *Hae*III, *Rsa*I, *Eco*RI and *Sph*I. Digestion products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels in TAE buffer and visualized after ethidium bromide staining.

**Mimicircle PCR-RFLP.** We used the extended *Leishmania* kDNA primers AJS31 (GGGGTTGGTGT AAAATAGGGCCGG) and DBY (CCAGGTTCC CGCCCCGAG) (SMYTH *et al.*, 1992). Amplification reactions were performed using the protocol described by MORALES *et al.* (2001). Briefly, 25  $\mu$ L containing 10 ng of total genomic DNA, 22.5 pmol of each primer, 0.2 mM each dNTP, (Amersham Pharmacia Biotech), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001% BSA and 0.7 units of *Tth* DNA polymerase (Biotools B&M Labs). The cycling conditions were 94.5°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 67°C for 30 s and 72°C for 30 s in a Perkin-Elmer GenAmp System™ 2400 thermocycler.

PCR products were purified using a silica matrix-based purification system (Biotools B&M Labs). Recoveries and PCR efficiencies were estimated following electrophoresis in agarose gels. 100 ng DNA were digested with the restriction enzymes *Alu*I, *Rsa*I, *Hpa*II, *Taq*I, *Tru*9I, *Hae*III and *Pst*I. Digestions were carried out overnight using the conditions suggested by the manufacturer (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The digested DNA samples were electrophoresed at 85 V for 2 h on 2.5% agarose gel in TAE buffer containing 10  $\mu$ g/mL ethidium bromide. The gel was visualized and photographed in a Gel Doc™ 1000 system (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain).

## Results

### Isoenzyme characterization of human and canine isolates

A total of 1826 phlebotomine sand flies were dissected; only 3 *P. perniciosus* (0.16%) were infected with promastigotes. In 2 cases it was not possible to isolate the strains, and the third survived in culture for only a short time, so only enough material was obtained to perform the PCR-RFLP.

The results of the isoenzyme typing are shown in the Table. MON-1 was the only zymodeme found in both humans and dogs; it was also the commonest in both groups. Some zymodemes (MON-24 and MON-34) were quite commonly isolated from humans but never from dogs, thus raising the question of their true reservoir. Zymodeme MON-108 has not previously been described in dogs in Spain.

Maintenance of the same zymodeme in sequential isolates from the same patient was the rule, even when we isolated strains from different biological samples from the same patient.

### RAPD and IRT examination

Fifteen *Leishmania* strains from HIV-infected subjects and 15 strains from dogs were examined by these

techniques, and all produced the same patterns, even when different zymodemes were studied (Figs 1 and 2). It was therefore not feasible to use these techniques to study intraspecific variability.

### Mimicircle PCR-RFLP

Isolates from the same 2 patients before and after treatment did not show any difference in their restriction patterns (Fig. 3), indicating that relapses, rather than reinfections, had occurred in these individuals. Isolates from different biological samples obtained from the same patient or dog also produced identical restriction patterns, indicating that it was not possible to

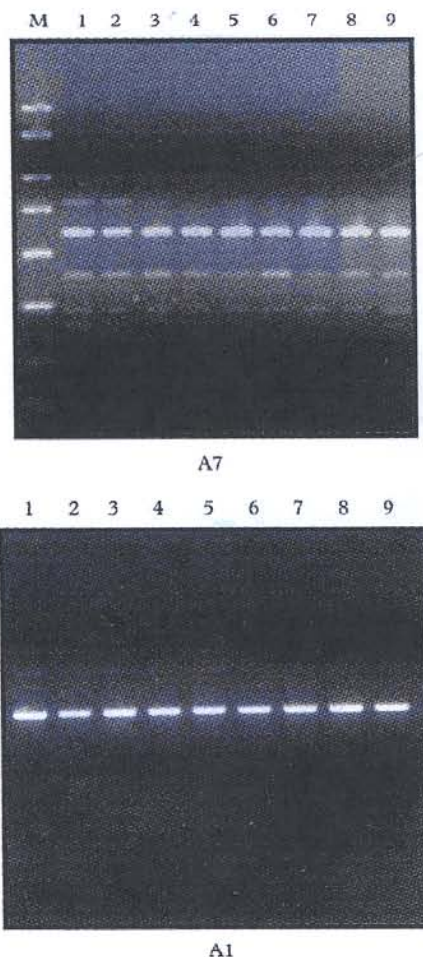


Fig. 1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns obtained from *Leishmania infantum* isolates using primers A7 (top) and A1 (bottom) (zymodeme designations are given in parentheses). Lanes 1 & 9, canine isolates (MON-1); lane 2, immunocompetent human isolate (MON-1); lanes 3–8, HIV+ human isolates (lanes 3, 6 & 7, MON-1; lanes 4, 5 & 8, MON-34). M = PCR molecular size marker (Sigma).

**Table.** Frequency of zymodemes found in isolates of *Leishmania infantum* from human and canine hosts in Majorca

Hosts	Zymodemes			
	MON-1	MON-24	MON-34	MON-108
Human	38 (70.4%)	6 (11.1%)	10 (18.5%)	–
Canine	36 (94.7%)	–	–	2 (5.3%)

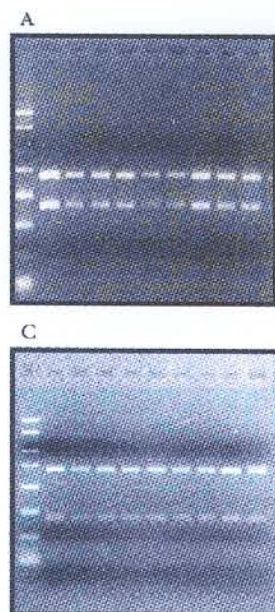


Fig. 2. Intergenic ribosomal typing (IRT) restriction patterns obtained using 3 endonucleases (A, *AluI*; B, *SphI*; C, *HaeIII*) after IRT-polymerase chain reaction amplification of *Leishmania infantum* isolates (zymodeme designations are given in parentheses). The initial lane contained PCR molecular size marker (Sigma); subsequent lanes (not numbered in photographs) 1 & 9, canine isolates (MON-1); 2, immunocompetent human isolate (MON-1); 3-8, HIV+ human isolates (lanes 3, 6 & 7, MON-1; lanes 4, 5 & 8, MON-34).

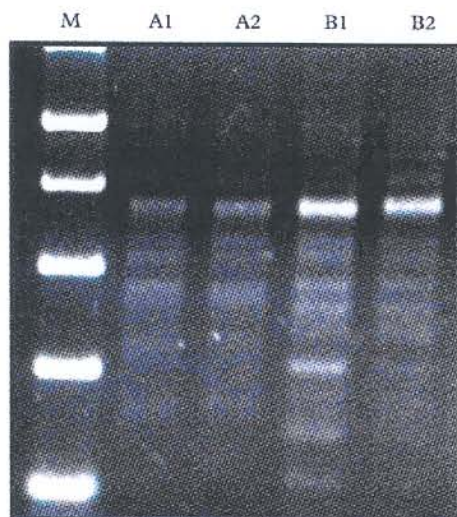


Fig. 3. Kinetoplast DNA minicircle restriction patterns obtained using endonuclease *HpaII* and *Leishmania infantum* isolates from 2 patients (A and B), before (A1, B1) and after (A2, B2) treatment. M = PCR molecular size marker (Sigma).

