

Artículos originales

Comparación de pruebas moleculares para el diagnóstico de *Leishmania spp.* en lesiones cutáneas con baja carga parasitaria

[Comparison of molecular tests for the diagnosis of *Leishmania spp.* in skin lesions with low parasite load]

Adelys Reina¹, Vanessa Pineda¹, José Eduardo Calzada¹, Azael Saldaña Patiño²

1) Departamento de Investigaciones en Parasitología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Rep. de Panamá; 2) Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá. Rep. de Panamá.

Palabras Claves

diagnóstico, Leishmaniasis cutánea, carga parasitaria, Panamá.

Keywords:

diagnosis, Leishmaniasis cutánea, carga parasitaria, Panama.

Correspondencia

Azael Saldaña Patiño
areina@gorgas.gob.a

Recibido

8 de septiembre de 2023

Aceptado

20 de octubre 2023

Publicado

31 de diciembre 2023

Uso y reproducción

Publicación de libre uso individual, no comercial. Prohibida la distribución para otros usos sin el consentimiento el editorial.

Aspectos bioéticos

Los autores declaran que el estudio fue aprobado por comité de bioética y se eximió necesidad de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas.

Financiamiento

Los autores declaran las siguientes fuentes de financiamiento: SENACYT, Panamá.

Uso de datos

Los autores declaran las siguientes fuentes de financiamiento: SENACYT, Panamá.

Resumen

Introducción: La leishmaniasis cutánea (LC) es un problema grave de salud pública en Panamá. El diagnóstico de esta parasitosis ha sido siempre desafiante, no sólo debido a su similitud con otras infecciones dérmicas, sino también a características particulares de las lesiones, como cargas parasitarias bajas. **Materiales y Métodos:** En este estudio, se evaluaron mediante cuatro métodos moleculares, 235 muestras de ADN procedentes de lesiones con frotis negativos por LC obtenidas durante el período 2015-2019. **Resultados:** Los resultados señalan que las sensibilidades encontradas fueron de 75.6% (IC 0.6234-0.8709) para la PCR kDNA-Género específico, de 66.7% (IC 0.5359-0.776) para la PCR Hsp70-Género específico y de 77.6% (IC 0.645-0.8949) para la qPCR 18S ribosomal. Todas las pruebas obtuvieron un valor predictivo positivo de 100%, mientras que el valor predictivo negativo más alto fue con la qPCR (80.58%) y el más bajo con el PCR Hsp70-Género específico (73.2%). En cuanto a la precisión de diagnóstico se obtuvo un rango mayor del 82% en todas las pruebas evaluadas. **Conclusión:** Este estudio confirma la buena sensibilidad de la PCR kDNA-Viannia para el análisis de lesiones de LC con baja carga parasitaria. Esta metodología es relativamente fácil de estandarizar, por lo que se recomienda su uso en laboratorios clínicos regionales de Panamá. Aun cuando la qPCR 18S ribosomal presentó una sensibilidad relativamente menor, el uso de esta metodología debe ser también considerada por su facilidad de uso, menor tiempo de ejecución y capacidad de cuantificación.

Abstract

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a serious public health problem in Panama. The diagnosis of this parasitosis has always been challenging, not only because of its similarity to other dermal infections, but also because of characteristics of the lesions, such as low parasite loads. **Materials and Methods:** In this study, 235 DNA samples from smear-negative lesions by LC obtained during the period 2015-2019 were evaluated by four molecular methods. **Results:** The results indicate that the sensitivities found were 75.6% (CI 0.6234-0.8709) for kDNA-Gene-specific PCR, 66.7% (CI 0.5359-0.776) for Hsp70-Gene-specific PCR and 77.6% (CI 0.645-0.8949) for 18S ribosomal qPCR. All tests obtained a positive predictive value of 100%, while the highest negative predictive value was with qPCR (80.58%) and the lowest with Hsp70-Gene-specific PCR (73.2%). In terms of diagnostic accuracy, a range greater than 82% was obtained in all the tests evaluated. **Conclusion:** This study confirms the good sensitivity of kDNA-Viannia PCR for the analysis of LC lesions with low parasite load. This methodology is relatively easy to standardize, so it is recommended for use in regional clinical laboratories in Panama. Although 18S ribosomal qPCR showed a relatively lower sensitivity, the use of this methodology should also be considered because of its ease of use, shorter execution time and quantification capacity.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea (LC) es producida por parásitos del género *Leishmania*. Estas infecciones pertenecen a un grupo de enfermedades tropicales consideradas desatendidas por la Organización Mundial de la Salud, al manifestarse principalmente en asentamientos humanos rurales desprovistos de las medidas para su prevención, manejo clínico y control [1,2].

