



**Caracterització de les leishmànies:
aplicabilitat de tècniques basades en l'estudi de
proteïnes i del ADN**

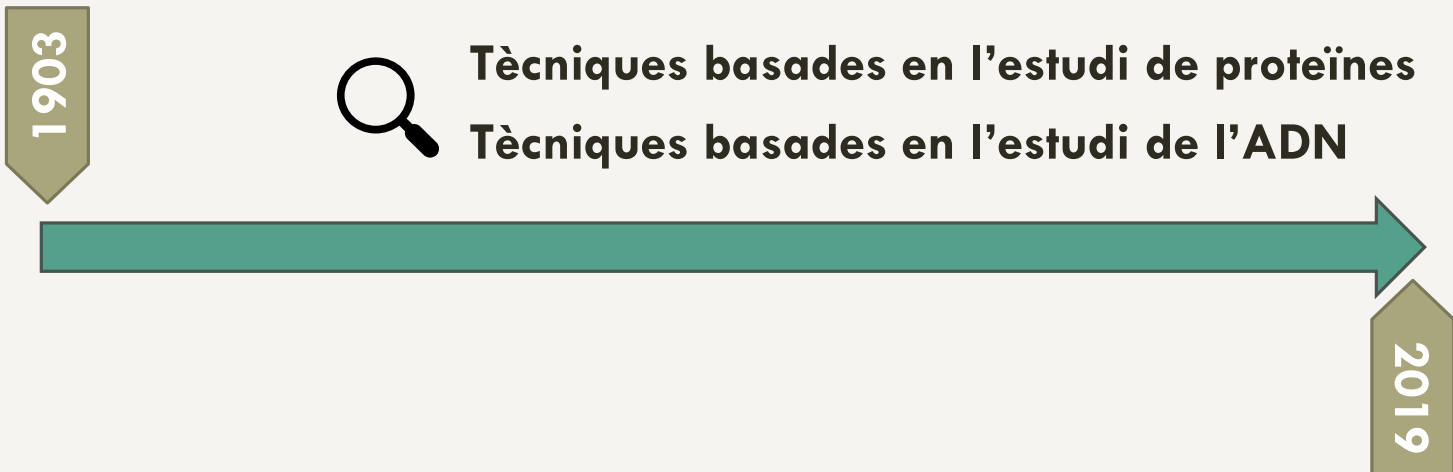


Anna Fernández Arévalo

**Secció de Parasitologia. Departament de Biologia,
Sanitat i Medi Ambient (Dra. M. Gállego Culleré)
Servei Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant
Pau (Dra. C. Muñoz Batet)**

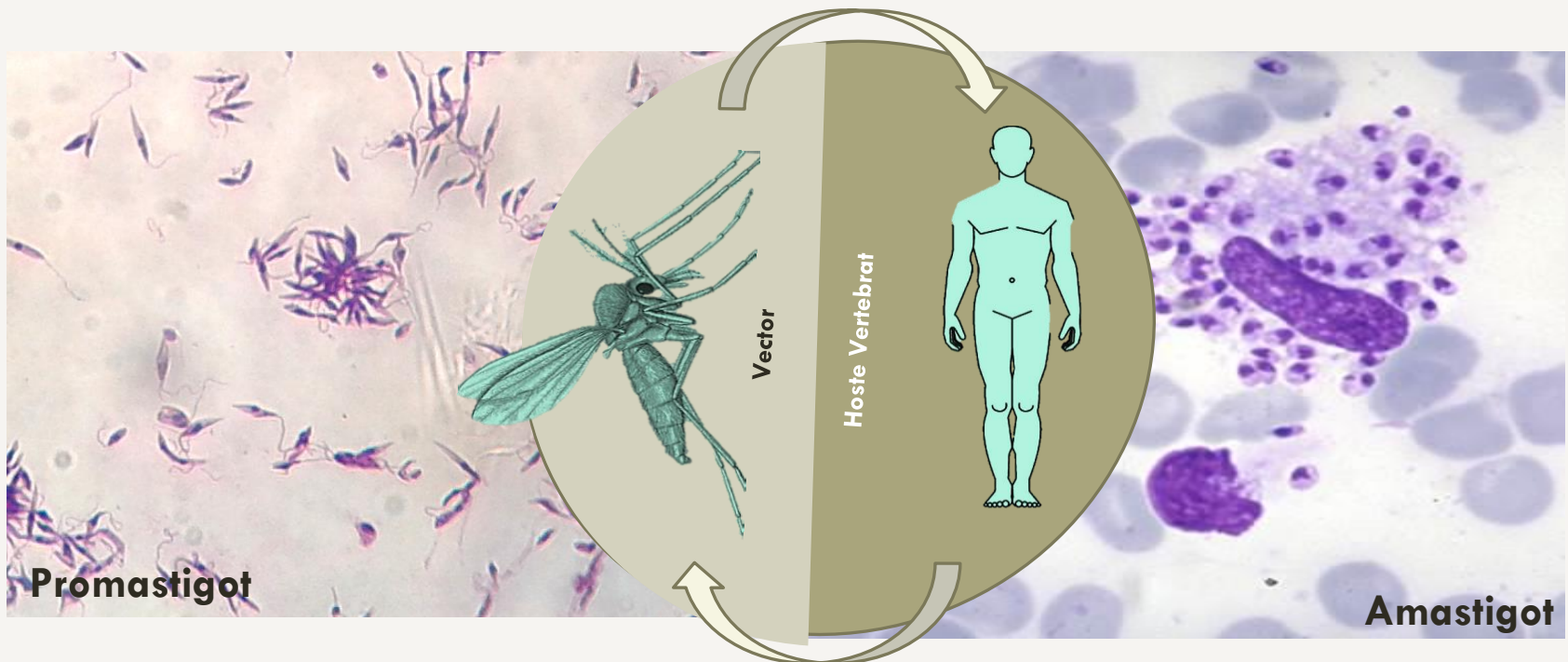
**5è Seminari de
Recerca 2019
FFCA - UB**

- **Introducció**
 - **Leishmànies**
 - **Espècies de *Leishmania***
 - **Leishmaniosis**
 - **Interès de la caracterització**
- **Mètodes de caracterització**



Leishmania spp.

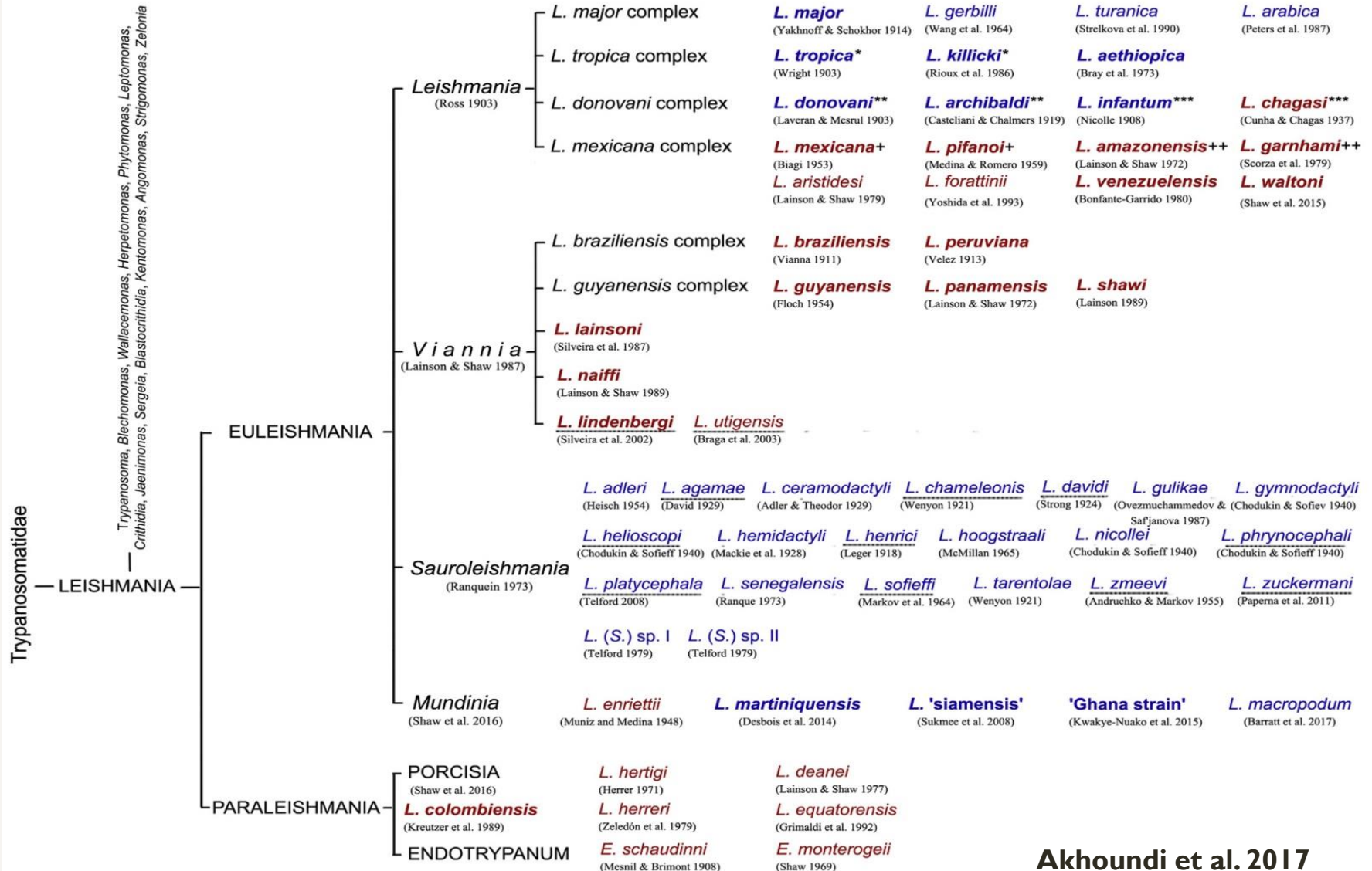
- Protozoous, classe Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae
- Eucariotes unicel·lulars, uniflagel·lats, amb kinetoplast i paràsits estrictes
- Transmissió per picada de femelles de dípters flebotòmids: *Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp.
- Possibles hostes: gossos, rosegadors, humans, etc.
- Agents causals de les leishmaniosis