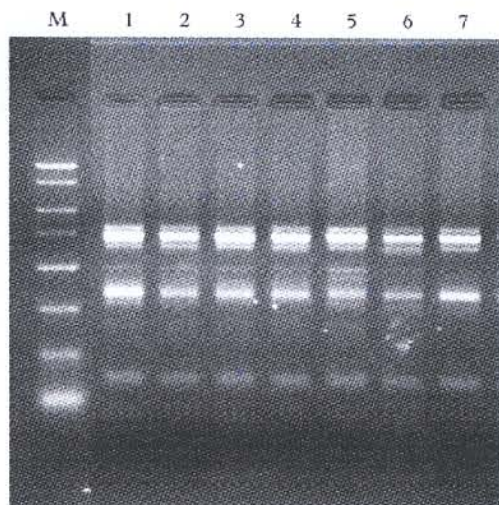


Fig. 4. Kinetoplast DNA minicircle restriction patterns obtained using endonuclease *HpaII* and different samples obtained from the same patient with *Leishmania infantum*. Lanes 1, 2 & 7, peripheral blood before (1 & 2) and after (7) treatment; lanes 3, 4 & 6, bone marrow before (3) and after (4 & 6) treatment; lane 5, skin sample after treatment. M = PCR molecular size marker (Sigma).

establish any relationship between restriction pattern and tropism of a particular strain (Fig. 4).

The one strain isolated from a phlebotomine sand fly yielded a restriction pattern identical to that of a canine stock (Fig. 5). One stock isolated from an immunocompetent subject also produced the same pattern as a canine stock.

A dendrogram was constructed by the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) from the genetic distances derived from the RFLP data (Fig. 6). The isolates formed 2 main clusters (I and II). Cluster II contained only strains from HIV-infected patients. Cluster I consisted of 4 minor clusters (A, B, C and D). Cluster A contained only canine stocks; other isolates from co-infected patients (only) were present in cluster B and strains from dogs, sand flies

and immunocompetent patients and strains from dogs, HIV-infected and immunocompetent patients were grouped in clusters C and D, respectively.

#### Discussion

*L. infantum* stocks isolated from patients co-infected with HIV and VL have already been extensively characterized enzymatically in Italy (GRAMICCIA *et al.*, 1995), Spain (JIMÉNEZ *et al.*, 1995, CHICHARRO *et al.*, 1999) and, to a lesser degree, France and other Mediterranean countries such as Portugal, Greece and Algeria (PRATLONG *et al.*, 1995). The studies have

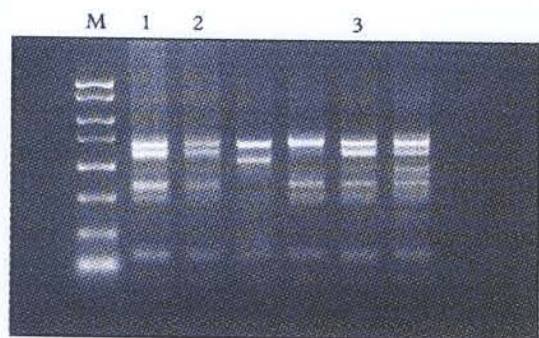


Fig. 5. Kinetoplast DNA minicircle restriction patterns obtained using endonuclease *TaqI* and isolates from sand flies (lanes 1 & 2) and an identical canine isolate (lane 3); unlabelled lanes contained other canine isolates. M = PCR molecular size marker (Sigma).

revealed new zymodemes, greater variability and visceralization of normally dermatotropic zymodemes.

Our study of *L. infantum* in Majorca has revealed less variability than on the mainland (data obtained in our laboratory during the last 10 years), and did not identify any zymodemes that had not previously been described. This was possibly due to the fact that Majorca is an island, and thus a closed ecological niche, where the influx of individuals from endemic areas is lower than that in other regions of Spain, such as Madrid.

However, on this island, as in other Mediterranean countries (reviewed by ALVAR *et al.*, 1997), it is common to isolate normally 'cutaneous' zymodemes from the bone marrow of co-infected patients. This visceralization in HIV-infected subjects is possibly due to their

anergic state. Thus, the tropism of *L. infantum* for skin or viscera and its virulence may be influenced by the immunological state of the host more than by the biochemical characteristics of the strain (GRADONI & GRAMICCIA, 1994; JIMÉNEZ *et al.*, 1995).

Since the extreme variability of *L. infantum* in subjects co-infected with HIV has been well demonstrated, one should consider the relationship between the use of zymodeme characterization and other tools. Isoenzyme characterization is an extremely useful taxonomic tool for epidemiological purposes, but it has some limitations when it is necessary to follow one stock individually. The PCR-RFLP reported in this paper has shown extreme reproducibility as well as a high degree of reliability. The use of at least 6 restriction endonucleases in each assay enables us to assert with confidence the similarity, or dissimilarity, between 2 strains. Other advantages of the technique include its simplicity and rapidity compared with isoenzyme characterization; once the total DNA has been extracted, it takes only several hours to obtain the final results.

Minicircle sequences evolve rapidly (ROGERS & WIRTH, 1988). In spite of this, the stability of certain minicircles has been reported, even in very distant geographical areas (GUTIÉRREZ-SOLAR *et al.*, 1995), which suggests the possibility of finding considerable homogeneity among the minicircle restriction patterns from sequential isolates from one particular patient. We have isolated stocks from some patients after a time interval of 3 years, and found that they had maintained their minicircle restriction profiles. Thus this PCR-RFLP allowed us to confirm that the same strain can survive unchanged throughout a long period of time.

We reported that the facts that a strain isolated from a phlebotomine sand fly gave a restriction pattern identical to that of a canine stock, and that a stock from an immunocompetent subject yielded the same pattern