La LC se transmite mayormente de manera zoonótica, por la picadura de pequeños mosquitos pertenecientes a la subfamilia phlebotominae [3]. Estos vectores y un número considerable de mamíferos reservorios mantienen, en las áreas endémicas, el ciclo biológico natural de las diferentes especies de *Leishmania* [4]. En el ser humano la LC se manifiesta como diferentes formas clínicas que pueden comprometer la piel y las mucosas [5].

Leishmania (Viannia) panamensis es el principal agente causal de la LC en Panamá. Sin embargo, recientemente se han confirmado otras especies y variantes genéticas que circulan en los distintos sitios endémicos del país [6]. Estas parasitosis se presentan en varias regiones geográficas del istmo, principalmente en comunidades rurales, generalmente montañosas y con abundante vegetación cercana, en donde proliferan los vectores (chitras) y reservorios (perezosos, roedores y zarigüeyas entre otros) de estos parásitos. Anualmente se reportan en Panamá entre 1,000 y 3,000 casos de LC. Esta incidencia está ligada a muchos factores, incluyendo los cambios climáticos, la deforestación y los movimientos de las poblaciones afectadas [7] y en la mayoría de los años se considera una subestimación de la cifra real [8].

El diagnóstico de la LC es desafiante debido en parte al amplio espectro de formas clínicas involucreadas. Las lesiones cutáneas varían en gravedad, apariencia clínica, duración y, en ciertos casos, pueden ser indistinguibles de las causadas por bacterias y hongos, como botriomicosis cutánea, lepra lepromatosa, lobomicosis cutánea o inclusive de ciertos tipos de cáncer cutáneo [9]. El estándar de oro actualmente aceptado para el diagnóstico de la LC requiere el aislamiento de los parásitos en cultivos *in vitro* y/o la visualización microscópica del estado de amastigotes en fragmentos procesados de tejido de una lesión sospechosa [10]. Sin embargo, la sensibilidad de estas metodologías parasitológicas varía de 40 a 74.4% [11], dependiendo entre otras variables, de las especies causales, el tiempo de evolución clínica, el tipo de la lesión, la carga parasitaria presente y la experiencia del personal técnico que realiza la detección microscópica [12].

Las pruebas parasitológicas, mediante frotis y/o cultivos del parásito, tiene una alta especificidad diagnóstica para la LC. Sin embargo, debido a su relativa baja sensibilidad, las técnicas moleculares representan una alternativa más eficiente para el diagnóstico de estas infecciones [13]. Adicionalmente, los métodos moleculares tienen la ventaja de poder determinar la carga parasitaria y la especie del parásito presente en las lesiones. Con esto se mejora el pronóstico del paciente, al adecuar el tratamiento y permitir monitorear la eficacia del mismo [14].

Un buen desempeño diagnóstico de los métodos convencionales (frotis/cultivo) depende en gran medida de cargas parasitarias relativamente altas y a la ausencia de contaminación bacteriana en las lesiones [15]. Esta última puede inducir no sólo resultados falsos positivos, sino también falsos negativos [16], aun cuando las características clínicas/epidemiológicas sugieran que el paciente presente una LC. De hecho, las lesiones de LC con cargas parasitarias bajas representan uno de los escenarios clínicos en donde los métodos parasitológicos con frecuencia fallan en diagnosticar la infección. Al respecto, entre los años 2015 al 2019 se registraron en el Departamento de Investigaciones en Parasitología del ICGES (DIP-ICGES) 342 pruebas para LC con resultados negativos por frotis de lesión y cultivo. Sin embargo, 179 de estas muestras (52.34 %) resultaron ser positivas al analizarse posteriormente con una prueba de PCR standard que detecta una secuencia específica de kDNA [17]. Esta prueba molecular es una de las más utilizadas durante el diagnóstico molecular de la LC en el DIP-ICGES.

Si bien, un número importante de métodos moleculares han sido desarrollados para el diagnóstico de la LC en América Latina [18], estas técnicas todavía se usan principalmente en laboratorios de investigación y referencia.