Espècies de *Leishmania*

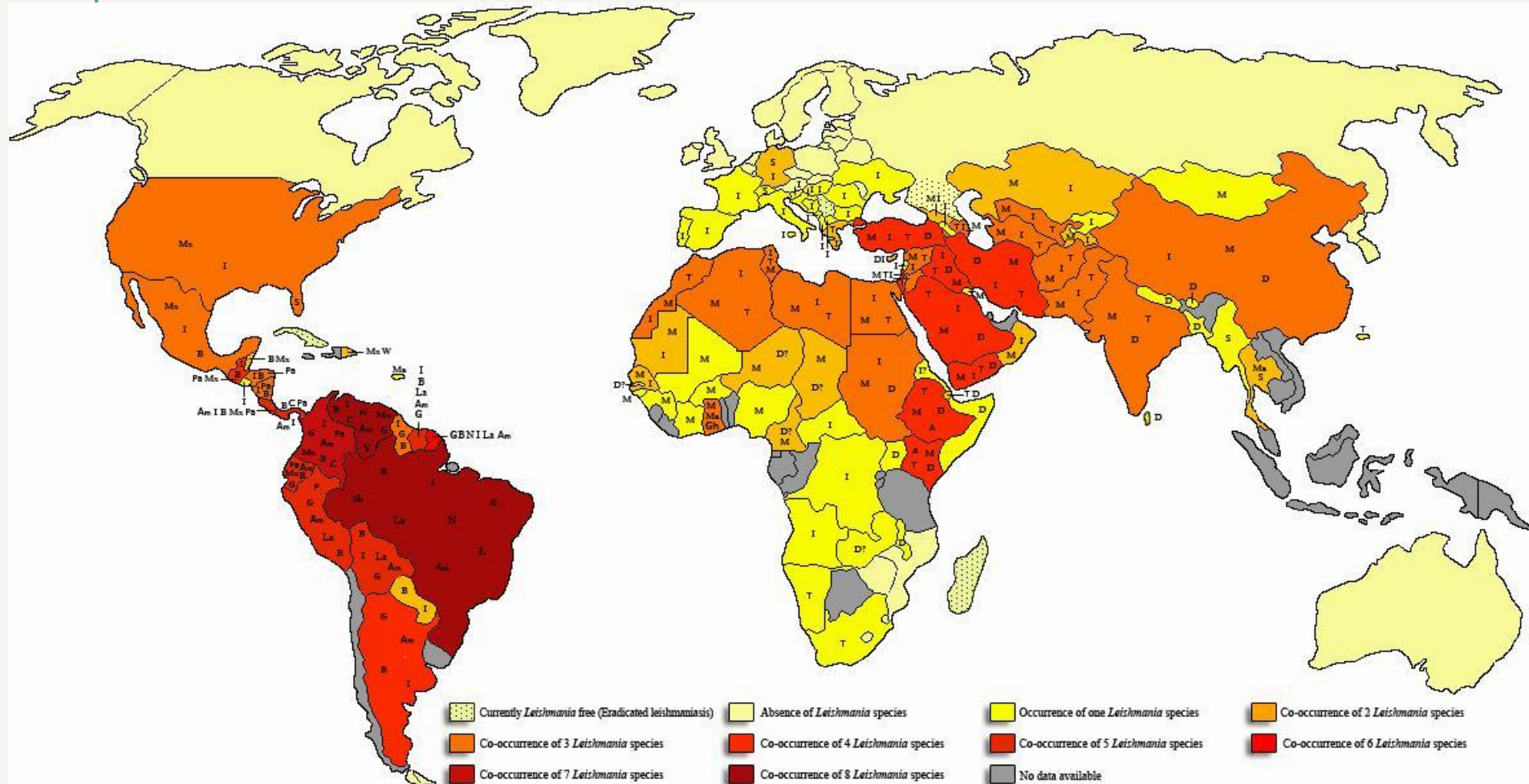
Actualment 54 espècies; 20 afecten al ser humà

Gènere dividit en: Seccions, Subgèneres, Complexes i Espècies

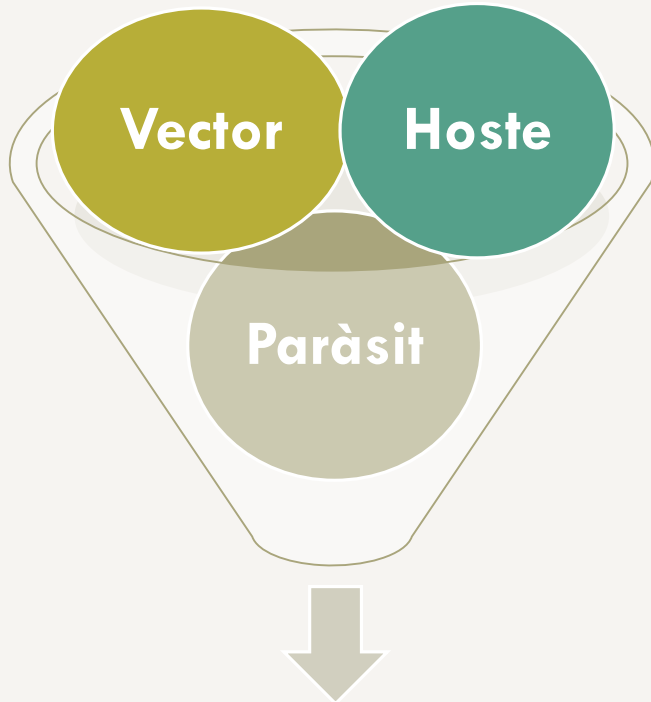


Espècies de *Leishmania*

- Àrees tropicals i subtropicals
- Espècies en zones geogràfiques concretes



Leishmaniosis



Tipus de Leishmaniosis

- Asimptomàtica
- Leishmaniosi Cutània (LC)
- Leishmaniosi Mucocutània (LMC)
- Leishmaniosi Visceral (LV)



Interès de caracteritzar

- Tropisme de les espècies vers LC, LMC, LV o altres formes:
 - Complexe *L. donovani* principal responsable LV
 - *L. braziliensis* principal responsable LMC
- Severitat i derivació de la malaltia



- Anticipació a la possible evolució del pacient
- Millor gestió i tractament
- Epidemiologia



Abans de caracteritzar...

- **Espècies no distingibles morfològicament**
- **Casos importats: 5% del casos de 2017 a Espanya**
- **Complexes ben definits, però dificultats per establir què es una espècie. Espècies o poblacions?**
 - **Resolució variable entre tècniques**
 - **Reproducció sexual**
 - **Heterozigosis**
 - **Formes intermèdies entre espècies properes**
 - **Híbrids**





Tècniques de caracterització



Factors extrínsecs

De 1903, fins els anys 70...

