

Identificación de especies de *Leishmania* mediante PCR en tiempo real acoplada a curvas de fusión de alta resolución

Identification of *Leishmania* species by real time PCR coupled with high resolution melting curve analysis

Rafael Guillermo Villarreal Julio^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9009-1086>

Giovanny Herrera¹ <https://orcid.org/0000-0002-1395-4466>

Carlos E. Muskus López¹ <https://orcid.org/0000-0003-4280-5627>

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina. Colombia.

*Autor para la correspondencia: rafael.villarreal@udea.edu.co

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*. En Colombia se han informado 10 especies patógenas. El diagnóstico parasitológico tradicional basado en la observación de los parásitos no permite identificar la especie, por lo cual se deben emplear métodos moleculares, entre ellos la reacción en cadena de la polimerasa o PCR convencional, pero esta presenta algunas limitaciones y requiere extensos periodos de tiempo para la obtención de resultados, que en ocasiones no son concluyentes.

Objetivo: Evaluar un método basado en PCR en tiempo real acoplado a curva de temperatura de desnaturalización media de alta resolución (PCR-HRM) que permita el diagnóstico y la identificación simultánea de parásitos del género *Leishmania* en muestras clínicas de humanos y en cultivos *in vitro* de manera sensible y específica.

Métodos: Se estandarizó una PCR-HRM, mediante la cual se evaluaron 237 muestras clínicas, 98 clasificadas como positivas y 139 como negativas, parasitológicamente por directo y/o cultivo. Las tipificaciones fueron comparadas con los resultados en paralelo obtenidos de una variante de la PCR, realizando cortes al amplicon que generó un fragmento de restricción de longitud polimórfica o PCR-RFLP que había sido previamente estandarizada.

Resultados: Se logró implementar una PCR-HRM para el diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania*, logrando un 100 % de concordancia con las tipificaciones obtenidas por PCR-RFLP. Incluso, se logró detectar e identificar el parásito en muestras diagnosticadas como negativas por los métodos convencionales. Se encontró que con un porcentaje de confiabilidad superior al 95 %, se lograron tipificar 91 muestras de 98; de estas el 81,63 % de los casos fueron *L. panamensis*, el 11,22% *L. braziliensis* e indeterminadas el 7,14 % de los casos.

Conclusiones: La PCR-HRM es un buen método que permite la identificación de las especies más prevalentes en Colombia, comparando temperaturas medias de desnaturalización específicas según la especie de *Leishmania* involucrada.

Palabras clave: *Leishmania*; diagnóstico; identificación; PCR en tiempo real; HRM.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. Ten pathogenic species have been reported in Colombia. Traditional parasite diagnosis based on observation of the parasites does not make it possible to identify the species. Therefore, it is necessary to use molecular methods, among them conventional polymerase chain reaction or PCR, but this test presents some limitations and requires long periods of time to obtain results which sometimes are not conclusive.

Objective: Evaluate a method based on real time PCR coupled with high resolution mean denaturalization temperature curve analysis (HRM-PCR) for the diagnosis and simultaneous identification of parasites of the genus *Leishmania* in clinical samples from humans and *in vitro* cultures in a sensitive and specific manner.

Methods: Standardization was performed of an HRM-PCR with which 237 clinical samples were evaluated, 98 classified as positive and 139 as negative, by direct parasitological examination and/or culture. The typing obtained was compared with parallel results from a PCR variant, making cuts on the amplicon that generated a restriction fragment length polymorphism or PCR-RFLP previously standardized.

Results: An HRM-PCR could be implemented for the diagnosis and identification of *Leishmania* species, achieving 100% concordance with the typing obtained by PCR-RFLP. It was even possible to detect and identify the parasite in samples diagnosed as negative by conventional methods. Of the total 98 samples, 91 could be typed with a percentage of reliability above 95%. Of these, 81.63% of the cases were *L. panamensis*, 11.22% were *L. braziliensis* and 7.14 % were indeterminate.

Conclusions: HRM-PCR is a good method to identify the species most prevalent in Colombia, comparing specific mean denaturalization temperatures according to the *Leishmania* species involved.

Key words: *Leishmania*; diagnosis; identification; real time PCR; HRM.

Recibido: 10/01/2021

Aceptado: 03/09/2021

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania*.⁽¹⁾ La infección es endémica en 102 países ubicados en regiones tropicales y subtropicales.⁽²⁾ Tres formas clínicas básicas de la infección han sido descritas: Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, siendo esta última la forma más grave de la enfermedad ya que puede ser mortal.⁽³⁾ Existen 53 especies diferentes del parásito, de las cuales 20 especies son patógenas para el humano.⁽¹⁾ Esta gran diversidad de especies hace que sea importante la identificación de especies ya que algunas se han asociado con determinadas formas clínicas de la enfermedad e incluso hasta la resistencia a los tratamientos convencionales.⁽¹⁾ Por lo cual, un diagnóstico oportuno y en lo posible acompañado de la identificación de la especie es necesario para la administración de un adecuado tratamiento y seguimiento. Sin embargo, los métodos tradicionales de diagnóstico como el examen directo y el cultivo, carecen en general de una adecuada sensibilidad diagnóstica y no permiten hacer identificación de la especie. Estos métodos tradicionales de diagnóstico han venido siendo reemplazados por técnicas moleculares sobre todo por métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa), dado que es una técnica rápida, sensible y específica,⁽⁴⁾ como método diagnóstico, pero para realizar la identificación de la especie normalmente se requiere de una evaluación post-PCR como RFLP (fragmento de restricción de longitud polimórfica),⁽⁵⁾ hibridación⁽⁶⁾ o secuenciación.⁽⁷⁾

Aunque estos avances en técnicas moleculares muestran mejores resultados respecto a las metodologías convencionales, todavía resulta algo dispendiosas si se necesita realizar además del diagnóstico, la identificación de la especie. Es por eso que ha surgido la necesidad de emplear incluso variaciones de las metodologías actuales, que permiten realizar no solo el diagnóstico sino la identificación de la especie de una forma más rápida y en el caso de la identificación de manera más confiable. Se sabe que la PCR en tiempo real, la cual bajo condiciones óptimas presenta una mayor sensibilidad, una alta especificidad que las PCRs convencionales,⁽³⁾ cuando se acopla a curvas de temperaturas de desnaturalización media de alta resolución (HRM-High Resolution Melting) resulta útil, en nuestro caso, para la discriminación de especies ya sea de cultivos del microorganismo o directamente de la muestra clínica, lo que resulta ventajoso para microorganismos que no se aíslan o incluso de microorganismos que se pueden aislar pero que por algunas causas no se logra su cultivo para la posterior identificación de la especie. Las curvas de HRM miden la tasa de disociación de la doble cadena del ADN a cadena sencilla con incrementos de temperatura y registrando los cambios en la fluorescencia correspondientes al tamaño del fragmento, el contenido de CG, la complementariedad y la termodinámica de los nucleótidos más cercanas.⁽⁸⁾