La aplicación de análisis moleculares en prácticas clínicas y establecimientos de salud, requiere de personal técnicamente capacitado y de equipos/reactivos relativamente costosos que generalmente no están disponibles en países con limitados recursos económicos. No obstante, la alta sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular refuerza la necesidad de implementarlos, especialmente en situaciones donde los métodos parasitológicos han demostrado tener una eficiencia limitada. El objetivo de este estudio fue comparar el desempeño diagnóstico de cuatro pruebas moleculares en lesiones de LC que presentaron inicialmente un diagnóstico parasitológico negativo debido a la escasa presencia de formas amastigotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de ADN evaluadas

Se evaluaron 235 muestras de ADN procedentes de lesiones de LC que presentaron pruebas parasitológicas negativas. Estas muestras fueron obtenidas de pacientes que asistieron a la Clínica de Medicina Tropical del ICGES durante el periodo de 2015-2019. Los fragmentos de tejido de la lesión (raspados) se mantuvieron en una solución tampón TE (Tris EDTA) y luego se realizó la extracción de ADN empleando el kit Qiagen QIAamp® DNA Blood Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). En ninguna de estas lesiones fue posible demostrar la presencia de amastigotes mediante frotis teñidos de raspados o formas promastigotas en cultivos. En 123 muestras se confirmó la LC mediante un análisis de PCR kADN *Viannia* específico [17]. El uso de estas muestras clínicas y sus respectivos datos fue revisado y aprobado por el Comité Nacional de Bioética en Investigación, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá, Panamá (Código: 733/CBI/ICGES/19).

Análisis Moleculares

Las 235 muestras fueron reevaluadas mediante cuatro técnicas de PCR que amplifican diferentes regiones del genoma de *Leishmania*:

(1) PCR kDNA-*Viannia* específico [17]

Se utilizaron los cebadores B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') y LV (5'-ATTTTTGAACGGGTTTCTG-3') que amplifican un producto de 750 pb de minicírculo de las especies de *Leishmania Viannia*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µL que contenía 25 µL de PCR Master Mix 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µL de MgCl₂ 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a una concentración final de 1mM, 3 µL de cada primer con una concentración final de 0.6 µmol/L, 12 µL de agua calidad biología molecular, y 5 µL de ADN de muestra o aislados de referencia: *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS-94). Se utilizó un termociclador MiniAmp™ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), y la amplificación se realizó de acuerdo a la siguiente programación: 5 ciclos de 95 °C por 6 min, 95 °C por 30 s, 64.5 °C por 2 min, 72 °C por un min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 64 °C por 1 min, y 72 °C durante 1 min; luego, 72 °C por 10 min e indefinidamente a 4 °C.

(2) PCR kDNA-Género específico [19].

Se utilizaron los cebadores L-150 (5' GGGKAGGGGCGTTCTSCCAA-3' y L-151 (5' SSSMCTATWTTACACCAACCC-3') que amplifican un producto de 120 pb de la región conservada del kDNA de las es-

pecies de *Leishmania*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 30 µL que contenía 12.5 µL de PCR Master Mix 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 1 µL de MgCl₂ 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a una concentración final de 1mM, 2.5 µL de cada primer con una concentración final de 1 µmol/L, 6.5 µL de agua calidad biología molecular, y 5 µL de ADN de muestra o aislados de referencia: *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS-94). Se utilizó un termociclador MiniAmp™ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), y la amplificación se realizó de acuerdo al siguiente ciclo: 1 ciclo de 94 °C por 4 min seguido de 29 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, y 72 °C por 30 s; luego, 72 °C por 10 min e indefinidamente a 4 °C.

(3) PCR Hsp70-Género específico [20].

Se emplearon los cebadores F25 y R1310 que amplifican un producto de 1286 pb del gen que codifica la proteína de choque térmico hsp70. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µL que contenía 25 µL de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µL de cada primer con una concentración final de 0.6 µmol/L, F25 (5' GGACGCCGGCACGATTKCT 3') y R1310 (5' CCTGGTTGTTG TTCAG CCACTC-3'), 16 µL agua de calidad biología molecular, y 5 µL de ADN de muestra o aislados de referencia: *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS-94), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) [21-23]. Se utilizó un termociclador MiniAmp™ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), y la amplificación se realizó de acuerdo al siguiente ciclo: 94 °C por 5 min, 33 ciclos de 94 °C por 30 s, 61 °C por 1 min, y 72 °C durante 3 min; luego, 72 °C por 10 min e indefinidamente a 4 °C.

(4) qPCR 18 s ribosomal [24].

