



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*, A PARTIR DE
MUESTRAS DE PACIENTES INFECTADOS CON LEISHMANIASIS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora guía

MD. PhD. Manuel Eduardo Baldeón Tixe

Autora

Erika Belen Muñoz Salazar

Año

2015

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

.....
Manuel Eduardo Baldeón Tixe

MD. PhD.

C.I. 1706483201

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

.....
Erika Belen Muñoz Salazar

C.I. 1722593793

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a cada uno de los miembros del CIT, especialmente al Dr. Manuel Baldeón y a la Ing. Stephanie Santander, gracias por todo el conocimiento compartido y la confianza brindada. A mis amigos, gracias por todas las veces que me dieron ánimos para continuar. A Javier, por todo el apoyo y comprensión. A mi mami y mis abuelitos, he llegado hasta aquí gracias a ustedes. Y a todas las personas que de una u otra forma formaron parte de este trabajo.

RESUMEN

La Leishmaniasis es una parasitosis causada por protozoarios del género *Leishmania*, que se manifiesta en forma cutánea, mucocutánea o visceral, según la especie del parásito. En el Ecuador se han reportado siete especies causantes únicamente de las formas cutánea y mucocutánea: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major-like*, *L. mexicana*, *L. naiffi* y *L. panamensis*. Para el diagnóstico e identificación del parásito se han desarrollado varias técnicas moleculares basadas en la PCR y secuenciación de diferentes genes. En la presente investigación se identificó *Leishmania* a nivel de especie en muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis, mediante la amplificación del gen codificante para el 18S rRNA y posterior amplificación y secuenciación del gen que codifica para el citocromo b. Se incluyó a 35 pacientes, reclutados en Santo Domingo (n=13), Pedro Vicente Maldonado (n=11) y el Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas (n=11). De los 13 primeros pacientes se obtuvieron únicamente muestras por aspirado de la lesión, destinadas a cultivo, pero estos presentaron contaminación y no fueron analizados por métodos moleculares. En los 22 pacientes restantes se recolectaron 2 muestras adicionales, una por raspado de la lesión y otra de sangre periférica. De estos pacientes, solo 5 fueron mujeres; 9 aún no habían empezado tratamiento con Glucantime® y 1 presentaba reactivación de una lesión previa luego de seis meses de haber terminado el tratamiento. La mayoría de las lesiones, localizadas en las extremidades superiores, fueron características de Leishmaniasis cutánea. 5 de los 22 pacientes tuvieron diagnóstico negativo por frotis; mientras que por la amplificación del gen codificante para el 18S rRNA, se obtuvieron dos resultados negativos, detectándose la presencia del parásito en 19 muestras de sangre y en 20 de raspado. Con el ADN de las muestras positivas se amplificó, por PCR o qPCR, y luego secuenció el gen del citocromo b, obteniéndose el amplicón de interés para 3 muestras, 2 de raspado y 1 de sangre. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y mediante Blast se identificó, con una identidad del 99% que las especies causantes de las lesiones en los pacientes eran *L. guyanensis*, *L. shawi*, y *L. naiffi*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which manifests in its cutaneous, mucocutaneous or visceral form, according to the specie of the parasite. In Ecuador has been reported seven species, responsible of causing only the cutaneous and mucocutaneous forms: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major-like*, *L. mexicana*, *L.* and *L. panamensis naiffi*. Various molecular techniques have been developed for the diagnosis and identification of the parasite, based on PCR and sequencing of different genes. In this research, *Leishmania* was identified up to the species level, in samples of patients infected with Leishmaniasis, by amplification of 18S rRNA gene and subsequent gene amplification and sequencing of cytochrome b gene. The study included 35 patients, recruited from Santo Domingo (n = 13), Pedro Vicente Maldonado (n = 11) and the “Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas” (n = 11). Of the first 13 patients there was obtained only samples of the aspirate of the lesion, intended to culture, but the culture media were contaminated and were not analyzed. In the remaining 22 patients, two additional samples, scrapings of injury and peripheral blood, was collected. Of these patients, only five were women; nine had not started treatment with Glucantime®, and one had reactivation of a previous injury after six months of finalizing the treatment. Most ulcerated lesions, located in the upper limbs, were typical of cutaneous leishmaniasis. Five of the 22 patients had negative diagnosis by smear; while for amplification of the 18S rRNA gene, two negative results were obtained, detecting the presence of the parasite in 19 blood samples and 20 of scraping. With the DNA of the positive samples, the cytochrome b gene was amplified, by PCR or qPCR, and then sequenced, giving the amplicon of interest for three samples, two of scraping and one of blood. The resulting sequences were analyzed, and by Blast, with 99% of identity, it was found that the species causing the patients' lesions were *L. guyanensis*, *L. shawi*, and *L. naiffi*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	1
Hipótesis.....	4
Justificación	4
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos	5
1. Marco Teórico	7
1.1. Leishmaniasis.....	7
1.1.1 Agente Causal	12
1.1.1.1 Clasificación Taxonómica	12
1.1.1.2 Características Moleculares	16
1.1.1.3 Ciclo biológico	17
1.1.2 La Leishmaniasis en el ser humano: Manifestaciones Clínicas.....	22
1.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)	22
1.1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	24
1.1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)	26
1.1.3 Tratamiento	27
1.1.4 Resistencia a los tratamientos.....	29
1.2 Métodos de Diagnóstico e Identificación.....	30
1.2.1 Métodos Directos	30
1.2.2 Métodos Indirectos	31
1.2.3 Técnicas Moleculares.....	32
1.2.3.1 Gen codificante de la subunidad menor 18S del RNA ribosomal	34
1.2.3.2 Gen codificante del citocromo b	35
2. Metodología.....	36
2.1. Toma de muestra.....	36
2.2. Transporte de las muestras	37

2.3. Cultivo de <i>Leishmania</i> a partir de úlceras de pacientes infectados	37
2.4. Extracción de ADN	38
2.5. Identificación de casos positivos mediante amplificación del gen 18S rRNA por PCR convencional	39
2.6 Identificación de la especie de <i>Leishmania</i> en casos positivos por PCR cuantitativa (qPCR), PCR convencional y secuenciación del gen que codifica para el citocromo b (cyt b).....	43
3. Resultados	45
3.1. Protocolo de extracción de ADN de <i>Leishmania</i> , a partir de muestras de úlceras de pacientes infectados.....	45
3.2. Protocolo para identificación de <i>Leishmania</i> a nivel de especie por PCR y secuenciación de ADN	48
3.3. Identificación molecular de especies de <i>Leishmania</i> en muestras de pacientes	52
3.4. Alineamientos y árboles filogenéticos para las diferentes especies de <i>Leishmania</i>	61
4. Discusión.....	63
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	66
REFERENCIAS.....	68
Anexos.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Situación de endemicidad de Leishmaniasis en el 2013	7
Figura 2. Número de casos de Leishmaniasis en el Ecuador, por provincia, hasta la semana epidemiológica 7 (SE) del 2015	8
Figura 3. Casos de Leishmaniasis reportados en Ecuador por Semana Epidemiológica, SE 1-7, 2015	9
Figura 4. Taxonomía del género Leishmania	14
Figura 5. Organización estructural de las formas biológicas del parásito.....	18
Figura 6. Vista esquemática de las fases de interacción entre el parásito y el interior de la hembra del mosquito	20
Figura 7. Vista esquemática de las fases de interacción entre el parásito y la célula del huésped vertebrado	21
Figura 8. Lesión característica de leishmaniasis cutánea	23
Figura 9. Alineamiento del gen que codifica para el citocromo b (cyt b) con primers de la Tabla 4	42
Figura 10. Esquema protocolo extracción DNA de Leishmania a partir de muestras de pacientes	47
Figura 11. Verificación presencia amplicón de interés (gen que codifica para el 18S rRNA)	55
Figura 12. Comparación métodos de diagnóstico: frotis de la lesión vs. amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA	57
Figura 13. Alineamientos con secuencias obtenidas.....	60
Figura 14. Árbol Filogenético de las especies de Leishmania según el gen del cyt b	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> encontradas en el ser humano	15
Tabla 2. Fármacos empleados para el tratamiento de Leishmaniasis.....	28
Tabla 3. Cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA	39
Tabla 4. Cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica para el citocromo b	41
Tabla 5. Condiciones de ciclado para amplificación por PCR convencional del gen que codifica para el 18S rRNA.....	48
Tabla 6. Condiciones de ciclado para amplificación por qPCR del gen que codifica para el citocromo b	49
Tabla 7. Condiciones de ciclado para amplificación por PCR del gen que codifica para el citocromo b	50
Tabla 8. Condiciones de ciclado de PCR de secuenciación	50
Tabla 9. Números de acceso de secuencias del gen que codifica para el citocromo b disponibles en el Gen Bank	51
Tabla 10. Resultados amplificación del gen que codifica para el cyt b.....	58
Tabla 11. Resultados de la secuenciación.....	60

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La Leishmaniasis es una parasitosis de distribución mundial, causada por algunas especies de protozoarios del orden Kinetoplástida y del género *Leishmania* (OMS, 2010). Es transmitida por la picadura de las hembras de los mosquitos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (CFSPH, 2009). El ciclo vital de *Leishmania* spp. se mantiene entre animales silvestres, el vector, y los seres humanos. El fenómeno de urbanización que se ha experimentado en las últimas décadas, ha provocado que el ser humano esté en mayor contacto con el parásito y se convierta en huésped reservorio accidental (OMS, 2010), al igual que ciertos mamíferos domésticos y peri domésticos como el perro (*Cannis familiaris*), el conejo de campo (*Sylvilagus brasiliensis*) o la rata (*Ratus rattus*) (ACI, 2010).

La *Leishmania*, al pertenecer al orden de Kinetoplástida, cuenta con un organelo llamado kinetoplasto, formado por cientos de moléculas de DNA concatenadas entre sí denominados maxicírculos y minicírculos (Nozcua, 2011). Los maxicírculos codifican genes encargados de la transcripción del RNA, mientras que los minicírculos codifican secuencias guía para la transcripción del RNA (Weirather *et al.*, 2011). Las distintas especies de *Leishmanias* son genéticamente muy similares, pero difieren tanto en los maxicírculos como en los minicírculos (Cárdenas *et al.*, 2012).

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Viannia* que se encuentra presente únicamente en el Nuevo Mundo y *Leishmania* que se halla presente tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo (CFSPH, 2009). La principal diferencia entre los dos subgéneros radica en su lugar de desarrollo dentro del tracto digestivo del vector; el desarrollo de las especies del subgénero *Viannia* es suprapilórico mientras que el de las del subgénero *Leishmania* es peripilórico (OMS, 2010).

Dependiendo de la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del

hospedador, se pueden presentar tres formas clínicas de esta parasitosis. La Leishmaniasis cutánea (LC), es la forma más frecuente y se caracteriza por la formación de una o varias lesiones en la piel, éstas pueden variar entre pápulas, úlceras o incluso lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas. Las principales especies causantes de Leishmaniasis cutánea son *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* (CFSPH, 2009).

La segunda forma clínica de la enfermedad es la Leishmaniasis mucocutánea (LM); la OMS (2010) estima que entre el 3 y el 5% de los casos de Leishmaniasis Cutánea pueden reincidir en casos de LM. Esta reincidencia se debe a que los parásitos localizados en la piel pueden llegar a propagarse por los vasos linfáticos hasta las mucosas, principalmente de las vías aéreas superiores, como consecuencia de un tratamiento inicial no exitoso o la falta de este (ACI, 2010). Estas lesiones pueden llegar a destruir el tabique nasal, desprender la punta de la nariz o incluso causar daños en la úvula y el paladar (CFSPH, 2009). La falta de un diagnóstico adecuado puede ocasionar complicaciones progresivas y deformantes (OMS, 2010).

La tercera forma clínica es la Leishmaniasis visceral (LV), la cual se caracteriza por la migración de parásitos al hígado, médula ósea y bazo del hospedador. Esta forma clínica resulta mortal si no se recibe el tratamiento oportuno (MinSaludCol, 2010).

La evolución de la enfermedad y su forma clínica están directamente relacionadas con la especie de *Leishmania*, por este motivo, su identificación es un factor determinante en las etapas de diagnóstico, tratamiento y manejo epidemiológico de esta parasitosis (Montalvo, 2011). El método común de diagnóstico se realiza mediante frotis de una muestra de la lesión con coloración de Giemsa o mediante cultivos de muestras de pacientes sospechosos de Leishmaniasis (Canese, Domingo y Oddone, 2011). La principal desventaja de estas pruebas directas es que tanto la experticia de las personas que toman y examinan las muestras como la carga parasitaria y la

contaminación bacteriana de la lesión afectan la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico (Córdova et al, 2011).

Para la detección de Leishmaniasis se emplean también pruebas indirectas con el fin de identificar anticuerpos específicos contra el parásito (MSaludCol, 2010). El método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) mide anticuerpos contra antígenos de *Leishmania* mediante una reacción *in-vitro*; la presencia de anticuerpos no significa un caso positivo, se debe tomar en cuenta además la sintomatología clínica y la posibilidad de reacciones cruzadas (Canese et al, 2011). La Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) es una prueba cutánea empleada como prueba complementaria mas no como prueba de diagnóstico ya que puede presentar falsos negativos y reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas (Rojas et al, 2012). Otros métodos empleados son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la aglutinación directa (DAT por sus siglas en inglés: *direct agglutination test*) y la prueba de hemaglutinación indirecta; cuya sensibilidad y especificidad es aproximadamente del 70% para Leishmaniasis cutánea, del 80% para Leishmaniasis mucocutánea y del 90% para Leishmaniasis visceral (Canese et al, 2011).

Actualmente, para el diagnóstico, diferenciación e identificación de especies se ha empleado métodos moleculares basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Chena et al. 2012). Algunos de estos nuevos métodos son PCR en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés: *quantitative PCR*), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR-miniexón, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés: *Random Amplified Polymorphic DNA*), entre otros (Rodríguez et al, 2011).

Hipótesis

El protocolo basado en técnicas moleculares permite diagnosticar e identificar la infección por *Leishmania* a nivel de especie en pacientes infectados con este parásito.

Alcance

El alcance del presente trabajo de titulación es identificar las especies de *Leishmania* a partir de muestras de pacientes infectados por el parásito, obtenidas en las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

La identificación se realizará mediante PCR y PCR en tiempo real (qPCR); empleando primers específicos que amplificarán una región del gen que codifica para 18S rRNA y una región del gen del citocromo b (cyt b), localizada en los maxicírculos.

Los amplicones correspondientes a las amplificaciones del gen del cyt b serán secuenciados y posteriormente se procederá a alinear estas secuencias con las reportadas para estos genes y depositadas en el GenBank.

Justificación

En el país se emplea como técnica de diagnóstico en las unidades de salud, únicamente, el frotis de la lesión coloreado con Giemsa, mas no se realiza diagnóstico ni identificación a nivel de especie mediante técnicas moleculares (Calvopiña et al, 2012). La identificación oportuna de la especie de *Leishmania* permite la selección del tratamiento más adecuado y de las medidas de control requeridas, además de mantener un manejo epidemiológico eficiente (Montalvo, 2011).

Mediante la tipificación del parásito a nivel de especie se permitirá la creación de una base de información que favorezca, eventualmente, la obtención de antígenos locales útiles para la generación de vacunas contra esta grave enfermedad.

Objetivo General

Identificar *Leishmania* a nivel de especie en muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis, mediante técnicas moleculares y secuenciación de ADN.

Objetivos específicos

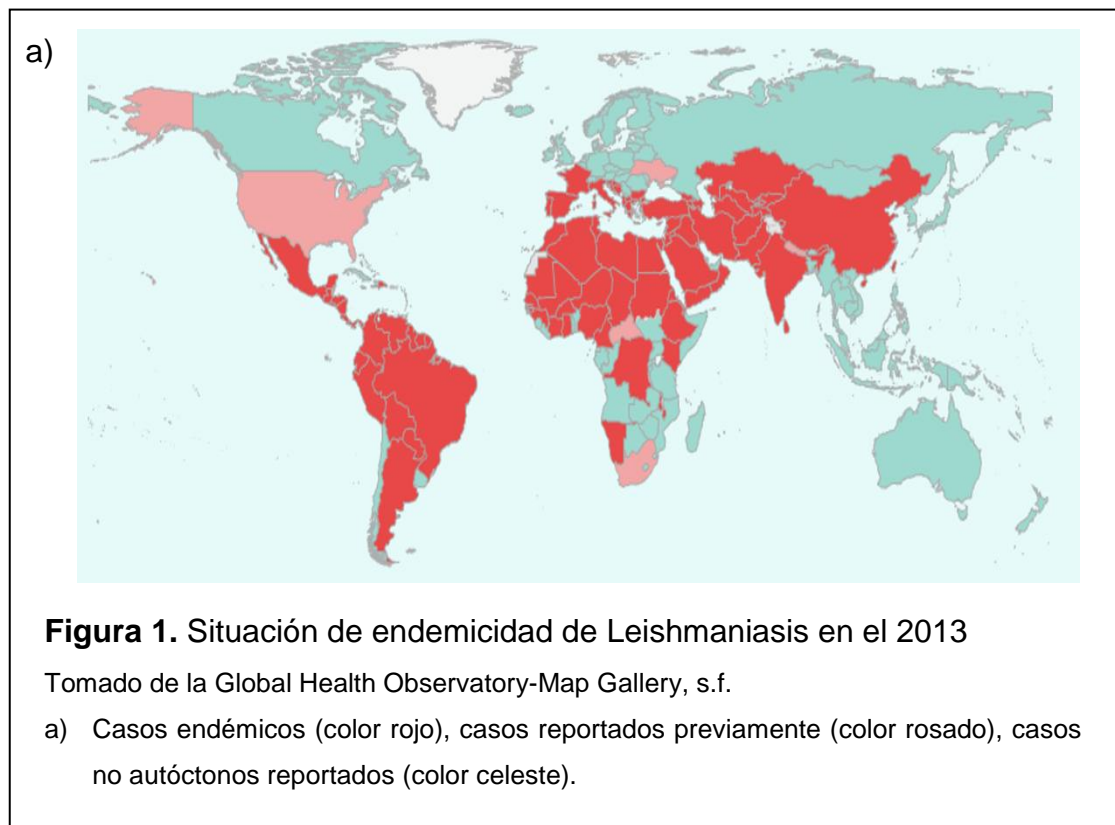
- I Desarrollar un protocolo estandarizado de extracción de ADN que permita la obtención de material genético de *Leishmania*, a una concentración apta, a partir de muestras de úlceras de pacientes infectados
- II A partir de las secuencias de los genes que codifican para el 18S rRNA y el citocromo b (cyt b) de *Leishmania* disponibles en GenBank, se realizarán alineamientos y árboles filogenéticos para las diferentes especies de *Leishmania*.
- III Desarrollar un protocolo para la identificación de *Leishmania* a nivel de especie mediante técnicas de PCR y secuenciación de ADN.
- IV Probar la técnica de identificación molecular en muestras de pacientes diagnosticados por métodos convencionales.