- Comportament en el cultiu
- Comportament en l'hoste
- Comportament en el vector
- Geografia
- Reaccions serològiques
- Reaccions a fàrmacs

IDENTIFICATION OF SPECIES

For general purposes in human medicine, it is enough to determine the geographical origin of a given strain of *Leishmania* and the disease with which it is associated. In a few places — e.g., Panama and the adjacent part of South America — however, two or more species may be present simultaneously and identification becomes more difficult. An

A AGGLUTINAÇÃO E O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEISHMANIAS (*)

DR. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA

Primeres definicions de moltes espècies basades en aquest tipus de criteris

Leishmania infantum, agent des cas d'infection splénique infantile, voisins du Kala-Azar, observés en Italie et dans la Régence de Tunis.⁽¹⁾

Tècniques bioquímiques

Dels anys 70 fins "l'actualitat"

Factors intrínsecs

Anàlisi indirecte del contingut genètic

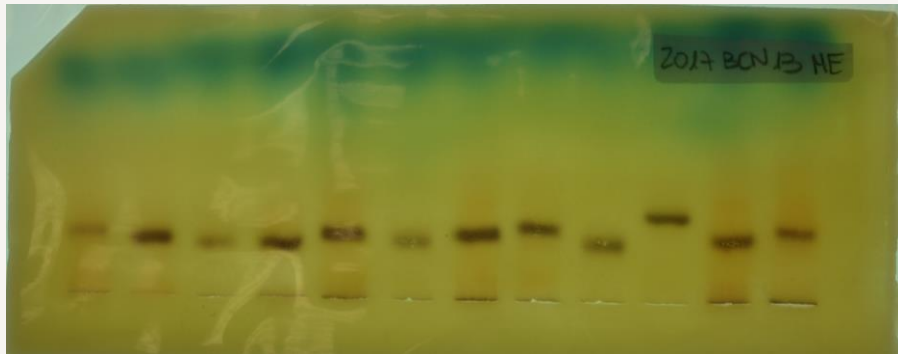
Deducció a partir de fenotip

- **Radiorespirometria en cultius de promastigots**
- **Estudi de glúcids de membrana per aglutinació de lectines**
- **Anticossos monoclonals**
- **Estudi de isoenzims**



Tècniques bioquímiques- MLEE

- **Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)**
- **13-15 enzims metabòlics (MON): DIA, FH, GOT1, GOT2, GPI, G6PD, GLUD, ICD, MDH, ME, MPI, NP1, NP2, PGD, PGM**
- **Electroforesis, a pH constant, de proteïnes. Revelat dels enzims seleccionats. Donar valor numèric a les distàncies de migració. Recopilació del conjunt de valors obtinguts per a tots els enzims. Assignació d'un zimodema.**
- **1 enzim - 1 gen. Existència de polimorfismes que canvien la proteïna que alteren la seva migració electroforètica**



Zymodemes MON-	Enzyme profiles														Reference strains	
	MDH	ME	ICD	PGD	G6PD	GLUD	DIA	NP ₁	NP ₂	GOT ₁	GOT ₂	PGM	FH	MPI		GPI
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/FR/78/LEM 75
11	104	100	100	100	105	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/FR/80/LEM 189
24	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/DZ/82/LIPA 59
27	100	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/IT/79/ISS 7
28	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/ES/83/BCN 2
29	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	MHOM/ES/81/BCN 1

Rioux et al. 1990

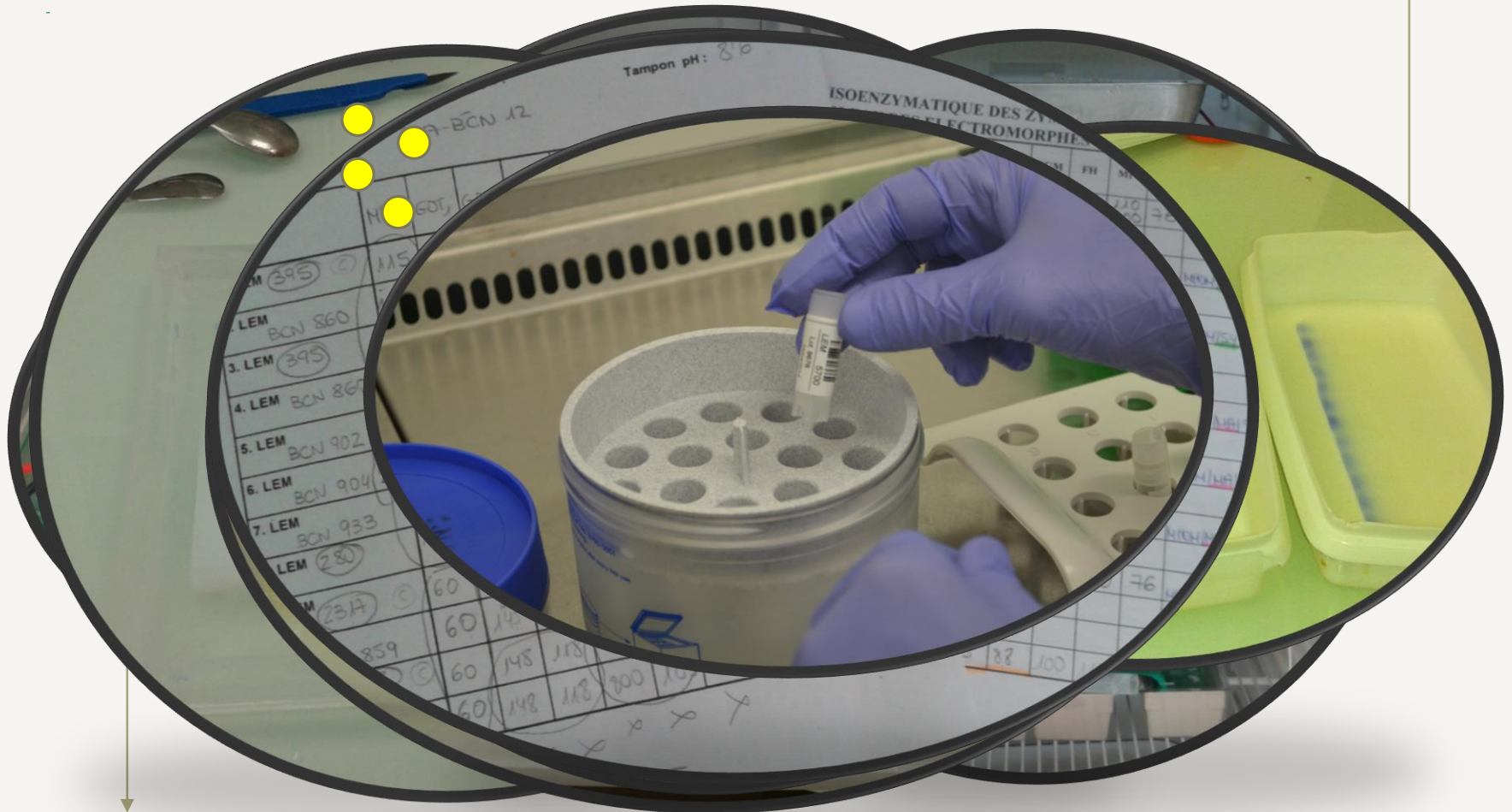
Tècniques bioquímiques- MLEE

Obtenció
extractes
proteics

Disseny dels
gels

Confecció dels gels

Càrrega dels gels



Migració dels
gels

Tall dels
gels

Revelació i
fixació

Interpretació i
identificació

MLEE – Estudi en soques importades

Origen	Espècie de <i>Leishmania</i>	Zimodema
Marroc (n=4)	<i>L. major</i>	MON 25
Mauritania (n=2)	<i>L. major</i>	MON 26
Israel (n=1)	<i>L. tropica</i>	MON 137
Jordània (n=1)	<i>L. major</i>	MON 67
Ecuador (n=3)	<i>L. guyanensis</i> (n= 2)	MON 327, MON 330
	<i>L. braziliensis</i> (n=1)	MON 158
Brasil (n=2)	<i>L. braziliensis</i>	MON 130, MON 158
Panamà (n=1)	<i>L. panamensis</i>	MON 329
Guatemala (n=1)	<i>L. braziliensis</i>	MON 328
Desconegut (n=4)	<i>L. braziliensis</i> (n=1)	MON 158
	<i>L. infantum</i> (n=3)	MON 24, MON 29, MON 34
19 SOQUES	6 ESPÈCIES	13 ZIMODEMES (4 NOUS)

MLEE – Estudi en soques importades

Origen	Espècie de <i>Leishmania</i>	Zimodema
Marroc (n=4)	<i>L. major</i>	MON 25
Mauritania (n=2)	<i>L. major</i>	MON 26
Israel (n=1)	<i>L. tropica</i>	MON 137
Jordània (n=1)	<i>L. major</i>	MON 67
Ecuador (n=3)	<i>L. guyanensis</i> (n= 2)	MON 327, MON 330
Brasil (n=2)	<i>L. braziliensis</i>	MON 130, MON 158
Panamà (n=1)	<i>L. panamensis</i>	MON 329
Guatemala (n=1)	<i>L. braziliensis</i>	MON 328
Desconegut (n=4)	<i>L. braziliensis</i> (n=1)	MON 158
	<i>L. infantum</i> (n=3)	MON 24, MON 29, MON 34
19 SOQUES	6 ESPÈCIES	13 ZIMODEMES (4 NOUS)