Teniendo en cuenta la necesidad de implementar una metodología que permitiera realizar el diagnóstico e identificación de especie en un solo paso, con alta sensibilidad, especificidad, rapidez, el presente trabajo tuvo como objetivo

implementar una PCR-HRM que permita diagnosticar e identificar la especie infectante en muestras clínicas de humanos.⁽⁹⁾

Métodos

Población de estudio

Se incluyeron pacientes atendidos en el consultorio del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia y provenientes de zonas endémicas de Colombia o que visitaron zonas endémicas en los últimos 6 meses y con presencia de lesiones compatibles con leishmaniasis cutánea, no estar recibiendo tratamiento al momento de la consulta y quien manifestó su participación voluntaria en el estudio, mediante la firma de consentimiento informado; se excluyeron aquellos que no cumplieran los criterios de inclusión mencionados. El tamaño muestral fue calculado utilizando Epidat V 3.1, de acuerdo con los fundamentos QUADAS, y la relación de no enfermos/enfermos, 10/7 con el fin de obtener unos resultados con una sensibilidad mayor o igual al 95 %, especificidad mayor o igual al 90 % y con un nivel de confianza del 95 %. El estudio es de tipo prospectivo y las muestras se procesaron en ciego. Para comparar la capacidad de las técnicas de examen directo/cultivo vs. PCR en tiempo real, se calcularon los siguientes indicadores estadísticos con sus respectivos intervalos de confianza al 95%: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.

Toma de muestras

Las muestras se recolectaron entre los años 2012 y 2014; todas se procesaron en las instalaciones del laboratorio PECET. El procesamiento de ellas por las diferentes metodologías diagnósticas y de tipificación se realizaron por expertos, con amplia experiencia en cada una de las metodologías; cada proceso lo realizaron de manera separada, y cada persona se encargó solo de una metodología. El mismo día de la consulta y de manera simultánea a cada paciente se le tomó los siguientes tipos de muestras, un aspirado para cultivo, un raspado para el examen directo que es la técnica de referencia en la enfermedad y un raspado para la extracción de ADN y PCR (convencional y qPCR-HRM) las cuales se realizaron por triplicado.

Para el examen directo la muestra del raspado fue fijada con metanol y posteriormente teñida con colorante de Giemsa durante 15 min y lavada con agua y leídas por dos expertos en diagnóstico de forma independiente.⁽¹⁾ Para el cultivo se toma un aspirado de la lesión empleando una jeringa de tuberculina conteniendo una fase líquida, y esto es cultivado en medio NNN a 26 °C durante mínimo 30 días, evaluando por microscopía la presencia de parásitos cada semana y haciendo pases de los cultivos a medio NNN fresco.⁽¹⁾

Para las PCRs, la extracción del ADN de raspado de las lesiones de pacientes, se realizó empleando el DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El ADN obtenido, se cuantificó en un Nanodrop (ND1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). La calidad del ADN purificado se evaluó además por electroforesis en gel de agarosa al 1 % conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y visualizados en un fotodocumentador de imágenes.⁽¹⁰⁾

Selección de la secuencia blanco y diseño de oligonucleótidos para la PCR-HRM

Para la PCR en tiempo real acoplada a HRM, se diseñaron unos oligonucleótidos que amplifican una región previamente seleccionada y basada en alineamientos múltiples usando las secuencias reportadas en el NCBI y el Trityp. Los alineamientos se realizaron con T-coffee y visualizando en MEGA7. Mediante estos alineamientos se buscaron y evidenciaron diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen de la *ADN polimerasa 2* que es un gen conservado, multicopia y que proviene de una evaluación de varios marcadores realizadas en el grupo, dicho gen se evaluó *in silico* entre las seis diferentes especies de *Leishmania* más prevalentes en Colombia que son *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. infantum*.⁽¹¹⁾ Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y la calidad del diseño de los oligonucleótidos fue evaluada por oligoanalyzer (<https://www.idtDNA.com/calc/analyzer>), para determinar la no formación de homo y heterodímeros además de horquillas. La especificidad de los oligonucleótidos se analizó por Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) y Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INPUT_SEQUENCE=%20EU563945.2&LINK_LOC=nucore).

PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión de alta resolución

La PCR-HRM fue realizada utilizando 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 12,5 µL de Master Mix 2X (HRM PCR Qiagen, Hilden, Alemania), 9,5 µL de agua libre de ADNasas (Qiagen, Hilden, Alemania) y 1 µL de ADN (10-20 ng/µL) para un volumen final de 25 µL por muestra. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Rotor-Gene 6000 Corbett Life Science (Qiagen, Hilden, Alemania). El perfil térmico utilizado fue de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, alineamiento a 57 °C por 40 segundos y extensión a 72 °C por 10 s. El análisis de temperaturas medias de desnaturalización de alta resolución (HRM), se realizó entre 78 °C y 90 °C, aumentando 0,1 °C cada 2 s para lograr la desnaturalización de los amplicones, y realizando lecturas de fluorescencia en cada aumento de temperatura. Los

análisis fueron realizados mediante el programa High Resolution Fusión Q software (Qiagen, Hilden, Alemania).

Linealidad, límite de detección, especificidad analítica y reproducibilidad

La linealidad capacidad del método de prueba para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del análito en la muestra. Para evaluar la linealidad de la PCR-HRM se construyó una curva de temperatura estándar a partir de ADN aislado de parásitos de *Leishmania panamensis*. La curva se construyó tomando una concentración conocida equivalente a 390 625 parásitos y realizando diluciones en base 5 se llevó dicha concentración hasta cinco parásitos.

El límite de detección es la mínima cantidad de concentración de ADN que se detecta de forma confiable y reproducible con una probabilidad del 95 %. Para realizar el análisis del límite de detección de la PCR convencional y la PCR en tiempo real-HRM, se emplearon diluciones seriadas 1:10 de ADN de *L. panamensis*, partiendo de una concentración de 10 ng/μL hasta llegar a una dilución 1:10.000.000 equivalentes a una concentración de 1 fg/μL de ADN del parásito *Leishmania spp.*

El análisis de especificidad analítica se refiere a la capacidad de detección específica de los oligonucleótidos, al amplificar solo especies del género *Leishmania spp.* Este análisis se realizó empleando ADN de *Trypanosoma cruzi* (AC29), *Sporothrix schenckii*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* y como control negativo se utilizó ADN de personas sanas no infectadas con *Leishmania spp.* Al no tener en el laboratorio diferentes cultivos de otros patógenos, no se pudo utilizar una cantidad más completa de ADN de microorganismos en este análisis con los que comúnmente se realiza el diagnóstico diferencial de la enfermedad. No se tuvo en cuenta el microorganismo *Histoplasma* debido a que las manifestaciones clínicas son muy diferentes, y que su confusión sería solo por morfología, por lo cual no se consideró. Pero para contrarrestar estas falencias si se realizó un análisis *in silico* por metodologías bioinformáticas utilizando Primer Blast donde se demostró que los oligonucleótidos se hibridaban específicamente solo al genoma de *Leishmania* y no presentaba unión con ningún otro microorganismo, lo que impide la amplificación inespecífica.