Capítulo I

1. Marco Teórico

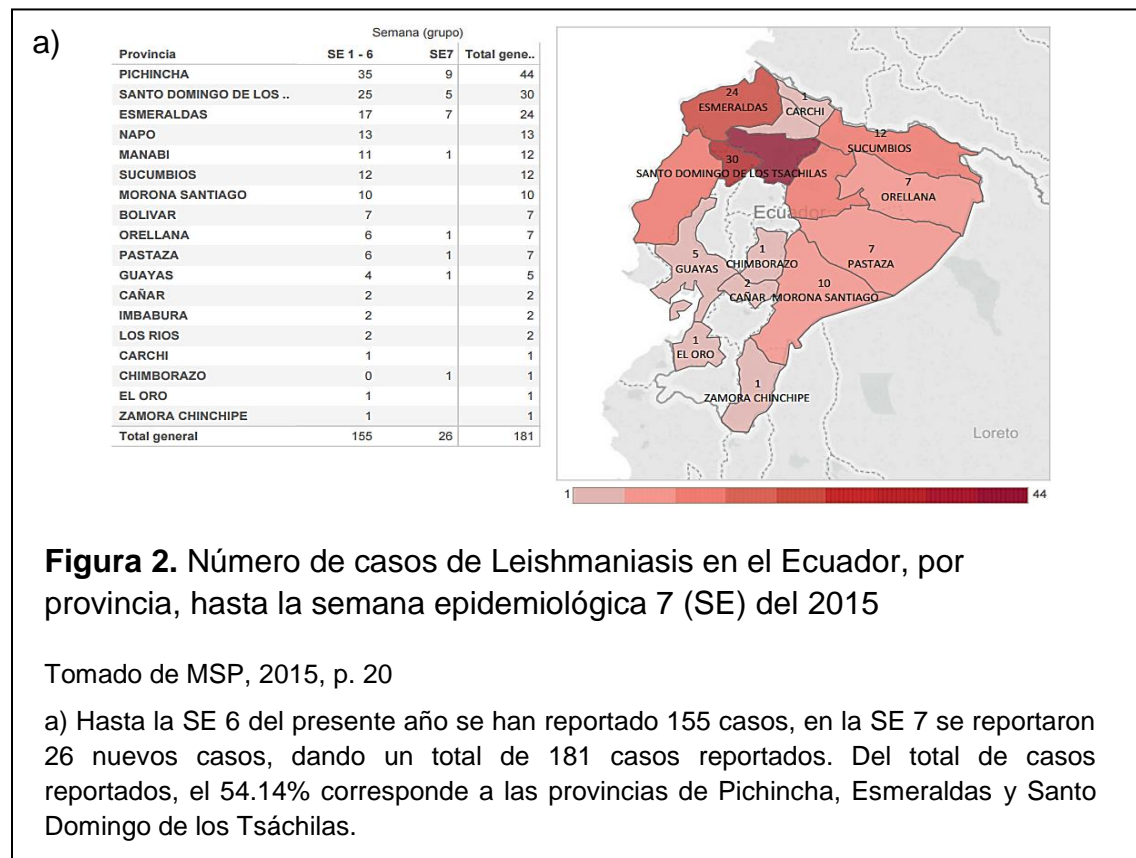
1.1. Leishmaniasis

La Leishmaniasis es un conjunto de manifestaciones clínicas causadas por diferentes agentes etiológicos, todos ellos protozoarios del género *Leishmania* (Fernández, 2012). Esta parasitosis es de amplia distribución, y se encuentra catalogada, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo (OMS, 2010). Esta enfermedad es endémica en 98 países, de los cinco continentes (Alvar *et al.*, 2012). Se ha convertido en un importante problema de salud pública, con un promedio de 2 millones de nuevos casos al año, más de 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad, y 2.35 millones de años de vida perdidos por discapacidad (AVAD) (Reveiz, Maia-Elkhoury, Nicholls, Sierra, y Yadon; 2013).



En las Américas, la Leishmaniasis es endémica en 21 países, desde México hasta Argentina; cada año se reporta un promedio de 67 mil casos y se estima que existen aproximadamente 41 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (Revez *et al.*, 2013). Es importante tener en cuenta que los casos de Leishmaniasis, al igual que en otras enfermedades tropicales desatendidas (NTDs por sus siglas en inglés *neglected tropical diseases*), se concentran en áreas rurales remotas, lo que trae como consecuencia que sea objeto de subregistro y a su vez, dificulta la extrapolación de datos oficiales (Alvar *et al.*, 2012).

En el Ecuador, el organismo encargado de reportar los casos de Leishmaniasis es el Ministerio de Salud Pública (MSP), el cual publica la información generada a partir de los distintos subsistemas de vigilancia en gacetas epidemiológicas semanales (MSP, 2015). Se ha reportado un promedio de 1500 casos anuales, en 23 de las 24 provincias del país, concentrándose principalmente en las zonas rurales de las tres regiones del Ecuador (OPS/OMS, 2013).



El MSP publica sus datos durante la Semana Epidemiológica (SE). Las semanas epidemiológicas permiten comparar distintos eventos epidemiológicos sucedidos en un año con los sucedidos en años previos, o entre países, ya que es una metodología aceptada a nivel mundial. Las SE comienzan el domingo y terminan el sábado, y se las comienza a contar cada año luego del primer sábado del mes de enero (OPS, 2011).

Como se indica en la Figura 3, hasta la SE 7 del presente año, existe un total de 181 casos reportados por parte del MSP. Como se puede observar, se han producido un promedio de 25 casos cada semana, siendo el género masculino el más afectado por esta enfermedad principalmente, los hombres entre 20 y 49 años de edad (MSP, 2015).

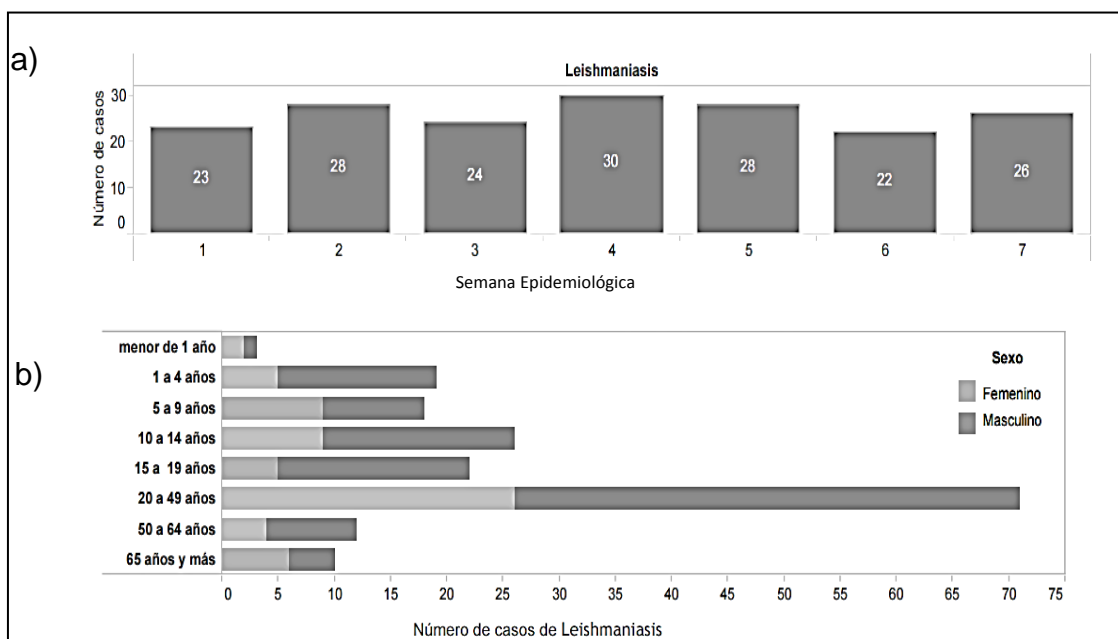


Figura 3. Casos de Leishmaniasis reportados en Ecuador por Semana Epidemiológica, SE 1-7, 2015

Tomado de MSP, 2015, p.20

a) Tendencia por Semana Epidemiológica. Hasta la SE 7, se han reportado un total de 181 casos, los cuales se han dividido según la SE en la que fueron reportados

b) Número de casos de Leishmaniasis, por grupos de edad y sexo. Los 181 casos reportados se han dividido según la edad y sexo del paciente. Las barras grises corresponden a los pacientes de género femenino, mientras que las barras negras corresponden a los pacientes de género masculino.

La Leishmaniasis es catalogada como una parasitosis de transmisión vectorial ya que su principal vector son las hembras de los mosquitos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Fernández, 2012). Sin embargo, se ha reportado también transmisión congénita, por transfusiones sanguíneas y por jeringuillas en consumidores de drogas intravenosas; no obstante, estas formas de transmisión son más inusuales (OMS, 2010).

De manera general, se considera que para una determinada especie de *Leishmania* existe un único huésped reservorio principal en una zona en particular; aunque, se ha determinado que en esa misma zona pueden infectarse otros mamíferos, convirtiéndose en huéspedes incidentales o menores (OMS, 2010).

Dentro de los animales salvajes que sirven como huéspedes reservorios, se encuentran principalmente los roedores y cánidos salvajes. En cuanto a los animales domésticos, se considera que la especie más importante en la epidemiología de esta enfermedad es el perro (Dawit, Girma y Simenew; 2013). Para dos especies de *Leishmania*, *L. donovani* y *L. tropica*, el principal huésped reservorio es el ser humano (OMS, 2010).

Dependiendo de la fuente de la infección humana, se puede dividir a las Leishmaniasis en dos categorías, zoonóticas y antroponóticas (CFSPH, 2009). Los huéspedes reservorios de las zoonóticas son animales salvajes, mientras que en las antroponóticas es el ser humano; sin embargo, se han reportado casos en los que el ser humano ha sido huésped ocasional de ciertas especies de *Leishmania* catalogadas típicamente como zoonóticas (OMS, 2010).

El incremento en la incidencia a nivel mundial de esta parasitosis se atribuye principalmente a factores causados por el ser humano, principalmente la migración masiva, la urbanización, y la deforestación; esto genera cambios en el ecosistema causando a su vez una alteración en la densidad poblacional del vector y por ende una mayor exposición del ser humano al vector infectado (Dawit *et al.*, 2013).

Los brotes de Leishmaniasis se concentran principalmente en las áreas más pobres de los países en vías de desarrollo (Fernández, 2012). La pobreza se encuentra directamente relacionada con ésta enfermedad de muchas formas; las malas condiciones de las viviendas y las condiciones sanitarias inadecuadas, brindan más sitios de criadero para los vectores y facilitan su contacto con los seres humanos (Dawit *et al.*, 2013).

En los países andinos, la falta de terrenos cultivables en las tierras altas, las sequías y los conflictos bélicos, han provocado desplazamientos masivos de personas hacia regiones donde la Leishmaniasis es endémica, principalmente hacia las selvas de la cuenca amazónica (OMS, 2010)

La transmisión de la Leishmaniasis es un complejo sistema en el que participa el ser humano, el flebótomo, el parásito y, en ciertas ocasiones, un reservorio animal. Por esta razón los programas de control para esta enfermedad debe enfocarse hacia varios frentes (OMS, 2010). Una medida de control eficaz es el control de los vectores, principalmente en las áreas domésticas (Wilson, Dhiman, Kitron, Scott, van den Berg, y Lindsay; 2014). En el Ecuador, se realiza el control físico y químico del mosquito; las medidas físicas consisten en la deforestación de 30 a 50 metros a la redonda de las casas, y la limpieza de malezas, piedras y troncos alrededor de los hogares. Las medidas químicas se realizan en aquellas viviendas donde se han confirmado casos de Leishmaniasis; y consisten en rociar insecticida de acción residual en un perímetro de 30 a 50 metros de la vivienda y especialmente en áreas peridomésticas como los criaderos de animales y las letrinas sanitarias (MSP, 2013).

Otras medidas de prevención contra la Leishmaniasis incluyen el uso de repelentes, insecticidas de acción residual para el interior de las viviendas, y toldos impregnados con insecticida (Bates, *et al.*, 2015). El MSP (2013), recomienda como medidas personales y comunitarias, (especialmente a las personas en riesgo como son madereros, ganaderos, extractores de oro, agricultores y turistas en las zonas endémicas), el uso de ropa delgada de manga larga y repelentes; y evitar el ingreso de mosquitos a las habitaciones

empleando telas y mallas finas en puertas y ventanas.

1.1.1 Agente Causal

El agente causal de la Leishmaniasis es un parásito protozoario perteneciente al género *Leishmania*, a la familia *Trypanosomatidae* y al orden Kinetoplastida (Von Stebut, 2015). Es importante mencionar que esta familia está compuesta también por protozoarios del género *Trypanosoma* como por ejemplo *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Minaya, Vargas, Monteza, Purisca, y Delgado; 2014). Se puede clasificar al género *Leishmania* en dos grandes grupo, las viejas especies que se localizan en Europa, Asia y África, y las nuevas especies que se localizan en el continente americano (Dawit *et al.*, 2013).

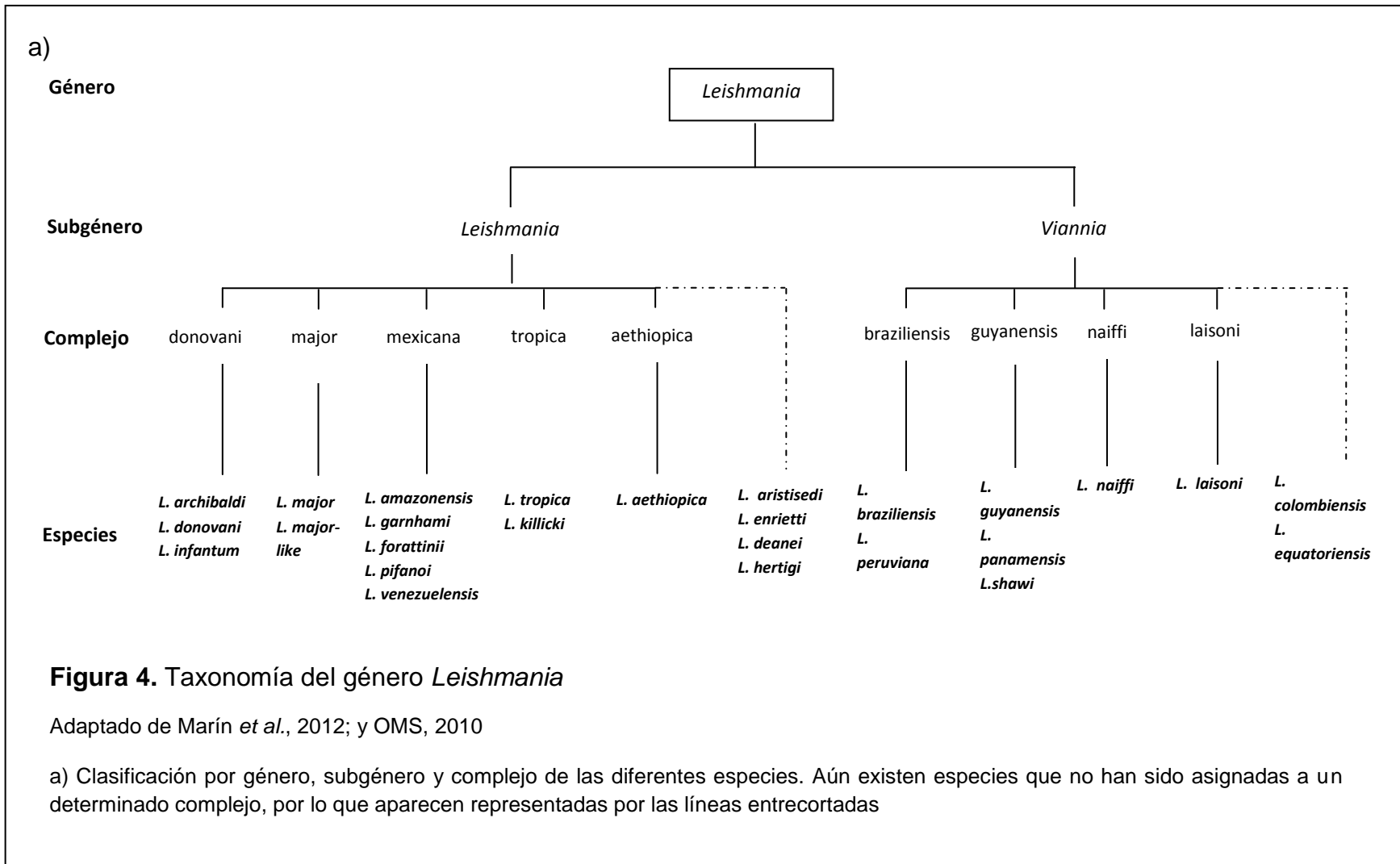
1.1.1.1 Clasificación Taxonómica

Actualmente, la clasificación oficial aceptada a nivel mundial para el género de este parásito, se basa en la taxonomía establecida en los años 90, para la cual se emplearon cepas de referencia e isoenzimas (OMS, 2010). Se han identificado aproximadamente 30 especies de *Leishmania*, las cuales no son diferenciables morfológicamente pero si mediante el análisis isoenzimático, el uso de anticuerpos monoclonales y de técnicas moleculares (Shapiro, 2012).

En función de su desarrollo en el intestino del flebótomo, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros. El subgénero *Leishmania* presenta únicamente desarrollo suprapilórico, es decir, solamente crece en la porción del tubo digestivo anterior al píloro, en donde se une el intestino posterior con el intestino medio. El subgénero *Viannia* presenta desarrollo peripilórico, lo que significa que puede crecer tanto en el intestino medio como en el intestino posterior (OMS, 2010). Esta división se asocia a su vez con la distribución geográfica puesto que las especies del subgénero *Leishmania* se encuentran presentes tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, especialmente en los Paleotrópicos; mientras que las especies del subgénero *Viannia* únicamente se encuentran en los Neotrópicos (Marcili, *et al.*, 2014).

En la Figura 4, se puede observar la clasificación taxonómica de las especies del género *Leishmania*. Como se puede observar, los subgéneros a su vez se subdividen en complejos, en los cuales se agrupan diferentes especies (Marín *et al.*, 2012).

En el Informe Técnico de Control de las Leishmaniasis, la OMS (2010, p 7), determinó la existencia de 20 especies de *Leishmania*, reportadas como las causantes de la enfermedad en el ser humano. En la Tabla 1 se registran estas especies, clasificadas en función de su distribución geográfica, subgénero y tropismo principal. El informe indica, que en el Ecuador, las principales especies circundantes son *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major-like*, *L. mexicana*, y *L. panamensis*. Esta información fue corroborada por Calvopiña y colaboradores, 2006, quienes realizaron la identificación de especie en muestras de pacientes, mediante electroforesis y tinción de isoenzimas. Para esta identificación, los autores emplearon 11 enzimas; placas de acetato de celulosa como matriz porosa; y 6 cepas de referencia de la OMS para la comparación del perfil enzimático.



En el año 2013, Kato, Calvopiña, Criollo y Hashiguchi, reportaron el primer caso de LC en el Ecuador por *L. naiffi*. Esta identificación se realizó mediante una variante de la PCR, la PCR anidada o nested PCR, cuya secuencia blanco fue el gen del citocromo b. Los productos obtenidos fueron clonados en el sistema pGEM-T Easy Vector y secuenciados posteriormente. Al realizar el análisis filogenético se determinó que era el primer caso reportado de LC por *L. naiffi*, en el Ecuador.

Tabla 1. Especies de *Leishmania* encontradas en el ser humano

	<i>L. (Leishmania)</i>		<i>L. (Viannia)</i>	
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^A <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^A <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^A <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^B	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
	Visceral	Dérmico		Mucoso
	Tropismo Principal			

Tomado de OMS, 2010, p.7

Nota: ^A Estatus de especie en debate; ^B Posición taxonómica en debate

1.1.1.2 Características Moleculares

Los protozoarios pertenecientes al orden Kinetoplastida, como es la *Leishmania* spp., cuentan con una estructura particular llamada kinetoplasto, en la cual está contenido el ADN de su única mitocondria(kDNA), que corresponde a cerca del 20% del ADN total del parásito (Weirather *et al.*, 2011). El kinetoplasto se encuentra formado por dos tipos de moléculas de ADN circular, las cuales se encuentran concatenadas entre sí, y reciben el nombre de maxicírculos y minicírculos (Nocua, Ramírez, Requena y Puerta; 2011).

Cada parásito, contiene en su kDNA cerca de 10 mil minicírculos; cada minicírculo tiene un tamaño aproximado de 800 pares de bases (pb), y está compuesto por una región altamente conservada de 200 pb y una región variable de alrededor de 600 pb (Hernández-Montes, González, Martínez, y Monroy-Ostria; 2012). Los minicírculos poseen un origen de replicación conservado, el cual codifica para secuencias de RNA guía (gRNA), involucrados en la edición, mediante inserción o eliminación de residuos de uridinas, de la información codificada por los maxicírculos (Weirather *et al.*, 2011). A pesar de su pequeño tamaño y alto número de copias, no son fáciles de alinear debido a la elevada variabilidad que presenta su composición nucleotídica (Rodrigues *et al.*, 2013).