Correlació entre origen geogràfic i zimodema

MLEE – Estudi en soques importades

Origen	Espècie de <i>Leishmania</i>	Zimodema
Marroc (n=4)	<i>L. major</i>	MON 25
Mauritania (n=2)	<i>L. major</i>	MON 26
Israel (n=1)	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilitat d'espècies i zimodemes a Amèrica Llatina • Nous zimodemes 	
Jordània (n=1)		<i>L. major</i>
Ecuador (n=3)	<i>L. guyanensis</i> (n= 2)	MON 327, MON 330
	<i>L. braziliensis</i> (n=1)	MON 158
Brasil (n=2)	<i>L. braziliensis</i>	MON 130, MON 158
Panamà (n=1)	<i>L. panamensis</i>	MON 329
Guatemala (n=1)	<i>L. braziliensis</i>	MON 328
Desconegut (n=4)	<i>L. braziliensis</i> (n=1)	MON 158
	<i>L. infantum</i> (n=3)	MON 24, MON 29, MON 34
19 SOQUES	6 ESPÈCIES	13 ZIMODEMES (4 NOUS)

MLEE

- Permet establir relacions entre soques
- Utilitzada per caracteritzar gairebé totes les espècies
- Tècnica en la que se basa la taxonomia
- Millor coneixement de epidemiologia (zimodemes circulants, vectors, reservoris)
- *Gold standard*

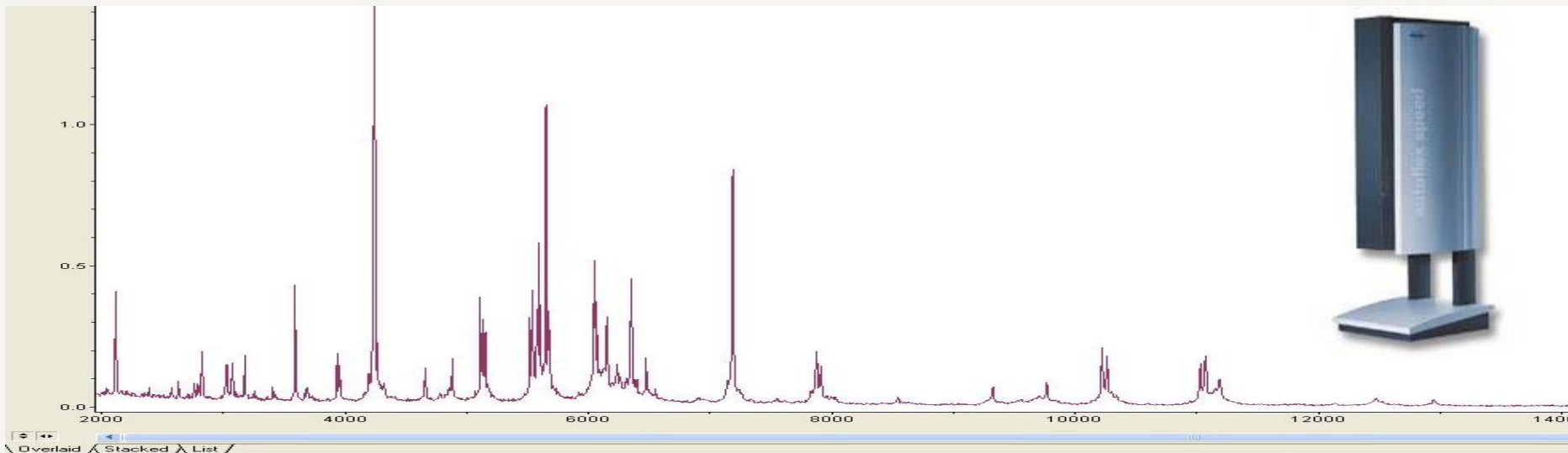


- Parteix de grans quantitats de cultiu
- Feixuga, lenta, casolana i cara
- Difícil interpretació
- Diferents fenotips de genotips idèntics i viceversa

Tècniques proteòmiques

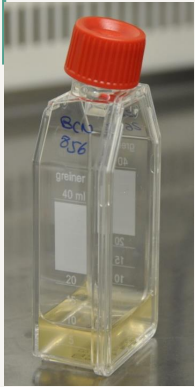
De 2014 fins l'actualitat

- **Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-flight Mass spectrometry**
- **Identificació per l'espectre proteic:**
 - **Identificació de pics concrets**
 - **Comparació amb bases de dades**

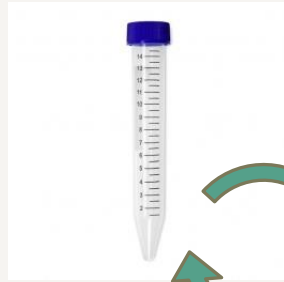


MALDI-TOF MS

■ Procediment adquisició d'espectres (Cassagne et al. 2014)



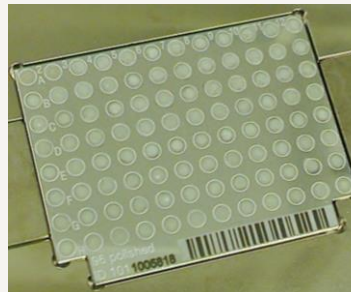
Cultiu $\approx 10^6$ prom/ml



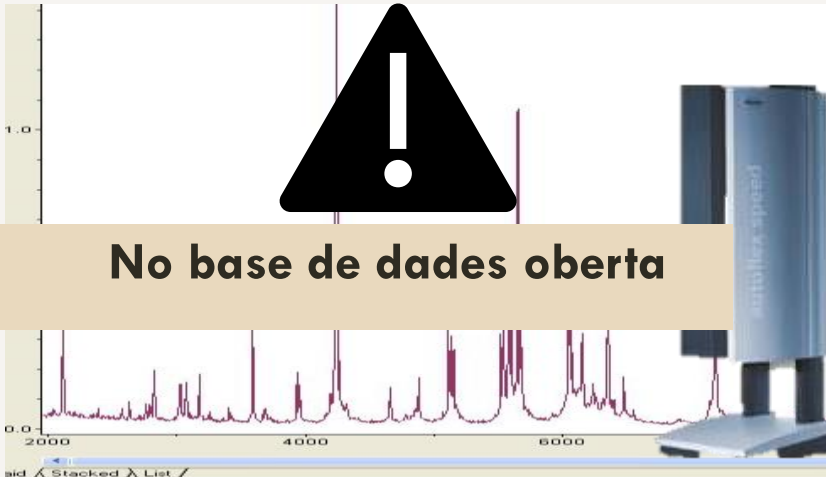
Rentats amb NaCl 0,9%



Resuspensió



cultiu + matriu



No base de dades oberta

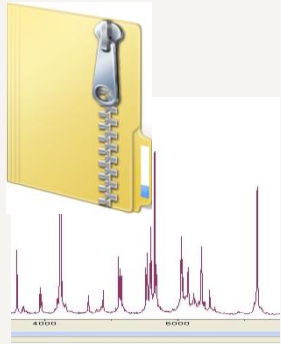
- Col·laboració amb Marsella, Montpeller, Caiena

OBJECTIU:

Crear una base d'espectres per identificació de leishmànies *on-line*

- Creació d'un llibreria d'espectres amb 121 soques (33 espècies)
- Incorporació de la llibreria a l'aplicació web
- Validació de la llibreria amb 231 soques de *Leishmania* + 37 soques d'altres kinetoplàstids, bacteries i fongs.

MALDI-TOF MS – Llibreria *on-line*



MSI

<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>

Welcome to MSI Platforme

MSI provides you the opportunity to experiment new ways of identifying mass spectra

Connection

PERSO_LAURENCE

.....

Connection

Create account

NEW IDENTIFICATION

REPORT LIST

Q SAMPLES IDENTIFICATION

Select a reference spectra database

COMMUNITY

Select an organism

Leishmania

Diptera

Filamentous & Yeast

Select a ZIP file

Browse ...