El análisis de reproducibilidad se realizó procesando todas las muestras por triplicado y evaluando la concordancia tanto en el diagnóstico como en la tipificación entre las tres réplicas de cada muestra.

Evaluación de la interferencia del ADN humano

Como se tomó muestras de raspado de lesiones de pacientes humanos, estas contenían ADN humano y del parásito, por tal motivo se realizó el análisis de

interferencia con ADN humano. Se tomaron 3 concentraciones de ADN de los parásitos; 0,7 ng/μL, 3,5 ng/μL y a 17,6 ng/μL correspondientes a 3 125, 15 625 y 78 125 parásitos, respectivamente. Adicionalmente a cada muestra se le adicionó ADN extraído de células mononucleares humanas, hasta completar de 20 ng/μL de ADN total y se les realizó la PCR-HRM siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM)

Se realizó con el programa Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 (Build 4) utilizando el módulo High Resolution Fusión Q software (Qiagen, Hilden, Alemania). Para conseguir realizar un análisis óptimo de HRM se revisó que los datos de amplificación cumplieran con las siguientes características: a) todas las curvas de amplificación tuvieran un valor de Ct < 30, b) todas las curvas de amplificación debían alcanzar una fase plató similar, c) entre las muestras, el valor de Ct no debía variar más de 5 unidades de Ct o 5 ciclos, para garantizar que en cada muestra existiría concentraciones similares de ADN. Las curvas de temperaturas de desnaturalización media se analizaron con el programa Gene Scanning.

Simultáneamente con la corrida de todas las muestras por PCR-HRM, todas las muestras se evaluaron también empleando una PCR para detección y PCR-RFLP para la identificación: La PCR convencional se realizó empleando el protocolo de Hsp70-N descrito por *Montalvo* y otros⁽⁵⁾ 1 μL a 20 ng/μL se amplificó así: Desnaturalización inicial 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento de oligonucleótidos a 61 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 8 min en un termociclador C1000 (Bio-Rad, Foster City, CA, USA). El producto de la amplificación fue visualizado en un gel de agarosa al 1 %, donde se debía observar un amplicón de 593 pb. La digestión enzimática para el RFLP se realizó en un volumen final de 10 μL, utilizando 8,5 μL del amplicón, 1 μL (1X) de *buffer* Tango y 0,5 μL (2,5 U) de la enzima de restricción *Bsa*II (MBI Fermentas). La mezcla de reacción se incubó a 55 °C durante 3 h. El análisis de la digestión de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 4% (AMRESCO, Ohio, USA), el cual fue corrido a 70 V durante 2 h.

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra para validación de las pruebas diagnósticas se calculó asumiendo una sensibilidad del 95 %, una especificidad del 90 %, la razón de enfermos y no enfermos de 1,43 y un nivel de confianza del 95 %. Los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y las razones de verosimilitud se calcularon utilizando Epidat[®] 3.1. De igual manera se calculó el índice Kappa para evaluar la concordancia entre los resultados de cada prueba, así como se construyeron curvas de Características Operativas del Receptor (ROC) con sus respectivas áreas bajo la curva, tomando como referencia los resultados del diagnóstico por microscopía (Directo), mediante el programa Stata 15 (Ref:

StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC.)

Resultados

Se calculó un tamaño muestral de 139 personas sanas y 98 enfermos estimando una precisión de 5 %, para un total de 237 pacientes (Tabla 1).

Tabla 1 - Estimación del tamaño muestral

| Precisión | Enfermos | Sanos | Total |
|-----------|----------|-------|-------|
| 1,0 | 2419 | 3458 | 5877 |
| 2,0 | 605 | 865 | 1470 |
| 3,0 | 270 | 385 | 655 |
| 4,0 | 152 | 217 | 369 |
| 5,0 | 98 | 139 | 237 |

De las 237 muestras iniciales, 98 fueron positivas por microscopía mientras que solo 48 muestras resultaron positivas por cultivo (Tablas 2 y 3).

Tabla 2 - Resultados de los diferentes métodos empleados para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en muestras clínicas

| Resultado | Examen directo | Cultivo | PCR <i>Hsp70N</i> | PCR-HRM |
|-----------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Negativo | 139 | 189 | 150 | 139 |
| Positivo | 98 | 48 | 87 | 98 |
| Total | 237 | 237 | 237 | 237 |

Tabla 3 - Resultados de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo de los diferentes métodos diagnósticos

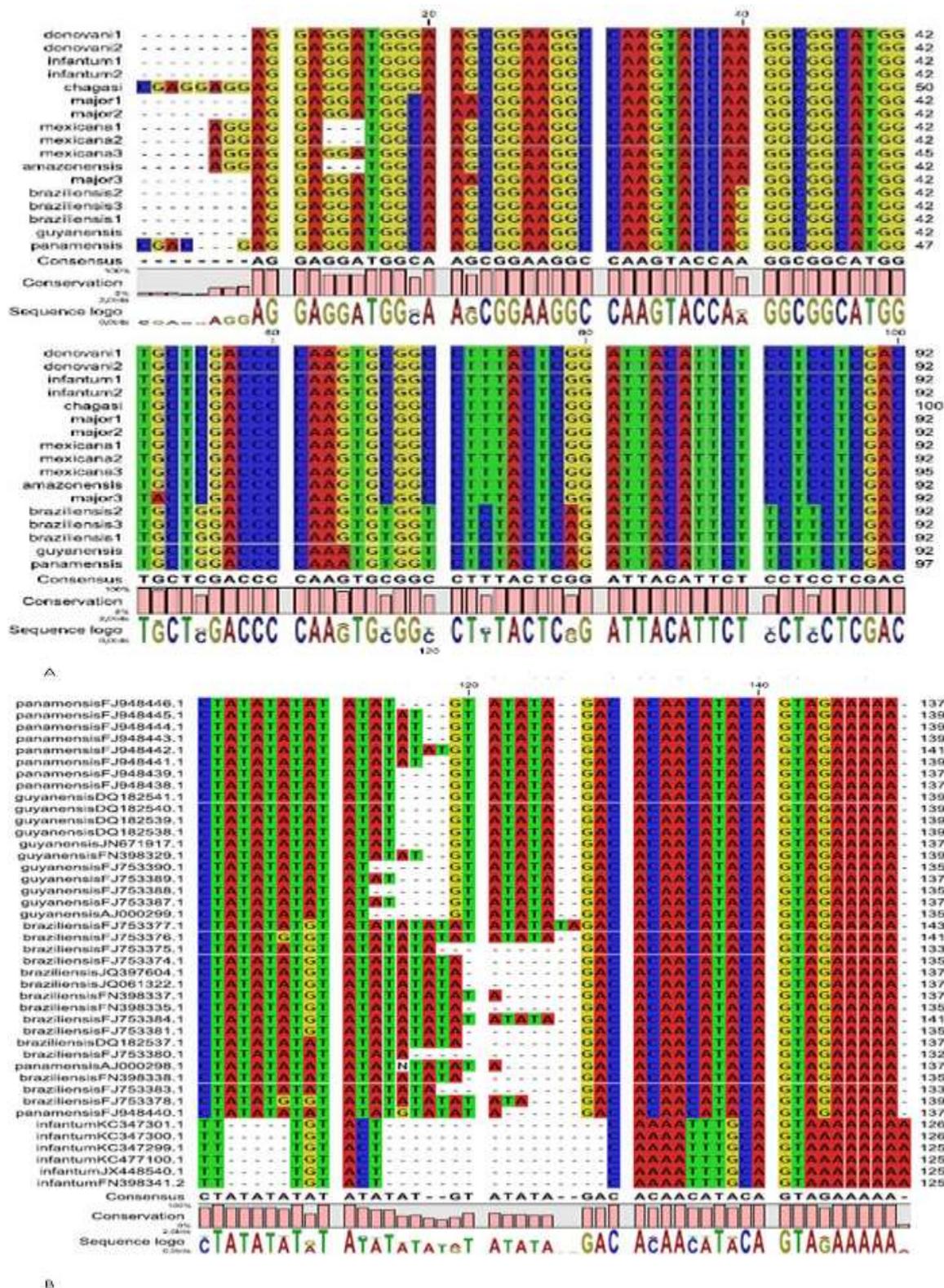
| Parámetro evaluado | PCR-HRM | | PCR Convencional | | Cultivo | |
|--------------------|---------|-----------|------------------|-------------|---------|-------------|
| | Valor | IC (95%) | Valor | IC (95%) | Valor | IC (95%) |
| Sensibilidad | 100 | 99,49-100 | 88,78 | 82,02-95,54 | 48,98 | 38,57-59,39 |
| Especificidad | 100 | 99,64-100 | 100 | 99,64-100 | 100 | 99,64-100 |
| VPP | 100 | 99,49-100 | 100 | 99,43-100 | 100 | 98,96-100 |
| VPN | 100 | 99,64-100 | 92,67 | 88,16-97,17 | 73,54 | 66,99-80,10 |
| RVP | 9999999 | - | 0,11 | 0,06-0,2 | 0,51 | 0,42-0,62 |
| RVN | 0 | - | 0 | - | 0 | - |