En el kDNA se encuentran entre 20 y 50 maxicírculos, cuyo tamaño varía entre 20 y 38 kilobases (kb) (Nocua *et al.*, 2011). Los maxicírculos codifican para productos de genes mitocondriales típicos como RNA ribosomales (rRNA) o subunidades de los complejos de la cadena respiratoria; pero esta información en la mayoría de las veces se encuentra encriptada (Lukes *et al.*, 2002). Es aquí cuando intervienen los gRNA codificados por los minicírculos, editando la información encriptada y generando RNAs mensajeros (mRNA) funcionales (Nocua *et al.*, 2011).

El número de cromosomas varía entre especies; por ejemplo, las especies del complejo donovani, major, tropica y aethiopica cuentan con 36 cromosomas, mientras que debido a la fusión de los cromosomas 20 y 34, el genoma de las

especies del complejo *braziliensis* cuenta únicamente con 35 cromosomas (Peacock *et al.*, 2007)(Sterkers *et al.*, 2012). De igual manera, el genoma de las especies pertenecientes al complejo mexicana, debido a la fusión entre los cromosomas 8 y 29 y los cromosomas 20 y 36, está compuesto únicamente por 34 cromosomas (Rogers *et al.*, 2011).

Análisis genómicos comparativos entre las diferentes especies de *Leishmania*, han demostrado que existe una elevada sintonía entre ellos, existiendo un pequeño número de genes propios de cada especie (Smith, Peacock y Cruz; 2007). La función de las proteínas codificadas por estos genes es aún desconocida, pero se ha planteado la hipótesis que su función se encuentra asociada con el tropismo propio de cada especie y la patología de las diferentes formas clínicas de la Leishmaniasis (Rogers *et al.*, 2011).

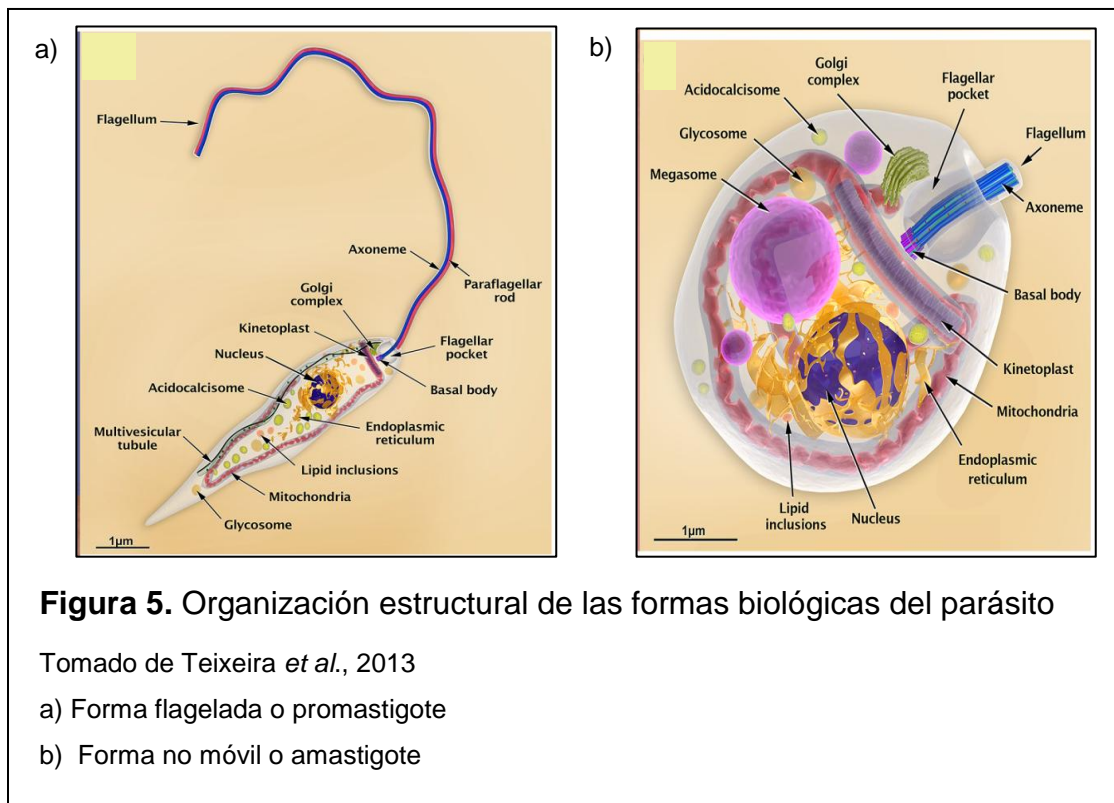
Al realizar un análisis comparativo entre el genoma completo de tres especies, *L. braziliensis*, *L. infantum*, y *L. major*, se determinó que únicamente 200, de un total aproximado de 8300 genes, se encuentran distribuidos de diferente manera entre estas especies; y que *L. braziliensis* posee 47 genes específicos de su especie, mientras que *L. infantum* posee 27 y *L. major* solamente cuenta con 5 de estos genes (Smith *et al.*, 2007).

Con respecto al número de copias de cada uno de los cromosomas, se ha determinado que *Leishmania* spp. presenta aneuploidía, no solo entre especies sino entre cepas de una misma especie (Downing *et al.*, 2011). En el 2012, Sterkers y colaboradores concluyeron que el número de copias de un gen en una especie no es estable, sino que éste varía como consecuencia de las modificaciones ambientales en las que se desarrolla el parásito.

1.1.1.3 Ciclo biológico

Los protozoarios del género *Leishmania* pueden adoptar dos formas parasitarias, morfológicamente diferentes, según la fase del ciclo biológico en que se encuentren (Hernández, 2012). Cuando el parásito se encuentra en el interior de las células del sistema fagocítico mononuclear del huésped reservorio, adopta la forma de amastigote (Fig. 3 (b)). Esta forma se caracteriza

por ser redondeada, de entre 3 y 5 μm de longitud y hasta 2.5 μm de ancho, y carecer de un flagelo móvil desarrollado. Una vez que el parásito llega al intestino del flebótomo, adquiere la forma de promastigote (Fig. 3 (a)); en esta fase no invade las células del vector sino que permanece en el lumen, alcanzando hasta 30 μm de longitud y 3 μm de ancho. Es fusiforme y desarrolla un flagelo que permite su movilidad (Montalvo, 2011).



Leishmania sp. es transmitida por medio del mosquito de arena, pequeños dípteros de la familia *Psychosidae*, subfamilia *Phlebotominae*, y de dos distintos géneros, *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Es importante mencionar que únicamente las hembras de estos flebótomos son hematófagas, puesto que requiere de sangre para completar su ciclo de oviposición (Marín *et al.*, 2012).

El ciclo empieza cuando el mosquito pica al mamífero infectado, para alimentarse de su sangre, como puede observarse en la Figura 6. El desarrollo del parásito se da en el intestino del vector, 24 a 36 horas después de la picadura (Hernández, 2012). Los amastigotes se agrupan en “células nido”, las

cuales se encuentran rodeadas por una matriz que las protege de las enzimas digestivas. Los amastigotes se transforman a una forma replicativa pero no infectiva de promastigote, conocida como promastigote procíclico (Teixeira et al., 2013).

Luego de unos días, la tasa de replicación disminuye y la forma de lo promastigotes empieza a elongarse, transformándose en promastigotes nectomónados. Esta forma migratoria del parásito le permite romper la matriz y ser liberados al epitelio intestinal, donde empiezan a reproducirse por fisión binaria y se adhieren al epitelio. La replicación decrece y migran hasta la válvula estomodeal; aquí se da una nueva transformación, a promastigotes leptomónados, adquiriendo una forma más pequeña pero nuevamente replicativa (Bates, 2007). Esta nueva forma de promastigote es responsable de la producción de PSG (*promastigote secretory gel*), que causa dificultades en el mosquito durante la ingesta de sangre, evitando que obtenga la cantidad completa requerida (Sainz, 2013).

Finalmente, se transforman en promastigotes metacíclicos, la forma infectiva del parásito en el vector. Desde que los amastigotes ingresan al mosquito hasta que se da esta última transformación transcurren entre 6 y 9 días, dependiendo de la especie de *Leishmania*, y el proceso tiene el nombre de metaciclogénesis (Marín et al., 2012).

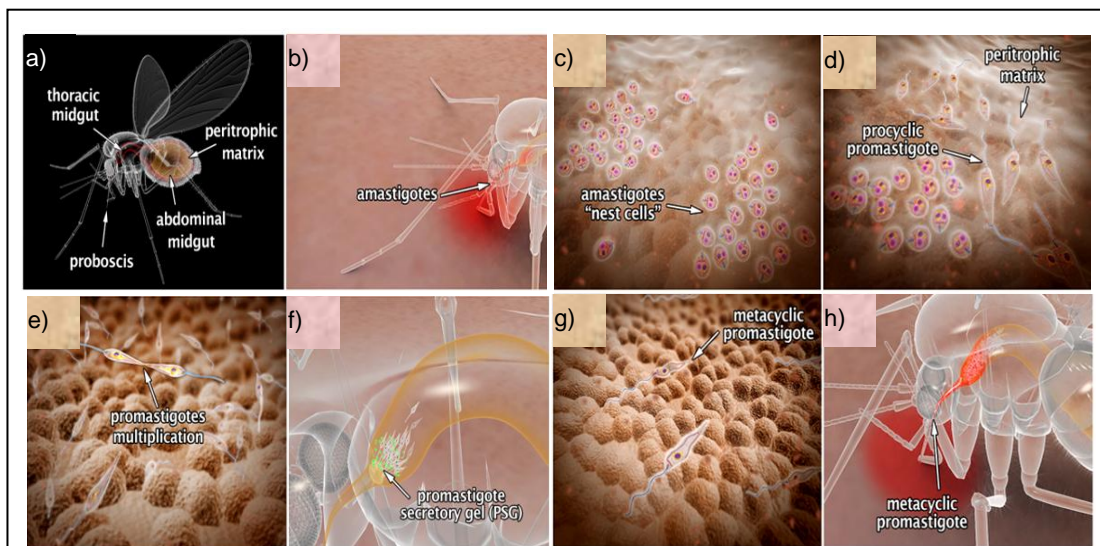


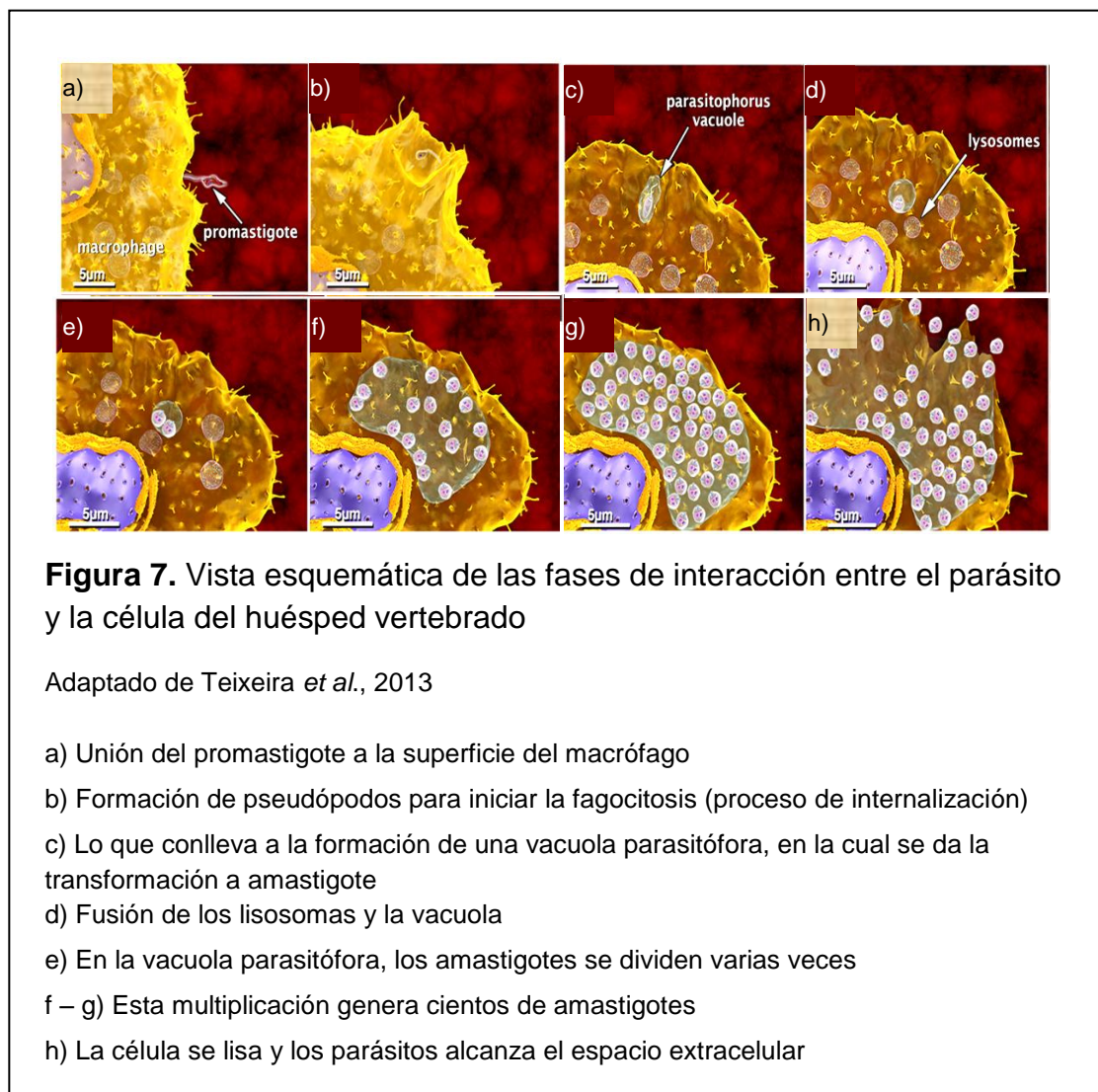
Figura 6. Vista esquemática de las fases de interacción entre el parásito y el interior de la hembra del mosquito

Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013

- a) Vista esquemática de tracto digestivo de la hembra del mosquito
- b) Durante la picadura, el mosquito ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes en los tejidos y sangre del reservorio vertebrado
- c) Amastigotes en "células nido" en el interior del intestino del vector
- d) Transformación de amastigotes en promastigotes procíclicos
- e) Multiplicación y adhesión de los promastigotes al epitelio intestinal
- f) Los parásitos migran hacia el intestino medio anterior, reanudan la replicación y empiezan a producir gel secretor de promastigotes (PSG)
- g) Transformación en promastigotes metacíclicos infectivos
- h) Promastigotes metacíclicos infectados a un nuevo huésped vertebrado mediante regurgitación durante la picadura

Los promastigotes metacíclicos ubicados en la válvula estomodeal, causan un daño en ésta, lo que facilita el reflujó, ocasionando que durante varias picaduras, el mosquito libere promastigotes en el tejido de diferentes huéspedes vertebrados (Teixeira *et al.*, 2013). Y como el PSG causa problemas para obtener la cantidad de sangre requerida, el mosquito picará aun mayor número de vertebrados y en menor cantidad de tiempo que un mosquito no infectado, por lo que la posibilidad de la transmisión se incrementa (Sainz, 2013).

Cuando el mosquito infectado, pica al huésped vertebrado, introduce hasta 200 promastigotes metacíclicos, vía regurgitación. Los polimorfonucleares logran destruir a unos cuantos, pero los que logran sobrevivir son fagocitados por los macrófagos al adherirse a sus receptores de membrana (Fig. 7) (Hernández, 2012). Los parásitos son internalizados en una estructura llamada vacuola parasitófora, donde se transforman en amastigotes. Esta vacuola se fusiona con los lisosomas de la célula hospedadora y los amastigotes empiezan a multiplicarse. La multiplicación intensa provoca la ruptura de la membrana celular del macrófago, liberando a los amastigotes en el tejido. Una vez liberados, los amastigotes pueden seguir infectando nuevos macrófagos o ser ingeridos por otro mosquito y de esta manera iniciar nuevamente el ciclo (Teixeira et al., 2013).



1.1.2 La Leishmaniasis en el ser humano: Manifestaciones Clínicas

La Leishmaniasis es una parasitosis que puede presentar tres formas clínicas en el ser humano. Tanto la evolución de la enfermedad como la forma clínica se encuentran directamente relacionadas con la especie de *Leishmania* y el estado inmunológico del paciente (Von Stebut, 2015).

1.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

Esta forma clínica de la enfermedad es endémica en las regiones de los subtrópicos; generalmente, la enfermedad se presenta como una lesión localizada en el área de la picadura del flebótomo (Hartley, Drexler, Ronet, Beverley, y Fasel; 2014). En América, existen diversos focos de transmisión de LC, ecológicamente diferentes entre sí y con varias especies de *Leishmania* involucradas; afectan a casi todo el continente ya que están presentes en prácticamente todos los países, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (OMS, 2010).

De todos los casos de LC reportados a nivel mundial, el 90% proviene de Algeria, Afghanistan, Arabia Saudí, Brazil, Iran, Pakistan, Perú, y Siria (Saab, El Hage, Charafeddine, Habib, y Khalifeh; 2015).

Luego de semanas o incluso meses, aparece un nódulo en el lugar de la picadura, que va creciendo durante las siguientes semanas hasta adquirir la forma de la lesión más característica de la LC, una úlcera de bordes elevados (Von Stebut, 2015). Esta úlcera característica se observa en la Figura 8, la fotografía fue tomada en el Centro de Salud N° 17D12 - Pedro Vicente Maldonado, a un paciente de género femenino, de 25 años de edad, previo al inicio del tratamiento. La lesión tiene aproximadamente un mes de evolución y presenta bordes bien definidos, sobreelevados e hiperpigmentados.

a)



Figura 8. Lesión característica de leishmaniasis cutánea

a) Paciente de género femenino de 25 años de edad. En su brazo izquierdo presenta una única úlcera de aproximadamente 2.5 cm, con bordes sobreelevados e hiperpigmentados.

Las lesiones pueden manifestarse en formas variadas, desde úlceras que se curan espontáneamente, nódulos granulomatosos, e incluso grandes heridas eritematosas. Las complicaciones pueden durar años, causando una cicatriz hiperpigmentada permanente y un importante daño en el tejido (Hartley, *et al.*; 2014). Se ha logrado identificar que dos especies del subgénero *Leishmania*, *L. major* y *L. mexicana*, son causantes de lesiones que curan espontáneamente luego de pocos meses (Mouri *et al.*, 2014).

En la mayoría de los casos la infección es asintomática, lo que ocasiona que el parásito esté presente en el ser humano por un prolongado periodo de tiempo (MPS, 2010). Esta presencia confiere inmunidad a la superinfección en el hospedador, pero a su vez eleva las probabilidades de una reactivación de las lesiones, esta vez con un cuadro sintomático más grave (Hartley, *et al.*, 2014).

Se han identificado tres variantes en la LC, la Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la Leishmaniasis cutánea recidivante, y la Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Canese, Domingo y Oddone, 2011). La más común es la LCL, en la

cual, la lesión inicia como un eritema en el lugar de la picadura del flebótomo, días después el centro se ulcera y los bordes se definen, sobreelevan e hiperpigmentan. En otros casos, la lesión desarrolla hiperqueratosis en lugar de ulcerarse; la aparición de lesiones junto a la lesión principal, o lesiones satélite, también son usuales (Rabes, Baquero, y García; 2010).

