

Taller internacional de estandarización de un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga parasitaria en el manejo de la leishmaniasis cutánea en las Américas



Zaida E Yadon¹, Otacilio C Moreira², Luiza de O R Pereira³, Elisa Cupolillo³

1. Investigación en Enfermedades Transmisibles. Departamento de Enfermedades Transmisibles y Análisis de Salud - Organización Panamericana de Salud
2. *Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.*
3. *Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.*

Las leishmaniasis son un importante problema de salud pública en las Américas debido a su amplia distribución y elevada prevalencia. Es considerada la enfermedad tropical más desatendida por el criterio de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (DALYs, del inglés *disability-adjusted life years*). Globalmente, alrededor de 12 millones de personas están infectadas y 350 millones viven en áreas de riesgo. La enfermedad presenta diferentes manifestaciones clínicas, incluyendo infecciones asintomáticas y sus dos formas más comunes: leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis cutánea (LC).¹ La manifestación clínica de la LC varía desde pequeñas lesiones localizadas hasta grandes úlceras diseminadas en todo el cuerpo. Esta manifestación clínica está asociada con varias especies de *Leishmania* en el Nuevo Mundo (Hemisferio Occidental), principalmente *L.mexicana*, *L.amazonensis*, *L.braziliensis*, *L.guyanensis*, *L.panamensis* y *L.peruviana*, dependiendo de la región geográfica.

El diagnóstico de la LC es realizado a través de la combinación de criterios clínicos, epidemiológicos y diagnóstico parasitológicos. El diagnóstico parasitológico permanece como el

estándar de oro e incluye el examen microscópico de frotis o aspirados, examen histopatológico de biopsias de las lesiones y el cultivo del parásito a partir de muestras de biopsias trituradas o de aspirados.²

El abordaje molecular para el diagnóstico de la LC y para la identificación del parásito ha sido utilizado desde hace décadas y presenta un gran potencial para ser aplicado directamente en muestra clínica, evitando el retraso del proceso de aislamiento y cultivo del parásito.

Desde el inicio de la utilización de PCR para el diagnóstico de la leishmaniasis, varias metodologías han sido evaluadas sin un consenso en cuanto a los protocolos y blancos moleculares a ser utilizados. Lo que dificulta la comparación de datos, una vez que cada grupo de investigación utiliza su propio protocolo interno, incluso para la preparación de muestra. De este modo, la estandarización y validación de un protocolo único en diagnóstico molecular y en la estimación de la carga parasitaria representan una necesidad para la conducción de estudios relacionados al desarrollo de nuevos medicamentos, a la vigilancia epidemiológica y al diagnóstico clínico de rutina.

En este contexto, el Programa de Investigación en Enfermedades Transmisibles de la Organización Panamericana de Salud promovió la estandarización y validación de PCR para el diagnóstico y manejo de la LC aplicable en diferentes laboratorios en varios países. Para ello se llevó a cabo un taller de validación y armonización de métodos de PCR que reunió expertos que realizan PCR para el diagnóstico de LC en laboratorios de biología molecular de varios países endémicos en América Latina. Este taller internacional fue financiado por Ruta N, OPS y por DNDi América Latina y realizado en diciembre de 2016 con la participación de 10 laboratorios especializados en PCR para la LC, de 7 países de América Latina (Argentina, Brasil (2), Colombia (3), Costa Rica, México, Panamá y Perú). El principal objetivo de este encuentro fue comparar el desempeño de ensayos moleculares en la identificación y cuantificación de diferentes especies de *Leishmania*, a fin de establecer un protocolo estandarizado de PCR en tiempo real multiplex mediante la cuantificación absoluta de la carga parasitaria y la normalización por el ADN humano, a partir de muestras obtenidas de úlceras cutáneas.

Durante el taller, se estandarizó un protocolo basado en una columna de sílice para la extracción de ADN en muestras de lesiones cutáneas, conteniendo un control de calidad externo. Además, se comparó el desempeño de tres blancos moleculares para *Leishmania*: SSUrDNA, kDNA y HSP70.

Los resultados preliminares con cepas de las especies más prevalentes de *Leishmania* indicaron un rango reportable de 10^6 a 5 Par. Eq./mL para los blancos SSUrDNA y kDNA y de 10^6 a 50 Par. Eq./mL para HSP70. Para el blanco humano RNase P, se obtuvo una linealidad de 10 a 10^{-3} ng/mL de ADN humano en la PCR multiplex con los blancos de *Leishmania*, indicando la viabilidad de cuantificar el parásito y normalizar los datos por la cantidad de ADN humano, a partir de muestras clínicas. En las muestras de pacientes que presentaron parasitismo alto, moderado y bajo, todos los blancos pudieron ser detectados y la carga parasitaria estimada siguiendo esta metodología. Por otra parte, durante la evaluación de la especificidad analítica con muestras de referencia de otros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Chitidia fasciculata* y *Herpetomonas muscarum*, el blanco HSP70 presentó una mayor especificidad para la identificación de especies de *Leishmania*.

El próximo paso será la estandarización y validación clínica de la metodología definida consensualmente durante este taller. Para eso, se utilizará el ADN extraído de muestras de úlceras obtenidas de pacientes con LC atendidos en unidades de salud en los países participantes de esta iniciativa.

El taller se celebró en la Unidad de Biología Molecular y Computacional - Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Sede de Investigación Universitaria – SIU – Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Todas las actividades científicas y técnicas fueron coordinadas por el Laboratorio de Investigaciones en Leishmaniasis y por el Laboratorio de Biología Molecular y Enfermedades Endémicas de la Fundación Oswaldo Cruz, Brasil.

Referencias:

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health OrganTech Rep Ser. 2010; (949):xii-xiii, 1-186, back cover.
2. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007 Sep;7(9):581-96.