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo, RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa

Se extrajo en promedio de 80 ng/μL de ADN en cada muestra y en ninguna de las muestras se observó degradación.

Análisis bioinformáticos

Utilizando las secuencias reportadas para el gen de la *ADN polimerasa 2* en: *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. infantum* tomando como referencia el gen *ADN polimerasa 2* con número de acceso AJ304944 de *L. guyanensis* se determinó que en la región comprendida entre 536 y 649 nucleótidos se encontraba diferencias en las secuencias en la composición de las bases entre cada especie. Para amplificar esta región donde se encontraban las variaciones se diseñaron los oligonucleótidos FW: AGGAGGATGGCAAGCGGAAG y RV: GCGACGGGTACAGGGAGTTG. Dichos análisis bioinformáticos también se realizaron en otras secuencias génicas como *ITS-1* (*Internal transcribed spacer 1*), *Hsp70N* (*N-terminal domain of Hsp70: residues 1-360*), *kADN* (*ADN del kinetoplasto de Leishmania*), *CPB* (*Cysteine proteinases B*), *7SL* (*7SL RNA Gene Region*) entre otras, para poder seleccionar finalmente para el diagnóstico y diferenciación la secuencia que mejores resultados arrojaran experimentalmente (Fig. 1).



Panel A: Alineamiento de las regiones conservadas intra e inter especies en el Gen *ADNpol 2*. Panel B: En el eje Y se encuentran los nombres de las diferentes especies utilizadas en el análisis, y en el eje X se encuentra especificado el nucleótido en cada columna. El alineamiento muestra una mayor variabilidad en las regiones que las vistas en la región *ITS1*. Se observan regiones conservadas intra e inter especie en la secuencia de la región *ITS1*. Los cambios en el color indican polimorfismos de acuerdo con la base que cambia (Adenina: rojo, Citocina: azul, Guanina: amarillo y Timina: verde) y los espacios en blanco, corresponden a deleciones en algunas de las secuencias o inserciones en las otras.

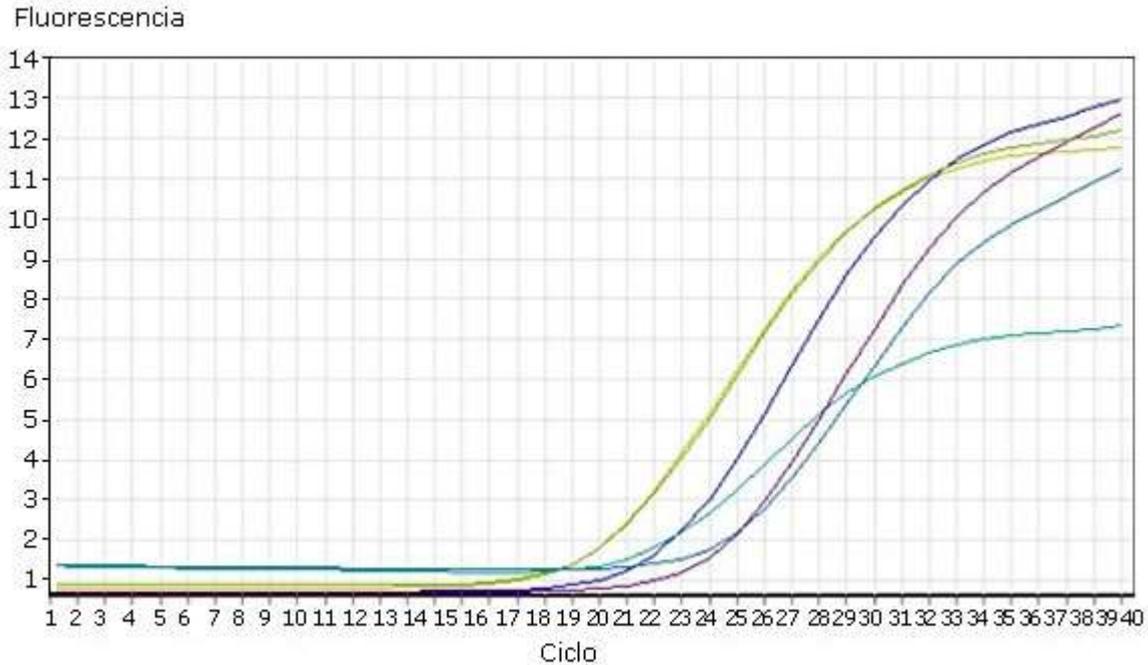
Fig. 1 - Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *ADN polimerasa 2 (ADNpol 2)* de diferentes especies de *Leishmania* y visualizados empleando Jalview.