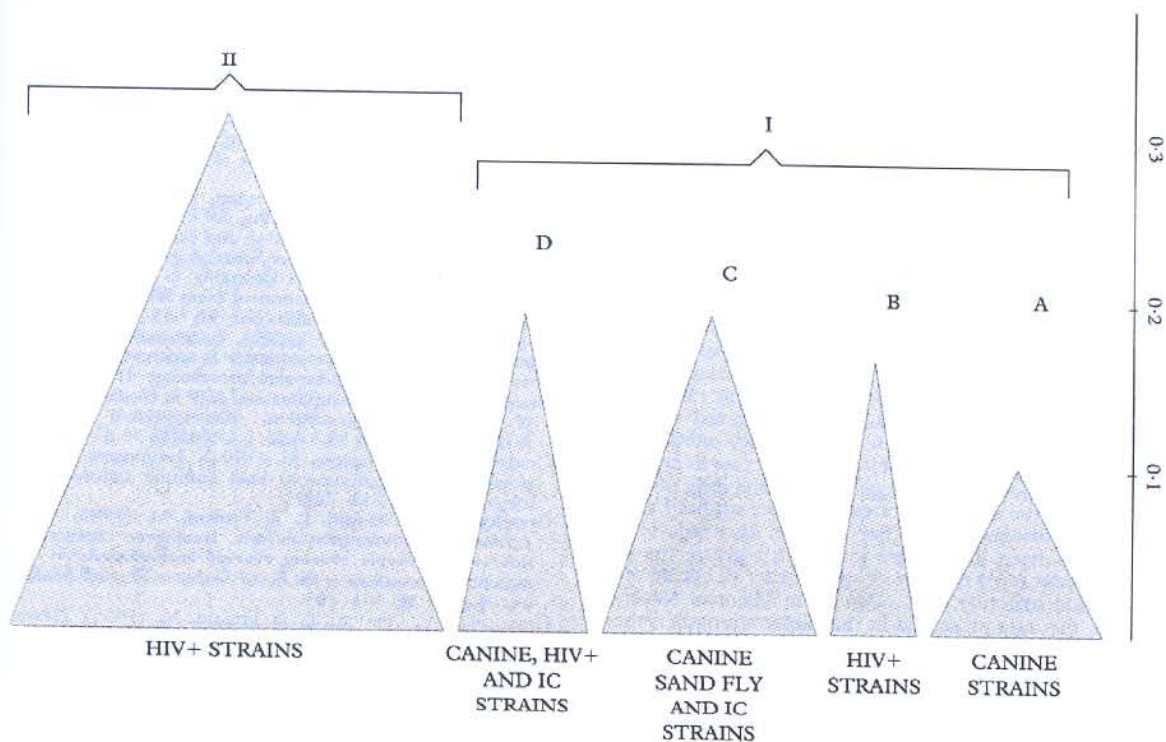


Fig. 6. Dendrogram (UPGMA [unweighted pair group method with arithmetic average]) constructed using the genetic distances derived from the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism data for *Leishmania infantum* strains. (IC = immunocompetent human isolates.)



as 2 canine stocks, fit well with the known zoonotic cycle of *Leishmania*.

The grouping of many *Leishmania* isolates from HIV-infected patients into a single cluster supports the existence of an anthroponotic cycle, as previously proposed by our group (ALVAR *et al.*, 1996, 1997), in which syringes have been substituted for sand flies and certain clones have been spread among intravenous drug users. This contrasts with the clusters (A, B, C and D in Fig. 6) that represent the zoonotic cycle, involving dogs, sand flies and humans (both immunocompetent and immunocompromised).

The points discussed above and the variability of *L. infantum* strains in Majorca possibly fit with a clonal population structure, in which the clones appear to be stable over large geographical areas and long periods of time. To assess whether *L. infantum* does indeed have a clonal population in Majorca, we should require data concerning segregation and recombination, the 2 fundamental genetic consequences of sexual reproduction, and therefore we need to determine their presence or absence in this population (TIBAYRENC *et al.*, 1990). As we do not have these data, we are unable to reach a conclusion about this. Nevertheless, we must take into account the fact that genetic recombination, and therefore sexual reproduction, could occur, as has been previously reported (KELLY *et al.*, 1991). The hypothesis of clonality does not rule out the possibility of occasional genetic recombination, but rather indicates that such recombination is not important enough to alter significantly the prevailing pattern of a clonal population structure. Moreover, such a hypothesis does not imply that the stocks characterized as identical on the basis of, for example, isoenzymatic typing are necessarily a completely homogeneous set, but rather that they are families of related clones. This point is relevant to the clones characterized by PCR-RFLP within zymodeme MON-1. In our particular study in Majorca, if genetic recombination had occurred, phylogenetic analysis of the degree of similarity among the clones would have shown greater variability than we have observed, as a general rule. However, the temporal stability of clones has been demonstrated with the aid of the minicircle PCR-RFLP technique. Taking into account the mutation rates of kinetoplast minicircle DNA that have been widely reported, the maintenance of the restriction pattern throughout 2–3 years is feasible only with a clonal population structure. Recently, TIBAYRENC & AYALA (1999) have proposed the idea of 'epidemic clonality' (bouts of clonal propagation in a sexual species) as an alternative to true clonal evolution, instead of just sexual or clonal. They also made a distinction between 'structured' and 'non-structured' species. Within non-structured species, genetic exchange is frequent enough to prevent the appearance of separate evolutionary lineages. Non-structured species may conform either to the model of epidemic clonality, or simply to a model of panmixia. Structured species are subdivided into discrete evolutionary units that correspond either to stable clonal lineages or to cryptic species. All these questions give rise to the difficulty of defining a 'true clonal structure'. Further studies based on linkage disequilibrium (non-random association between genotypes at different loci) with a greater number of stocks must be carried out in order to clarify the population structure of *L. infantum* in Majorca. Nevertheless, the data presented in this paper strengthen the possibility of *L. infantum* constituting a clonal population in this particular area.

#### Acknowledgements

This study was supported in part by WHO/CTD (ref. L3/181/42), by Lab. PEN, S.A. (Grupo Esteve) (Ensayos Clínicos FSC.I.N.-005/96 and 006/96), FIPSE (3056/99) and DGCYT (ref. PB95-0033). J. A. was in receipt of grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (BAE no. 99/5038) and Christ's

College, University of Cambridge, UK. We are grateful for the collaboration of Dr Ricardo Molina, Dr Javier Nieto, Dr Javier Lucientes, Dr Ivan D. Vélez, Carmen Cañavate, Dr Javier Moreno, Jean M. Lohse, Artur Sans, Dr Fernando González, Xavier Mesquida, Israel Cruz and Cristina Chamizo in the field studies in Majorca; we also thank Dr Manuel Cuenca for help with statistical analysis and Emilia Garcia for technical assistance.

#### References

- Alvar, J., Molina, R., San-Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., González, F., San-Andrés, M. D., Boggio, J., Rodríguez, F., Sáinz, A. & Escacenas, C. (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**, 371–378.
- Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Pachón, I., Calbacho, E., Ramírez, M., Vallés, R., Guillén, J. L., Cañavate, C. & Amela, C. (1996). AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clinical Dermatology*, **14**, 541–546.
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M. L., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, M. & Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 298–319.
- Andresen, K., Ibrahim, M. E., Theander, T. G. & Kharazmi, A. (1996). Random amplified polymorphic DNA for the differentiation of *Leishmania donovani* isolated from Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**, 204–205.
- Angelici, M. C., Gramiccia, M. & Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99**, 301–309.
- Bañuls, A. L., Brisse, S., Sidibe, I., Noel, S. & Tibayrenc, M. (1999). A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Fiedlin reference strain. *Folia Parasitologica (Praha)*, **46**, 10–14.
- Barker, D. C. (1987). Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, **99**, supplement, S125–S146.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratloug, F., Dedet, J. P. & Abranches, P. (1994). HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**, 434–435.
- Chicharro, C., Sirera, G., Ares, M., Sans, A., Videla, S. & Alvar, J. (1999). Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253 involved in an outbreak among intravenous drug users? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**, 385–386.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H. & Beverly, S. M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **73**, 145–155.
- Cupolillo, E., Momen, H. & Grimaldi, G. (1998). Genetic diversity in natural population of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**, 663–668.
- Dedet, J. P. & Pratloug, F. (2000). *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**, 37–39.
- Desjeux, P. (1998). *Leishmania and HIV in Gridlock*. Geneva: World Health Organization, mimeographed document WHO/CTD/LEISH/98.9 Add. I, UNAIDS/98.23.
- Gradoni, L. & Gramiccia, M. (1994). *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitology Today*, **10**, 264–267.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. & Troiani, M. (1992). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 161–163.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. & Troiani, M. (1995). Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiology Letters*, **128**, 33–38.
- Guarga, J. L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M. J., Peribáñez, J., Alvar, J. & Castillo, J. A. (2000). Correlation between the percentage of T helper cells of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* and the infectivity for its vector. *Research in Veterinary Science*, **69**, 249–253.
- Gutiérrez-Solar, B., Smyth, A. J., Alvar, J. & Barker, D. C. (1995). *Leishmania infantum*: sequence homology within