La forma recidivante, es una manifestación crónica de la LC antroponótica; se caracteriza por la escasa presencia de amastigotes en la zona de la lesión, generando un diagnóstico incorrecto o tardío. Esta forma de la enfermedad es altamente destructiva y desfigurante (OMS, 2010). Se caracteriza por la reactivación de pápulas, de color rojo o café, alrededor de una lesión ya cicatrizada (Calvopiña *et al.*, 2005).

La forma difusa es causada principalmente por *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, y *L. pifanoi* (Reveiz *et al.*, 2013). Las lesiones no presentan ulceración, en su lugar se caracterizan por la aparición diseminada por todo el organismo de máculas, pápulas, nódulos o placas cutáneas. Esta variante no presenta curación espontánea y las lesiones suelen reactivarse luego de haber terminado el tratamiento (OMS, 2010).

En el Ecuador, las variantes de la Leishmaniasis cutánea se concentran por regiones geográficas. Las lesiones pápulo-ulcerosas de menor tamaño, conocidas comúnmente como “Leishmaniasis andina” o “nigua de ratón”, se encuentran principalmente en la región interandina. En la cordillera del Pacífico, se presentan lesiones ulcerosas húmedas y la forma recidivante; mientras que en las zonas bajas del Pacífico se presenta además la forma difusa. En la región amazónica se reportan principalmente la forma ulcerosa, sin mayores complicaciones (Calvopiña, Loor, Lara, Zambrano, y Hashiguchi; 2012).

1.1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Esta forma clínica de la enfermedad es endémica únicamente en el Nuevo Mundo, con una mayor incidencia en Bolivia, Brasil y Perú (OMS, 2010). La Leishmaniasis mucocutánea se presenta como una secuela en el 5 al 20% de

los casos de LC ya que los parásitos pueden diseminarse por vía sanguínea o linfática hasta las mucosas, o incluso por extensión directa de las lesiones en el rostro hacia las mucosas de las vías respiratorias superiores (Luna, *et al.*, 2012).

Factores como la especie de *Leishmania*, la inmunidad del hospedador, y el tratamiento recibido influyen en el lapso de tiempo transcurrido entre la cicatrización de la forma cutánea y la aparición de los signos clínicos de la forma mucocutánea; pudiendo variar entre pocos meses o varios años (Montenegro, Montañez, Chian, y Benites; 2014). Un 90% de los casos reportan afectación nasal, inicialmente el tabique se ulcera y perfora, posteriormente la punta de la nariz se desprende. Se han reportado con menor frecuencia casos en los cuales se hallan comprometidos el paladar, la faringe, la laringe y el labio superior (Luna *et al.*, 2012).

Las principales causantes son las especies del subgénero *Viannia*, especialmente *L. panamensis* y *L. braziliensis*; estas especies se caracterizan por causar metástasis en la mucosa bucal y en las vías respiratorias superiores (OMS, 2010).

La evolución a la forma mucocutánea se encuentra comúnmente relacionada con estados de inmunosupresión, causados por neoplasias o enfermedades crónicas, así como con infecciones virales como el virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) (Montenegro *et al.*, 2014). Se han identificado, otros factores de riesgo asociados con el desarrollo y gravedad de la forma mucocutánea, como el estado nutricional, la edad, el tiempo de duración de las lesiones cutáneas y características propias del parásito (Fernández y Almeida, 2012). A estos factores se suman además el género (masculino) y genética del paciente, el lugar de las lesiones, presencia de enfermedades concomitantes y la falta de tratamiento de lesiones previas por Leishmaniasis cutánea (González *et al.*, 2009).

En el Ecuador, los casos de LMC son pocos, la relación reportada de

Leishmaniasis cutánea en relación a la Leishmaniasis mucocutánea es 13:1 (Calvopiña *et al.*, 2012). Los casos poco frecuentes de la forma mucocutánea se concentran en el Litoral y Amazonía del país (Fernández y Almeida, 2012).

1.1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)

La Leishmaniasis visceral es la forma más grave de la enfermedad ya que puede tener complicaciones mortales. En el continente americano se reportan un promedio de 6 mil casos anualmente, mientras que a nivel mundial causa más de 50 mil muertes cada año (Revez *et al.*, 2013). Más del 90% de los casos reportados pertenecen a seis naciones, Bangladesh, Brazil, Etiopía, India, y Sudán (Alvar *et al.*, 2012). En el Ecuador únicamente se han reportado casos de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, ningún caso de la forma visceral (Calvopiña *et al.*, 2012).

En el Viejo Mundo, es causada por dos especies del subgénero *Leishmania*, *L. donovani* y *L. infantum*. Cabe mencionar que se han reportado casos por *L. tropica*, pero en menor proporción. En el Nuevo Mundo, únicamente se ha detectado como agente causal a *L. infantum* (OMS, 2010). Esta forma de la enfermedad es del tipo zoonótico, siendo el perro (*Cannis familiaris*) el principal reservorio. Se presenta, en la mayoría de los casos, en niños menores de 10 años o en pacientes inmunocomprometidos (Prieto *et al.*, 2010). Luego de la picadura del vector, el período de incubación puede variar entre 10 días y 24 meses. La sintomatología clínica comprende un cuadro febril prolongado, hepatoesplenomegalia, anemia y pérdida progresiva de peso (Salomón *et al.*, 2012).

Los parásitos migran a la sangre y al sistema retículo endotelial, causando que los nódulos linfáticos, el bazo y el hígado se inflamen. La sintomatología clínica incluye debilidad, fiebre, fatiga, falta de apetito y pérdida de peso. Si no se recibe un tratamiento efectivo, la Leishmaniasis visceral resulta altamente letal; pero incluso presenta una tasa de mortalidad del 10 al 20% en pacientes que han recibido tratamiento (Montalvo, Fraga, Monzote, García, y Fonseca; 2012).

1.1.3 Tratamiento

Se ha demostrado que la especie de *Leishmania* causante de la infección, juega un papel determinante en la respuesta al tratamiento, por lo que su identificación es de vital importancia durante la selección del régimen terapéutico más adecuado (Mouri *et al.*, 2014). Desafortunadamente, en la práctica, no ocurre esto. Se emplea como droga de primera línea, en casos de diagnóstico positivo para Leishmaniasis, antimoniales pentavalentes (Sb^{+5}); administrándose diariamente dosis de 10 a 20 mg/kg, por un periodo no menor a 20 días (Oliveira *et al.*, 2011). En la Tabla 2 se indican los principales fármacos empleados en el tratamiento de ésta parasitosis.

A nivel mundial, se encuentran disponibles comercialmente dos presentaciones de antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio (Pentosam®), que contiene 100 mg de Sb^{+5} por ml de solución, y el antimoniato de Meglumina (Glucantime®), que contiene 81 mg de Sb^{+5} por ml de solución. Son similares químicamente, pero su toxicidad y eficacia varía según su contenido de antimonio (OPS, 2013). Su administración es sistémica y puede ser realizada vía intramuscular o intravenosa (OMS, 2010).

Muchos de los pacientes suspenden el tratamiento debido a los efectos adversos causados por los antimoniales; en la Tabla 2 se indican los efectos reportados con mayor frecuencia (Oliveira *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, los niños, los adultos mayores y los individuos con enfermedades crónicas o inmunosuprimidos, son excluidos de ensayos clínicos, ya que reaccionan de distinta manera al tratamiento con antimoniales. Por esta razón, no se cuenta con suficiente evidencia de su eficacia y toxicidad, lo que dificulta la elección de un tratamiento para estos casos (Fontenele, Freire, Gomes, y Tolentino; 2013).

La anfotericina B (Amp B), es la droga de segunda línea recomendada para el tratamiento de Leishmaniasis mucocutánea y visceral que no respondan al tratamiento de primera línea (OMS, 2015). Presenta elevada toxicidad y serios

efectos adversos (Tabla 2), como escalofríos, fiebre alta, hipopotasemia, nefrotoxicidad, miocarditis y tromboflebitis (OMS, 2010). Debido a estos efectos crónicos, se ha desarrollado una formulación liposomal de Amp B, la cual es mejor tolerada y menos tóxica (Mohapatra, 2014). Sin embargo, no se ha determinado una dosis estándar para el tratamiento. En la mayoría de los casos de LC se ha usado 3 mg diarios de la formulación liposomal de Amp B por kg de peso corporal, con un máximo de 10 dosis, administrada mediante infusión intravenosa (CDC, 2014).

Otro fármaco que ha demostrado tener actividad antileishmania es la pentamidina, una de las primeras drogas de uso oral contra esta parasitosis. Se ha empleado en Asia para tratar LV, pero no ha sido muy efectiva para los casos causados por *L. infantum*; sin embargo, ha demostrado ser efectiva para ciertos casos de LC (OMS, 2015). No es muy utilizada debido a su toxicidad irreversible y su efectividad variable (CDC, 2014).

Hace poco más de un año que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó el uso oral de miltefosina, conocida comercialmente como Impavido, en adultos y adolescentes mayores de 12 años, que, en el caso de ser mujeres, no se encuentren embarazadas o en período de lactancia. Esta droga se limita a tratar infecciones causadas por tres especies del subgénero *Viannia*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, y *L. panamensis* (FDA, 2014), pero este medicamento también produce efectos secundarios (Tabla 2), principalmente gastrointestinales; a esto se suma el hecho de que su vida media en el organismo es prolongada (González *et al.*, 2009).

Tabla 2. Fármacos empleados para el tratamiento de Leishmaniasis

Nombre	Supuesto Modo de Acción	Vía de Administración	Efectos adversos
Antimoniales pentavalentes	Inhibición de glicólisis y β -oxidación de ácidos grasos del parásito	Sistémica Intralesional (LC)	Dolor muscular, de cabeza, y abdominal; eritema; náuseas; toxicidad

Amfotericina B	Unión a los esteroides de la membrana, cambiando su permeabilidad selectiva de K ⁺ y Mg ²⁺	Formulación liposomal Desoxicolato	Elevada toxicidad, escalofríos, fiebre, hipopotasemia, nefrotoxicidad, miocarditis y tromboflebitis
Pentamidina	Interferencia en la síntesis del ADN y modificación morfológica del kinetoplasto	Parental Intramuscular	Dolor de cabeza, hipertensión, hipo e hiperglicemia, mareo, náuseas, vómito
Miltefosina	Intervención en la biosíntesis de fosfolípidos y en el metabolismo de alquil-lípidos	Oral	Anorexia, diarrea, náuseas, e incremento en la creatinina

Adaptado de Oliveira et al., 2011; Kaur y Rajput, 2014

En los países en donde la enfermedad es endémica, se recomienda que se elija el tratamiento en base a la relación riesgo-beneficio de cada fármaco y su disponibilidad, el tipo de servicio de salud y su accesibilidad, y consideraciones de salud pública, principalmente la prevención de la fármacorresistencia (OMS, 2010).

1.1.4 Resistencia a los tratamientos

A pesar de la amplia gama de opciones terapéuticas, la resistencia generada por ciertas especies de *Leishmania* a los tratamientos se está convirtiendo en un problema. Hay regiones en el mundo en las cuales se ha reportado una resistencia total hacia los medicamentos, principalmente los de primera línea (Kaur y Rajput, 2014). La principal causa para esta resistencia emergente es el mal uso de los fármacos. La mayoría de los pacientes acude inicialmente a practicantes de medicina no calificados, quienes al no poseer la información necesaria sobre los fármacos administran dosis subterapéuticas y por periodos menores o no adecuados. El costo también es un factor determinante, debido a que la mayoría de pacientes pertenecen a las regiones más pobres de los países en vías de desarrollo y generalmente no cuentan con los recursos económicos para completar el tratamiento (Mohapatra, 2014).

Los antimoniales pentavalentes han sido administrados en dosis menores a las adecuadas y con periodos intermedios libres de tratamiento, lo que ha provocado niveles subterapéuticos del fármaco en la sangre, facilitando la

tolerancia del parásito (Sundar, Singh, y Singh; 2014).

Se ha logrado determinar que la multirresistencia de estos parásitos radica principalmente en proteínas de membrana y mutaciones en su ADN genómico. Incluso, se ha logrado identificar una región de 40 kb en donde se encuentran genes que le otorgan resistencia tanto a los compuestos derivados del arsénico como a los antimoniales (Beltrán, Durán y Corredor; 2008).

1.2 Métodos de Diagnóstico e Identificación

1.2.1 Métodos Directos

La especie de *Leishmania* causante de la infección es un factor crucial en el desarrollo de la enfermedad y su reacción al tratamiento, por lo que su identificación es determinante al momento de elegir el régimen terapéutico más adecuado. Desafortunadamente, en la práctica, únicamente se presume la especie en base al cuadro clínico y al posible lugar de adquisición de la enfermedad (Mouri *et al.*, 2014).

Antes de proceder con las técnicas de diagnóstico de la Leishmaniasis es necesario primeramente considerar los aspectos epidemiológicos, como el lugar de residencia del paciente, visita a áreas endémicas de esta enfermedad o infecciones previas con este parásito. Tras estas consideraciones, se debe proseguir con la revisión de la sintomatología clínica para identificar el tipo de Leishmaniasis y finalmente pasar al diagnóstico mediante técnicas de laboratorio (Marín *et al.*, 2012).

Por lo general, las manifestaciones clínicas suelen coincidir con una amplia gama de enfermedades; la Leishmaniasis cutánea, por ejemplo, puede ser confundida con las infecciones estafilocócicas o estreptocócicas, las úlceras microbianas o incluso la lepra; la del tipo mucocutáneo puede ser confundida con la rinitis alérgica, las micosis profundas o la sarcoidosis; mientras que la Leishmaniasis visceral puede simular casos de paludismo crónico, esquistosomiasis u otro tipo de infecciones sistémicas (OMS, 2010).

El diagnóstico se confirma principalmente mediante la visualización directa, por microscopía, de los amastigotes en el frotis del tejido infectado, teñido preferentemente con Giemsa, ya sea de la epidermis, las mucosas o del aspirado tisular (Marín *et al.*, 2012). Este método es de los más usados y su sensibilidad varía entre el 33 al 90%, dependiendo tanto de la experticia de la persona que toma la muestra como de quien la examina (Nógaló, Molina, Norry, Romano, y Lorenz; 2012).

Aunque las técnicas microscópicas son baratas, éstas requieren de un entrenamiento adecuado, no solo de quien examina la muestra sino también de quien la toma. Este aspecto es de vital importancia en casos de LMC O LC recidivante, ya que la presencia de amastigotes en la lesión es generalmente escasa (Cañavate, Cuadros, Martínez y Martín-Rabadán; 2009).

Otro método directo de diagnóstico es el cultivo en medios especializados, pero presenta elevada contaminación, y sensibilidad relativamente baja, entre el 50 y 70% (Lloveras, Moreno, Bava, y Orduna; 2011). Los medios bifásicos de agar sangre, principalmente el medio de Novy, Nicolle y McNeal (NNN) y los medios líquidos Schneider o RPMI son los más empleados para el crecimiento del parásito; pero factores como el elevado costo o las dificultades para su importación reduce su aplicabilidad en países en vías de desarrollo (Montealegre, 2010).

Los medios deben ser incubados a 27°C, examinados cada semana para tratar de identificar promastigotes, y resembrados en medio nuevo después de 7 días. Si luego de cuatro semanas, no se observa promastigotes se considera un caso negativo y se lo descarta. La contaminación es frecuente, especialmente por bacterias u hongos (Cañavate *et al.*, 2009).

1.2.2 Métodos Indirectos

Se han desarrollado además técnicas de diagnóstico indirecto o inmunológicas, las cuales detectan la presencia del parásito en base a la respuesta inmune del paciente al generar anticuerpos específicos a causa de la infección (Lloveras *et al.*, 2011). La Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) es una prueba que

emplea antígenos de promastigotes de *Leishmania spp* para medir la reacción de hipersensibilidad retardada (Rojas, Guzmán, Verduguez, y Montaña; 2010). La prueba en sí no es diagnóstica, ya que una reacción positiva únicamente indicaría el contacto previo con estos parásitos (INS, 2014). A pesar de que presenta una alta sensibilidad y especificidad, se ha reportado un 5% de reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas (Rojas *et al.*, 2010).

Otros métodos de diagnóstico indirecto son las pruebas serológicas, que pueden presentar una sensibilidad de hasta el 90% para casos de Leishmaniasis visceral, pero no ocurre lo mismo para la forma cutánea y mucocutánea debido principalmente a la baja cantidad de anticuerpos presentes (OMS, 2010). Se han reportado reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas y ciertas micosis profundas. Dentro de las principales técnicas serológicas se encuentra la prueba de aglutinación rápida para tamizaje (FAST), la prueba por aglutinación directa (DAT), la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y las pruebas de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (Rios y Yuil, 2010).

Además de las reacciones cruzadas, los métodos indirectos presenta otras desventajas. Los anticuerpos pueden ser detectados incluso años después de la curación, por lo que no son útiles en el diagnóstico de recaídas o infecciones nuevas; y en caso de pacientes VIH positivos infectados con Leishmaniasis, la generación de anticuerpos antileishmania es baja, por lo que la sensibilidad de este tipo de pruebas se ve reducida (Cañavate *et al.*, 2009).

1.2.3 Técnicas Moleculares

Los avances que han tenido lugar en las últimas décadas en el área de la biología molecular, han permitido el desarrollo de herramientas para el diagnóstico de una amplia gama de enfermedades, entre ellas para la Leishmaniasis (Monzote, Ordeñana, Fraga, Montalvo y Montano; 2009). Dentro de estas técnicas moleculares sobresale la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, la cual presenta una alta sensibilidad y especificidad (Córdova, Vargas, Hasiguchi, Kato, y Gómez; 2011).

Todas las técnicas directas e indirectas, antes mencionadas, dependen de la experticia de la persona que toma y examina las muestras como de la lesión en sí, es decir, la contaminación bacteriana y la carga parasitaria. Pero todas estas desventajas son superadas al aplicar una de las técnicas moleculares más utilizadas, la PCR (Córdova, Vargas, Hasiguchi, Kato, y Gómez; 2011). Cabe mencionar, que a pesar de que su sensibilidad y especificidad son altas, éstas dependerán de la secuencia blanco que se elija para la amplificación (Chena, Nara, Canese, Oddone, y Russomando; 2013).

La aplicación de la PCR ha sido fundamental para lograr un mejor entendimiento de los aspectos etiológicos de esta enfermedad. Además, ha permitido la interpretación adecuada del comportamiento de este parásito, un diagnóstico más acertado, y la selección del tratamiento más idóneo, permitiendo por ende, la aplicación de medidas de control eficaces (Cannova, 2007).

La PCR se ha convertido en una herramienta de gran utilidad, puesto que ha logrado identificar *Leishmania* no solo en muestras de pacientes o cultivos sino también en los vectores y en los huéspedes reservorios (Jojoa, 2012). Dentro de las principales secuencias de interés utilizadas para el análisis por técnicas moleculares, resaltan el ADN del kinetoplasto (kDNA), ya que cuenta con genes altamente polimórficos y presentes en una gran número de copias (Córdova, Vargas, Hasiguchi, Kato, y Gómez; 2011).

Además de las ventajas previamente mencionadas, la PCR no depende de un determinado estado morfológico del parásito para su detección ni de la respuesta inmune del hospedador. Esta última característica es importante puesto que permite diagnosticar e identificar tanto infecciones activas como aquellas que permanecen asintomáticas (Jojoa, 2012). Todas estas ventajas que presenta la PCR, incrementan su sensibilidad si se compara con las pruebas serológicas, principalmente al tratarse de pacientes con LC, LMC o inmunodeprimidos. Este tipo de pacientes, presentan concentraciones bajas o incluso nulas de anticuerpos anti-*Leishmania* por lo que resultarían negativos a las pruebas serológicas (Tsokana *et al.*, 2014).

El uso de muestras de sangre periférica para la identificación molecular del parásito ha demostrado gran especificidad y sensibilidad para casos de Leishmaniasis visceral (Tsokana *et al.*, 2014). En la bibliografía no se han encontrado ensayos en los que se hayan empleado muestras de sangre periférica para casos de Leishmaniasis cutánea o mucocutánea.