Diagnóstico e identificación mediante PCR-RFLP

Amplificando la región N-terminal del gen *HSP70* (*HSP70N*) un total de 87 muestras de las 237 fueron diagnosticadas como positivas. De estas 71 muestras se identificaron como *L. panamensis* (81,6 %), 2 muestras como *L. braziliensis* (2,29 %) y 14 (16,09 %) muestras fueron catalogadas como indeterminadas, debido a que los patrones de RFLP no fueron compatibles con ninguno de los patrones de referencia. Cabe resaltar que no hubo concordancia del 100% de esta prueba con los resultados del directo. Fueron en total 11 muestras negativas por la PCR convencional, pudo deberse a cargas parasitarias bajas o la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra, que impidieron la amplificación del fragmento para la posterior identificación. En estas muestras negativas por PCR convencional pero positivas por examen directo, se evaluó la presencia de interferentes de la misma, mediante adición de ADN del parásito purificado y amplificación. Se observó que en todas estas muestras hubo amplificación, descartando la presencia de interferentes causantes del resultado negativo en estas muestras y por tanto sugiriendo la presencia de bajas cargas de parásitos en las lesiones o baja sensibilidad analítica de esta PCR convencional.

PCR en tiempo real y análisis de temperaturas de desnaturalización media de alta resolución-PCR-HRM

Previo al análisis del desempeño de la prueba en muestras clínicas se evaluó la especificidad analítica, la sensibilidad analítica, la linealidad del método y la interferencia del ADN humano (Fig. 2). Inicialmente utilizando como control ADN de las seis especies de *Leishmania* que se han reportado en Colombia se amplificó el fragmento esperado y no amplificó en ADN de *Sporothrix schenckii*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*, sumado a que de manera *in silico* mostró unión específica solo con especies del género *Leishmania*. Se logró detectar a partir de 1 fg de ADN del parásito, mientras que por PCR convencional solo se logró amplificar a partir de 1 000 fg. Utilizando 20 ng de ADN, en relación ADN parásito/ADN humano así: 5/1, 1/5 y 0,1/5, se logró amplificar el fragmento esperado, sin afectar la especificidad. Esto podría explicar por qué en la PCR convencional existieron algunos falsos negativos al tener menor sensibilidad que la PCR en tiempo real.

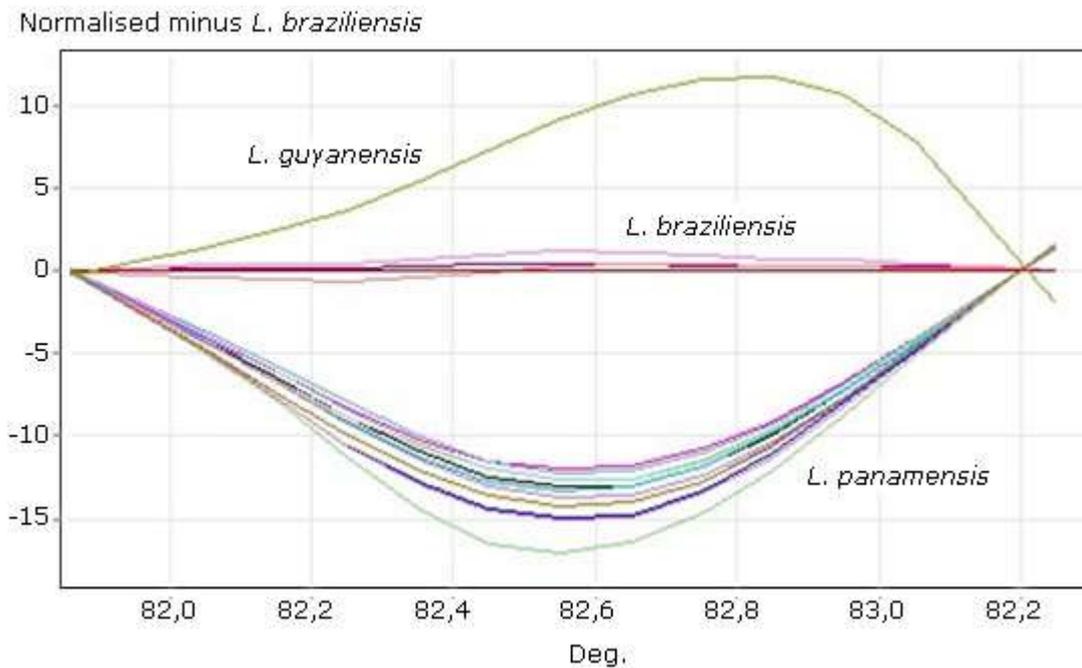


Se realizó la comparación de tres concentraciones diferentes de ADN de *L. panamensis*: 17,6 ng/μL, 3,5 ng/μL y 0,7 ng/μL vs. 17,6 ng/μL + 2,4 ng/μL de ADN humano, 3,5 ng/μL + 16,5 ng/μL de ADN humano y 0,7 ng/μL + 19,3 ng/μL de ADN humano.

Fig. 2 - Determinación de la interferencia del ADN humano en la detección del ADN parasitario

Análisis de la curva de temperatura de desnaturalización media de alta resolución (HRM)

Teniendo en cuenta que en Colombia el 98 % de los casos corresponde a *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, se validó la diferenciación de estas tres especies mediante PCR-HRM (Fig. 3), logrando con el protocolo establecido tipificar 91 muestras así: 80 *L. panamensis*, 11 *L. braziliensis* y 7 indeterminadas, estas muestras indeterminadas se reportaban como indeterminadas y no se les pudo identificar por estas metodologías, todas fueron enviadas a secuenciar y se estableció que 4 de ellas están más asociadas con secuencias de *L. panamensis* y tres de ellas muestran una relación intermedia entre *L. panamensis* y *L. braziliensis*.



Reproducibilidad de la tipificación por PCR HRM: Cada una de las muestras fue corrida por triplicado en tres corridas diferentes y no se observó discordancias en las tipificaciones.

Fig. 3 - Análisis de los datos de PCR-HRM mediante gráficos diferenciales, empleando como referencia ADN de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

Determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo e índice de validez de la prueba

El análisis comparativo de los resultados obtenidos tanto del diagnóstico directo, el cultivo, la PCR convencional, y la PCR en tiempo real, muestran que la PCR en tiempo real detectó el mismo número de muestras positivas que el examen directo (98 de 237). La PCR convencional basada en el gen Hsp70 detectó un menor número de muestras positivas que el examen directo y la PCR en tiempo real, (87 de 237) y el cultivo fue el que menor nivel de detección presentó (48 de 237) como era de esperarse (Tabla 3).

La sensibilidad, la especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR en tiempo real fueron comparados con los resultados del examen directo y/o cultivo que fueron tomados como el GOLD Standard para el diagnóstico de leishmaniasis. Adicionalmente, se compararon estos mismos parámetros con el diagnóstico por PCR convencional (Tabla 3). En el caso de la comparación con el GOLD estándar, la PCR en tiempo real mostró un índice de validez, una sensibilidad, una especificidad, un valor predictivo positivo y un valor predictivo negativo del 100 % (Tabla 3).