Se utilizaron los cebadores 18 S ADN ribosomal (5'-AAG TGC TTT CCC ATC GCA ACT- 3', 5'-GAC GCA CTA AAC CCC TCC AA- 3') y 0.25 µL de la sonda FAM (5'-6FAM CGG TTC GGT GTG TGG CGC C - NFQ). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 12 µL, que contenía 2 µL de la muestra, 6.0 µL de taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1.0 µL de los primers y 1.75 µL de agua calidad molecular. Se utilizó un termociclador QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) con las siguientes condiciones: desnaturalización 95 °C durante 10 minutos, seguido de 44 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 15 segundos y finalmente 60 °C durante 50 segundos para la detección de FAM.

Análisis de Datos

Las comparaciones entre las pruebas moleculares y su evaluación del desempeño diagnóstico se realizaron empleando el software OpenEpi, versión 3, la calculadora de código abierto DiagnosticTest software (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Se determinaron los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y el coeficiente kappa.

tratamiento de esta infección [25]. De hecho, en Panamá la Norma Nacional indica que para poder suministrar el tratamiento etiológico de LC es necesaria una prueba de laboratorio positiva. En este sentido, las pruebas de diagnóstico parasitológico convencionales no siempre son definitivas con el diagnóstico clínico [26].

RESULTADOS

Se evaluaron 235 muestras de ADN provenientes de lesiones de LC con resultados de pruebas parasitológicas negativas utilizando cuatro métodos moleculares previamente descritos.

Como era esperado, 123 de las muestras fueron reconfirmadas positivas al ser analizadas con el PCR kDNA-Viannia específico (Ver tabla 1). Esta prueba molecular se emplea rutinariamente en el DIP-ICGES para hacer el diagnóstico de referencia a nivel nacional, y fue empleada para la selección inicial de las muestras en este estudio.

La mayor sensibilidad (77.6%) y coeficiente k (0.77) se obtuvo al comparar los resultados del PCR kDNA-Viannia específico y el qPCR, seguido de 75.6 % y coeficiente k (0.74) para la comparación entre PCR kDNA-Viannia específico y qPCR kDNA-Género específico. El PCR Hsp70-Género específico presentó la sensibilidad más baja con 66.6 % y un coeficiente k de 0.65 (Ver tabla 1).

Todas las pruebas realizadas obtuvieron un valor predictivo positivo de 100%, mientras que el valor predictivo negativo más alto fue para la qPCR (80.58 %) y el más bajo fue para el PCR Hsp70-Género específico (73.2 %). En cuanto a la precisión de diagnóstico se obtuvo un rango mayor del 82% en todas las pruebas estudiadas (Ver tabla 1).

Los métodos clásicos utilizados para realizar el diagnóstico en áreas endémicas muestran una baja sensibilidad, debido a que en muchas ocasiones los laboratorios clínicos disponibles no cuentan con una infraestructura adecuada, la toma de muestra es deficiente, los reactivos utilizados son de calidad baja, se utiliza una sola metodología diagnóstica y el personal técnico encargado no cuenta con suficiente entrenamiento para identificar de forma confiable los parásitos presentes en los frotis cutáneos [27]. El examen directo para la detección de parásitos en frotis teñidos tiene una sensibilidad no mayor al 75%, no obstante, esta metodología ha demostrado ser una prueba útil, relativamente rápida y económica para el diagnóstico de la mayoría de los casos de LC [28]. El análisis de frotis con fragmentos de tejido de la lesión es el método más utilizado actualmente para el diagnóstico de la LC en Panamá. Sin embargo, la técnica pierde mucha sensibilidad en lesiones con baja carga parasitaria. El escaso número de amastigotes en una lesión puede tener muchas causas, entre las que destacan el tiempo de evolución, circulación de diferentes especies de *Leishmania*, respuesta inmune del huésped y tratamientos implementados [29]. Por lo tanto, es necesario contar con metodologías alternas al diagnóstico directo, con mejor sensibilidad y buena especificidad, aun en casos clínicos que presenten una carga parasitaria baja.

Los métodos moleculares son una alternativa para la detección temprana de pacientes infectados con parásitos del género *Leishmania*, lo que ayuda a una implementación rápida del tratamiento. Además, permiten la caracterización de las especies de parásitos involucradas [30]. Sin embargo, los análisis moleculares tienen como principal desventaja sus elevados costos, lo que hace difícil su uso en regiones endémicas donde los recursos económicos son limitados. La sensibilidad de los métodos moleculares es variable, dependiendo de la metodología utilizada y del número de copias de la secuencia blanco presentes en el genoma del parásito [18]. A pesar de esto, numerosos estudios argumentan que los métodos moleculares representan una alternativa confiable, específica y sensible que deben formar parte del algoritmo diagnóstico de la LC en las regiones endémicas de América Latina.