En la actualidad, se emplea mundialmente como técnica de referencia para la identificación de *Leishmania* a nivel de especie la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE por sus siglas en inglés, *multilocus enzyme electrophoresis*), pero presenta ciertas limitantes. Se han reportado diferencias en los perfiles electroforéticos debido a la heterocigosidad presentada en la posición del nucleótido. Además, su uso se restringe a ciertos laboratorios debido a que se requieren grandes volúmenes del cultivo del parásito (Guerbouj, Mkada-Driss, y Guizani; 2014). Mientras que para lograr identificar taxonómicamente al parásito hasta el nivel de especie mediante la PCR, se requiere únicamente de la secuenciación del ADN amplificado (Cannova, 2007). Si se emplea una de las variantes de la PCR, la qPCR se puede llegar a identificar las diferentes especies mediante el análisis de las temperaturas de melting de los productos amplificados (Weirather *et al.*, 2011).

Para lograr discriminar entre especies empleando las temperaturas de melting, Weirather y colaboradores (2011), emplearon ADN extraído de 28 cepas de cultivos puros de 10 especies y 22 juegos de primers. Al analizar los diferentes picos de melting que presentaba cada curva del producto amplificado lograron identificar que para ciertos primers y con ciertas especies, se puede determinar la especie únicamente por el pico de melting puesto que, entre una especie y otra, existe una variación de más de 1° de temperatura.

1.2.3.1 Gen codificante de la subunidad menor 18S del RNA ribosomal

Se ha empleado diferentes tipos de muestras clínicas, y diferentes secuencias diana para el diagnóstico e identificación de *Leishmania spp*, principalmente aquellas secuencias codificadas en el ADN del kinetoplasto (kDNA) y secuencias variables que codifican para las subunidades menores del ARN ribosomal (SSU rRNA) (Montalvo *et al.*, 2014). En el ADN del parásito, existen

secuencias que presentan múltiples copias, como es el caso del gen codificante para la subunidad menor 18S del ARN ribosomal (18S rRNA), que cuenta con aproximadamente 160 copias (Lemrani, Hamdi, Laamrani, y Hassar; 2009).

La amplificación del gen del 18S rRNA permite únicamente la identificación de *Leishmania* a nivel de género más no de especie (Guerbouj, Mkada-Driss, y Guizani; 2014). El diagnóstico de casos positivos para Leishmaniasis cutánea mediante la amplificación de este gen por PCR presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 84.6% (Lemrani, Hamdi, Laamrani, y Hassar; 2009).

1.2.3.2 Gen codificante del citocromo b

Uno de los citocromos involucrados en el transporte de electrones durante el proceso de la respiración mitocondrial es el citocromo b (cyt b). El gen que codifica para este citocromo, localizado dentro del kinetoplasto, ha demostrado ser de mucha utilidad en el estudio filogenético (Marco *et al.*, 2006). En los últimos años se ha demostrado que la amplificación y secuenciación del gen del citocromo b permite la identificación del género *Leishmania* así como la diferenciación entre las distintas especies que lo conforman (Yang, 2013).

En 2006, Marco y colaboradores emplearon 16 muestras de tejido humano y una muestra de cánido para probar que mediante la amplificación y secuenciación del gen del citocromo b, se podía realizar la identificación a nivel de especie y obtener los mismos resultados que al utilizar MLEE. Además, se ha demostrado que se puede emplear estos resultados para construir relaciones filogenéticas, al compararlas con las bases de datos del GenBank (Yang, 2013).

El gen del citocromo b se considera uno de los más útiles para el análisis taxonómico y filogenético debido a su tasa de evolución lenta. A esto se suma el elevado número de copias que presenta al estar localizado en el kDNA, específicamente en los maxicírculos (Guerbouj, Mkada-Driss, y Guizani; 2014).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

En el presente proyecto de investigación se incluyó a los pacientes que ingresaron, con sospecha o con diagnóstico confirmado de Leishmaniasis al Centro de Salud N° 17 Augusto Egas - Santo Domingo de los Tsáchilas, entre enero y junio del 2014; al Centro de Salud N° 17D012 - Pedro Vicente Maldonado, entre diciembre del 2014 y febrero del 2015; y al servicio de dermatología del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No.1, entre septiembre del 2014 y mayo del 2015.

2.1. Toma de muestra

Previo a la toma de la muestra, los pacientes fueron informados según los lineamientos del consentimiento informado (Anexo1), aprobado por el Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de las Américas (CEBE-UDLA).

A los pacientes del Centro de Salud N° 17 Augusto Egas, se les realizó la toma de la muestra mediante aspirado, siguiendo el protocolo establecido en “Specimen Collection Guide for Cutaneous Leishmaniasis”, descrita en la página oficial de Public Health Ontario (PHO, 2014). Cada muestra se tomó por duplicado.

En el caso de los pacientes del Centro de Salud N° 17D012 y del hospital, se procedió a tomar muestras por duplicado mediante aspirado y raspado de la lesión, siguiendo el protocolo antes mencionado; y colectando adicionalmente de 1 a 3 ml de sangre venosa con tubos BD Vacutainer® con EDTA K₂.

Para cada paciente, se llenó la ficha técnica de recolección, en la cual consta información personal; el posible lugar de contagio; número, localización y características de la/s lesión/es; método de recolección empleado e información de un contacto (Anexo2). Junto con la ficha técnica se llenó además un formulario, en el cual se indican datos sobre la infección actual; existencia de infecciones previas por este parásito; tipo/s de tratamiento/s

recibido/s; y presencia de esta enfermedad en parientes inmediatos (Anexo3).

2.2. Transporte de las muestras

La toma y transporte de las muestras por aspirado se realizó en jeringuillas de tuberculina de 1 cc, BSG®, cargadas con 0.4 ml de tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Salines (PBS), GIBCO®, Invitrogen) pH 7.4 (1X); a temperatura ambiente. En el caso de las muestras por raspado, se las transportó a temperatura ambiente en tubos Eppendorf® de 1.5 ml, que contenían 1 ml de PBS 1X suplementado con Penicilina-Estreptomicina ((Pen-Strep), GIBCO®, Invitrogen) al 1% (v/v). Como se mencionó previamente, las muestras de sangre fueron recolectadas y transportadas en tubos BD Vacutainer® con EDTA K₂ a temperatura ambiente.

2.3. Cultivo de *Leishmania* a partir de úlceras de pacientes infectados

Medio Bifásico Ushmaru

Para el cultivo de *Leishmania* aislada de muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis, se empleó el medio bifásico de cultivo Ushmaru, el cual consta de una fase sólida compuesta por Base de Agar Sangre (Agar Infusión), BBL™, suplementado con sangre de conejo desfibrinada al 15% (v/v) y Pen-Strep al 1% (v/v). Para la fase acuosa del medio se empleó PBS 1X suplementado con Pen-Strep al 1 % (v/v). El medio fue vertido en tubos de ensayo con tapón de algodón y mantenido a 4°C hasta el momento de la inoculación.

Antes de inocular la muestra del aspirado en este medio, se descartó la aguja de la jeringuilla, y se sembró la totalidad de su contenido. En el caso de las muestras del raspado, se sembraron 500 µl del contenido de uno de los tubos Eppendorf®. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 27° C por 10 días y se verificó el crecimiento tanto de parásitos como de algún otro tipo de microorganismo mediante microscopía.

Medio Brain Heart Infusion (BHI)

Para el cultivo de parásitos de *Leishmania* aislados de pacientes, también se probó con el agar infusión de cerebro y corazón, BHI por sus siglas en inglés.

Para su elaboración se empleó BBL™ Brain Heart Infusion, suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado, al 2.75% (v/v); Hemina al 0.5% (v/v) y Pen-Strep al 0.1% (v/v).

La muestra restante del aspirado, fue cultivada, luego de descartar la aguja de la jeringuilla, en Flask CORNING, estéril, para cultivo de células, de 25 cm². Se procedió de la misma manera con los 500 µL restantes de la muestra de raspado. Las muestras así sembradas se incubaron a 27°C, verificando el crecimiento tanto de *Leishmanias* como de algún otro tipo de microorganismo mediante microscopía.

2.4. Extracción de ADN

Estandarización protocolo de extracción de ADN

La estandarización del protocolo de extracción del ADN se realizó empleando dos kits comerciales, Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) y, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®). En esta fase de la metodología se empleó un cultivo puro de *Leishmania equatorensis*, cultivada en medio BHI, la cual fue proporcionada por en el Centro de Investigación Traslacional (CIT). Para simular las condiciones de las lesiones, en donde la concentración del parásito puede ser baja, se diluyó el cultivo en agua (relación 1:10 y 1:100).

Luego de realizar las extracciones con cada uno de los kits por triplicado y analizar la absorbancia a 260/280 nm mediante espectrofotometría, para determinar su concentración y calidad, se eligió al kit de Roche®, High Pure PCR Template Preparation Kit, para las extracciones de ADN de muestras de pacientes.

Uno de los objetivos de la presente investigación, fue “desarrollar un protocolo estandarizado de extracción de ADN que permita la obtención de material genético de *Leishmania*, a una concentración apta, a partir de muestras de úlceras de pacientes infectados”, por lo que las modificaciones realizadas a los protocolos de los kits de aislamiento de ADN se indican en la sección de Resultados.

El ADN, se extrajo de forma directa tanto de las muestras de sangre y raspado como de los cultivos obtenidos. Se partió de un volumen de muestra de 200 μ L y se procesó cada muestra por triplicado. En el caso de los cultivos, se partió de 1 ml del medio y se realizaron tres lavados consecutivos con PBS 1X, centrifugando 10 minutos a 3000 rpm; el sobrenadante se desechó. Se resuspendió el pellet en 200 μ l de PBS 1X como indica el protocolo establecido por el fabricante.

Se aceptaron las muestras en las que la relación 260/280 nm osciló entre 1.8 y 2.2, indicador de una calidad óptima para su utilización en los procedimientos ulteriores. El ADN extraído se almacenó a -20° C hasta su procesamiento.

2.5. Identificación de casos positivos mediante amplificación del gen 18S rRNA por PCR convencional

La identificación de casos positivos para Leishmaniasis se realizó mediante la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA, que es una secuencia que permite identificar específicamente el género *Leishmania* (Rios y Yuil, 2010).

Con este propósito se obtuvieron los cebadores (Integrated DNA Technologies) que se indican en la Tabla 3, a partir del trabajo publicado por Nzelua *et al.*, 2014. Previo a la experimentación “*in vitro*” se realizaron alineamientos en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 6.0, empleando los algoritmos de Neighbour Joining con bootstrap de 100, entre las secuencias completas del gen codificante para el 18S rRNA de las diferentes especies de *Leishmania* disponibles en el GenBank y el juego de cebadores.

Tabla 3. Cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA

Nombre del cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Tamaño amplicón (pb)
F3-Le.rRNA	GGGTGTTCTCCACTCCAGA	210
B3-Le.rRNA	CCATGGCAGTCCACTACAC	

Adaptado de Nzelua *et al.*, 2014

Otro de los objetivos del presente trabajo fue “Desarrollar un protocolo para la identificación de *Leishmania* a nivel de especie mediante técnicas de PCR y secuenciación de ADN”, por lo que la composición de la mezcla y las condiciones de la PCR se encuentran detalladas en la sección de Resultados. Dichas condiciones fueron estandarizadas empleando ADN extraído a partir de un cultivo puro de *Leishmania equatorensis*.

Para la amplificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los pacientes se empleó como control positivo el mismo ADN de *Leishmania equatorensis*, y dos controles negativos, agua y ADN extraído de sangre de una persona sana. Se comprobó la presencia del fragmento amplificado mediante electroforesis, en gel de agarosa (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) al 2% (p/v). La presencia de una banda de amplificación del peso molecular esperado (210 pb) la banda de interés, representó diagnóstico positivo para Leishmaniasis.

2.6. Identificación de la especie de *Leishmania* en casos positivos por PCR cuantitativa (qPCR), PCR convencional y secuenciación del gen que codifica para el citocromo b (cyt b)

Para la amplificación del gen que codifica para el citocromo b (cyt b) se empleó la PCR convencional y una de sus variantes, PCR en tiempo real (qPCR), con el fin de identificar el protocolo más óptimo tanto para la amplificación a partir de las lesiones de pacientes, como para su posterior secuenciación.

PCR en tiempo real (qPCR)

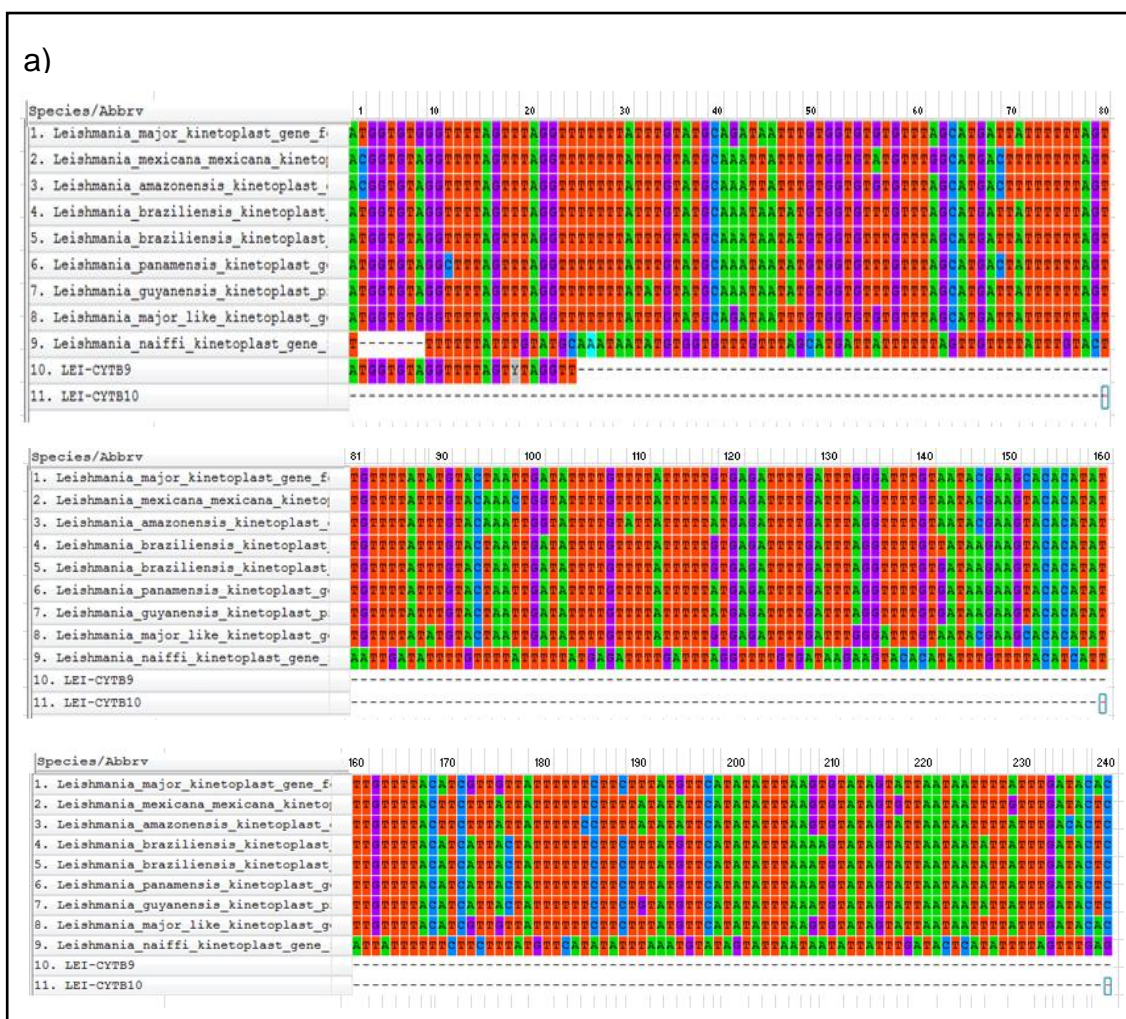
Para la amplificación de este gen por qPCR, se eligió el juego de cebadores que se indica en la Tabla 4, proporcionados comercialmente por Integrated DNA Technologies (IDT). Este par de cebadores fueron elegidos a partir de la publicación de Foulet *et al.*, en julio del 2007.

Tabla 4. Cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica para el citocromo b

Nombre del cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Tamaño amplicón (pb)
LEI-CYTB9	TTATGGTGTAGGTTTTAGTYTAGGTT	539
LEI-CYTB10	CCATCCGAACATCATAAAATAATGT	

Adaptado de Foulet et al, 2007

La secuencia del amplicón varía dependiendo de la especie de *Leishmania*. En la Figura 9, se indica esta variación en las especies circundantes reportadas en el Ecuador. Las secuencias de dichas especies, disponibles en el GenBank fueron alineadas con los cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica para el gen del citocromo b con la ayuda del software Mega6.



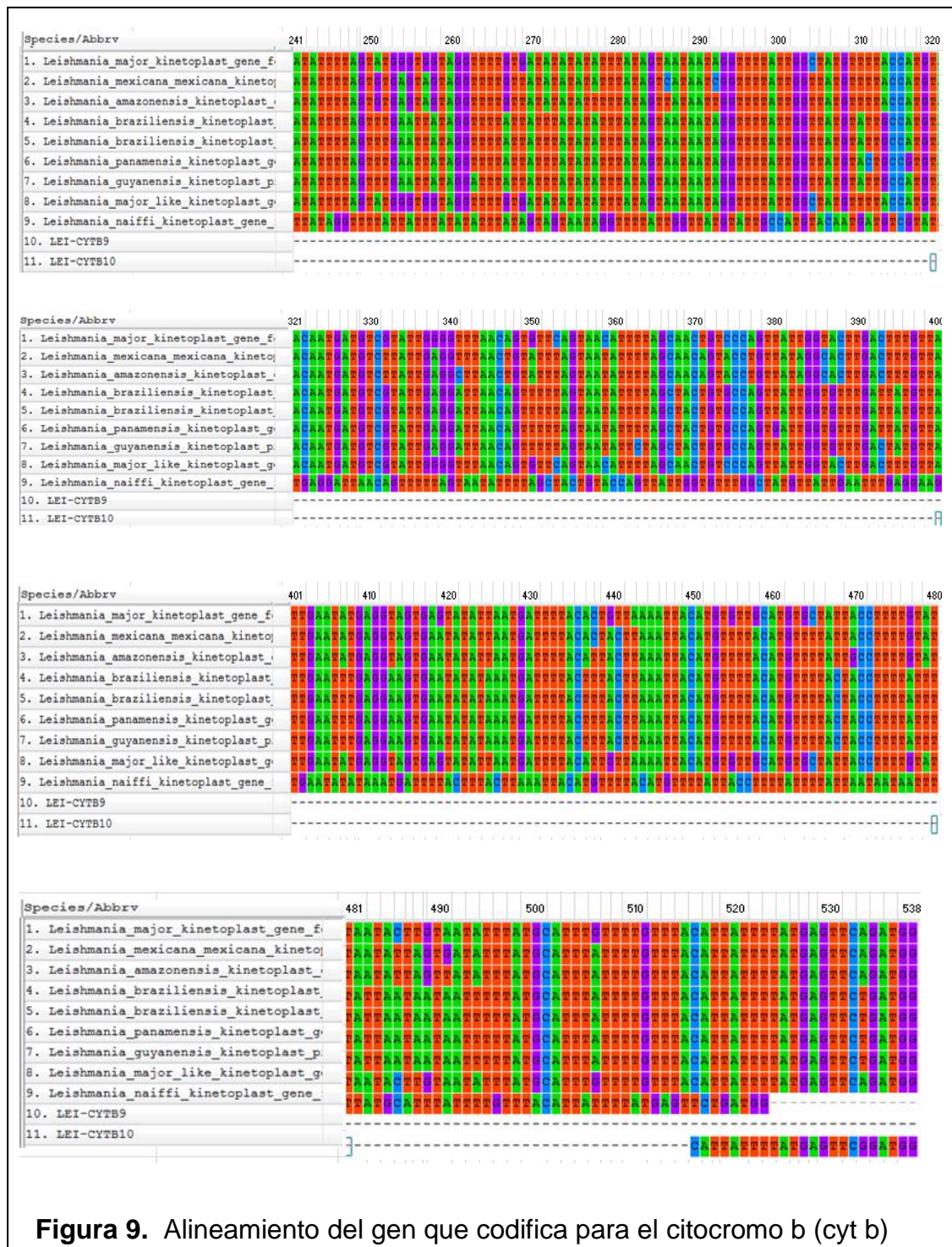


Figura 9. Alineamiento del gen que codifica para el citocromo b (cyt b) con primers de la Tabla 4

a) Alineamiento, realizado en el programa Mega6, entre las secuencias del gen del citocromo b de las especies de *Leishmania*, de las especies circulantes en el Ecuador disponibles en el GenBank, y los cebadores elegidos

Para la fase de estandarización se empleó el ADN extraído a partir del cultivo puro de *L. equatorensis*. Una vez estandarizadas las condiciones, se prosiguió a realizar la qPCR con las muestras de pacientes que dieron positivas para el gen que codifica para el 18S rRNA. Las condiciones del ciclado estandarizadas se encuentran detalladas en la sección de Resultados.