Distribución geográfica de especies identificadas empleando PCR-HRM

Finalmente, con los resultados de las identificaciones obtenidas mediante PCR-HRM se realizó un mapa de distribución de las especies, teniendo en cuenta el

lugar de procedencia del paciente y los posibles lugares donde pudo contraer la infección (Fig. 4). Se encontró que las cepas identificadas en determinadas áreas son concordantes con reportes previos de la presencia de estas especies en dichas áreas de Colombia como los departamentos de Córdoba, Chocó, Antioquia, Santander, Meta y Caquetá.⁽¹¹⁾

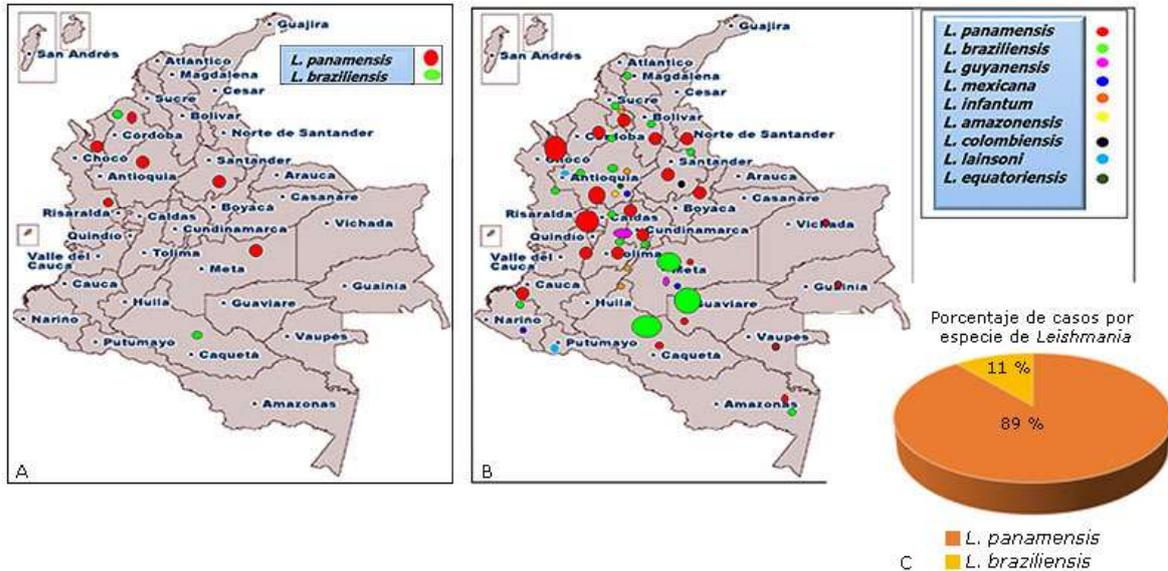


Fig. 4 - Mapa de distribución de las especies de *Leishmania* identificadas mediante PCR-HRM (Panel A), y mapa de localización de especies de *Leishmania* en el territorio colombiano (Panel B) y porcentaje de casos de *Leishmania* reportados en este estudio (Panel C).

El 98,9 % de los casos (97 casos de 98 casos totales) mostró la presentación clínica leishmaniasis cutánea, distribuidas así, 85 casos de leishmaniasis cutánea por *L. panamensis*, 11 casos de leishmaniasis cutánea por *L. braziliensis* y un caso de leishmaniasis cutánea diseminada por *L. panamensis*. Además, solo hubo un caso de *L. mucocutánea* y la especie involucrada fue *L. panamensis*. De todos los casos de leishmaniasis cutánea se evidenció un solo caso de coinfección con VIH, un solo caso con coinfección con úlcera piógena y dos casos con coinfección con micosis (Fig. 5).

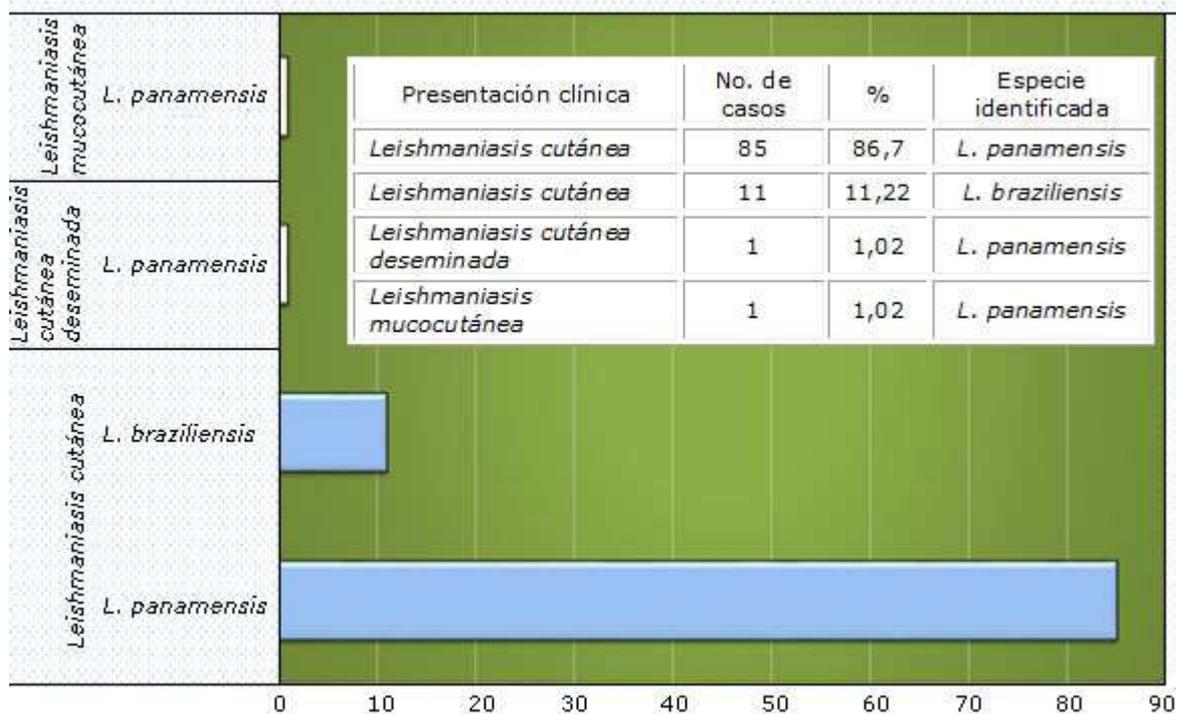


Fig. 5 - Presentaciones clínicas de leishmaniasis, especie infectante identificada y número de casos. Se muestra la relación entre la presentación clínica cutánea, cutánea diseminada, mucocutánea con la especie que estaba infectado al paciente y el número de casos de pacientes para cada una de estas presentaciones clínicas.