The ZIP size must be less than 50 Mo

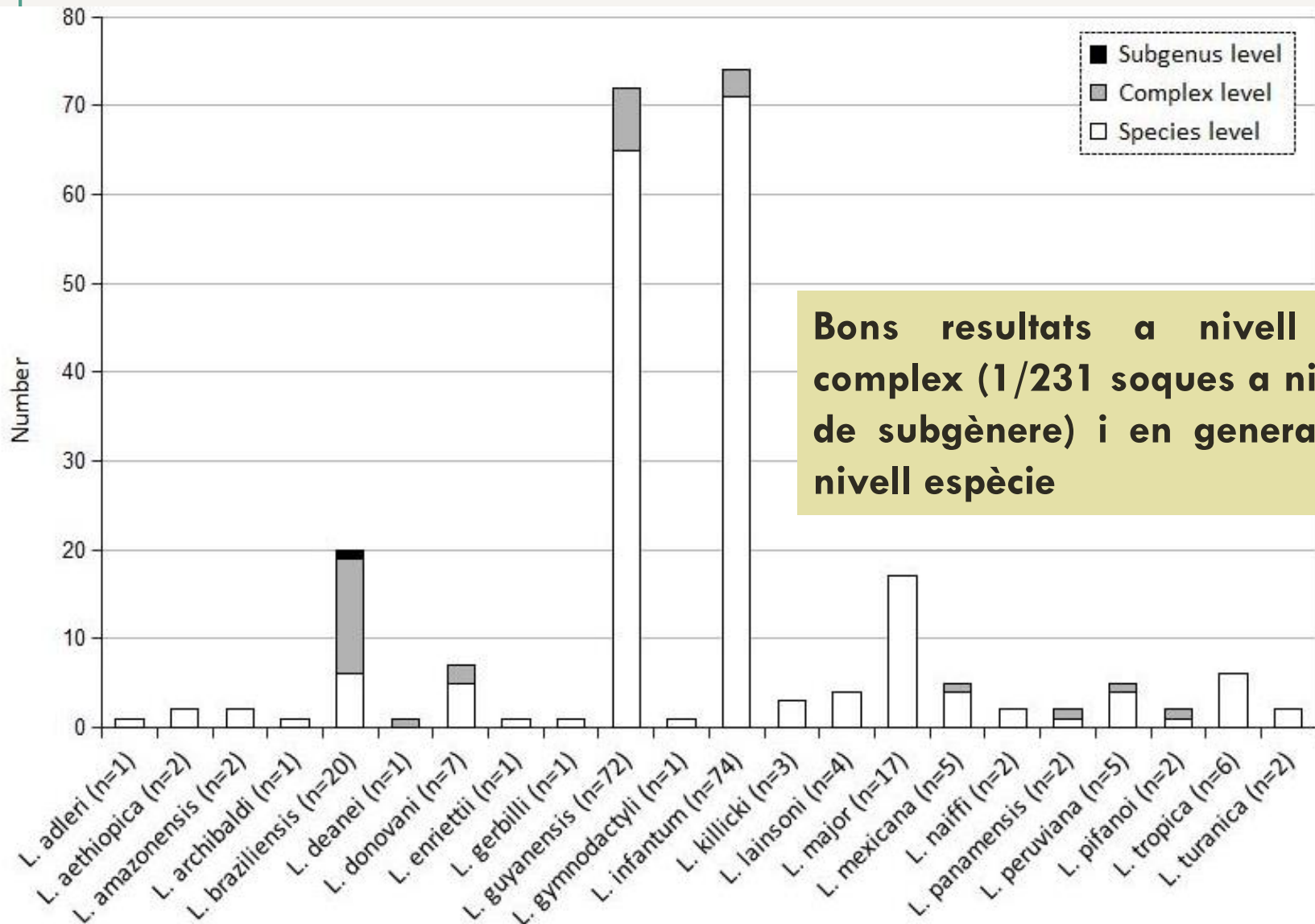
Delete Start Browse ...

RESULTS LIST

SAMPLE	PKS	REFERENCE	S%	CLOSED GRP	S%	FAR GRP	S%	CTM1	S%	CTM2	S%	ACTION
170608 BCN962:0_A1	38	Leishmania archibald ...	42	Leishmania infantum ...	39	Leishmania mexicana ...	26					
170608 BCN962:0_A10	42	Leishmania infantum	43	Leishmania archibaldi	41	Leishmania arabica	25					
170608 BCN962:0_A2	30	Leishmania infantum	36	Leishmania archibaldi	33	Leishmania mexicana	31					
170608 BCN962:0_A3	41	Leishmania infantum	36	Leishmania archibaldi	36	Leishmania gerbilli	26					