Para esta amplificación se empleó el ADN extraído a partir del cultivo puro de *L. equatorensis*. y como control negativo únicamente, agua. La comprobación del fragmento amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) al 1% (p/v).

PCR convencional

Para esta amplificación, se eligieron los mismos cebadores empleados en la qPCR. De igual manera, se estandarizaron las condiciones empleando el ADN extraído a partir del cultivo puro y luego se procesaron las muestras de los pacientes positivas para el gen codificante del 18S rRNA.

Las amplificaciones se realizaron con los mismos controles que en el caso de la qPCR; y se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) al 1% (p/v).

Secuenciación

Una vez comprobada la presencia del gen, se purificó el producto amplificado, empleando el kit PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen). Los amplicones obtenidos para el cyt b, fueron secuenciados directamente empleando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, USA), en un secuenciador Applied Biosystems® 3300.

Creación de una Base de datos con las secuencias de las especies de *Leishmania* encontradas

Se creó una base de datos de los genes codificantes para el 18S rRNA y el cyt b, de las cepas de *Leishmania* obtenidas de las muestras de los pacientes. Subsecuentemente estas secuencias se compararon con aquellas registradas

en el GenBank, con los archivos tipo fasta. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el software Mega 6, empleando los algoritmos de Neighbour Joining con bootstrap de 100. Se empleó BlastN para corroborar los resultados obtenidos y para la asignación taxonómica preliminar.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

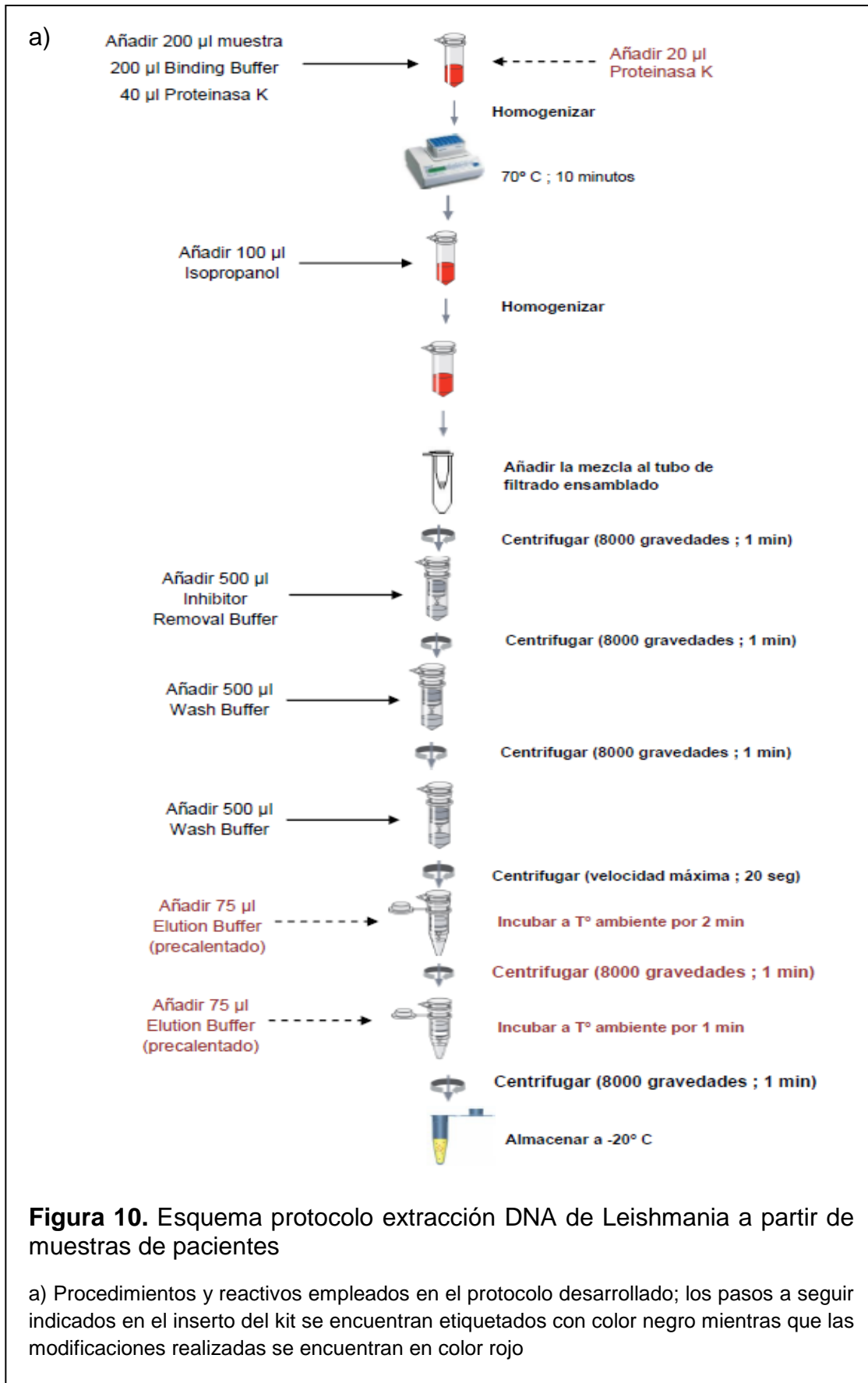
3.1. Protocolo de extracción de ADN de *Leishmania*, a partir de muestras de úlceras de pacientes infectados

Como ya se indicó en la sección de Metodología, para las extracciones de ADN de muestras de úlceras de pacientes se empleó el kit de Roche®, High Pure PCR Template Preparation Kit, al que se le realizaron modificaciones, las cuales se ilustran en la Figura 10. Cada muestra fue procesada por triplicado.

Como se puede apreciar en la Figura 10, el proceso de aislamiento partió de 200 µl de muestra (raspado de la úlcera, medio de cultivo, o sangre venosa de pacientes con sospecha de Leishmaniasis) que se colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml, y se le adicionaron 200 µl de “Binding Buffer” y 40 µl de Proteínasa K reconstituida. La primera modificación al procedimiento de Roche fue añadir 20 µl de RNasa (Invitrogen®). El contenido del tubo se mezcló inmediatamente en el Vortex a velocidad máxima por 15 segundos y se incubó a 70°C por 10 minutos. Luego se le añadieron 100 µl de Isopropanol y se mezcló nuevamente en el Vortex a máxima velocidad por 10 segundos. Se colocó el tubo de filtrado en un tubo de recolección (ambos proporcionados en el kit), se añadió la mezcla previamente realizada y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g a temperatura ambiente. Se descartó el tubo de recolección con el líquido que éste contenía y se ensambló el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recolección. Se añadieron 500 µl de “Inhibitor Removal Buffer” y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g a temperatura ambiente.

Nuevamente se descartó el tubo de recolección y el líquido y se reensambló el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recolección. Se añadieron 500 µl de “Wash Buffer” y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g a temperatura ambiente. Se descartó nuevamente el tubo de recolección y se reensambló el tubo de filtrado. Se añadieron 500 µl de “Wash Buffer” y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g a temperatura ambiente. Se descartó el líquido y se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por 20 segundos.

Se descartó el tubo de recolección con el líquido y se ensambló el tubo de filtrado en un nuevo tubo Eppendorf® de 1.5 ml. Como se puede observar en la Figura 6, se realizó otra modificación en la fase de la elución puesto que no se añadió 200 µl del “Elution Buffer” precalentado (70°C) como se indica en el protocolo establecido por el fabricante, sino que se añadieron 75 µl del “Elution Buffer” precalentado a 70°C y se incubó a temperatura ambiente por dos minutos. Se centrifugó por 1 minuto a 8000 g a temperatura ambiente. Con el tubo de filtrado ensamblado en el mismo tubo Eppendorf® se añadieron 75 µl más del “Elution Buffer” y se incubó a temperatura ambiente por un minuto. Finalmente se centrifugó por 1 minuto a 8000 gravedades a temperatura ambiente. El tubo Eppendorf® contiene el ADN extraído, el cual se cuantificó por su absorbancia a 260/280 por espectrofotometría y se almacenó a -20° C hasta su procesamiento.



3.2. Protocolo para identificación de *Leishmania* a nivel de especie por PCR y secuenciación de ADN

Identificación de casos positivos mediante amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA por PCR convencional

Para la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA se estandarizaron las condiciones de la PCR para un volumen total de 50 μ L. En un nuevo tubo Eppendorf® de 1.5 ml se preparó una master mix, que contenía Buffer de PCR (-MgCl₂) 1X; 0.2 mM de cada dNTP; 1.5 μ M de MgCl₂; 0.2 μ M de cada cebador (Tabla 2); 1.25 U de Platinum® *Taq* ADN Polimerasa; y agua libre de DNasa y RNasa. Una vez alicuotada la mezcla en tubos Eppendorf® de 0.1 ml, se añadió a cada tubo 3 μ M de ADN genómico total.

El ADN empleado para la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA se extrajo a partir de muestras de pacientes con sospecha o con diagnóstico de Leishmaniasis, de un cultivo puro de *L. equatorensis* (control positivo), y de sangre de un individuo sin Leishmaniasis (control negativo). Las condiciones de la reacción de PCR se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de ciclado para amplificación por PCR convencional del gen que codifica para el 18S rRNA

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Denaturación inicial	94 °C	1 minuto
30	Denaturación	94 °C	30 segundos
	Hibridación	56 °C	30 segundos
	Extensión	68 °C	1 minuto
1	Extensión final	72 °C	1 minuto

Identificación de la especie de *Leishmania* por PCR cuantitativa (qPCR) mediante amplificación del gen que codifica para el *cyt b*

Para la amplificación del gen que codifica para el citocromo b, se estandarizaron las condiciones de la qPCR para un volumen total de 25 μ L. La

amplificación se realizó por duplicado; la mezcla contenía SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) 1X, 0.4 μ M de cada cebador, y agua libre de DNasa y RNasa. Una vez alícuota la mezcla en los tubos Eppendorf® de 0.1 ml, se añadió 5 μ M de ADN a cada tubo. Las condiciones de ciclado se indican a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de ciclado para amplificación por qPCR del gen que codifica para el citocromo b

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Denaturación Inicial	95 °C	1 minuto
35	Denaturación	94 °C	30 segundos
	Hibridación	50 °C	45 segundos
	Extensión	68 °C	1:45 minutos
1	Extensión Final	72 °C	2:30 minutos

Con el propósito de facilitar la estandarización del qPCR, previamente se establecieron las condiciones de PCR convencional para la amplificación del cyt b. La amplificación se realizó por duplicado, para un volumen de reacción de 50 μ L; La mezcla contenía PCR Buffer (- Mg) 1X, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 μ M de cada cebador, 1.5 unidades de Platinum® Taq DNA Polymerase, 3 μ M de ADN, y agua libre de DNasa y RNasa. Las condiciones de ciclado se indican a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de ciclado para amplificación por PCR del gen que codifica para el citocromo b

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Denaturación inicial	95 °C	1:30 minutos
35	Denaturación	94 °C	1:30 minutos
	Hibridación	50 °C	1:10 minutos
	Extensión	68 °C	2:30 minutos
1	Extensión final	72 °C	3 minutos

Secuenciación del gen que codifica para el citocromo b (cyt b)

Luego de comprobar la presencia del amplicón de interés, se purificó el producto de PCR mediante kit PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen).

Para la reacción de secuenciación se empleó el kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, USA), los cebadores LEI-CYTB9 y LEI-CYTB10, y las muestras ya purificadas. Las condiciones de esta PCR se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de ciclado de PCR de secuenciación

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Denaturación inicial	96 °C	3 minutos
25	Denaturación	96 °C	10 segundos
	Hibridación	50.5 °C	5 segundos
	Extensión	60 °C	4 minutos

El producto de esta PCR fue purificado empleando AGENCOURT® CLEANSEQ® Dye-Terminator Removal. Una vez purificado el producto purificado, se cargó en el plato de secuenciación del secuenciador 3500 Genetic Analyzer de Applied Biosystems®.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el software SeqScape® v2.5 (Applied Biosystems) y comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos de secuencias nucleotídicas del GenBank. Los números de acceso se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9. Números de acceso de secuencias del gen que codifica para el citocromo b disponibles en el Gen Bank

Especie	Número Acceso
<i>Leishmania donovani</i>	AB095957
<i>Leishmania infantum</i>	AB095958
<i>Leishmania chagasi</i>	AB095959
<i>Leishmania tropica</i>	AB095960
<i>Leishmania major</i>	AB095961
<i>Leishmania aethiopica</i>	AB095962
<i>Leishmania mexicana</i>	AB095963
<i>Leishmania amazonensis</i>	AB095964
<i>Leishmania garnhami</i>	AB095965
<i>Leishmania braziliensis/ cepa MHOM/BR/75/M2904</i>	AB095966
<i>Leishmania braziliensis/ cepa MHOM/EC/88/INH-03</i>	AB095967
<i>Leishmania panamensis</i>	AB095968
<i>Leishmania guyanensis</i>	AB095969
<i>Leishmania major-like</i>	AB095970

<i>Leishmania naiffi</i>	AB433279
<i>Leishmania lainsoni</i>	AB433280
<i>Leishmania shawi</i>	AB433281
<i>Leishmania peruviana</i>	AB433282

3.3. Identificación molecular de especies de *Leishmania* en muestras de pacientes

En el presente estudio se incluyeron 35 pacientes reclutados en Santo Domingo (n=13), Pedro Vicente Maldonado (n=11) y el Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas No. 1 (F.F.A.A.A) (n=11). En el Anexo 4 se indican datos clínicos de los pacientes y las áreas geográficas en donde se reclutaron. Inicialmente se incluyeron 13 pacientes cuyas muestras se trató de cultivar previo al análisis molecular. Este análisis no se pudo llevar a cabo debido a que los cultivos de las muestras se contaminaron con hongos y/o bacterias. A pesar de que los cultivos fueron tratados con Pen-Strep, no fue posible controlar la contaminación. Estas 13 muestras fueron colectadas en coordinación con personal del Ministerio de Salud, del Centro de Salud N° 17 Augusto Egas (Santo Domingo), en recintos cercanos. Las muestras fueron tomadas por aspirado en personas con sospecha de Leishmaniasis.

Debido a las dificultades en el cultivo de las muestras de pacientes se decidió tomar de cada paciente 3 muestras, 2 de la lesión (por raspado y aspirado) y una tercera de sangre venosa periférica para el análisis molecular. 11 pacientes fueron reclutados en el Centro de Salud N° 17D012 - Pedro Vicente Maldonado (PVM). Las edades de los pacientes variaron desde los 7 meses hasta los 60 años. De estos pacientes 4 eran mujeres y 7 hombres. La mayoría de las lesiones fueron úlceras con bordes definidos y sobreelevados, localizadas en las extremidades superiores todas éstas características de las lesiones presentes en la Leishmaniasis cutánea.

De estos pacientes únicamente 1 no había iniciado el tratamiento con

Glucantime® al momento de la toma de las muestras debido a que no tenía diagnóstico confirmado de Leishmaniasis. En otro de los casos, a pesar de no tener diagnóstico confirmado por frotis, el paciente recibía tratamiento con Glucantime®, por decisión del médico tratante. Además, dentro del grupo de estos pacientes, había 2 casos especiales, uno que había presentado un tumor cervical que le había sido extirpado dejando como secuela dificultad en su movilidad y otro que presentaba una leve discapacidad mental y al momento de la toma de las muestras tenía 2 meses de embarazo.

Las muestras obtenidas por aspirado se sembraron en los medios de cultivo, pero todas presentaron contaminación, principalmente por hifas de hongos, por lo que fueron desechadas inmediatamente. De las muestras sangre y del raspado se realizaron extracciones del ADN. La cuantificación del ADN obtenido arrojó una concentración promedio de 47,73 ng/μl.

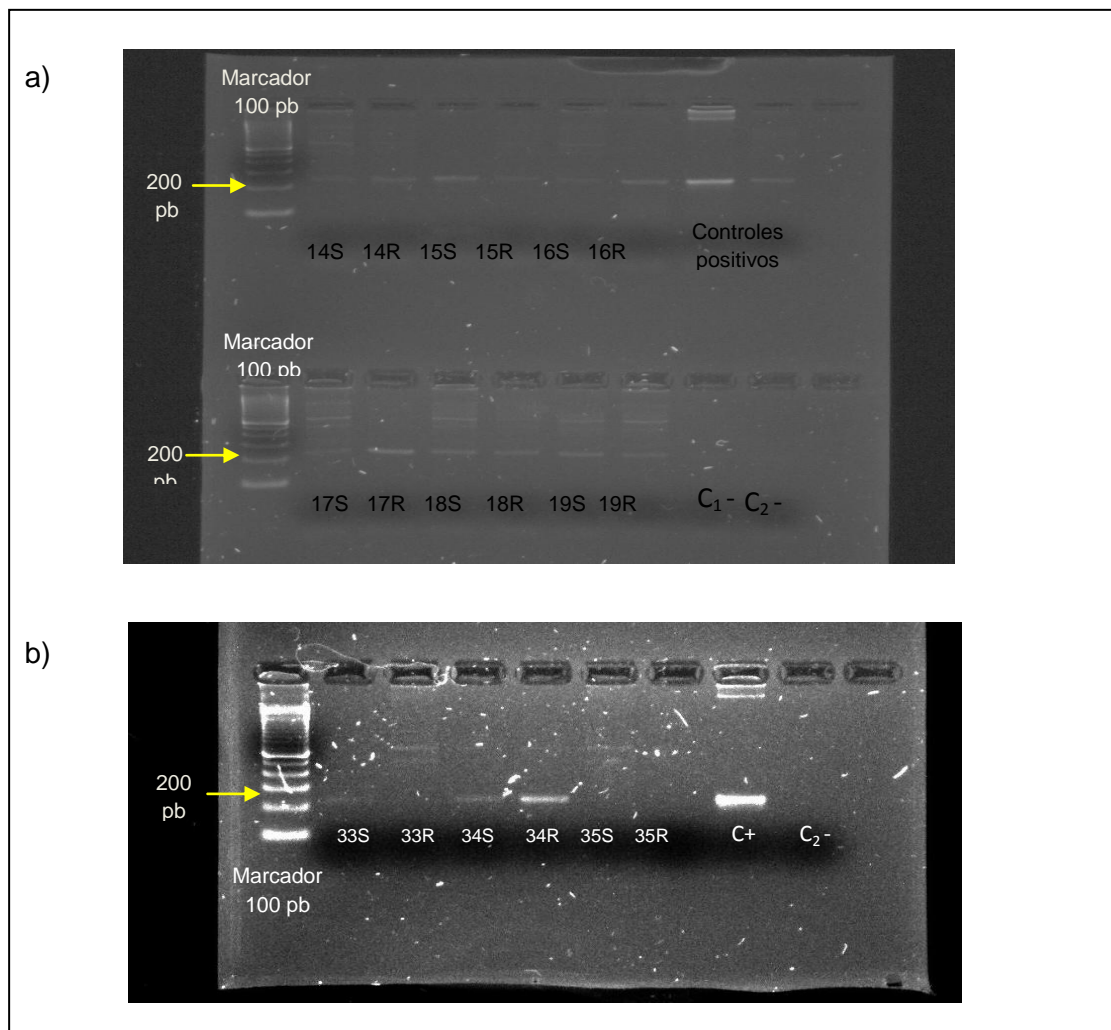
En el Hospital de las F.F.A.A., se reclutaron también 11 pacientes, quienes fueron derivados del Área de Dermatología al Laboratorio de Microbiología, con diagnóstico de sospecha de Leishmaniasis. Como se puede observar en el Anexo 4, las edades variaron entre 11 y 41 años. La mayoría de las lesiones fueron úlceras con bordes definidos, lesiones características de la Leishmaniasis cutánea; y se presentaron en su mayoría, en las extremidades superiores. De los 11 pacientes, una era mujer y los 10 restantes hombres. El 55% de los pacientes reportó como posible lugar de adquisición de la infección a la Base Militar Shangrilá, en la ciudad del Coca, provincia de Orellana, el restante número de pacientes refirieron haber visitado o vivir en la región subtropical de Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas, y Esmeraldas.