Discusión

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial (1). Colombia es el segundo país con mayor número de casos en Latinoamérica después de Brasil.⁽¹¹⁾

En Colombia y en la mayoría de países del mundo, la confirmación parasitológica, con algunas excepciones, es necesario para iniciar el tratamiento, porque los efectos colaterales y eventos adversos de los medicamentos solo se justifican en pacientes con diagnóstico confirmado debido al riesgo beneficio de ofrecer un tratamiento que puede ser perjudicial en el paciente, sumado a lo anterior el tratamiento es brindado por el estado y los medicamentos no son de venta libre por lo que se hace necesario que exista un diagnóstico definitivo para poder ser ofrecido al paciente.^(1,2,3) Además, los medicamentos utilizados son altamente tóxicos y en algunos casos están contraindicados en algunas condiciones, como por ejemplo, en mujeres embarazadas, niños con desnutrición y en personas con problemas hepáticos, cardíacos o renales.⁽¹²⁾

Los métodos diagnósticos indicados por la OMS son: el examen directo que presenta una sensibilidad variable (50 %-90 %) y está influenciado por diferentes factores como calidad y tipo de muestra y la experiencia de la persona que realiza la lectura,⁽¹³⁾ el cultivo tiene una sensibilidad mucho menor (10 %-30 %) y el crecimiento del parásito puede tardar hasta un mes, lo cual impide una

implementación pronta del tratamiento, además el chance de lograr aislar el parásito en cultivo es inversamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad, debido a que quizás se disminuye la carga parasitaria.⁽¹⁴⁾

En vista de la necesidad de implementar metodologías, rápidas, sensibles y específicas se ha avanzado hacia el diagnóstico molecular, basado principalmente en la detección del ADN del parásito y esto ha surgido como una alternativa diagnóstica rápida y confiable con alta sensibilidad y especificidad.⁽¹⁵⁾

Sin embargo, una cosa es el diagnóstico molecular y otra es la identificación de la especie, esta identificación es necesaria básicamente por tres razones: 1. comprender epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad, lo cual permite orientar el muestreo a áreas poco estudiadas e implementar estrategias para definir zonas de riesgo y áreas prioritarias de control; 2. identificación de cepas resistentes a los tratamientos de elección; 3. elección del tratamiento adecuado.

La identificación de especies permite: caracterizar las poblaciones de los parásitos para mejorar el diagnóstico y tratamiento, evaluar las recaídas o reinfecciones, y establecer el pronóstico y control.

Uno de los principales avances en la identificación mediante PCR-RFLP,⁽¹⁶⁾ amplificando una región de un tamaño de 593 pb del gen *Hsp70*, con el cual se ha logrado diferenciar 9 especies empleando un solo par de oligonucleótidos y una única enzima de restricción *HaeIII*, sin embargo, al tratar de resolver los patrones de corte en algunos casos al presentar diferencias de solo 10 nucleótidos en el patrón de bandas entre una especie y otra se dificulta la diferenciación en el gel de agarosa.^(5,11)

Los avances en identificación de especies mediante PCR-RFLP han tenido como cimiento la presencia de un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido en el genoma de *Leishmania* spp.⁽¹⁷⁾

Teniendo en cuenta la presencia de estos polimorfismos y la capacidad de identificar estas diferencias utilizando PCR HRM, que en primer lugar es una técnica mucho más sensible, ya que en nuestro caso logró detectar la infección a bajas cargas parasitarias tanto como 1 fg de ADN del parásito, mientras que por PCR convencional solo se logra con 1 000 fg del ADN del parásito, logrando una amplia mejoría en la sensibilidad analítica.

Se eligió el gen de la *ADN polimerasa 2* debido a que es un gen de copia única y al ser de copia única, no se observaron diferencias en la secuencia en el mismo parásito, como si ocurre en los genes de copia múltiple que se han utilizado en la tipificación.⁽¹⁸⁾

El análisis *in silico* de una región del gen de la *ADN polimerasa 2* permitió determinar diferencias a nivel de nucleótidos que pueden presentarse entre las especies y de acuerdo con las propiedades de la PCR-HRM de diferenciar cambio en la fluorescencia en función curvas de temperaturas de desnaturalización media de alta resolución permitieron la realización final de la diferenciación de especies.⁽¹⁹⁾

La PCR-HRM permitió hacer la detección e identificación simultánea de las 3 especies de *Leishmania* responsables de más del 98% de los casos de Leishmaniasis cutánea en Colombia, adicionalmente la tipificación por esta técnica no presenta discrepancias con los obtenidos por PCR-RFLP y los resultados son reproducibles a otros estudios realizados por diferentes grupos de investigación.^(1, 11)

La prueba de especificidad evidenció la ausencia de productos de amplificación inespecíficos y dímeros de oligonucleótidos como se observó por las curvas de fusión, además de un tamaño del amplicón acorde al esperado, demostrando que amplificaban la región para la cual fueron diseñados y que no presentaban alineamientos inespecíficos.

Además, con estos oligonucleótidos y mediante normalización de la fluorescencia se obtuvieron curvas de temperatura de desnaturalización media de alta resolución que eran específicas para cada especie evaluada, permitiendo así su correcta identificación y el análisis posterior con las respectivas muestras clínicas.

La sensibilidad analítica de ambas PCR (PCR *HSP70N* y PCR-HRM) reafirmaron lo descrito por estudios anteriores⁽¹⁵⁾ en los cuales se demostró una mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real respecto a la PCR convencional, muy seguramente debido al método de detección empleado en PCR convencional.

Evaluando la linealidad de la PCR-HRM, se observó que ésta presentó una buena linealidad en las diferentes concentraciones analizadas, lo cual permite afirmar que la técnica guarda una relación directamente proporcional entre la concentración del ADN parasitario y el ciclo de amplificación. Esto sumado al coeficiente de correlación y la elevada eficiencia las cuales ya habían sido descritas en estudios previos para la PCR-HRM.⁽¹⁵⁾ Por su parte la prueba de reproducibilidad no evidenció cambios en los diagnósticos y/o tipificaciones, evidenciando la confiabilidad de los resultados. Esto gracias a la capacidad de la técnica de eliminar las variaciones intraensayo, concentrando los análisis en los puntos comunes existentes entre las muestras y los controles.

La evaluación de la interferencia del ADN humano en la eficiencia de la amplificación reveló una disminución leve de la eficiencia de la PCR en tiempo real en aquellas muestras con bajos niveles de ADN parasitario. Sin embargo, se obtuvo amplificación en un mayor número de muestras comparado con la PCR convencional y que eran parasitológicamente positivas, de acuerdo con el examen directo, sin observarse cambios en las tipificaciones. Esto permitió obtener un diagnóstico positivo de todas las muestras a pesar de la presencia del ADN humano, el cual se conoce que puede afectar la amplificación de ADN en reacciones de PCR.⁽²⁰⁾

En este caso la sensibilidad del directo fue del 100 % debido a que el personal que realizó el diagnóstico directo está altamente entrenado. La sensibilidad mostrada para el diagnóstico con la PCR HRM fue de un 100 %, con una especificidad del 100 %, no se presentaron falsos negativos ni falsos positivos, lo que evidencia el excelente desempeño de esta técnica, como prueba diagnóstica.