- minicircle classes regardless of geographical distance. *Experimental Parasitology*, **81**, 416–419.
- Jiménez, M. I., Gutiérrez-Solar, B., Benito, A., Aguilar, E., García, E., Cercenado, E. & Alvar, J. (1991). Cutaneous *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, **51**, 95–99.
- Jiménez, M. I., Laguna, F., de la Torre, J., Solís, F. & Alvar, J. (1995). New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme responsible for visceral leishmaniasis in HIV-positive co-infected patients from Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**, 33.
- Kelly, J. M., Law, J. M., Chapman, C. J., Van Eys, G. J. & Evans, D. A. (1991). Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **46**, 253–264.
- Le Blancq, S. M. (1986). Enzymatic characterization and the epidemiology of Old World *Leishmania*. In: *Leishmania, Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, Rioux, J. A. (editor). Montpellier: IMEEB, pp. 333–339.
- Marty, P., Fuzibet, J. G., Pratlong, F., Quinsat, D., Gari-Toussaint, M., Dor, J. F., Le Fichoux, Y. & Rioux, J. A. (1991). Leishmaniose viscérale causée par une souche dermatotrope de *Leishmania infantum* chez un sidé. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **84**, 365–367.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J. A., Lucientes, J. & Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 491–493.
- Molina, R., Lohse, J. M., Pulido, F., Laguna, F., López-Vélez, R. & Alvar, J. (1999). Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**, 51–53.
- Morales, M. A., Chicharro, C., Cañavate, C., Ares, M., Barker, D. C. & Alvar, J. (2001). Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**, 104–107.
- Motazedian, H., Noyes, H. & Maingon, R. (1996). *Leishmania* and *Saurolishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. *Experimental Parasitology*, **83**, 150–154.
- Noyes, H. A., Belli, A. A. & Maingon, R. (1996). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA–polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**, 98–105.
- Pratlong, F., Dedet, J. P., Marty, P., Portús, M., Deniau, M., Dereure, J., Abranches, P., Reynes, J., Martini, A., Lefebvre, M. & Rioux, J. A. (1995). *Leishmania*–human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of *Leishmania infantum* complex. *Journal of Infectious Diseases*, **172**, 323–326.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. & Perières, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **65**, 111–125.
- Rogers, W. O. & Wirth, D. F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **30**, 1–8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smyth, A. J., Ghosh, A., Hassan, M. D. Q., Basu, D., De Bruijn, M. H. L., Adhya, S., Mallick, K. K. & Barker, D. C. (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, **105**, 183–192.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. (1999). Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection*, **1**, 465–472.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **87**, 2414–2418.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. & Ayala, F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 1335–1339.
- WHO (1999). *Leishmania/HIV* co-infection, South-Western Europe, 1990–1999. *Weekly Epidemiological Record*, **74**, 365–376.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531–6535.

## CONCISE COMMUNICATION

Relapses versus Reinfections in Patients Coinfected with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus Type 1

Miguel A. Morales,<sup>1</sup> Israel Cruz,<sup>1</sup> Jose M. Rubio,<sup>2</sup>  
Carmen Chicharro,<sup>1</sup> Carmen Cañavate,<sup>1</sup>  
Fernando Laguna,<sup>3</sup> and Jorge Alvar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>World Health Organization Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, <sup>2</sup>Centro Nacional de Enfermedades Tropicales, and <sup>3</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigación Clínica, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

In the Mediterranean basin, *Leishmania infantum* is a major opportunistic parasite in people with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), and up to 9% of the patients with AIDS suffer from newly acquired or reactivated visceral leishmaniasis. Distinguishing between reinfections and relapses in these patients is important because some apparent treatment failures occur in patients with new rather than reactivated infections. Isoenzyme characterization is limited for use in determining relapsed versus newly acquired leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients because of the variability of *L. infantum* and the predominance of the MON-1 zymodeme in people coinfecting with HIV. A seminested polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *L. infantum* minicircle kinetoplast DNA, and, after digestion, the restriction fragment-length polymorphism (RFLP) profiles showed that 3 (7.5%) of 40 patients coinfecting with *L. infantum* and HIV had a new infection, whereas isoenzyme characterization indicated that all 40 patients had infection relapses. These results suggest the utility of this PCR-RFLP analysis in detecting leishmaniasis reinfection in HIV-positive patients.

In the Mediterranean basin, *Leishmania infantum* is the infectious agent of both visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL) and has been shown to be an important opportunistic parasite in patients with AIDS. VL is the clinical form most frequently associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and AIDS in southwestern Europe, and up to 9% of people with AIDS suffer from newly acquired or reactivated VL. Another cause for concern is the increased number of cases of coinfection in eastern Africa and the Indian subcontinent, which is due to the simultaneous spread and geographic overlap of both diseases and periodic epidemics of VL [1].

The VL and CL relapse/reinfection dichotomy is a major concern in patients with AIDS, who are at risk for opportunistic

infections. In areas where the diseases are endemic, the rate of reinfections might be higher than estimated. This could lead physicians to believe that treatment for relapsed infection failed when, in fact, the patient has a newly acquired infection. Therefore, the inability to distinguish relapses from reinfections might be an important impediment to the evaluation of leishmaniasis treatment protocols.

Enzymatic characterization is the most common method used to study the variability of *Leishmania* species, and this method has shown the extreme variability of *L. infantum* in HIV-positive patients. However, half the *Leishmania* isolates from HIV-infected persons belong to a single zymodeme (MON-1), and isoenzyme characterization cannot differentiate relapsed infections from newly acquired infections when sequential isolates from the same individual exhibit the same zymodeme. Several researchers have developed molecular methods, mainly based on restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis, to resolve this problem [2, 3]. The use of polymerase chain reaction (PCR) and RFLP analysis of the amplified product to detect reinfections was successful in a preliminary study with 10 *L. infantum* stocks from 5 HIV-positive patients [4]. The kinetoplast contains ~10000 minicircles of DNA, and the conserved region of these minicircles is an ideal target for PCR assays.

Almost 80% of patients with VL respond initially to classic chemotherapy (pentavalent antimony); however, the disease shows a clear tendency to relapse in HIV-positive patients (27% and 60% of the patients relapse within 6 and 12 months, respectively, after treatment), with the time between the first and second relapse being shorter than the time between the first episode and first re-

Received 13 November 2001; revised 14 January 2002; electronically published 22 April 2002.

Presented in part: WORLDleish2, Hersonissos, Crete, Greece, 20–24 May 2001. (abstract P191).

All patients gave signed, informed consent for this study, which had ethics committee approval from all hospitals involved.

Financial support: Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, Spain (Grupo Pen S.A., Ensayo Clínico Protocolo n 97/154); World Health Organization/Control of Tropical Diseases (L3/181/42); Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España (3056/99 to M.A.M.); Instituto de Salud Carlos III (BISC98/4045 to I.C.).

Reprints or correspondence: Dr. Jorge Alvar (jalvar@isciii.es) or Dr. Miguel A. Morales (mmorales@isciii.es), World Health Organization Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

The Journal of Infectious Diseases 2002;185:1533–7

© 2002 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
0022-1899/2002/18510-0024\$02.00

lapse [5], including in patients with HIV treated with highly active antiretroviral therapy [6].