Los resultados de la presente investigación señalan que la metodología de kDNA-Viannia específico re-

DISCUSIÓN

La LC es una zoonosis parasitaria endémica en Panamá, afecta principalmente a poblaciones desatendidas rurales e indígenas, generalmente cercanas a regiones boscosas. Uno de los pilares para su control, un diagnóstico oportuno, confronta dificultades debido a la diversidad de formas clínicas que adopta la enfermedad, al tipo de metodología utilizada, a la escasez de laboratorios y la poca disponibilidad de personal capacitado que brinden este servicio en las regiones endémicas. Un diagnóstico eficiente para detectar casos de LC, representa un requisito ineludible para el funcionamiento de los programas de vigilancia, prevención y

Tabla 1. Evaluación del desempeño de tres pruebas moleculares para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea (kDNA Género específico, Hsp70 Género específico y qPCR 18S ribosomal) en comparación con una prueba molecular de referencia (kDNA *Viannia* específico).

Parámetro	kDNA- <i>Viannia</i> específico			kDNA-Género específico			Hsp70-Género específico			qPCR 18 S ribosomal		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	123	0	123	93	30	123	82	41	123	94	27	121
Negativo	0	112	112	0	112	112	0	112	112	0	112	112
Total	123	112	235	93	142	235	82	153	235	94	139	233
	Referencia			IC 95 %			IC 95 %			IC 95 %		
Sensibilidad	Referencia			75.61 % (67.32-82.35)			66.67 % (57.94-74.38)			77.69 % (69.48-84.19)		
Especificidad	Referencia			100 % (96.68-100)			100 % (96.68-100)			100 % (96.68-100)		
VPP	Referencia			100 % (96.03-100)			100 % (95.52-100)			100 % (96.07-100)		
VPN	Referencia			78.87 % (71.44-84.78)			73.2 % (65.68-79.59)			80.58 % (73.21-86.29)		
Precisión de Diagnóstico	Referencia			87.23 % (82.36-90.91)			82.55 % (77.19-86.87)			88.41 % (83.67-91.91)		
índice Kappa	Referencia			0.7471 (0.6234-0.8709)			0.6559 (0.5359-0.776)			0.77 (0.645-0.8949)		

VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo. Resultados de OpenEpi, versión 3, la calculadora de código abierto DiagnosticTest

sultó ser la técnica con mejor sensibilidad, esto al ser comparado con las otras tres metodologías de PCR evaluadas. De acuerdo con nuestros hallazgos, la PCR de kDNA tiene una alta sensibilidad durante la detección de *Leishmania (Viannia) spp.*, aun en muestras que resultaron negativas al diagnóstico parasitológico. Bajo nuestras condiciones de laboratorio, esta prueba puede detectar hasta 0.0098 pg de ADN de *Leishmania (Viannia) sp.* (Datos no mostrados).

Los controles de la PCR kDNA-*Viannia* no mostraron contaminación, por lo tanto, se asumió que 123 de estas muestras con examen directo negativo, correspondían a lesiones positivas de LC con cargas parasitarias bajas [31]. Las diferencias en sensibilidad encontradas en este estudio están quizás mayormente asociadas con el número de copias de las diferentes secuencias blanco presentes en el genoma del parásito.

En el caso del análisis por PCR kDNA-*Viannia*, la secuencia amplificada se encuentran entre 10,000 a 20,000 copias por célula en las especies de *L. Viannia* [32], la PCR kDNA-Género específico amplifica una región del cinetoplasto que tiene aproximadamente 700 copias [19], para la PCR HSP-70, la secuencia amplificada está presente en sólo 1 a 15 copias [20] y para la secuencia 18S ribosomal entre 20 a 40 copias [33]. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que debemos contemplar que la metodología de qPCR incrementa la sensibilidad de las pruebas, aun con secuencias blanco poco abundantes en el genoma [24].