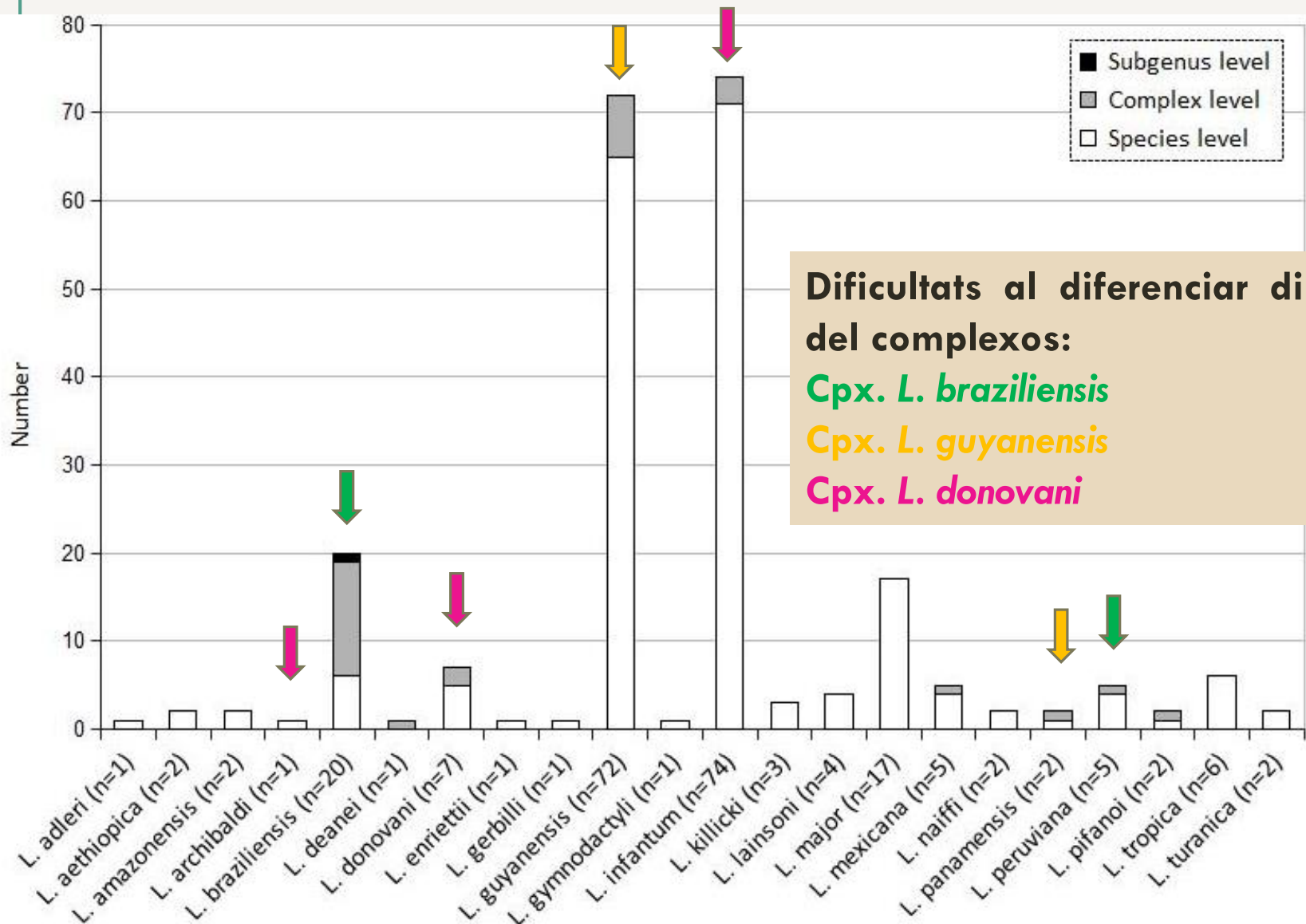
MALDI-TOF MS – Llibreria *on-line*

Resultats d'identificació en la validació

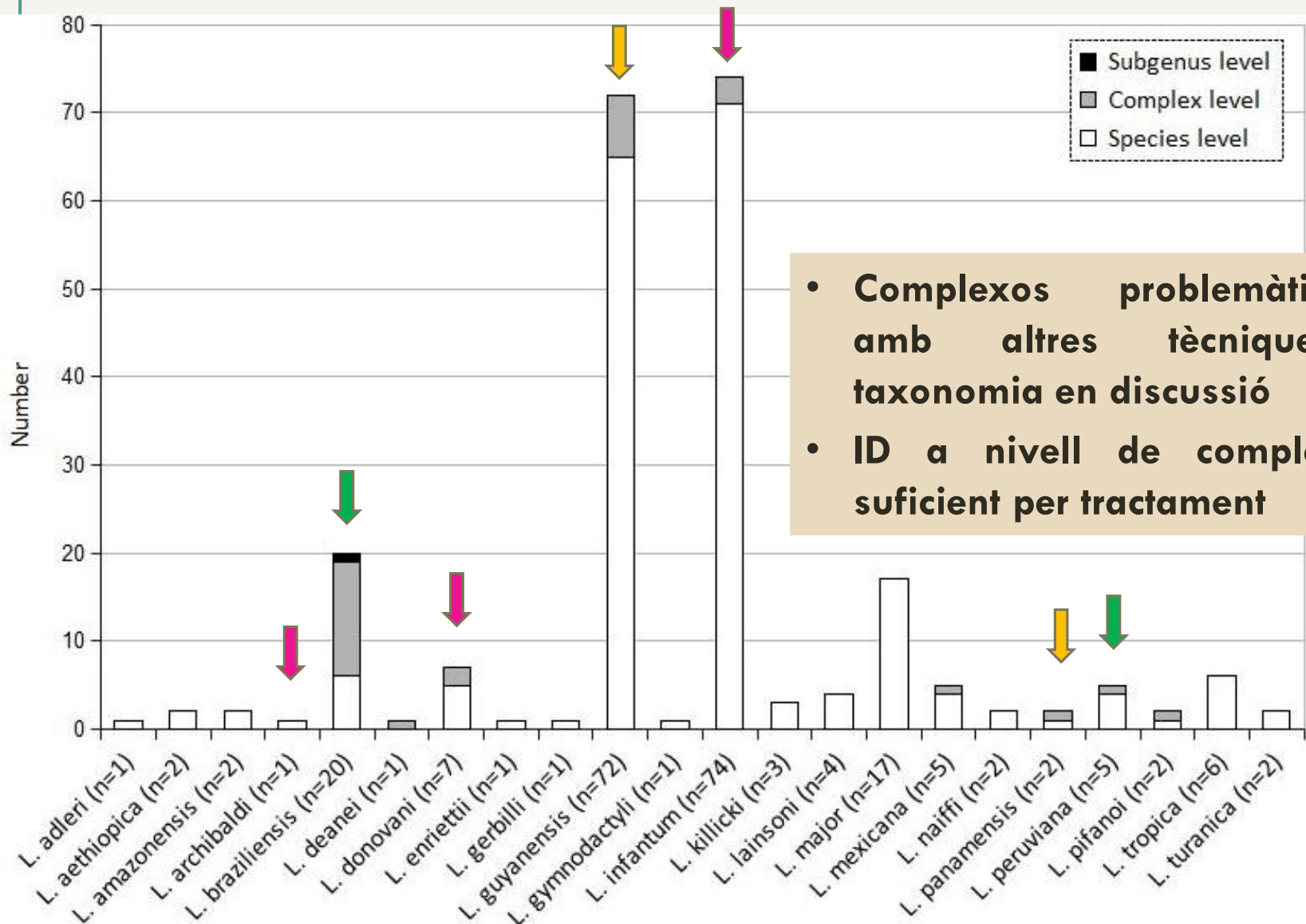


Bons resultats a nivell de complex (1/231 soques a nivell de subgènere) i en general, a nivell espècie

Resultats d'identificació en la validació



Resultats d'identificació en la validació



- **Complexos problemàtics amb altres tècniques: taxonomia en discussió**
- **ID a nivell de complex suficient per tractament**

MALDI-TOF MS – Llibreria *on-line*

Valors de similitud. Influència del punt de tall

Threshold	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
Id correct at the species level	200	198	198	197	193	184	171	159	138	100	63	34	13	2	0
Id correct at the complex level	30	30	30	29	25	17	13	9	5	3	0	0	0	0	0
Incorrect Id	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Threshold not reached	0	2	2	4	13	30	47	63	88	128	168	197	218	229	231
PPV (species level)	0,86	0,86	0,86	0,86	0,89	0,91	0,92	0,94	0,96	0,97	1	1	1	1	-
PPV (complex level)	0,99	0,99	0,99	0,99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-

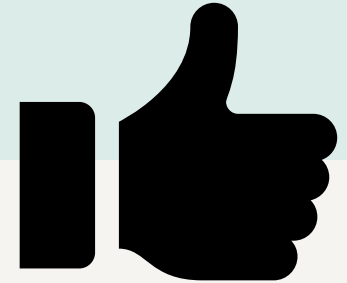
- A mesura que puja punt de tall, disminueix n° de soques identificables
- Valor mínim recomanable = 20
- Punt de tall a establir per cada usuari en funció de nivell d'identificació necessari
- Visió global i crítica dels resultats (4 rèpliques, 3 valors de similitud...)

MALDI-TOF MS – Llibreria *on-line*

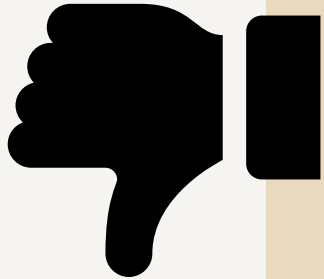
- Ràpida
- Senzilla
- Baix cost de reactiu*



Base de dades on-line i gratuïta



- Gran inversió inicial*
- Poden donar-se problemes d'interpretació
- Algunes espècies poc representades
- Dificultat per separar algunes espècies
- ~~■ Falta de base de dades~~

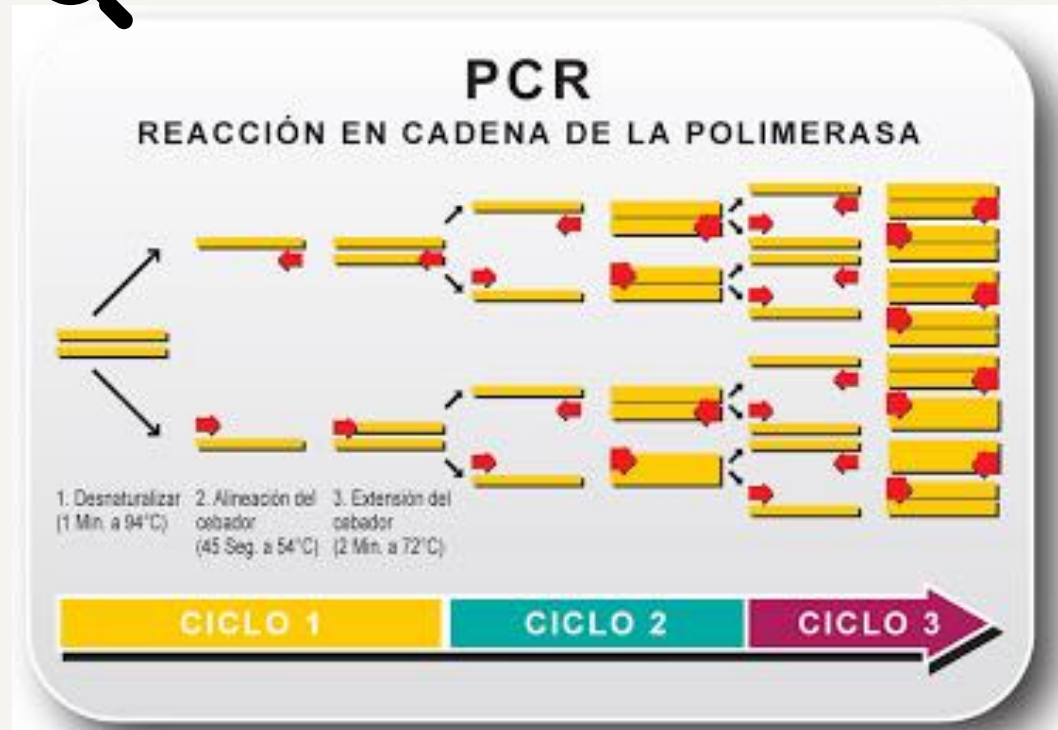


Implementada com a tècnica de caracterització a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tècniques moleculars

Dels anys 70 fins l'actualitat

- Estudis de flotabilitat
- Hibridació per sondes
- Cariotip per camp polsat
- Tècniques basades en PCR