The intent of this study was to determine whether we could distinguish between reactivated and newly acquired leishmaniasis infections. To that end, we used seminested (sn) PCR-RFLP analysis of kinetoplast minicircles of DNA (kDNA) to monitor and follow 40 patients with VL who were treated for *Leishmania*-HIV coinfection.

## Materials and Methods

**Patients.** Forty HIV-1-infected patients from Spain who were suspected, on the basis of clinical data, of having leishmaniasis were studied. HIV positivity was established by ELISA and confirmed by Western blot analysis. All patients belonged to an open, randomized, multicenter trial comparing the efficacy of amphotericin B lipid complex against antimonials. The results of this trial are the subject of a different publication (authors' unpublished data). Thirty-one patients were confirmed as having leishmaniasis, as determined by bone marrow culture and/or microscopy; the other 9 cases were confirmed by PCR. Characteristics for 3 of the study patients who were determined to have new infections are summarized in table 1.

**Collection of biologic samples.** Bone marrow aspirate (200  $\mu$ L) and EDTA-treated blood (10 mL) samples were obtained on the day of diagnosis and 1 month after treatment ended. When possible, samples were also obtained during follow-up (1–20 months after treatment was completed).

**Parasite stocks and preparation of total genomic DNA from culture.** When possible, isolates of *L. infantum* were obtained from

bone marrow. The techniques used for culturing and extracting total DNA have been described elsewhere [4, 7].

**kDNA snPCR-RFLP analysis.** DNA extraction from blood samples and bone marrow aspirates has been described elsewhere [8]. In brief, for the first amplification, 5  $\mu$ L of DNA solution was added to 20  $\mu$ L of PCR mix containing 15 pmol specific *Leishmania* primers DRJ, 5'-CGA TTT TTG AAC GGG ATT TCT GCA C-3', and KLK2, 5'-CTC CGG GGC GGG AAA CTG G-3'; 0.2 mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 75 mM Tris HCl (pH 9.0); 2.0 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.001% bovine serum albumin; and 0.7 U of *Tth* (*Thermus thermophilus*) DNA polymerase (Biotools-B&M Laboratories). A GenAmp System 2400 thermocycler (Perkin-Elmer) was used with the following cycling conditions: 80°C for 2 min, 94.5°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 30 s and at 68°C for 30 s, with an extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Amplification products were visualized on a 1.6% agarose gel, with a 100-bp DNA ladder (Boehringer Mannheim) as a molecular weight marker, and stained with ethidium bromide (10 mg/mL). Samples with an 800-bp PCR product were considered to be positive for *Leishmania* DNA.

In the snPCR amplification, the reaction consisted of the reamplification of the previous PCR product, to improve the sensitivity and specificity of the reaction: 5  $\mu$ L of a 1:200 dilution of the first PCR product was added to 20  $\mu$ L of PCR mix under the same conditions as the first amplification, with 7.5 pmol DRJ primer and 7.5 pmol of new *Leishmania*-specific primer AJS31, 5'-GGGGTTGGTGTA-AATAGGGCCGG-3' [9], 0.7 U of *Tth*, and a new annealing temperature in the cycling parameters (70°C). Amplification reactions were visualized on 1.6% agarose gel, and positive samples yielded a PCR product of 780 bp.

**Table 1.** Data for human immunodeficiency virus type 1-positive patients in Spain who were determined to have newly acquired *Leishmania* infections, by use of seminested polymerase chain reaction–restriction fragment–length polymorphism analysis of kinetoplast minicircles of DNA (kDNA snPCR-RFLP).

Patient code, date biologic samples obtained <sup>a</sup>	Result of kDNA snPCR-RFLP analysis	Therapeutic regimen <sup>b</sup>	Zymodeme type
GRJ 26 Oct 1998, A 1 Dec 1998, B 19 May 1999, C	Shift of the RFLP pattern, indicating reinfection	Amphotericin B lipid complex (3 mg/kg) intravenously once daily for 5 days	MON-34
JAE 16 Apr 1998, A 24 Jun 1998, B 13 Oct 1999, C			
APB 7 Oct 1997, A 28 Oct 1997, B 10 Jun 1998, C			

<sup>a</sup> A–C indicate, respectively, samples obtained on the day of diagnosis (before treatment), 1 month after treatment ended, and during follow-up (up to 20 months after treatment ended).

<sup>b</sup> Treatment failed in all 3 patients.

In all assays, negative controls without DNA and negative controls with healthy human DNA were used. A positive control (DNA from 10 promastigotes) was also used.

**Restriction analysis.** Digestions were carried out as described elsewhere [4]. To assure that partial digestions were not occurring, samples were electrophoresed at a wide range of digestion times.

**Cloning and DNA sequencing.** Fifty randomly selected PCR products were subcloned in a vector system (pGEM-T; Promega). Ten clones from each product were sequenced on a DNA sequencer (ABI Prism, model 377; Applied Biosystems).

**Parasite cloning.** The cloning method we used has been described elsewhere [10]. In brief, a single parasite was isolated from a limiting dilution into a 96-well plate and transferred onto a blood-agar plate after examination by microscope. It was then cultured under the same conditions as the parent strain.

**Results**

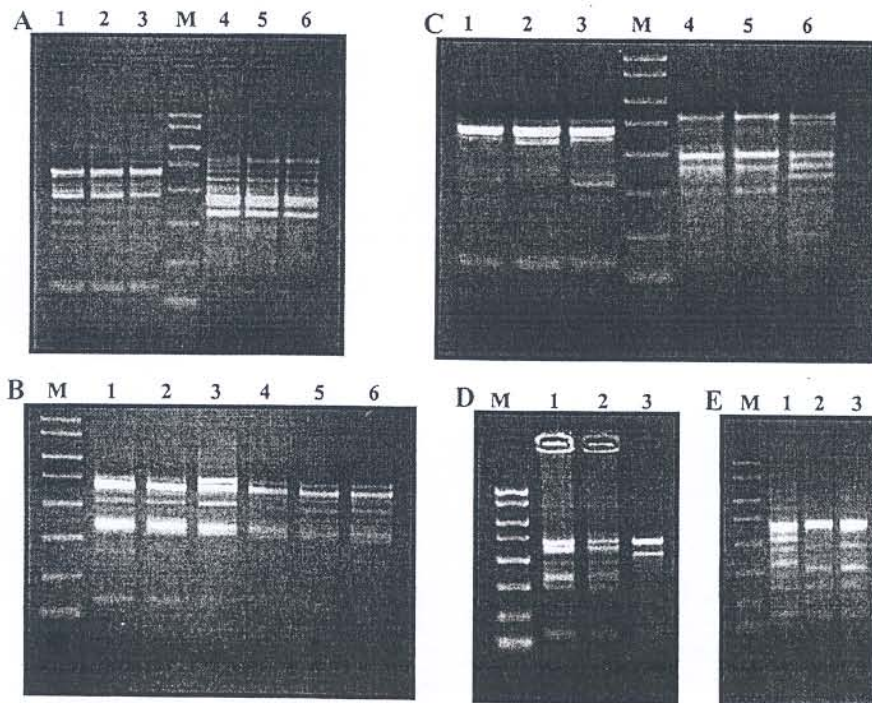
The first PCR, using DNA from *L. infantum*, resulted in a single product of 800 bp, whereas the second PCR product was a frag-

ment of 780 bp. Subcloning these 2 products in a commercial vector system and sequencing revealed that a major minicircle class was always amplified in each isolate, indicating that restriction patterns did not randomly appear.