Las cuatro pruebas moleculares evaluadas reportaron un índice bueno de concordancia. Sin bien la metodología de PCR HSP-70 presentó las sensibilidad más baja (66.67%), esta prueba presenta el valor agregado de ser útil en la caracterización de las *leishmanias* a nivel de especies en combinación con otros análisis moleculares como el RFLP y la secuenciación. La utilización de estas pruebas han permitido describir muchas de las especies y variantes genéticas de *Leishmania* que circulan en áreas endémicas de Panamá [34]. La sensibilidad encontrada para el PCR kDNA-género específico fue de 75.6%, sólo ligeramente menor que la hallada con la qPCR. Esta prueba tiene la ventaja de permitir el diagnóstico de casos de LC inducidos por especies de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* [30]. A pesar de que el subgénero *Leishmania* no circula con frecuencia en las áreas endémicas de Panamá, el contar con una prueba molecular que pueda detectar estas infecciones es importante no sólo por su valor diagnóstico sino también para fortalecer la vigilancia epidemiológica en nuestro medio.

Por otro lado, existe actualmente un gran interés por el uso de metodologías de qPCR ya que las mismas pueden ser utilizadas para el diagnóstico, cuantificación de carga parasitaria e identificación de especies de *Leishmania* [35]. En el presente estudio se evaluó la qPCR 18S ribosomal como diagnóstico, mostrando una sensibilidad de 77.6%, un resultado un poco más bajo comparado con los reportados en otros estudios con plataformas de qPCR para el diagnóstico de la LC, en donde las

sensibilidades encontradas alcanzaron hasta un 90%, [14]. Sin embargo, es importante considerar que estos análisis fueron realizados con paneles de muestras con altas y bajas cargas parasitarias. También debemos señalar que la diana utilizada en nuestro estudio ha sido descrita con una sensibilidad menor comparada con la del qPCR de kDNA empleado en la determinación de carga parasitaria [36]. Además, la menor sensibilidad de la qPCR evaluada en este estudio puede estar relacionada con el tipo de muestra utilizada, ya que originalmente las muestras fueron colectadas para otros tipos de análisis moleculares.

En la actualidad algunos grupos de investigación trabajan en la estandarización del método de toma de muestras para una qPCR de uso en América Latina [11]. Al respecto, se refiere que las muestras recolectadas raspando el borde interior de la lesión LC ulcerada son las más apropiadas para el diagnóstico, tanto para el diagnóstico molecular como para el examen parasitológico directo [29]. De igual manera se sugiere que la muestra de tejido de la lesión sea colectada con la ayuda de un cepillo citológico, lo cual ayudaría a homogenizar la cantidad y tipo muestra a ser evaluada [37]. Estas recomendaciones representan limitantes confrontadas en el presente estudio que deben ser consideradas en futuras evaluaciones de la qPCR 18S ribosomal y de otros marcadores que utilicen la metodología de PCR en tiempo real.

La qPCR 18S ribosomal es una metodología robusta que es posible considerar en el diagnóstico de la LC en Panamá, sobre todo por su facilidad de uso, menor tiempo de ejecución, menor riesgo de contaminación y capacidad de cuantificar la carga parasitaria [11]. Al respecto algunos reportes han demostrado que la cuantificación de la carga parasitaria en lesiones de LC, resulta útil para la evaluación del pronóstico clínico de los pacientes, implementación del tratamiento y reforzar estudios epidemiológicos [38,39].

Además de las metodologías de qPCR, es también necesario establecer otras alternativas de diagnóstico molecular para la LC en Panamá, especialmente aquellas de fácil implementación en entornos de áreas endémicas. Este es el caso de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), ya que no requiere de un termociclador, el tiempo total de amplificación es corto, la visualización de los resultados puede ser directa, reporta altas sensibilidades y bajo riesgo de contaminación [40].

La metodología de kPCR *Viannia* específico ha sido utilizada por más de 15 años en el Departamento de Investigaciones en Parasitología del ICGES [32], es por lo tanto un método bien estandarizado, de relativamente fácil ejecución y de buena sensibilidad y especificidad, lo cual fue comprobado con los resul-

tados del presente estudio. El uso de esta prueba también se justifica al considerar que los parásitos del subgénero *Viannia* prevalecen en la gran mayoría de los casos de leishmaniasis diagnosticados en Panamá [34]. Sin embargo, el costo de la kPCR *Viannia* específica aún es muy superior a la de los análisis parasitológicos. En la actualidad en el ICGES, el costo aproximado de sólo los reactivos necesarios para analizar una muestra por esta metodología es de B/7.98, pero este precio puede variar debido a múltiples factores. No obstante, hacemos la recomendación de que esta metodología diagnóstica sea utilizada en algunos laboratorios clínicos cercanos a regiones endémicas para LC en Panamá. La descentralización de este diagnóstico beneficiaría a un importante número de personas afectadas por esta enfermedad parasitaria y a los programas estatales de vigilancia, manejo y control de la LC en el país.