Al momento de realizar la toma de muestras, únicamente 2 pacientes habían iniciado el tratamiento con Glucantime®. Otro de los pacientes presentó una úlcera de aproximadamente 0.5 cm junto a una lesión previa ya cicatrizada de Leishmaniasis, hacía aproximadamente 6 meses. En esta infección previa, el paciente cumplió con las 28 dosis de Glucantime® correspondientes al tratamiento recomendado.

Las muestras obtenidas por aspirado se sembraron en los medios de cultivo,

pero todas presentaron contaminación, principalmente por bacterias. A pesar de que los cultivos fueron tratados con Pen-Strep, no fue posible controlar la contaminación. De las muestras sangre y del raspado se realizaron extracciones del ADN. La cuantificación del ADN obtenido arrojó una concentración promedio de 22,34 ng/ μ l.

Los resultados de la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA se evidenciaron en geles de agarosa como se describió en la sección Metodología. En la Figura 11 se muestra algunas de las corridas de electroforesis realizadas del producto de la amplificación por PCR para el gen que codifica para el 18S rRNA de los pacientes. La presencia de una banda del peso molecular esperado (210pb) representa diagnóstico positivo para Leishmaniasis.



c)

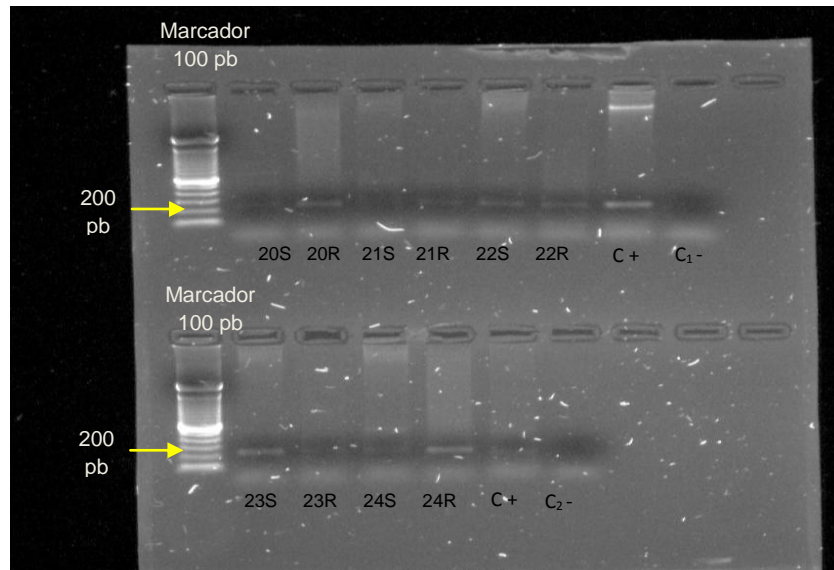


Figura 11. Verificación presencia amplicón de interés (gen que codifica para el 18S rRNA)

a) Gel de agarosa al 2% para comprobar presencia de banda de 210 pb para diagnóstico de los pacientes 14 al 19. Las S junto a los números representan al DNA extraído de las muestras de sangre, mientras que las R corresponde al DNA extraído de las muestras de los raspados. C₁- corresponde al control negativo con agua y C₂- al control negativo con DNA de una persona que nunca ha sufrido leishmaniasis. Los controles positivos corresponden al DNA extraído del cultivo puro de *L. equatorensis*.

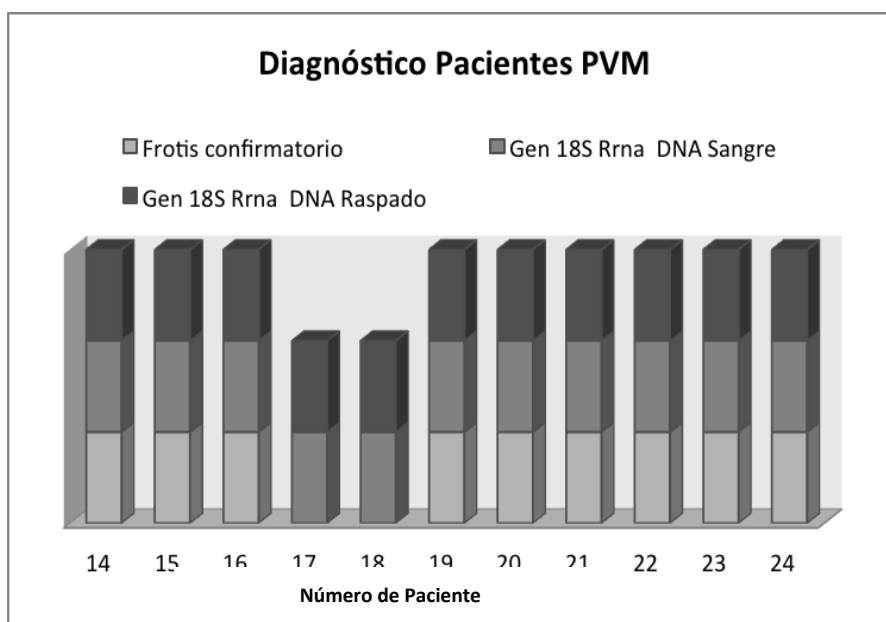
b) Gel de agarosa al 2% para comprobar presencia de banda de 210 pb para diagnóstico de los pacientes 33 al 35. Las S junto a los números representan al DNA extraído de las muestras de sangre, las R corresponde al DNA extraído de las muestras de los raspados. C₂- corresponde al control negativo con DNA de una persona que nunca ha sufrido leishmaniasis. C+ corresponde al control positivos (DNA extraído del cultivo puro de *L. equatorensis*)

c) Gel de agarosa al 2% para comprobar presencia de banda de 210 pb para diagnóstico de los pacientes 20 al 24. Las S junto a los números representan al DNA extraído de las muestras de sangre, las R corresponde al DNA extraído de las muestras de los raspados. C₁- corresponde al control negativo con agua y C₂- al control negativo con DNA de una persona que nunca ha sufrido leishmaniasis. C+ corresponde a los controles positivos (DNA extraído del cultivo puro de *L. equatorensis*)

La Figura 12 compara los resultados del diagnóstico por frotis de raspado de las lesiones de pacientes de PVM y del Hospital de Especialidades de las F.F. A.A. No. 1, con los resultados del análisis molecular para la identificación del gen que codifica para el 18S rRNA en sangre y raspado de las lesiones. Como se puede observar en la Figura 12, literal a), de los 11 pacientes de PVM, únicamente dos tuvieron resultado negativo en el frotis confirmatorio. Mediante el diagnóstico molecular por la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA, se obtuvo diagnóstico positivo para ambos pacientes.

En la Figura 12, literal b), correspondiente a los 11 pacientes del Hospital de Especialidades de las F.F. A.A., se puede observar que existieron dos pacientes que fueron atendidos por sospecha de Leishmaniasis, pero tanto el frotis como la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA, en los dos tipos de muestras, dieron resultado negativo. Por otro lado, el paciente con sospecha de reactivación de Leishmaniasis, tuvo un resultado positivo en la muestra del raspado solamente. En un caso no hubo amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA en sangre. Para los siete pacientes restantes, se obtuvo resultado positivo en el frotis y este resultado fue confirmado con la amplificación tanto en la muestra de sangre como en el raspado.

a)



b)

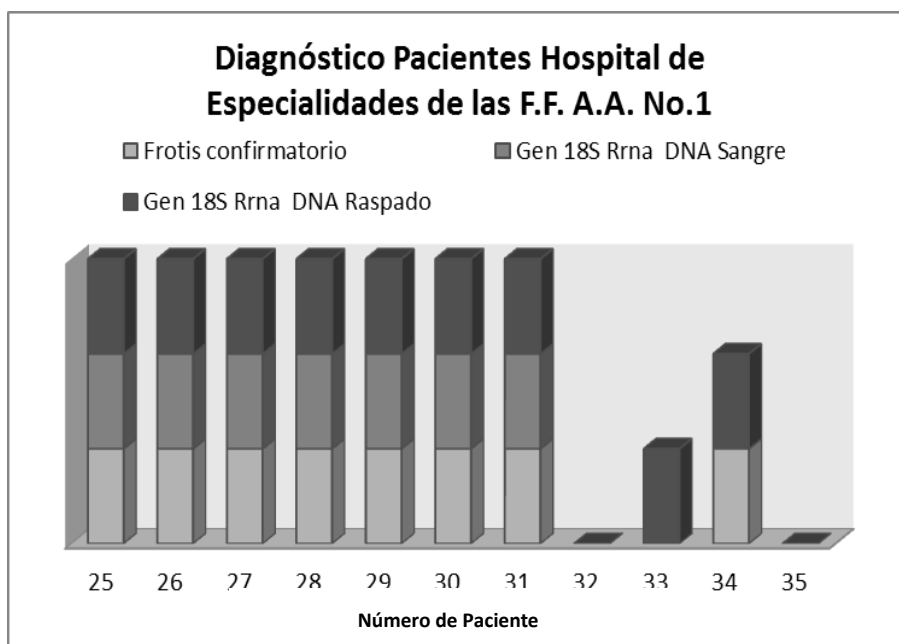


Figura 12. Comparación métodos de diagnóstico: frotis de la lesión vs. amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA

a) Pacientes Pedro Vicente Maldonado

b) Pacientes Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas

En relación a la amplificación del gen que codifica para el cyt b para la identificación de las especies de *Leishmania*, solamente se logró la amplificación en 3 muestras, 2 de PVM y una del Hospital de Especialidades de las F.F. A.A. (Tabla 10). El gen que codifica para el cyt b se amplificó a partir de muestras de lesiones cutáneas de los pacientes de PVM, pero no se logró a partir de muestra de sangre. Sin embargo, se logró amplificación a partir de la sangre del paciente del Hospital, pero no a partir de la lesión cutánea.

Tabla 10. Resultados amplificación del gen que codifica para el cyt b

# Paciente	Gen que codifica para el cyt b			
	PCR Convencional		qPCR	
	S	R	S	R
17	-	+	-	+
18	-	-	-	+
25	-	-	+	-

Los productos amplificados del gen que codifica para el cyt b de los 3 pacientes se purificaron y secuenciaron con el objetivo de identificar las especies de *Leishmania*. Tras realizar el alineamiento de secuencias, empleando el programa BLAST, se determinó que el paciente 17, presentaba infección por *Leishmania guyanensis*, con una puntuación máxima de 924, y un 99% de identidad. Se determinó que la especie que infectaba al paciente 18, era *Leishmania shawi*, con una puntuación máxima de 897 y un porcentaje de identidad del 98%, a pesar de compartir estos resultados con *L. braziliensis*. Finalmente, para el paciente 25, se identificó que el agente causante era *Leishmania naiffi*, con una puntuación máxima de 945 y un porcentaje de identidad del 99%. Los alineamientos se pueden observar en la Figura 13, mientras que las secuencias en formato FASTA se indica en la Tabla 11.

a)

Download ▾ [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania guyanensis isolate 5Paris12faculty cytochrome b (cytb) gene, partial cds; kinetoplast
Sequence ID: [gi|146164411|gb|EF679912.1](#) Length: 872 Number of Matches: 1

Range 1: 13 to 507 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
924 bits(479)	0.0	489/495(99%)	0/495(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AATAIGTGGtgtttgttttagcatgactattttttagttgtttttattgttactaattgata 60
Sbjct 13  AATAIGTGGTGTITGTTTAGCATGATTATTTTTAGTIGTTTTATTGTACTAATTGATA 72

Query 61  ttttgttttatttttatgagatgttttagttgtttgtgataagaagtacacatatttg 120
Sbjct 73  TTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTTGATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTG 132

Query 121  ttttaCATCATTACTATTTTTTCTTCTTTATGTTTCATATATTTAAATGcatagtattaat 180
Sbjct 133  TTTTACATCATTACTATTTTTTCTTCTGTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAAT 192

Query 181  aatattatttgatactcacaatatttagtttgaattatagggtttttattttatattttat 240
Sbjct 193  AATAITATTGTACTCATAATTTTAGTTGAATTTATAGGATTTATTTATATATTTAT 252

Query 241  agtaataatagggttttattggtttatgtattGCCAIGTACAATGATGTCGATTTGAGGATT 300
Sbjct 253  AGTAATAATAGGTTTTATTGGTTATGTAATGCCATGTACAATGATGTCGATTTGAGGATT 312

Query 301  AACAGTTTTTAGTAATATCTAGCTACTGTGCCAGTATTGGTGTGTTGACTATGTTATTG 360
Sbjct 313  AACAGTTTTTAGTAATATCTAGCTACTGTGCCAGTATTGGTGTGTTGACTATGTTATTG 372

Query 361  AATTGAGGAAGTGAATATATAAATGatctttactttayttaaaattacatgttttcatgt 420
Sbjct 373  AATTGAGGAAGTGAATATATAAATGATTTTACTTTACTTAAATACATGTTTACATGT 432

Query 421  tttactaccttttattttatataataaattttttatgcattttttgttttaccattatt 480
Sbjct 433  TTTACTACCTTTTATTTTATTAATAAATAATTTTTATGCATTTATTTGTTTACATTATT 492

Query 481  tatraGTTCCGATGG 495
Sbjct 493  TATGAGTTCGATGG 507

```

b)

Download ▾ [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania shawi kinetoplast pre-edited Cytb gene for cytochrome b, strain: MHOM/BR/79/M15065
Sequence ID: [gi|209571383|dbj|AB434680.1](#) Length: 1078 Number of Matches: 1

Range 1: 48 to 547 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
897 bits(464)	0.0	492/502(98%)	2/502(0%)	Plus/Minus

```

Query 15  aaaaattattatttaataaaaaatraaaggtaataaaacatgtaaaacatgtaatttaagt 74
Sbjct 547  AAAAAATTATTATT-AATAAAA-TAAAAGGTAGTAAACATGTAAAACATGTAATTTAAGT 490

Query 75  aaagtaaaatCATTATATATTCACCTTCTCAAAATCAATAACATAACCAACACCAATA 134
Sbjct 489  AAAGTAAAATCATTATATATTCACCTTCTCAAAATCAATAACATAACCAACACCAATA 430

Query 135  ACTGGTACAGTAGCTAAAATATTACTAAAACTGTTAATCCTCAATACGACATCATTGTA 194
Sbjct 429  ACTGGCACAGTAGCTAAAATATTACTAAAACTGTTAATCCTCAATACGACATCATTGTA 370

Query 195  CAITGGCaataacataaacaataaaaaacctattactactataaataataaataaataaacct 254
Sbjct 369  CATGGCAATACATAARCCAATAAARACCTATTATTACTATAAATATATAAATAAATAAARCC 310

Query 255  ataactcaaaactaaaatattgagatatacaataatatttataaactatacatttaaatata 314
Sbjct 309  ATAATTCAAACTAAAATATGAGTATCAAATAATATTATTAATACTATACACTTAAATATA 250

Query 315  tgaacataaagaagaaaaataaataatGATGtaaaacaaatattgttacttcttatcaca 374
Sbjct 249  TGAACATAAAGAAGAAAAATAAATAATGATGTAAAACAAATATGTGACTTCTTATCACA 190

Query 375  aaacctaaatcaaaatctcataaaaaataaaacaaaatattcaatttagtacaataaaca 434
Sbjct 189  AAACCTAAATCAAATCTCATAAAATAAAAACAAAATATCAATTAGTACAATAAARCAA 130

Query 435  ctaaaaaatagtcgatgctaaacaaacmCCACATATTATTGCAATACAAATaaaaaaacCT 494
Sbjct 129  CTAAAAATAGTCATGCTAAAACAAACACCACATATTATTGCAATACAAATAAAAAACCT 70

