



Oficina internacional de padronização de ensaio de PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária no manejo da leishmaniose cutânea nas Américas

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

1. Pesquisa em Doenças Transmissíveis. Departamento de Doenças Transmissíveis e Análise de Saúde - Organização Pan-Americana da Saúde
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*

A leishmaniose é considerada a doença tropical mais negligenciada pelo critério de Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (DALYs, do inglês *disability-adjusted life years*). Globalmente cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas e 350 milhões vivem em áreas de risco. A doença apresenta diferentes manifestações clínicas, como infecções assintomáticas ou suas duas formas mais comuns: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose cutânea (LC).¹ A manifestação clínica da LC varia de pequenas lesões localizadas a grandes úlceras disseminadas por todo o corpo. Esta manifestação clínica está associada a várias espécies de *Leishmania* no Novo Mundo (Hemisfério Ocidental), principalmente *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, dependendo da região geográfica.

O diagnóstico da LC é realizado por meio da combinação de critérios clínicos, epidemiológicos e de testes parasitológicos. O diagnóstico parasitológico permanece o padrão-ouro e inclui o exame microscópico de escovado ou aspirados, o exame histopatológico de biópsias das lesões e a cultura de aspirados ou material obtidos das lesões.²

A abordagem molecular para o diagnóstico da LC e para a identificação do parasita tem sido usada há décadas pois apresenta um grande potencial para ser aplicada diretamente na amostra clínica, evitando o processo demorado de isolamento e cultivo do parasita.

Desde o início do uso da PCR para o diagnóstico da leishmaniose, várias metodologias vêm sendo testadas sem um consenso quanto aos protocolos e alvos moleculares. Isso dificulta a comparação de dados, uma vez que cada grupo de pesquisa utiliza o seu próprio protocolo interno, até mesmo para a preparação de amostra. Assim, a padronização e validação de um protocolo único no

diagnóstico molecular e na estimativa da carga parasitária representam uma necessidade para a condução de estudos relacionados ao desenvolvimento de novos medicamentos, à vigilância epidemiológica e ao diagnóstico clínico de rotina.

Nesse contexto, o Programa de Pesquisas em Doenças Transmissíveis da Organização Pan-Americana da Saúde vem desenvolvendo um projeto que visa a padronização e validação da PCR para o diagnóstico e manejo da LC, aplicável em diferentes laboratórios e vários países. Desta forma, foi realizada uma oficina de validação e harmonização de métodos de PCR, que reuniu especialistas trabalhando com PCR para LC em laboratórios de áreas endêmicas. Esta oficina internacional foi financiada pela Ruta N, OPAS e DNDi América Latina e realizada em dezembro de 2016 com a participação de 10 laboratórios especializados em PCR para LC, de 7 países da América Latina (Argentina, Brasil (2), Colômbia (3), Costa Rica, México, Panamá e Peru). O objetivo principal desse encontro foi comparar o desempenho de ensaios moleculares na identificação e quantificação de diferentes espécies de *Leishmania*, a fim de estabelecer um protocolo padronizado de PCR em tempo real multiplex mediante a quantificação absoluta da carga parasitária e normalização pela quantidade de DNA humano, a partir de amostras obtidas de lesões cutâneas.

Durante a oficina foi padronizado um protocolo baseado em coluna de sílica para extração de DNA a partir de amostras de lesões cutâneas, contendo um controle de qualidade externo. Além disso, comparou-se o desempenho de três alvos moleculares para *Leishmania*: SSUrDNA, kDNA e HSP70.

Os resultados preliminares com cepas das espécies mais prevalentes de *Leishmania* indicaram uma extensão dinâmica de 10^6 a 5 Par. Eq./mL para os alvos SSUrDNA e kDNA, e de 10^6 a 50 Par. Eq./mL para HSP70. Para o alvo humano RNase P, foi obtida uma linearidade de 10 a 10^{-3} ng/mL de DNA humano, na PCR multiplex com alvos de *Leishmania*, indicando a viabilidade de quantificar o parasita e normalizar os dados pela quantidade de DNA humano, a partir de amostras clínicas. Nas amostras de pacientes que apresentaram parasitismo alto, moderado e baixo, todos os alvos puderam ser amplificados e a carga parasitária pode ser estimada seguindo esta metodologia. Por outro lado, durante a avaliação da especificidade analítica com amostras de referência de outros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Chitidia fasciculata* e *Herpetomonas muscarum*, o alvo HSP70 apresentou maior especificidade para a identificação de espécies de *Leishmania*.

O próximo passo será a padronização e validação clínica da metodologia definida consensualmente durante esta oficina. Para isso, será utilizado o DNA extraído de amostras de úlceras obtidas de pacientes com LC atendidos em unidades de saúde dos países participantes desta iniciativa.

A oficina de trabalho foi sediada na Unidade de Biologia Molecular e Computacional - Programa de Estudo e Controle de Enfermidades Tropicais – PECET, Sede de Investigação Universitária – SIU – Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia.

Todas as atividades científicas e técnicas foram coordenadas pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses e pelo Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

Referências:

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.