CONCLUSIONES

La prueba de PCR kDNA-*Viannia* presentó la mejor sensibilidad diagnóstica, esto al ser evaluada con un panel de 235 muestras de ADN provenientes de lesiones de LC con diagnóstico parasitológico negativo. En base a estos resultados y su relativamente fácil ejecución, sugerimos la implementación de esta prueba en otros laboratorios del país. Las pruebas de PCR kDNA-género específico y PCR HSP-70, a pesar de ser menos sensibles, son respectivamente útiles en el diagnóstico de infecciones causadas por leishmanias del subgénero *Leishmania* y para la identificación de las especies. Finalmente, la sensibilidad de la prueba de qPCR 18S ribosomal fue 77.69%, sin embargo, el uso de esta metodología debe ser también considerada en Panamá, sobre todo por su facilidad de uso, menor tiempo de ejecución y capacidad de cuantificación.

Contribución de autores

Adelys Reina: Conceptualización, análisis de datos, análisis formal de Investigación, Metodología, Software, Redacción-borrador original, Redacción-revisión y edición. **Vanessa Pineda S.:** Metodología, Software, Redacción-borrador original, Redacción-revisión y edición. **José E. Calzada:** Conceptualización, Redacción-borrador original, Redacción-revisión y edición. **Azael Saldaña:** Conceptualización, Redacción-borrador original, Redacción-revisión y edición.

Agradecimiento: Departamento de Investigación en Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES); Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT-Panamá) y al Sistema Nacional de Investigación (SNI-SENACYT-Panamá). JE Calzada y A Saldaña son miembros del SNI.

REFERENCIAS

- [1] Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1-10. URL: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- [2] Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(21):8965-77. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>
- [3] Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Reports*. 2021;8(2):121-32. URL: <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
- [4] Çizmeçi Z, Karakuş M, Karabela ŞN, Erdoğan B, Güleç N. Leishmaniasis in Istanbul; A new epidemiological data about refugee leishmaniasis. *Acta Trop*. 2019;195(April):23-7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.008>
- [5] OPS. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas [Internet]. Washington, D.C.; 2019. 166 p. Available from: www.paho.org
- [6] Davila M, Pineda V, Calzada JE, Saldaña A, Samudio F. Evaluation of cytochrome b sequence to identify leishmania species and variants: The case of Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;116(1). URL: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200572>
- [7] Rigg CA, Calzada JE, Saldaña A, Perea M, Chaves LF, Valderrama A. Leishmania spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 Apr [cited 2019 Oct 3];100(4):798-807. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30793681> URL: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>
- [8] OPS, OMS, MINSA, ICGES C. Guía para el abordaje integral de la leishmaniasis en Panamá, 2015. 2015;1-70.
- [9] 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* [Internet]. 2018;184(August):29-37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020> URL: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>
- [10] Jaramillo O, Espinoza Aguirre A, Calvo Fonseca N, Mata Somarriba C, Wasserman H. La leishmaniasis cutánea en Costa Rica : prevención , diagnóstico y tratamiento. 2018;103-14.
- [11] Filgueira CPB, Moreira OC, Cantanhêde LM, de Farias HMT, Porrozzi R, Britto C, et al. Comparison and clinical validation of QPCR assays targeting leishmania 18s rDNA and HSP70 genes in patients with american tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Apr 25];14 (10):1-18. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008750> URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008750>
- [12] Merino G, Rodríguez J, Morillas-Márquez F, Tercedor J, Corpas-López V, Chiheb S, et al. Comparison of PCR-based methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in two different epidemiological scenarios: Spain and Morocco. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(11):1999-2003. URL: <https://doi.org/10.1111/jdv.15034>
- [13] Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Feb 1];44(2):253. Available from: [/pmc/articles/PMC7223249/](http://pmc/articles/PMC7223249/). URL: <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
- [14] Ceccarelli M, Buffi G, Diotallevi A, Andreoni F, Bencardino D, Vitale F, et al. Evaluation of a kDNA-Based qPCR Assay for the Detection and Quantification of Old World Leishmania Species. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Dec 16 [cited 2022 Mar 8];8(12):2006. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/12/2006>. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122006>
- [15] Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia). *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):601-6. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.601-606.2002>
- [16] Tsokana CN, Athanasiou L V., Valiakos G, Spyrou V, Manolakou K, Billinis C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. *Intech open*. 2018;2:64.
- [17] Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to Leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(4):423-9. URL: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.423>
- [18] Sevilha-Santos L, dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V, Bergmann JO, da Silva EF, Segato LF, et al. Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Feb 1;25(2):242-7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.025>
- [19] Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, et al. Leishmania (Viannia) braziliensis is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop*. 1999;72(3):251-8. URL:

- [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00100-4)
- [20] Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 2004; URL: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>
- [21] Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*. 2010;137(8):1159-68. URL: <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- [22] Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;31(7):1453-61. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1463-z>. URL: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- [23] Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 May [cited 2022 Aug 26];42(5):2294-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131217/> URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>
- [24] Van Der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan;46(1):73-8. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.01416-07>
- [25] Armijos T, Sebastián V. Estudio comparativo de métodos moleculares para el diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea. 2021 [cited 2023 May 11]; Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24823>
- [26] Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NCM, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Jul 1;49(1):70-4. URL: <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>
- [27] Çulha G, Kaya T, Gülbol Duran G, Urhan Küçük M, Dođramaci AÇ, Tiyekli Çelik D. Investigation of polymerase chain reaction method in patients with suspected chronic cutaneous leishmania of negative microscopy. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(4):408-18. URL: <https://doi.org/10.5578/mb.68692>
- [28] Espir TT, Guerreiro TS, Naiff M de F, Figueira L de P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol*. 2016 Aug 1;167:1-6. URL: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>
- [29] Thomaz C, Mello CX de, Espíndola O de M, Shubach A de O, Quintella LP, Oliveira RVC de, et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. 2021 Jan 1;16(1 January). URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243978>
- [30] de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools [Internet]. Vol. 5, Cell and Bioscience. BioMed Central Ltd.; 2015 [cited 2021 Jun 21]. p. 1-10. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13578-015-0021-2> URL: <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
- [31] Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr;44(4):1435-9. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>
- [32] Miranda A, Paz H, Pascale JM, Samudio FE. Molecular Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Panama Characterization of histopathological changes and cell immune response in skin injuries of skin leishmaniasis patients in Panama View project Sandfly from Panamá View project. 2009 [cited 2023 May 11]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/26881839>
- [33] Inga R, De Doncker S, Gomez J, Lopez M, Garcia R, Le Ray D, et al. Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 May 1;92(2):219-28. URL: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00009-7)
- [34] Reina AM, Mewa JC, Calzada JE, Saldaña A. Characterization of *Leishmania* spp. Causing Cutaneous Lesions with a Negative Parasitological Diagnosis in Panama. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(10). URL: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100282>
- [35] Sandoval-Juárez A, Minaya-Gómez G, Rojas-Palomino N, Cáceres O. Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020 Jun 8;37(1):87-92. URL: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4514>
- [36] Merdekios B, Pareyn M, Tadesse D, Eligo N, Kassa M, Jacobs BKM, et al. Evaluation of conventional and four real-time pcr methods for the detection of leishmania on field-collected samples in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Mar 6];15(1):1-18. Available from: <https://pmc/articles/PMC7802924/>. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008903>
- [37] Jara M, Valencia BM, Aduai V, Alba M, Lau R, Arevalo J, et al. Quantitative Kinetoplast DNA Assessment during Treatment of Mucosal Leishmaniasis as a Potential Biomarker of Outcome: A Pilot Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(1):107-13. URL: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0514>

- [38] Ghosh P, Hasnain MG, Hossain F, Ashfaq Khan MA, Chowdhury R, Faisal K, et al. Evaluation of Real-time PCR for Diagnosis of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis in Endemic Foci of Bangladesh. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 May 11];5(10). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/5/10/ofy234/5098413> URL: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy234>
- [39] Perez J. Carga Parasitaria, Distribución Espacial y Diversidad Genética de *Leishmania* spp en Personal de Militar del Ejército Nacional de Colombia con Lesiones Cutáneas. 2021 [cited 2023 Mar 15]; 80. Available from: <https://repositorio.unbosque.edu.co/handle/20.500.12495/7056>
- [40] Ibarra-Meneses AV, Chicharro C, Sánchez C, García E, Ortega S, Ndung'u JM, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Allows Rapid, Simple and Accurate Molecular Diagnosis of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* When Compared to PCR. *Microorganisms* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030610>