DNA samples from nonpathogenic flagellates (*Leptomonas*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, and *Blasitocrithidia* species) were also used to test the specificity of this PCR, and no amplification was observed.

Two or more pre- and posttreatment sequential samples were studied for 40 patients who were coinfecting with *Leishmania* and HIV and treated for VL. To distinguish between relapses and reinfections, we tested 256 clinical samples and 56 *Leishmania* stocks (derived from the bone marrow of patients) that were cultured in NNN medium. PCR-RFLP analysis of the samples revealed that 3 (7.5%) of the 40 patients had a newly acquired infection, whereas all the patients were considered to have relapses by isoenzyme characterization.

Figure 1B shows sequential isolates from 1 of the HIV-*Leishmania*-coinfecting patients. PCR was done on 6 bone marrow



**Figure 1.** Seminested polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis of kinetoplast minicircles of DNA from patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania*. **A**, Relapse of leishmaniasis, as determined by use of 2 different restriction enzymes, *HpaII* (lanes 1-3) and *RsaI* (lanes 4-6). **B**, Sequential isolates from the patient represented in panel A, showing a typical relapse of leishmaniasis over a 2-year period. Lanes 1-6, RFLP profiles obtained by digestion with *HpaII* of the second PCR product of 6 bone marrow samples. **C**, Shift of RFLP patterns, revealing a newly acquired infection of patient GRJ. Lanes 1-3 and 4-6, Restriction profiles determined by use of *HpaII* and *TaqI*, respectively. Despite the maintenance of the zymodeme MON-34, lanes 3 and 6 have a clearly different profile that suggests a newly acquired infection. **D**, Reinfection of patient JAE, with a shift of RFLP pattern in lane 3, as determined by use of *HpaII*. **E**, Reinfection of patient APB, with a shift of RFLP profile in lane 2, as determined by use of *HpaII*. **A-E**, Column M shows molecular size markers (2000, 1500, 750, 500, 300, 150, and 50 bp).

samples, and the product was digested using *Hpa* II. The restriction patterns are identical, revealing a typical relapse, which was also confirmed by isoenzyme analysis (zymodeme MON-1 was characterized in all stocks). The last isolate sample for the patient was obtained 2 years after the first. Another patient with relapse is represented in figure 1A, giving evidence of the maintenance of the profiles, regardless of the enzyme (*Hpa* II or *Rsa* I) used for RFLP analysis.

Figures 1C, 1D, and 1E present examples of reinfection in 3 HIV-*Leishmania*-coinfected patients. Isoenzyme analysis had determined the infections to be relapses (MON-1, MON-34, and MON-24 were typed in the 3 stocks, respectively, before and after treatment), but kDNA snPCR-RFLP analysis clearly shows different patterns, as determined by use of different restriction endonucleases. Sequence data from isolates taken before and after treatment from patient GRJ (GenBank access numbers: AJ275326 and AJ275331) confirms the shift of RFLP profile.

To confirm that the different restriction patterns observed in reinfections were not due to a mosaic structure population, we cloned (in blood-agar plates) pre- and posttreatment strains isolated from a coinfecting and reinfected patient. Eight clones from each strain were identical (in regard to PCR-RFLP profiles) to each other and to the parental strain, suggesting that the new pattern, which was thought to be a reinfection, was not formerly present in the population of that strain.

When possible, we isolated and cultured the parasite from clinical samples (56 *Leishmania* stocks isolated from bone marrow samples of patients). In all these cases, PCR-RFLP profiles were identical whether we worked directly with biologic samples or with their respective cultured *Leishmania* stock, indicating that cultures do not select any of the clones or affect the latter's restriction patterns.

## Discussion

In the Mediterranean basin, *L. infantum* is extremely variable in patients coinfecting with HIV. Enzyme analysis has been widely used to characterize these infections and it remains a useful technique for epidemiologic purposes or as a taxonomic tool; however, isoenzyme characterization has certain limitations when individual stocks from the same HIV-coinfecting patient need to be tracked through time. In addition, >50% of *L. infantum* stocks isolated from HIV-positive subjects are MON-1 [11], and the heterogeneity of stocks identified as MON-1 has been described after analysis with more discriminating methods [12]. Thus, in most cases, enzyme analysis does not reveal whether leishmaniasis infections are due to relapses or newly acquired infections.

As expected, the snPCR detected extremely small amounts of *L. infantum* in biologic samples from these patients, and we found that the PCR was highly specific for *Leishmania* species and that nonpathogenic flagellates, which are usually present in samples from immunocompromised patients, were not amplified. The

primers are expected to amplify all *L. infantum* minicircles present in the sample, and, as discussed elsewhere [4, 13], only one major minicircle class is found in the PCR product. In addition, the kDNA snPCR-RFLP analysis that we used has shown excellent reproducibility and reliability. We must take into account that the use of 6 different restriction enzymes (1 per digestion) ensures the similarity or lack of similarity between the profiles analyzed. Unlike results with isoenzyme characterization, kDNA snPCR-RFLP results can be obtained and interpreted within a few hours once the total DNA has been extracted.

It is remarkable that, in leishmaniasis relapses occurring long after the original infection, the same restriction pattern has persisted even though it has been proposed that minicircle sequences evolve rapidly [14]. However, recent evidence [15] has shown that the restriction sites utilized in PCR-RFLP analysis of the major minicircle classes are conserved over a considerable time (at least 2–3 years, the longest time patients in this study have been monitored).

snPCR-RFLP analysis revealed that the restriction profiles for the 56 *Leishmania* stocks, which were cultured in NNN medium, were identical to those from their respective biologic samples, providing confirmation that culturing does not select any specific clone and providing support for the use of these faster molecular techniques to complement data from isoenzyme analysis. Moreover, in certain situations (e.g., when contamination is present), it is not possible to culture the parasite.

In this study, 3 (7.5%) of the 40 patients had a newly acquired, rather than a relapsed, *Leishmania* infection. The shift in RFLP patterns might be due to the detection of a minority *Leishmania* population remaining after chemotherapy. However, to our knowledge, mixed infections due to *L. infantum* have not been reported, thus providing support for the data presented here.

As determined by isoenzyme characterization of zymodemes, all patients in this study had a relapse of leishmaniasis, and, although *Leishmania*-HIV-coinfecting patients have the tendency to relapse after treatment [8], the fact that most of these HIV-positive patients are intravenous drug users increases their risk of reinfection. Among these subjects, the habit of sharing syringes provides a mechanical substitute (the syringe) for the natural vector (the sandfly) and confirms the increased risk of acquiring new infections for such individuals [16].

In conclusion, use of kDNA snPCR-RFLP analysis could provide more information for physicians to determine whether leishmaniasis infections that fail to respond to treatment are newly acquired infections rather than isoenzyme analysis-determined relapses.

## Acknowledgments

We thank M. Jiménez-Mejías (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain), A. Sans (Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, Spain), and A. Salas and T. Serra (Hospital Son Dureta, Mallorca, Spain) for providing some of the biologic samples.

