

“Evaluación de estrategias de detección molecular de *Leishmania* spp.”

Tesis para optar por el título de Licenciada en Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín

Giuliana Saggion

Palabras clave: PARÁSITOS PROTOZOARIOS, LEISHMANIASIS, *L. (L.) INFANTUM*, *L. (V.) BRAZILIENSIS*, DIAGNÓSTICO, PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA), KINETOPLASTO, MINICÍRCULO DEL kDNA, SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE.

Resumen: Las leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos protozoarios transmitidos a través de las picaduras de flebótomos infectados. Son endémicas en más de 98 países, afectando en gran medida a las poblaciones con menores recursos de la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales. Estas enfermedades pueden ser asintomáticas o manifestarse según tres síndromes clínicos principales (leishmaniasis cutánea; mucocutánea y visceral) que surgen a partir de la infección con diferentes especies del parásito y de acuerdo a su tropismo principal en el humano.

En los últimos años, los reportes de leishmaniasis han ido en aumento en todo el mundo, principalmente asociado a la creciente movilidad de la población. Para prevenir la expansión de casos a áreas no endémicas se deben implementar estrategias epidemiológicas que incluyan un diagnóstico rápido y específico. En el marco de trabajo de esta Tesis, se estandarizó una estrategia diagnóstica basada en una PCR para la amplificación específica de regiones del minicírculo del kDNA de *Leishmania* spp.. El objetivo principal fue el de aumentar la sensibilidad de detección molecular respecto a la técnica de tipificación ya puesta a punto en el laboratorio, que tiene como target al gen nuclear *hsp70* de bajo número de copias (5 a 10 copias por genoma). Las ventajas de utilizar regiones de los minicírculos del kinetoplasto como blanco para una PCR incluyen su alto número de copias (alrededor de 10.000 copias por parásito) y su naturaleza conservada, que permite el diseño de *primers* específicos para una amplia gama de especies de *Leishmania*. Esto facilitó la creación de un algoritmo que optimiza la detección (PCR kDNA) y la determinación de la especie infectante (nPCR HSP70) para una determinación rigurosa de las recomendaciones terapéuticas, el tratamiento y el seguimiento clínico a aplicar en cada paciente.

Para lograr este objetivo, se evaluaron las condiciones de ciclado y la composición de la mezcla de reacción de la PCR de manera de optimizar la sensibilidad y especificidad de amplificación del kDNA de *Leishmania* spp.. Se aseguró que el protocolo permitiera el diagnóstico diferencial respecto

de la enfermedad de Chagas y de distintas micosis que comparten área endémica y/o sintomatología. Por otra parte, se realizaron ensayos de sensibilidad analítica para las especies de *Leishmania* prevalentes en Argentina, demostrando que el protocolo tiene límites de detección más bajos y, por lo tanto, más sensibles que la PCR HSP70.

Para analizar su desempeño, el protocolo estandarizado fue evaluado en muestras de pacientes con sospecha de leishmaniasis mediante un análisis de precisión diagnóstica. La sensibilidad y especificidad del protocolo fueron del 66,6% y 78,9%, respectivamente. Aunque la sensibilidad obtenida fue considerable, no alcanzó un nivel muy elevado. Sin embargo, se demostró que la técnica es altamente específica para detectar *Leishmania*, con un valor predictivo positivo (VPP) del 80%. Por otro lado, se completó el algoritmo propuesto con la determinación de la especie infectante en las muestras positivas, identificando infecciones por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) mexicana*. Se demostró efectividad en la detección de especies no contempladas en la estandarización de la técnica, lo que enfatiza su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis en pacientes que viajan a diferentes regiones del mundo.

En conclusión, el protocolo estandarizado constituye una herramienta prometedora para lograr un diagnóstico sensible y específico de las leishmaniasis en la región, siendo además de fácil implementación en zonas endémicas con recursos limitados en el área de salud.

"Evaluation of molecular detection strategies for *Leishmania* spp."

Keywords: PROTOZOAN PARASITES, LEISHMANIASIS, *L. (L.) INFANTUM*, *L. (V.) BRAZILIENSIS*, DIAGNOSIS, PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), KINETOPLAST, kDNA MINICIRCLE, SENSITIVITY, SPECIFICITY, DIAGNOSIS AND SPECIES IDENTIFICATION ALGORITHM.

Abstract: Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites transmitted through the bites of infected sand flies. They are endemic in over 98 countries, predominantly affecting populations with limited resources in tropical and subtropical regions. These diseases can be asymptomatic or manifest as three main clinical syndromes (cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis) depending on the species of the parasite and its primary tropism in humans.

In recent years, reports of leishmaniasis have been increasing worldwide, mainly associated with the growing population mobility. To prevent the spread of cases to non-endemic areas, epidemiological strategies that include rapid and specific diagnosis must be implemented. In the context of this thesis, a diagnostic strategy based on PCR for the specific amplification of regions of *Leishmania* spp. kDNA minicircles was standardized. The main objective was to increase the sensitivity of molecular detection compared to the molecular typing technique already established

in the laboratory, which targets the nuclear *hsp70* gene with a low copy number (5 to 10 copies per genome).

The advantages of using kinetoplast minicircle regions as PCR targets include their high copy number (around 10,000 copies per parasite) and their conserved nature, allowing the design of specific primers for a wide range of *Leishmania* species. This facilitated the creation of an algorithm that optimizes detection (kDNA PCR) and the identification of the infecting species (nPCR HSP70) for a more rigorous determination of therapeutic recommendations, treatment, and clinical follow-up for each patient.

To achieve this goal, cycling conditions and PCR reaction mix composition were evaluated to optimize the sensitivity and specificity of the amplification of *Leishmania* spp. kDNA. The protocol was designed to allow differential diagnosis with Chagas disease and different mycoses that share endemic areas and/or symptomatology. Additionally, analytical sensitivity assays were performed for prevalent *Leishmania* species in Argentina, demonstrating that the protocol has lower detection limits and, therefore, is more sensitive than the HSP70 PCR.

To assess its performance, the standardized protocol was evaluated in samples from patients with suspected leishmaniasis through diagnostic precision analysis. The sensitivity and specificity of the protocol were 66,6% and 78,9%, respectively. While the sensitivity obtained was considerable, it did not reach a very high level. However, the technique proved to be highly specific for detecting *Leishmania*, with a positive predictive value (PPV) of 80%. Furthermore, the proposed algorithm was completed with the determination of the infecting species in positive samples, identifying infections caused by *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, and *L. (L.) mexicana*. The effectiveness in detecting species not covered in the technique standardization was demonstrated, emphasizing its utility in diagnosing leishmaniasis in patients traveling to different regions of the world.

In conclusion, the standardized protocol represents a promising tool for achieving sensitive and specific diagnosis of leishmaniasis in the region, and it is easily implementable in endemic areas with limited healthcare resources.