Tècniques moleculars - PCR

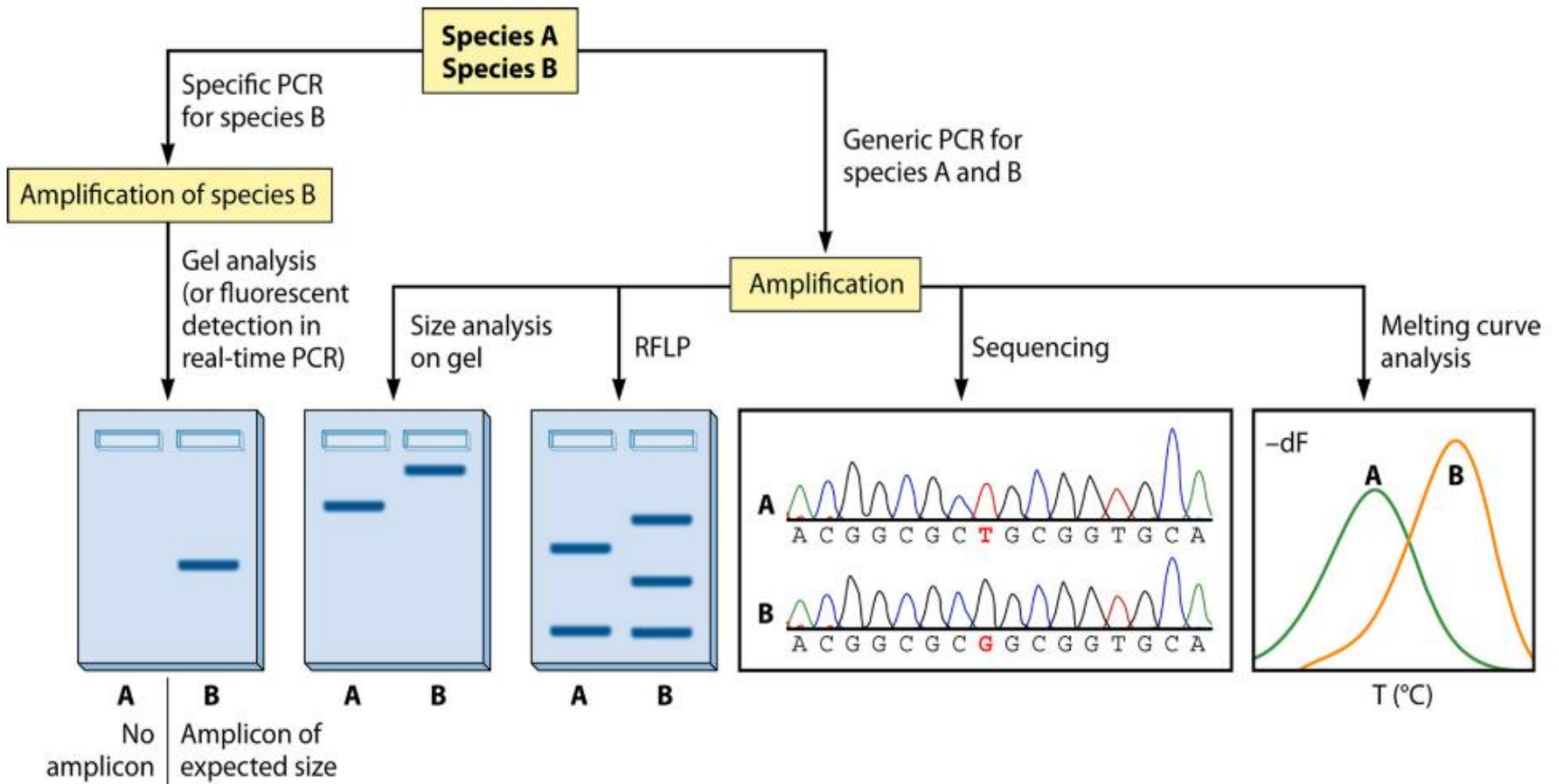
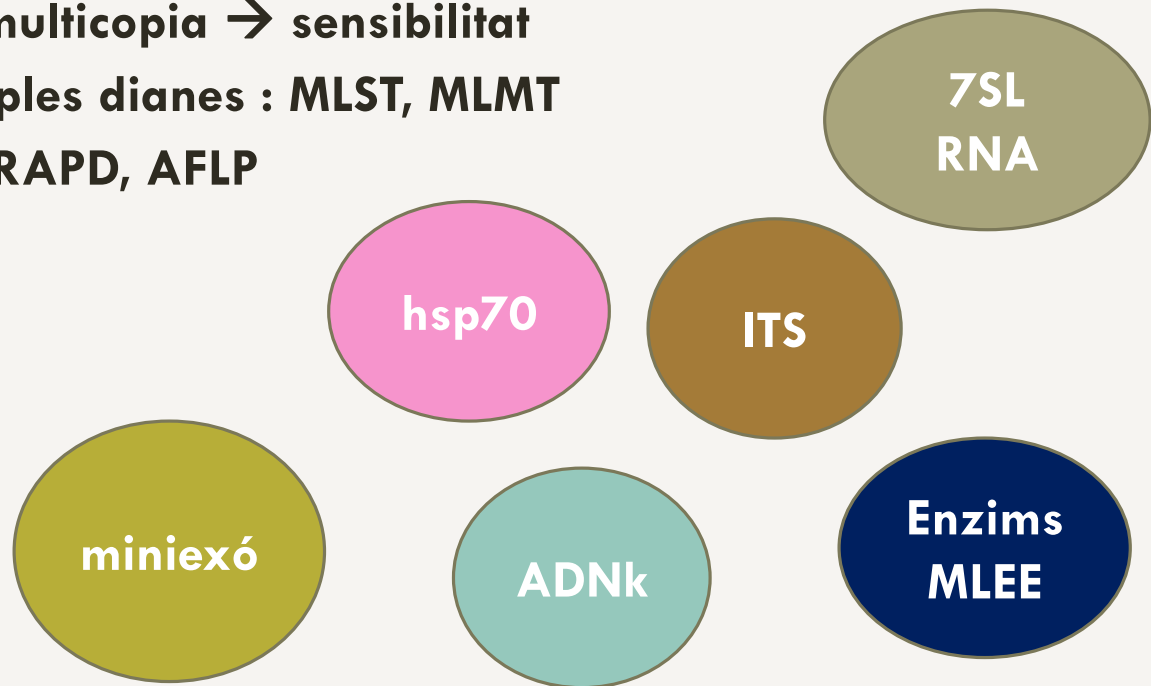


FIG 3 Schematic overview of common techniques to discriminate between two species (A and B). See "PCR-Based Methods" for details.

■ L'efectivitat de la tècnica depenent de les dianes



- Dianes molt/poc conservades → especificitat
- Dianes úniques o multicòpia → sensibilitat
- Utilització de múltiples dianes : MLST, MLMT
- Dianes aleatòries: RAPD, AFLP
- Genoma complet