## References

1. World Health Organization (WHO). *Leishmania*/HIV coinfection: south-western Europe 1990-1998 (WHO/LEISH/2000.42). Geneva: WHO, 2000.
2. van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999;341:1174-9.
3. Ohrt C, Mirabelli-Primdahl L, Karnasuta C, Chantakulkij S, Kain KC. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction genotyping. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:430-7.
4. Morales MA, Chicharro C, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:104-7.
5. Laguna F, López-Vélez R, Pulido F, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. *AIDS* 1999;13:1063-9.
6. Jiménez-Expósito MJ, Alonso-Villaverde C, Sardá P, Masana L. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients with non-detectable HIV-1 viral load after highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13:152-3.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
8. Cruz I, Canavate C, Rubio JM, et al. *Leishmania infantum* nested polymerase chain reaction (Ln-PCR): a comparative study with other techniques for diagnosis and monitoring of *Leishmania*/HIV coinfecting patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (in press).
9. Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MD, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of Kala-azar patients. *Parasitology* 1992;105:183-92.
10. Bastien P, Wahba M. A simplification of the technique for cloning *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 1989;83:435-7.
11. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:298-319.
12. Tibayrenc M, Ayola FJ. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes Infect* 1999;1:465-72.
13. Noyes H, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998;36:2877-81.
14. Rogers WO, Wirth DF. Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 1988;30:1-8.
15. Lambson B, Smyth A, Barker D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Exp Parasitol* 1999;101:229-32.
16. Cruz I, Morales MA, Rodríguez A, Noguera I, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002;359:1124-25.

(0.14–0.91) for women who had used HRT at some point. Our results suggest that use of HRT increases risk of breast cancer, as could be expected in view of previous epidemiological findings, and that tamoxifen use in women using HRT seems to reduce risk of breast cancer to that of non-users of HRT.

We have recorded no significant protective effect of tamoxifen against breast cancer in women at usual or slightly reduced risk of the disease in the expanded duration of follow-up of this cohort, but this drug was effective in women using hormone replacement therapy. No deaths from breast cancer have yet been recorded in our trial. Continuing follow-up of the tamoxifen intervention trials is needed to assess further the effect of tamoxifen use on breast cancer mortality and other long-term risks and benefits of such treatment.

#### Contributors

U Veronesi had the original idea, and designed the study with P Boyle. P Maisonneuve was responsible for the database and the statistical analysis, and N Rotmensz managed the data. V Sacchini coordinated the study. U Veronesi and P Boyle prepared the first draft of the report, to which everyone subsequently contributed.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### \*Italian Tamoxifen Study Group members

M Amadori, G Baratelli, A Barros, G Bernardo, F Bestetti, D Bettega, G Bocchiotti, L Bombelli, B Bonanni, M Bonsignori, G Brignone, S Bruno, J Bryce, L Canigiola, L Carli, P Carnaghi, D Casadei, E Cassano, E Chiesa, P Colombo, S Conforti, A Costa, G D'Aiuto, L D'Amore, M De Liso, A Decensi, L Della Torre, C Di Maggio, N Donadello, G Dossena, G Farante, A Ferrari, A Fini, P Gallotti, P Ghezzi, E Giorgetti, M Guazzi, G Gucciardo, A Guerrieri-Gonzaga, M Gugliuzza, R Guidetti, F Laginha, B Lenzi, F Lonardi, P Lorenzi, F Lovison, M Luerti, A Luini, P Maggi, A Magro, C Maltoni, P M Mannucci, S Milani, S Modena, A M Molino, F Monasterolo, M G Muraca, P Oliviero, P Pagni, G Pardi, P Pellegrino, G Peretti, M A Pizzichetta, A Pluchinotta, M Podda, N Ragni, F Raia, A Rancati, A Ravaioli, G Ravasi, C Robertson, R Rocci, M Rosselli del Turco, A Rulli, A Salvioni, B Santillo, G Scaltrini, G Scambia, M Scarpellini, F Schitulli, E Scolari, T Silipo, B Sorrentino, L Tabacchi, R Travaglini, M Valentini, P Vallivero, A Veronesi, P Veronesi, G Zandonini, N Zizza, A Zocca, M Zottar.

#### Acknowledgments

We thank the Italian women who took part in this study. The study was funded in part by grants from the Italian National Research Council, the Italian Association for Research on Cancer, the American Italian Cancer Foundation, and the Italian League Against Cancer. The study sponsors had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or in the writing of the report.

- 1 Veronesi U, Maisonneuve P, Costa A., et al, for the Italian Tamoxifen Study Group. Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomised trial among hysterectomised women. *Lancet* 1998; 352: 93–97.
- 2 Powles T, Eeles R, Ashley S, et al. Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention trial. *Lancet* 1998; 352: 98–101.
- 3 Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1371–88.
- 4 Veronesi U, Maisonneuve P, Costa A., Rotmensz N, Boyle P. Drop-outs in tamoxifen prevention trials. *Lancet* 1999; 353: 244.
- 5 Bergman L, Beelen MLR, Gallee MPW, et al. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet* 2000; 356: 881–87.

Divisions of Senology (Prof U Veronesi MD, V Sacchini MD) and Epidemiology and Biostatistics (P Maisonneuve Ing, N Rotmensz MSc, Prof P Boyle PhD), European Institute of Oncology, Milan, Italy

Correspondence to: Prof P Boyle, Division of Epidemiology and Biostatistics, European Institute of Oncology, via Ripamonti 435, 20141 Milan, Italy  
(e-mail: peter.boyle@ieo.it)

## Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users

I Cruz, M A Morales, I Noguera, A Rodriguez, J Alvar

Needle sharing by intravenous drug users (IVDUs) has been proposed as providing an alternative, artificial, and anthroponotic cycle for leishmania transmission. We looked for parasites in syringes discarded by IVDUs using two different PCR techniques. *Leishmania* spp were detected in 65 (52%) of 125 syringes collected in southern Madrid, Spain, in 1998, and in 52 (34%) of 154 collected in southwestern Madrid in 2000–01. We found shared restriction fragment length polymorphisms in 12 of 65 positive samples tested, suggesting that syringe sharing can indeed promote the spread of leishmania clones among IVDUs.

