

The Biologist (Lima), 2020, 18(1), jan-jun: 49-53.



The Biologist (Lima)



RESEARCH NOTE /NOTA CIENTÍFICA

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *LEISHMANIA* IN *DIDELPHIS MARSUPIALIS* LINNAEUS, 1758 OF UCAYALI, PERU

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *LEISHMANIA* EN *DIDELPHIS MARSUPIALIS* LINNAEUS, 1758 DE UCAYALI, PERÚ

Jesús Rojas-Jaimes¹

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Continental, Lima, Perú
Corresponding Author: jesus.rojas.jaimes@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to molecularly identify *Leishmania* sp. in a specimen of *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 in the Ucayali Region, Peru. Samples of kidney, liver and spleen were taken, DNA was extracted from the samples to be analyzed for the DNA kinetoplast and to identify *Leishmania* sp. but the parasite was not found.

Keywords: *Leishmania*– marsupial – Reservoir – wild

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar molecularmente a *Leishmania* sp. en un ejemplar de *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 en la Región Ucayali, Perú. Se tomaron muestras de riñón, hígado y bazo, se extrajo ADN de las muestras para ser analizadas para el kinetoplasto del ADN e identificar *Leishmania* sp. pero no se logró identificar al parásito.

Palabras clave: *Leishmania*– marsupial – reservorio – silvestre

doi: 10.24039/rtb2020181445

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis ocasionada por el parásito *Leishmania* sp. es una enfermedad infecciosa de importancia en Salud Pública que genera, adicionalmente al daño tisular, un daño psicosocial debido al estigma que se genera al paciente (Schallig *et al.*, 2007). La presentación de la enfermedad requiere de varios factores involucrados, incluyendo el reservorio del parásito (WHO, 2010).

Se sugiere que *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, un marsupial americano, se comporta como un reservorio de *Leishmania braziliensis* Lainson-Jaimes 1974 en zonas rurales, habiéndose identificado en muestras sanguíneas en Brasil, tanto por serología como por pruebas de detección de ADN (Cabrera *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2007). Así mismo, fue identificado *L. chagasi* Cunha & Chagas, 1937 en *D. marsupialis* en Colombia utilizando técnicas moleculares (Roa *et al.*, 2002), lo que indica la importancia de este marsupial en el ciclo de leishmaniasis visceral. Adicionalmente, se ha comprobado la infección en laboratorio de *L. chagasi* en *D. marsupialis* (Travi *et al.*, 1994; Roa *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2016).

El pequeño marsupial *D. marsupialis* se distribuye ampliamente en las Américas en casi todos los hábitats, a excepción de las zonas altas y desiertos, y su población está relacionada a la disponibilidad de alimentos como frutas y pequeños invertebrados. En el Perú se encuentra en las zonas rurales, donde hay presencia de leishmaniasis (Emmons & Feer, 1990; William *et al.*, 2008; Lozada *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente la presencia de *Leishmania* sp. en un ejemplar de *D. marsupialis* en el distrito de Raymondi, Ucayali, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ejemplar macho fue ubicado en agosto del 2017 en la comunidad nativa Aerija, distrito de

Raymondi, provincia de Atayala, región de Ucayali, Perú, coordenadas 10°44'00"S 73°45'00"O. El encuentro con el animal fue ocasional, siendo un espécimen que sería utilizado para el consumo de la población local. Se tomaron muestras de hígado, bazo y riñón utilizando instrumental estéril (Rojas-Jaimes *et al.*, 2017).

Los tejidos fueron colocados en frascos estériles con etanol al 96%. Los tejidos fueron cortados en secciones de 0,1 cm, colocados en un microtubo de 1,5 mL al cual se le añadió 300 µL de solución de lisis celular que contenía Dodecilsulfato Sódico en el tubo. Se adicionó 20 µL de proteinasa K y se mezcló suavemente, luego se centrifugó, solo si fue necesario, y el tubo se incubó a 55 °C durante toda la noche. Luego se añadió 100 µL de la solución hipertónica para precipitación de proteínas, se agitó vigorosamente durante 20 s y se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm. El sobrenadante se mezcló con 300 µL de isopropanol frío y se agitó suavemente por inversión por más de 50 veces; se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm, y se colocó en el congelador durante 1 h a -10 °C. Paso seguido, se desechó el sobrenadante y se colocó el tubo invertido en papel toalla y se dejó secar al aire durante 5 min. Se añadió 60 µL de solución de hidratación "agua grado biología molecular" y se agitó por 5 s. Finalmente se incubó a 65 °C durante 1 h para solubilizar el ADN (QIAGEN, 2017).