Al evidenciar las ventajas que tiene la PCR en tiempo real sobre otros métodos diagnósticos,^(20,21) y complementado con las curvas de fusión de alta resolución para la identificación de especie, hay inicialmente una optimización del tiempo de obtención de un diagnóstico e identificación además de disminuir el porcentaje de muestras indeterminadas de un 16 % a 7,14 %.

Con los datos de origen de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras identificadas por PCR-HRM, se comparó la distribución de estas especies con respecto a reportes previos de distribución de *Leishmania* spp en Colombia. En el mapa por departamentos (Fig. 4) se ubicaron cada una de las especies identificadas en este estudio y se observó que la distribución obtenida concuerda con la distribución de especies de *Leishmania* en Colombia de otras investigaciones del PECET, sugiriendo que la circulación de las especies se mantiene hasta ahora conservada, lo cual está directamente relacionado con la distribución del vector y los reservorios involucrados. Sobre la distribución de especies en Colombia, este estudio reportó datos similares a los encontrados en otros estudios donde en los departamentos de Córdoba, Chocó, Antioquia, Santander, Meta y Caquetá la especie comúnmente reportada es *L. panamensis* (Fig. 4).^(1,11)

Es uno de los primeros trabajos en Colombia que emplea PCR HRM para la identificación de *Leishmania*, adicionalmente, a la fecha, hay escasos reportes en el mundo empleando esta metodología de PCR-HRM para la identificación de *Leishmania* en pacientes.^(3,18,19,20,21) La implementación de este trabajo permitirá su aplicación en el diagnóstico, la clínica y la epidemiología. Las aplicaciones van dirigidas a laboratorios para el diagnóstico, centros de referencia e investigación, que precisan de herramientas confiables para la detección e identificación de *Leishmania* spp. Esta propuesta está dirigida contribuir al desarrollo e implementación de nuevas estrategias de diagnóstico que pueden favorecer la implementación o incluso para monitorear la efectividad de medidas de prevención, tratamiento y control de la Leishmaniasis y lograr una disminución de la incidencia de esta enfermedad pudiendo adaptarse para la tipificación de cepas responsables de otras formas clínicas de Leishmaniasis como mucosa, difusa, diseminada y visceral.

La técnica PCR-HRM basada en el gen de la ADN polimerasa 2, se constituye como una buena herramienta no solo de diagnóstico si no para la identificación de algunas especies de *Leishmania*, la cuál puede ser empleada para obtener un diagnóstico, rápido, sensible y específico, favoreciendo la instauración de un tratamiento oportuno y adecuado, además de permitir tener más y mejores datos de la distribución de las especies de *Leishmania*. Esta técnica puede ser luego empleada también para la evaluación de infección natural en vectores y reservorios, lo que la convierte en una excelente opción para posteriores estudios no solo clínicos, sino de carácter epidemiológico.

Se concluye que la PCR-HRM es un buen método que permite la identificación de las especies más prevalentes en Colombia, comparando temperaturas de desnaturalización medias específicas según la especie de *Leishmania* involucrada.

Referencias bibliográficas

1. Herrera G, Barragán N, Luna N. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. Sci Data 7. 2020;110. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0451-5>
2. Fayaz S, Fard-Esfahani P, Bahrami F, Parvizi P, Ajdary S. High resolution melting assay in discrimination of the main etiologic agents of leishmaniasis in Iran. Iran J Microbiol. 2021;13(1):137-44.
3. Asfaram S, Fakhar M, Mirani N, Derakhshani-niya M, Valadan R, Ziaei Hezarjaribi H, et al. HRM-PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. Acta Parasitol. 2019;65(2):310-6.
4. Ashwin H, Sadlova J, Vojtkova B. Characterization of a new *Leishmania major* strain for use in a controlled human infection model. Nat Commun. 2021;12:215. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-2056>
5. Montalvo AM, Fraga J, El Safi S. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80(1):35-9.
6. Moulik S, Sengupta S, Chatterjee M. Molecular tracking of the *Leishmania* parasite. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:623437.
7. Veasey JV, Zampieri RA, Lellis RF, Freitas THP de, Winter LMF. Identification of *Leishmania* species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis. An Bras Dermatol. 2020;95(4):459-68.
8. Ouso DO, Otiende MY, Jeneby MM, Oundo JW, Bargul JL, Miller SE, et al. Three-gene PCR and high-resolution melting analysis for differentiating vertebrate species mitochondrial DNA for biodiversity research and complementing forensic surveillance. Sci Rep. 2020;10(1):4741.
9. Ashrafi R, Bruneaux M, Sundberg LR. Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent intraspecific competition in a pathogenic bacterium. Sci Rep. 7, 2017;980.
10. Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O. Detection of *Leishmania* spp. based on the gene encoding HSP20. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014 Oct-Dec;31(4):635-43.
11. Salgado-Almario J, Hernández CA, Ovalle CE. Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. Biomedica. 2019 Jun 15;39(2):278-290. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>
12. Brindha J, Balamurali MM, Chanda K. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases-leishmaniasis and Chagas diseases. Front Chem. 2021;9:622286.

13. Diro E, Yansouni CP, Takele Y, Mengesha B, Lynen L, Hailu A, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood microscopy in Ethiopia: A prospective phase-III study of the diagnostic performance of different concentration techniques compared to tissue aspiration. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):190-6.
14. Pereira L de OR, Moreira RB, de Oliveira MP, Reis S de O, de Oliveira Neto MP, Pirmez C. Is *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? *Int J Infect Dis.* 2017;57:132-7.
15. Araujo-Pereira T de, Pita-Pereira D de, Moreira RB, Silva-Galdino T, Duarte MP de O, Brazil RP, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Acre State in the Amazonian Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018;51(3):376-81.
16. Kato H, Gomez EA, Seki C, Furumoto H, Martini-Robles L, Muzzio J, et al. PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):e0007403.
17. de Godoy N, Lima-Junior M da C, Lindoso JL, Pereira-Chioccola V, Okay T, Braz LA. A PCR and RFLP-based molecular diagnostic algorithm for visceral leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med.* 2020;13(2):62.
18. Wu Y, Tian X, Song N, Huang M, Wu Z, Li S, et al. Application of quantitative PCR in the diagnosis and evaluating treatment efficacy of leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:581639.
19. Nateghi Rostami M, Darzi F, Farahmand M, Aghaei M, Parvizi P. Performance of a universal PCR assay to identify different *Leishmania* species causative of Old World cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):431-8.
20. Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping—limitations and caveats in practical case studies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2316.
21. Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Trop.* 2018;184:29.

Conflicto de intereses

Los autores han declarado que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Rafel Guillermo Villarreal Julio: Concepción de la idea, desarrollo del trabajo investigativo, análisis *in silico* y de laboratorio, escritura de manuscrito.

Giovanny Herrera: Análisis de laboratorio, análisis estadístico, revisión de manuscrito.

Carlos E. Muskus López: Consecución de recursos, concepción de idea, dirección de trabajo investigativo, aprobación de resultados, revisión y aprobación de manuscrito.

Financiación

Este trabajo fue financiado con recursos del grupo PECET y la Universidad de Antioquia, Colombia.