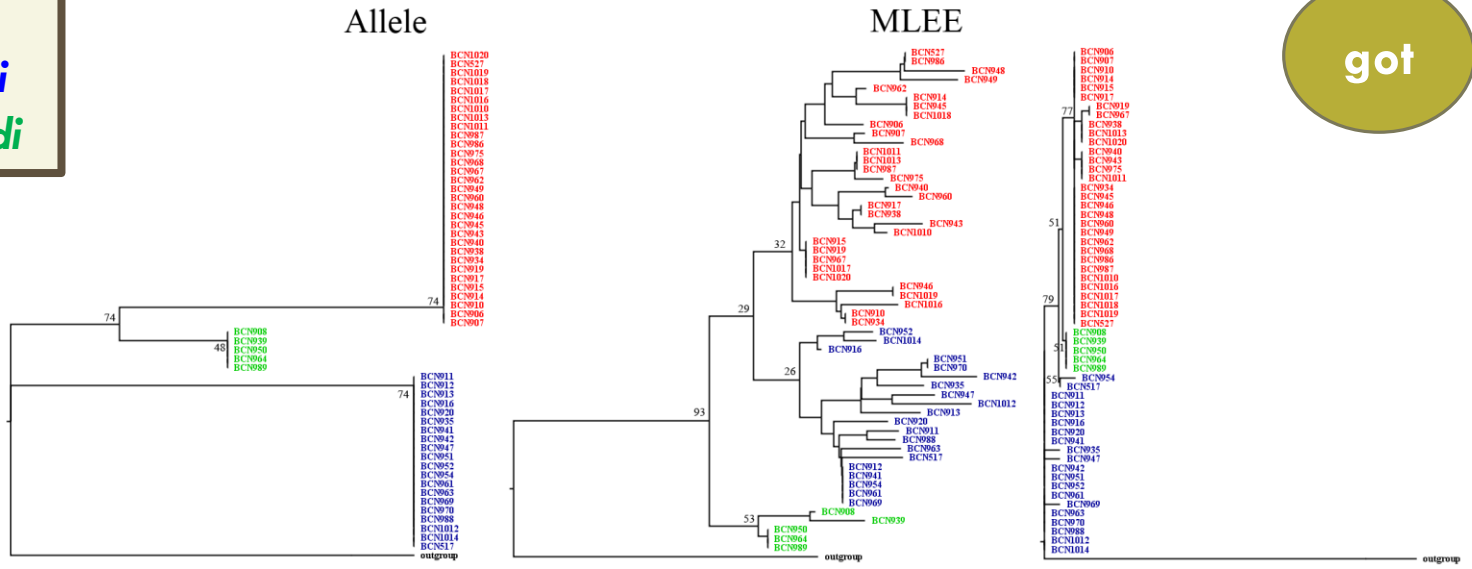


Tècniques moleculars - dianes

Estudi del complex *L. donovani*

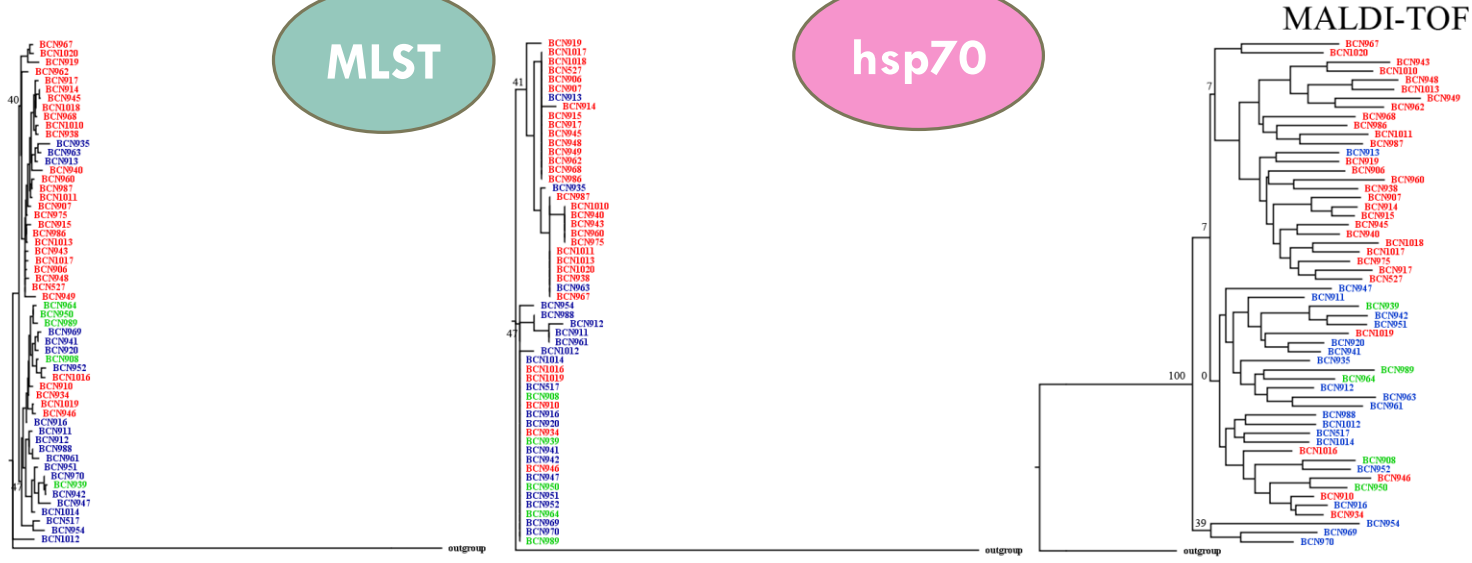
L. infantum
L. donovani
L. archibaldi

got



MLST

hsp70



Tècniques moleculars (Seqüenciació)

- Ràpida
- Fàcil interpretació dels resultats
- Resultats comparables, bases de dades
- Aplicable a mostra directa
- Alt poder discriminat (*)
- Permet establir relacions



- No assequible en tots els laboratoris
- No estandardització

Quina tècnica triar?

T^a DE
MELTING

MLST

SEQÜENCIACIÓ

ITS

MLEE

MLMT

AFLP

RFLP

FFL



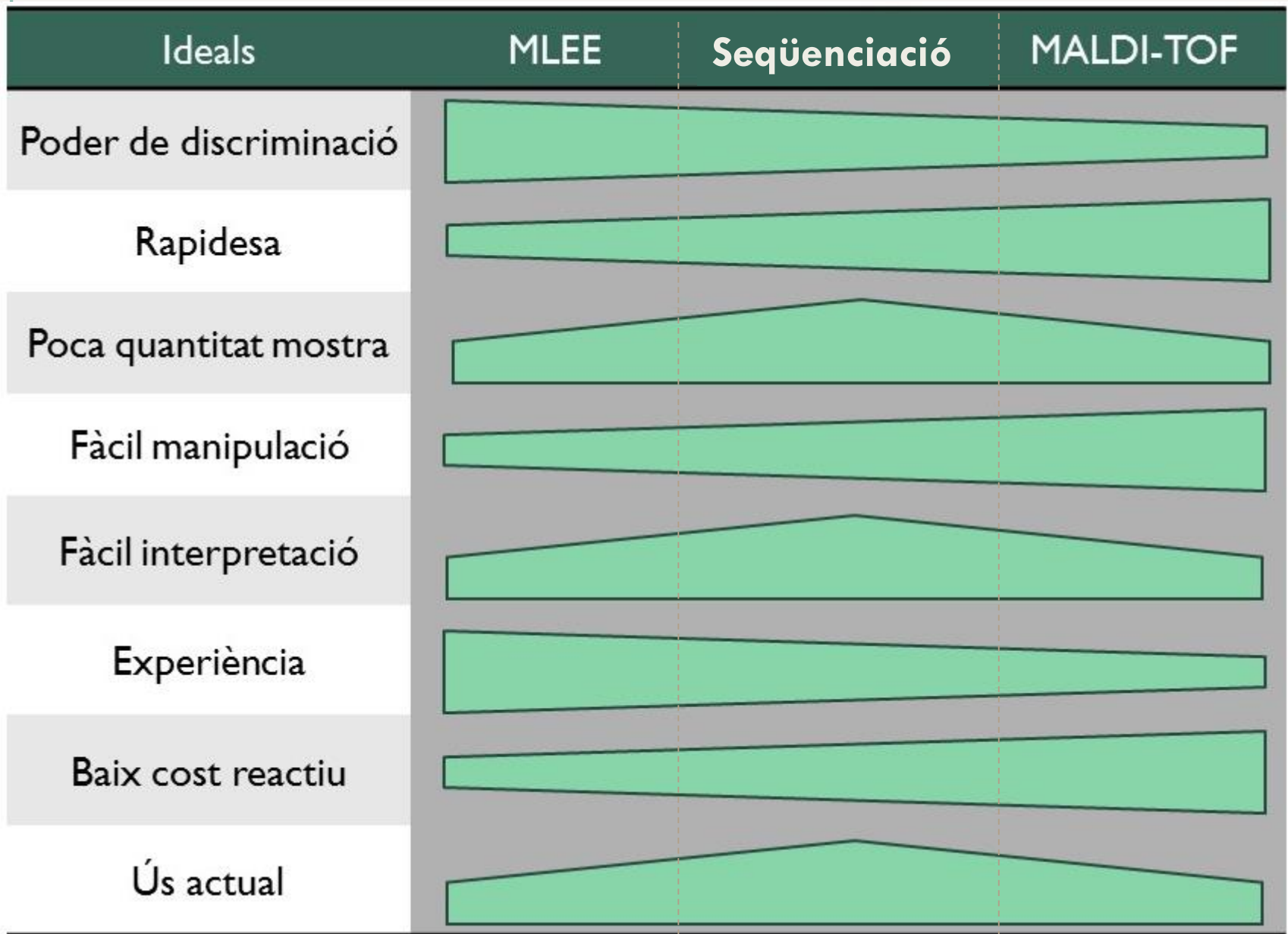
MALDI-
TOF

Comparació de tècniques

19 soques importades analitzades per MLEE, seqüenciació (*hsp70*, *fh*, *rpolLS*) i MALDI-TOF. Resultats identificació i variabilitat trobada

Espècies	n zim. MLEE	n seq. HSP70	n seq. FH	n seq. RPOILS	MALDI-TOF (MSI)
<i>L. braziliensis</i> (n=5)	3	5	2	4	2 <i>L. braziliensis</i> 2 <i>L. braz/L. peruv</i> 1 <i>L. peruviana</i>
<i>L. guyanensis</i> (n=2)	2	2	2	1	2 <i>L. panamensis</i> 1 <i>L. panam/L. guyan</i>
<i>L. panamensis</i> (n=1)	1	1		1	
<i>L. tropica</i> (n=1)	1	1	1	1	1 <i>L. tropica</i>
<i>L. major</i> (n=7)	3	3	1	2	7 <i>L. major</i>
<i>L. infantum</i> (n=3)	3	1	1	1	3 <i>L. infantum</i>

Comparació de tècniques



Quina tècnica triar?

TEMPS?

PRESSUPOST?

**TECNOLOGIA
DISPONIBLE?**



**TIPUS DE
MOSTRES?**

ESPÈCIES?

PERSONAL?

**VOLUM DE
MOSTRES?**

Agraïments

- **CHU Montpellier**

P. Bastien, L. Lachaud, F. Pratlong, C. Ravel, P. Lami

- **CHU La Timone (Marseille)**

R. Piarroux, AC. Normand, C. Nabet, F. Jeddi, M. Piarroux

- **Serv. Microbiologia HSCSP**

C. Muñoz, F. Navarro, T. Llovet, Secció R+D

- **Secció Parasitologia FFCA-UB**

M. Gállego, S. Tebar, C. Ballart, A. Arnau, A. Abras, R. Vélez

MOLTES GRÀCIES