Se utilizó un PCR-kDNA para la detección de *Leishmania*. Los cebadores usados fueron -MP1-L (directo) 5'-TAC TCC TGC CCG ACA CTC TG-3 y MP3-H (reverso) 5'CGG GGT GAA TTC TGT ATG C-3' (López *et al.*, 1993). El ADN de control usado fue *L. (V) braziliensis* cepa MHOM/BR/84/LTB300 y ADN humano a partir de muestras negativas para la leishmaniasis.

Para cada reacción de PCR se usó un control positivo para *L. (V) braziliensis* (cepa LTB300), un control negativo que consiste en ADN humano positivo para el gen de la globulina y un blanco (agua destilada, grado PCR) para revelar la contaminación cruzada. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final por reacción de 20 µl que contiene 4 DNA µl, 2 µl de tampón 10X PCR (Invitrogen), 1 µl de cada cebador (10 µM), 0.2 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen, Grand Island, NY), 0.6 µl de 50 mM de MgCl₂ y 2 µl de 1.25 mM de cada dNTP (Lopez *et al.*, 1993).

Las condiciones del termociclaje usadas en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 según la programación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y 35 ciclos incluyendo desnaturalización: 94 °C durante 45 s, hibridación de cebadores a 58 °C durante 45 s; extensión: 72 °C durante 1 min; y temperatura final de extensión: 72 °C durante 5 min. Después se refrigeró a 4 °C hasta su uso para preservación del amplicón.

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% (3 g de agarosa con 197 ml de buffer TBE 1X). Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb a 250 pb (Invitrogen). Se colocó 5 µl de los productos de la PCR y 3 µl del marcador de corrida por pocillo. La corrida electroforética se realizó sobre el buffer TAE 1X a un voltaje constante de 100V durante 35 min. El gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 mg/ml por 30 min (López *et al.*, 1993).

La presencia de una banda de 70 pb, cuando es comparada con el control positivo y con el marcador de peso molecular de 50 a 250 pb indica un resultado positivo.

Aspectos éticos: El animal fue sacrificado por la población nativa para autoconsumo, por tanto se aprovechó la ocasión para tomar las muestras en forma asépticas, respetando las normas éticas y resguardando los nombres de las personas que realizaron la caza.

RESULTADOS

La Fig. 1 nos señalan los resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar *Leishmania* sp. en *D. marsupialis*.

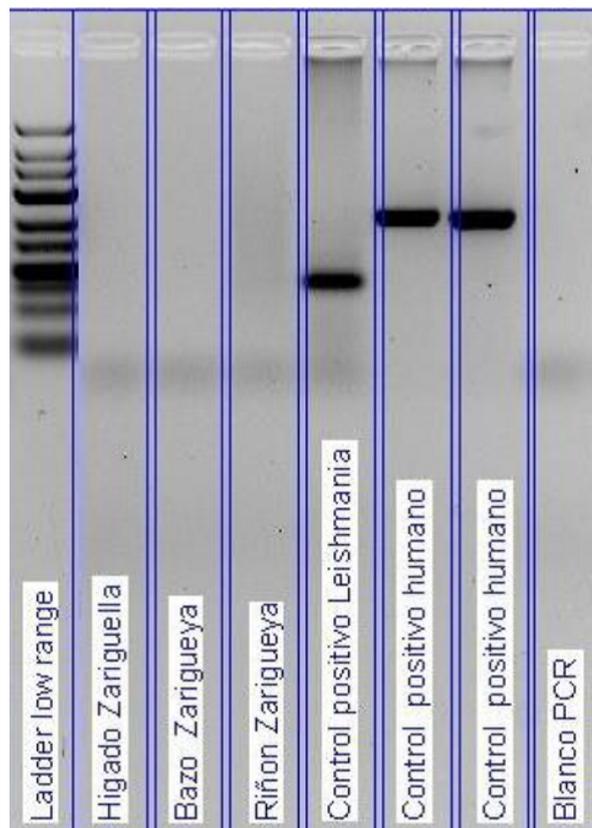


Figura 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar *Leishmania* sp. PCR-kDNA del riñón, bazo e hígado para la identificación de *Leishmania* sp. De izquierda a derecha, primer carril: marcador de peso molecular de 50-250 pb; carriles del 2-4: muestras negativas; carriles del 5-7: controles positivos y carril 8: blanco negativo.

DISCUSIÓN

Las pruebas moleculares de los tejidos viscerales resultaron negativas para la detección de *Leishmania* sp. (figura 1), cabe destacar que solo fue un animal muestreado y no se puede descartar la parasitosis en este animal más aun cuando existe varios estudios previos que han mostrado la presencia del parásito en *D. marsupialis* (Lainson *et al.*, 1989 ab; Emmons *et al.*, 1990; Cabrera *et al.*, 2003).