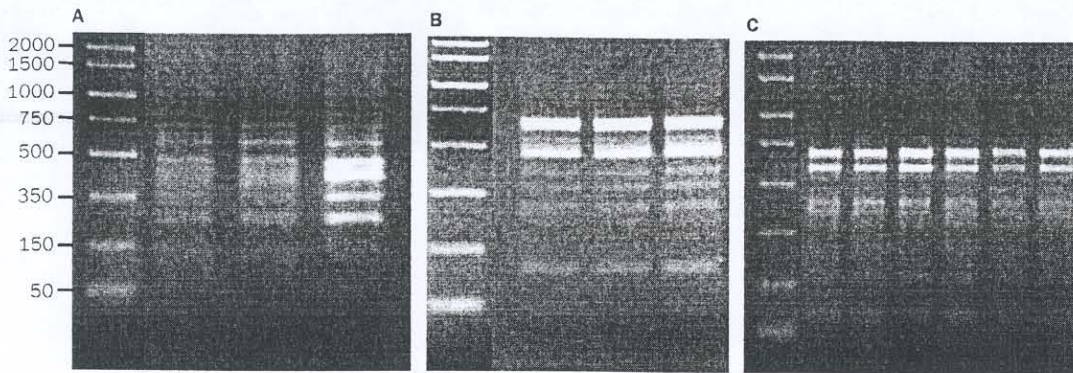
*Lancet* 2002; 359: 1124–25

Epidemiological studies have unexpectedly revealed occurrences of coinfection with HIV and *Leishmania* spp in southern Europe. Therefore, up to 70% of adult cases of visceral leishmaniasis could be associated with HIV infection, and up to 9% of all AIDS patients could have newly acquired or reactivated visceral leishmaniasis. Many patients with coinfection (50–92%, depending on the country)<sup>1</sup> are intravenous drug users (IVDUs), and needle sharing by these individuals has been proposed as providing an alternative, artificial, and anthroponotic cycle for leishmania transmission.<sup>2</sup> In support of this hypothesis,<sup>3</sup> biochemical variants (zymodemes) of *Leishmania infantum* that have been isolated from coinfecting IVDUs have not been seen in immunocompetent individuals with leishmaniasis nor in the natural canine reservoir. Furthermore, at least 52% of coinfecting patients have amastigotes in peripheral blood, whereas these are infrequently detected in the peripheral blood of immunocompetent individuals. Finally, entomological information suggests that mechanical transmission is physically possible: the minute volumes of infected blood (0.3–0.5 µL) habitually ingested by sandflies were found to be sufficient to start parasitisation via the vector in 100% of all cases tested. IVDUs commonly share 0.3 mL of blood via syringes—an amount that would ensure parasite transmission and explain the high prevalence of visceral leishmaniasis among HIV-positive individuals.<sup>4</sup>

We aimed to further assess the role of shared syringes in leishmania transmission among IVDUs. We first verified that leishmania stocks isolated from an outbreak of leishmaniasis among IVDUs in northeast Spain shared the same genotype and zymodeme,<sup>5</sup> and then looked directly for parasites in syringes discarded by IVDUs. Syringes were obtained from two exchange programmes: 125 samples (group A, southern Madrid) were obtained in 1998, and 154 samples (group B, southwestern Madrid) were obtained in 2000–01. DNA was isolated from clotted blood inside the syringes (about 100 µL) by phenol/chloroform extraction, and was used for leishmania-specific PCR analysis. This analysis involved two nested PCRs—one to amplify kinetoplast DNA (ie, the DNA within the parasite's mitochondrion), and the other to amplify *SSUrRNA* gene regions (expressed by all *Leishmania* spp). Both PCR protocols are highly specific for leishmania, and do not amplify DNA from non-pathogenic flagellates; an important point, since infections with lower trypanosomatids have been reported in IVDUs. Details of the PCR protocols are available from the authors. To determine the genotypic profiles of the leishmania parasites, we did a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using the product of the kinetoplast DNA PCR from samples in group A. A similar RFLP analysis was not done on the group B samples because of inadequate storage of these specimens.

Leishmania DNA was detected in 65 (52%) of 125 syringes from group A, and 52 (34%) of 154 from group B by both





### Molecular characterisation of *Leishmania* spp detected in syringes discarded by intravenous drug users

From 65 syringes positive for *Leishmania* spp, the three genotypes shown (A, B, and C) were shared by three, three, and six syringes, respectively.

PCR techniques, with a concordance of 100%. RFLP analysis of the group A syringes revealed that 53 samples had patterns unconnected with any other sample, but that 12 had one of three restriction profiles: one of which was shared by six syringes, and the other two of which were shared by three samples (figure).

The lower proportion of leishmania-positive blood samples collected in 2000–01 compared with 1998 is probably associated with the introduction of syringe-exchange programmes and the decrease in new cases of coinfection in Spain since highly-active antiretroviral therapy started in 1997.

The number of shared RFLP patterns among the samples is suggestive of the spreading of certain leishmania clones among IVUDs via syringe sharing. One person sequentially using several syringes could possibly have accounted for the findings, but we cannot explore this possibility because of the confidentiality issues involved with exchange programmes. The high prevalence of leishmania infection in IVDU populations is remarkable, and our findings lend support to the theory of leishmania transmission by shared syringes.

#### Contributors

All investigators participated in designing the study, doing the PCRs and molecular characterisation, in collecting syringes, and in interpreting the data.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Acknowledgments

I Cruz and M A Morales contributed equally to this work, which was partly supported by Control of Tropical Diseases/WHO (L3/181/42) and Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (3056/99). I Cruz also received a grant from the Instituto de Salud Carlos III (BISC 98/4045).

- Desjeux P, UNAIDS. *Leishmania* and HIV in Gridlock. WHO/CTD/LEISH/98.9 Add.I, UNAIDS/98.23.1998. Geneva: WHO, 1998.
- Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Molina R, et al. Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet* 1992; 339: 264–65.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, et al. *Leishmania* and HIV coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 298–319.
- Molina R, Cañavate C, Cercenado E, et al. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in ten patients with HIV-infection using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS* 1994; 8: 277–79.
- Morales MA, Chicharro C, Ares M, et al. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 104–07.

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain (I Cruz BSc, M A Morales BSc, J Alvar MD); Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (I Noguero MD); and Desk del Cuarto Mundo, Médicos del Mundo-España, Madrid (A Rodríguez MD)

Correspondence to: Dr J Alvar  
(e-mail: jalvar@isciii.es)

### HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium

David M Shavelle, Junichuro Takasu, Matthew J Budoff, SongShou Mao, Xue-Qiao Zhao, Kevin D O'Brien

There is no known pharmacological therapy for calcific aortic valvular sclerosis or stenosis. Because leaflet calcification occurs in areas of lipoprotein deposition, we hypothesised that 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors (statins) might slow aortic valve calcium (AVC) accumulation. We retrospectively identified 65 patients who had undergone two electron-beam computed tomography scans at a mean (SD) interval of 2.5 (1.6) years. 28 (43%) patients were receiving statins. Patients who were treated with statins had a 62–63% lower median rate of AVC accumulation ( $p=0.006$ ) and 44–49% fewer statin patients had definite AVC progression ( $p=0.043$ ). These findings suggest that statins may decrease AVC accumulation.

*Lancet* 2002; 359: 1125–26

Aortic valvular sclerosis, defined as thickening and calcification of a trileaflet aortic valve without obstruction to left ventricular outflow, is a common disease in the elderly. Progressive leaflet calcification and fibrosis can lead to obstruction of left ventricular outflow (aortic stenosis). At present, no pharmacological therapy has been shown to decrease the rate of leaflet calcification or frequency of clinical events in patients with calcific aortic valve disease.

Aortic valve calcification (AVC) occurs in areas of lipoprotein deposition,<sup>1</sup> and raised LDL concentrations are associated with an increased risk of aortic sclerosis.<sup>2</sup> Electron-beam computed tomography (EBT), which has been used to quantify coronary artery calcification,<sup>3,4</sup> is also a highly reproducible method of quantifying AVC.<sup>5</sup> Because 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitor (statin) use has been associated with a decrease in EBT-assessed coronary calcium accumulation,<sup>1</sup> we hypothesised that EBT might indicate an association between statin use and AVC accumulation.

We did a retrospective analysis on 620 asymptomatic patients referred to a single centre by their community-based, primary physicians for EBT scanning to assess coronary artery calcium, and who had undergone two consecutive EBT scans at least 6 months apart. Patients gave informed consent and the Harbor-UCLA Ethics Committee approved the protocol. Exclusion criteria were a history of left ventricular dysfunction; clinical evidence of coronary artery disease, such as angina pectoris, previous coronary bypass surgery or coronary angioplasty; or AVC score less than 10 on the initial scan.

Of the 65 patients who met study inclusion and exclusion