Leishmania es un parásito que se encontrado en forma natural infectando fauna silvestres como infectando animales en ensayos *in vivo* (Yoshida *et al.*, 1985; Travi *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2008). De esto se destaca la posibilidad que el parásito puede parasitar un amplio número de reservorios contribuyendo al ciclo de la enfermedad (Yoshida *et al.*, 1985). Es importante saber que la población local utiliza la carne de *D. marsupialis* para consumo atribuyendo a este alimento algunas propiedades medicinales. Como se pudo observar el consumo de carne de este marsupial puede generar parasitosis, si la carne no se encuentra bien cocida o por un accidente mecánico en la exista intercambio de fluido como la sangre entre el marsupial y la persona (Yoshida *et al.*, 1985; Travi *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 2015; Zambrano *et al.*, 2016).

Se concluye que no se identificó *Leishmania* sp. en las vísceras estudiadas de *D. marsupialis*, probablemente por el numero escaso de muestra que es una limitación de nuestro estudio, remarcando que otro estudio si encontró a *Leishmania* en el marsupial (Zambrano *et al.*, 2016)..

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, M.S.; Courtenay, O.; Maria, M.E.; Carvalho, F.G.; Carvalho, A.W.S.; Soares, F.; Carvalho, S.; Costa, P.; Zampieri, R.; Floeter-Winter, R.; Shaw, J. & Brandah-Filho S.. 2015. Infectiousness of sylvatic and synanthropic small rodents implicates a multi-host reservoir of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9:1–14.
- Cabrera, M.A.A.; Paula, A.A.; Camacho, L.A.B.; Marzochi, M.C.A.; Xavier S.; Da Silva, A. & Jansen, A. 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 45:79–83.
- Emmons, L.H. & Feer, F. 1990. *Neotropical rainforest mammals. A field guide*. USA: University of Chicago. 281 p.
- Lainson, R.; Braga, X.; De Souza, A.; Pôvoa, M.; Ishikawa, E. & Silveira, F. 1989a. *Leishmania* (*viannia*) *shawii* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in amazonian Brazil. Annal of Parasitology Human Comparative, 64: 200-207.
- Lainson, R. & Shaw, J.J.; 1989b. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyurus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. Annal of Parasitology Human Comparative, 64:3–9.
- Lopez, M.; Inga, R.; Cangalaya, M.; Echevarria, J.; Llanos-Cuentas, A.; Orrego, C. & Arevalo J. 1993. Diagnosis the *Leishmania* using the Polimerase Chain Reaction: A simplified procedure for field work. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 49: 348-356.
- Lozada, S.; Ramírez, G.F. & Osorio, JH. 2015. Características morfológicas de un grupo de zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) del Suroccidente Colombiano. Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru, 26: 200–205.
- QIAGEN. 2017. *Gentra®*, *Puregene®* (QIAGEN Group). 2007-2010. Fecha de consulta: 9 de junio de 2017. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/gentra-puregene-tissue-kit/#orderinginformation>
- Roa, DM.; Sarmiento, L.; & Rodríguez, G. 2002. Amiloidosis en *Didelphis marsupialis* infectado experimentalmente con *Leishmania chagasi*. Biomedica, 22: 237–240.
- Rojas-Jaimes, J.; Correa-Nuñez, G.; Rojas-Palomino, N. & Cáceres-Rey, O. 2017. Detección de *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* en ejemplares de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) recolectados en pecaríes de collar (*Pecari*

- tajacu*). *Biomédica*, 37: 208-214.
- Schallig, HDFH.; da Silva, ES.; van der Meide, WF.; Schoone, GJ. & Gontijo, CMF. 2007. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector borne and zoonotic diseases*, 7: 387–393.
- Travi, BL.; Jaramillo, C.; Montoya, J.; Segura, I.; Zea, A. & Goncalves, A. 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 50: 557-565.
- WHO. World Health Organization. 2010. *Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO expert Committee on the control of leishmaniases* Geneva Technical Report Series Geneva.
- Williams, SL. & Genoways, HH. 2008. *Marsupials*. En: Gardner, A.L. (ed). *Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. USA: University of Chicago. pp. 255-300.
- Yoshida, L.; Correa, F.; Pacheco, R.; Momen, H. & Grimaldi, G. 1985. *Leishmania mexicana* in *Didelphis marsupialis aurita* in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 27: 172.
- Zambrano, C.; Sotelo, M.; Oviedo, O.; Barraza, O. & Rodríguez, G. 2016. Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 7: 83-91.

Received July 28, 2019
Accepted January 30, 2020.