Query 495  AAACTAAAACCTACACCATAAA 516
Sbjct 69  AAACTAAAACCTACACCATAAA 48

```

c)

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania naiffi kinetoplast cytb gene for cytochrome b, partial cds
 Sequence ID: [gil176838316/dbj/AB433279.1](#) Length: 817 Number of Matches: 1

Range 1: 18 to 516 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
945 bits(487)	0.0	494/499(99%)	0/499(0%)	Plus/Plus
Query 12	aaawaawaTGIGGtgtttttagcatgattat	71		
Sbjct 18	AAATAATATGIGGtgtttttagcatgattat	77		
Query 72	gatattttgttttatttttagagattttgat	131		
Sbjct 78	GATATTTTGTITTTATTTTATGAGATTTG	137		
Query 132	tttgttttaCAICattattattttttctt	191		
Sbjct 138	TTTGTITTTACATCATTATTTATTTTCT	197		
Query 192	taataatattattttgatactcatat	251		
Sbjct 198	TAATAAATATTTTATGATACTCATATTT	257		
Query 252	ttatagtagtaaataggtttttattgg	311		
Sbjct 258	TTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTT	317		
Query 312	GATTAACAGTTTTAGTAATAATTTAG	371		
Sbjct 318	GATTAACAGTTTTAGTAATAATTTAG	377		
Query 372	ATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATA	431		
Sbjct 378	ATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATA	437		
Query 432	atgttttattaccotttttattttatta	491		
Sbjct 438	ATGTTTTATTACCTTTTATTTTATTA	497		
Query 492	attttatGAGTTCGATGG	510		
Sbjct 498	ATTTTATGAGTTCGATGG	516		

Figura 13. Alineamientos con secuencias obtenidas

a) Captura de pantalla del alineamiento realizado empleando el programa BLAST con la secuencia obtenida de la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el cyt b, paciente 17

b) Captura de pantalla del alineamiento realizado empleando el programa BLAST con la secuencia obtenida de la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el cyt b, paciente 18

c) Captura de pantalla del alineamiento realizado empleando el programa BLAST con la secuencia obtenida de la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el cyt b, paciente 25

Tabla 11. Resultados de la secuenciación

	Especie identificada	Secuencia formato FASTA
Paciente 17	<i>Leishmania guyanensis</i>	AATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGACTATTTTTAGTTGTTTATTTGTACT AATTGATATTTTGTTTATTTTATGAGATTTTGATTTAGGTTTTGTGATAA GAAGTACACATTTGTTTACATCATTACTATTTTTCTTCTTTATGTTCA TATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTAGTT GAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGG TTATGTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAG TAATATTCTAGCTACTGTGCCAGTTATTGGTGTGACTATGTTATTGAAT TTGAGGAAGTGAATATATAAATGATTTTACTTTAYTTAAATTACATGTTTTA CATGTTTTACTACCTTTTTATTTATTAATAATAATTTTTATGCATTTATTTG TTTACATTATTTTATRAGTTCCGGATGGA

<p>Paciente 18</p>	<p><i>Leishmania shawi</i></p>	<p>ATKAATTCCAA WAAAAAATTATTATTTAATAAAAAATRAAAGGTAATAAAA CATGTAAAACATGTAATTTAAGTAAAGTAAAATCATTATATATTCACCTTC CTCAAATTC AATAACATAACCAAAACACCAATAACTGGTACAGTAGCTAAA ATATTAATAAAAACTGTTAATCCTCAATACGACATCATTGTACATGGCAAT ACATAACCAATAAAAACTATTACTACTATAAAATATAAAATAATAAAACCTA TAACTCAAAC TAAATATGAGTATCAAATAATATTATTAATACTATACATTT AAATATATGAACATAAAGAAGAAAAATAATAATGATGTAAAACAAATATG TGTAATTTCTTATCACAAAACCTAAATCAAAATCTCATAAAAAATAAAACAAA ATATCAATTAGTACAAATAAAACAAC TAAAAAATAGTCATGCTAAAACAAAC MCCACATATTATTTGCATACAAATAAAAAAACCTAAACTAAAACCTACACC ATAAA</p>
<p>Paciente 25</p>	<p><i>Leishmania naiffi</i></p>	<p>ATGTWAAWGMAAAWAAWATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGATTATTTTTT AGTTGTTTTATTTGACTAATTGATATTTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTTG ATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATT TTTTCTTCTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTG ATACTCATATTTTAGTTTTGAGTTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGT AGTAATAGGTTTTATTGGTTATGTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTG AGGATTAACAGTTTTTAGTAATTTTTAGCTACTGTACCAGTTATTGGTGT TTGGTTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAATGATTTTACTTT ACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTACCTTTTATTTTATTAATAATAA TTTTTATGCATTTATTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCGRATGGA</p>

3.4. Alineamientos y árboles filogenéticos para las diferentes especies de *Leishmania*

A partir de las secuencias del gen que codifica para el citocromo b disponibles en el GenBank para las diferentes especies de *Leishmania*, y empleando las secuencias obtenidas mediante el protocolo desarrollado, se creó un árbol filogenético (Figura 14).

a)

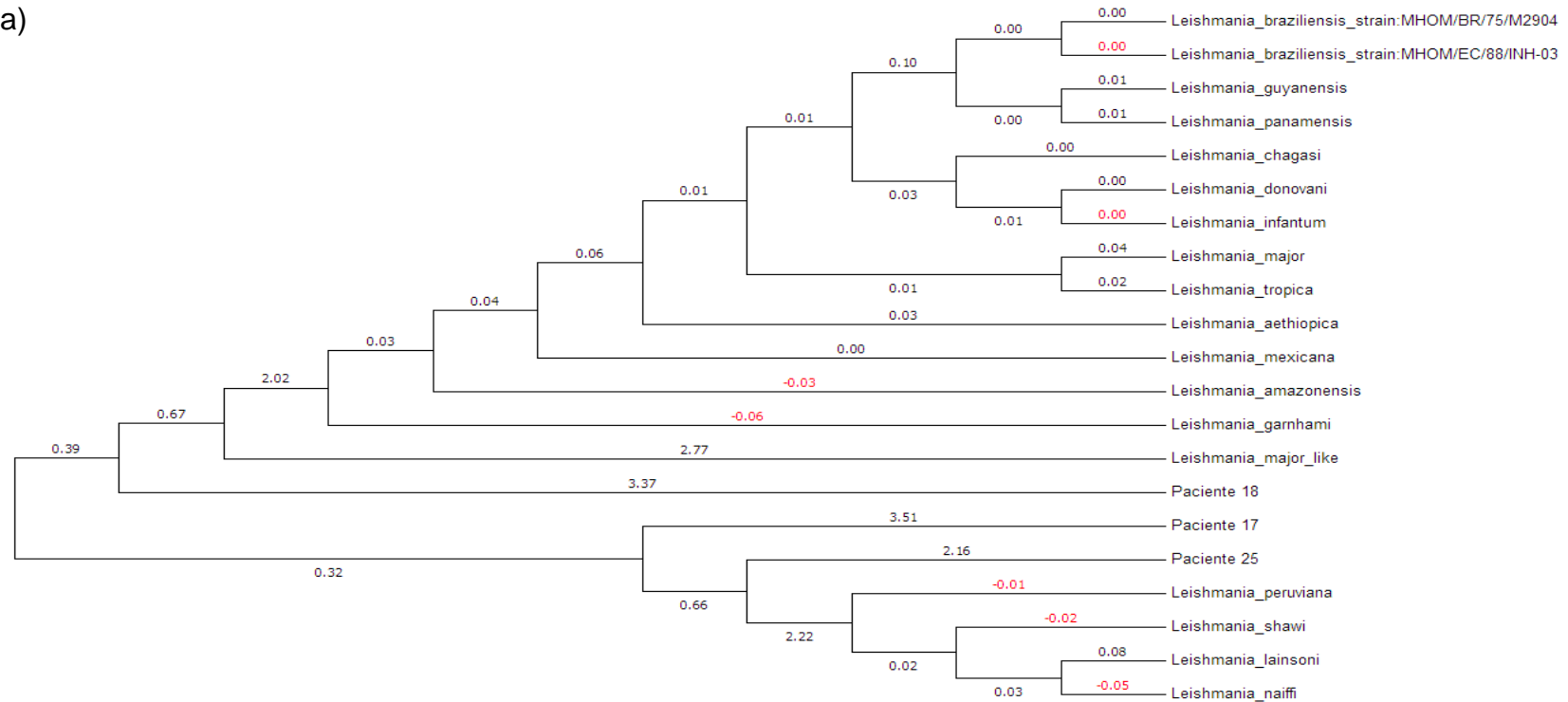


Figura 14. Árbol Filogenético de las especies de *Leishmania* según el gen del cyt b

a) Análisis filogenético entre las secuencias del gen del citocromo b de las diferentes especies de *Leishmania*, disponibles en el GenBank, y las especies identificadas en el presente estudio. Los valores que se indican corresponden al porcentaje de divergencia entre las secuencias.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

Los datos del presente estudio demuestran que para la identificación molecular de las especies de *Leishmania* en muestras de pacientes con la infección son necesarias condiciones definidas tanto para el aislamiento de ADN del parásito así como para la amplificación de los genes que codifican para el 18S rRNA y para el cyt b. La aplicación de estas técnicas moleculares con las modificaciones realizadas en el presente estudio permitieron la identificación molecular de *L. guyanensis*, *L. shawi*, y *L. naiffi* en muestras de raspado y sangre de pacientes infectados con Leishmaniasis.

La especie de *Leishmania* causante de la infección es un factor crucial en el desarrollo de la enfermedad, la respuesta al tratamiento farmacológico y su posible resistencia al tratamiento. Por lo antes expuesto, la identificación de las especies de *Leishmania* es determinante para el manejo clínico y epidemiológico de esta infección (Montalvo, 2011). En las últimas décadas se han desarrollado y mejorado técnicas moleculares para el diagnóstico de una amplia gama de enfermedades, como la Leishmaniasis (Monzote, Ordeñana, Fraga, Montalvo y Montano; 2009). La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, sobresale dentro de éstas técnicas debido a su alta sensibilidad y especificidad (Córdova, Vargas, Hasiguchi, Kato, y Gómez; 2011). Por otro lado, es crítico contar con un protocolo establecido y de fácil aplicación para el análisis molecular que permita no solo detectar la presencia del parásito sino también, identificar la especie de *Leishmania*. En esta investigación se ha desarrollado un protocolo, el cual permite diagnosticar e identificar *Leishmania* a nivel de especie.

El protocolo desarrollado en este estudio se basó en método de Roche® High Pure PCR Template Preparation Kit. Las modificaciones de la adición de RNasa y la reducción del volumen de la reacción total permitió evitar la degradación del ADN y mejoró la concentración final del ADN aislado. Estas modificaciones permitieron además, la amplificación específica de los genes

que codifican para el 18S rRNA y el cyt b.

La especificidad y sensibilidad del método se demostró al estudiar dos de los pacientes reclutados en PVM, que a pesar de tener resultados negativos en el frotis, se les diagnosticó de Leishmaniasis mediante la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA, en las muestra de raspado y de sangre. Al realizar el diagnóstico por técnicas moleculares se elimina el factor de la experticia humana que tiene una gran influencia en el diagnóstico por frotis. En uno de los pacientes del Hospital de Especialidades de las F.F A.A., con sospecha de reactivación de una lesión previa por Leishmaniasis, no se pudo realizar el diagnóstico mediante frotis, pero al realizar la amplificación por PCR del gen que codifica para el del 18S rRNA se detectó el parásito en la muestra del raspado por lo que comenzó nuevamente el tratamiento. Estos datos demuestran que la aplicación del protocolo desarrollado en este estudio permite un diagnóstico más preciso de esta infección.

Es importante anotar que por medio de esta técnica fue posible la identificación de ADN del parásito en pacientes que ya habían instaurado el tratamiento con Glucantime®. El ejemplo más notorio se dio en el paciente que tras haber recibido 22 dosis aún fue posible detectar *Leishmania* en sangre y raspado de la lesión. En los 22 pacientes analizados, que contaban con frotis confirmatorio, y habían recibido varias dosis de Glucantime®, se confirmó en todos el diagnóstico del frotis mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para el del 18S rRNA tanto en sangre como en raspado. No se encontró ningún caso en el que no hubiera amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA si el frotis había dado un resultado positivo. Esto prueba no solo su alta sensibilidad sino también su especificidad.

Es frecuente que se instaure un tratamiento anti-leishmania sin un diagnóstico establecido. El hecho de detectar ADN del parásito tras iniciado el tratamiento tiene un efecto benéfico en el manejo clínico de la infección.

Una de las limitaciones del presente estudio fue el limitado número de pacientes en los que se identificó la especie de *Leishmania*. Esto se puede

deber a varias causas, pero principalmente a que a pesar de contar inicialmente con cantidades razonables de ADN de las muestras biológicas, es posible que las concentraciones del gen que codifica para el citocromo b en el ADN total hayan sido muy bajas. Hay que considerar que el gen que codifica para el citocromo b se encuentra codificado en los maxicírculos del kDNA del parásito y por lo tanto presenta un menor número de copias en comparación con el gen que codifica para el 18S rRNA, codificado en los minicírculos. A pesar de haberse obtenido únicamente 3 resultados para la amplificación del gen que codifica para el cyt b, se logró identificar la especie mediante secuenciación para estos tres productos, lo que demuestra que el protocolo es adecuado para la detección e identificación de *Leishmania* a nivel de especie. Aunque la identificación de la especie del parásito requiere la secuenciación del fragmento del gen que codifica para el cyt b, esta información contribuirá al mejor manejo de los pacientes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo probaron además, que el protocolo permite detectar e identificar *Leishmania*, no solo en muestras de raspado sino que además ha demostrado ser efectivo para muestras de sangre. En otros estudios se han empleado muestras de sangre para el diagnóstico, pero solo en casos de Leishmaniasis visceral por lo que probar que el parásito puede ser detectado e identificado en sangre de pacientes con Leishmaniasis cutánea es de gran utilidad. El uso de sangre para análisis moleculares facilitaría no solo la toma y transporte de la muestra, sino que reduciría la influencia que tiene la experticia de quien la colecta y analiza. Una toma de muestra de sangre es menos invasiva y menos dolorosa para el paciente, principalmente al ser comparada con la toma de muestra por raspado, aspirado o por biopsia; y además, garantiza la esterilidad de la muestra. Una búsqueda exhaustiva de la literatura sobre reportes de identificación de especies de *Leishmania* en Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en muestras de sangre no permitió identificar ningún reporte. El presente estudio es uno de los primeros en demostrar el uso de muestras de sangre para el diagnóstico molecular de Leishmaniasis cutánea.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se desarrolló un protocolo estandarizado de extracción de ADN, que permitió la obtención de material genético de *Leishmania*, a una concentración útil, a partir de muestras de úlceras y de sangre de pacientes infectados.

Los alineamientos y árboles filogenéticos realizados a partir de las secuencias de los genes que codifican para el 18S rRNA y el citocromo b (cyt b) de las especies de *Leishmania* disponibles en GenBank, facilitaron la identificación de *Leishmania* en las muestras de los pacientes.

La aplicación de protocolos desarrollados en el presente estudio para el análisis de muestras de pacientes con sospecha o diagnóstico de Leishmaniasis evidenció que la amplificación por PCR del gen que codifica para la subunidad menor 18S del ARN ribosomal es efectivo para el diagnóstico de esta parasitosis, y permite diferenciar a nivel del género *Leishmania*, con la ventaja de que únicamente requiere de la amplificación por PCR convencional y la posterior comprobación de la misma en geles de agarosa.

A pesar de que solo se logró amplificar el gen que codifica para el cyt b en tres muestras, se pudo identificar a qué especie pertenecían a partir de la secuencia obtenida y su posterior alineamiento.

En base a todo lo antes mencionado, se puede concluir que se logró identificar *Leishmania* a nivel de especie en muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis, mediante técnicas moleculares y secuenciación de ADN.

Se recomienda el protocolo de la presente investigación para el diagnóstico de infecciones causadas por *Leishmania* a partir de la amplificación del gen que codifica para el 18S rRNA. Para la identificación a nivel de especie de éste parásito, se demostró que es efectivo el uso del gen que codifica para el citocromo b, pero se debe optimizar el protocolo aquí desarrollado para que la amplificación se pueda llevar a cabo a partir de concentraciones más bajas de

ADN y por ende, sea útil en muestras de pacientes.

Los protocolos aquí indicados pueden utilizarse para el diagnóstico a partir de muestras de lesiones y más importante aún, a partir de muestras de sangre de pacientes con sospecha de contagio o infección por *Leishmania*.

REFERENCIAS

- Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). (2014). *FDA approves Impavido to treat tropical disease Leishmaniasis*. Recuperado el 20 de abril del 2015 de <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm389671.htm>
- Alvar, J.; Vélez, I.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; y den Boert, M. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671-e35683.
- Beltrán, M.; Durán, P.; y Corredor, L. (2008). La Biología Molecular de *Leishmania* spp. como punto de partida para nuevas alternativas de tratamiento. *Investigaciones Andina*, 16 (10): 81-91.
- Bates, P.; Depaquit, J.; Galati, E.; Kamhawi, S.; Maroli, M.; McDowell, A.; Picado, A.; Ready, P.; Salomón, D.; Shaw, J.; Traub-Csekö, Y.; y Warburg, A. (2015). Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 8: 131-138.
- Bates, P. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10): 1097-1106. Recuperado el 20 de marzo del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675784/#!po=3.12500>
- Calvopina, M.; Armijos, R.; D Marco, J.; Uezato, H.; Kato, H.; Gómez, E.; Korenaga, M.; Barroso, P.; Mimori, T.; Cooper, P.; Nonaka, S.; y Hashiguchi, Y. (2006). *Leishmania* isoenzima polimorfismos en Ecuador: Las relaciones con la distribución geográfica y presentación clínica. *BMC Infectious Diseases*, 6: 136-139.
- Calvopiña, M.; Gomez, E.; Uezato, H.; Kato, H.; Nonaka, S.; y Hashiguchi, Y. (2005). Atypical clinical variants in New World Cutaneous Leishmaniasis: Disseminated, Erysipeloid, and Recidiva Cutis due to *Leishmania* (V.) *Panamensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 2005, pp. 281–284.
- Calvopiña, M.; Loor, R.; Lara, F.; Zambrano, P.; y Hashiguchi, Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha – Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 37: 31-38.

- Canese, A. Domingo, J. y Oddone, R. (2011). *Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis*. Asunción, Paraguay: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
- Cannova, D. (diciembre, 2007). Técnicas de caracterización de *Leishmania* spp y su aporte en la leishmaniasis. *SALUS: Revista de la Facultad de Medicina*, 11: 67-72. Recuperado el 29 de abril del 2015 de http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/caracterizacion_leishmania.pdf
- Cañavate, C.; Cuadros, J.; Martínez, R.; y Martín-Rabadán, P. (2009). El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2014). *Parasites-Leishmaniasis: Resources for Health Professionals*. Recuperado el 29 de abril del 2015 de http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/
- Chena, L.; Nara, E.; Canese, A.; Oddone, R.; y Russomando, G. (2013). Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 11(1). Recuperado el 29 de marzo del 2015 de http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1812-95282013000100007&script=sci_arttext
- Córdova, O.; Vargas, F.; Hashiguchi, Y.; Kato, H.; y Gómez, E. (2011). Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebotomíinos en áreas de transmisión en una región del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28 (3).
- Dawit, G.; Girma, Z.; y Simenew, K. (2013). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 4(2):166-173.
- Downing, T.; Imamura, H.; Decuypere, S.; Clark, T.; Coombs, G.; Cotton, J.; Hilley, J.; de Doncker, S.; Maes, I.; Mottram, J.; Quail, M.; Rijal, S.; Sanders, M.; Schönian, G.; Stark, O.; Sundar, S.; Vanaerschot, M.; Hertz-Fowler, C.; Dujardin, J.; y Berriman, M. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research*, 21(12): 2143–2156.

- Fernández, M. S. (2012). *Eco-epidemiología de vectores de Leishmania spp. en el noreste de la Argentina (Provincia de Misiones)*. (Tesis Doctoral). Recuperado el 20 de marzo del 2015 de http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5161_Fernandez.pdf
- Fernández, T.; y Almeida, R. (2012). Reporte de lesiones mucosas en Leishmaniosis Tegumentaria Americana, en el Litoral (Costa) Ecuatoriano. *Revista De Patología Tropical*, 41 (3): 356-366.
- Fontenele, J.; Freire, T.; Gomes, M.; y Tolentino, M. (2013). Treatment of American tegumentary leishmaniasis in special populations: a summary of evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46 (6): 669-677.
- Foulet, F.; Botterel, F.; Buffet, P.; Morizot, G.; Rivollet, D.; Deniau, M.; Pratlong, F.; Costa, J.; y Bretagne, S. (2007). Detection and Identification of Leishmania Species from Clinical Specimens by Using a Real-Time PCR Assay and Sequencing of the Cytochrome b Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7): 2110–2115.
- González, U.; Pinart, M.; Rengifo-Pardo, M.; Macaya, A.; Alvar, J.; y Tweed, J. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). *The Cochrane Collaboration*, 2: 1-171.
- Guebouj, S.; Mkada-Driss, I.; y Guizani, I. (2014). Molecular Tools for Understanding Eco-Epidemiology, Diversity and Pathogenesis of Leishmania Parasites. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*.
- Hartley, M.; Drexler, S.; Ronet, C.; Beverley, S.; y Fasel, N. (2014). The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends in Patology*, 30(8): 412–422. Recuperado el 20 de marzo del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287268/>
- Hernández, L. C. (2012). *Modulación de las Vías de Señalización del Macrófago por Leishmania sp con Énfasis en la Biosíntesis de Esteroles y Colesterol en el Macrófago*. (Tesis de Pregrado). Recuperado del Repositorio Digital de la Pontificia Universidad Javeriana, el 12 de abril del 2015 de <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/15417/1/HernandezSalarLeidiCarolina2012.pdf>
- Hernández-Montes, O.; González, S.; Martínez, F.; Barker, D.; y Monroy-Ostria, A. (2012). Analysis of Kinetoplast DNA from Mexican Isolates of *Leishmania (L.) mexicana*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012.

- Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia (INS). (2014). *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Leishmaniasis*. Recuperado el 20 de abril del 2014 de http://www.dadiscartagena.gov.co/images/docs/saludpublica/vigilancia/protocolos/pro_leishmaniasis_2014.pdf
- Jojoa, S. (2012). *Detección molecular de Leishmania spp en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas*. (Tesis de Maestría). Recuperado del Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Colombia, el 29 de abril del 2015 de http://www.bdigital.unal.edu.co/8158/1/186311._2012.pdf
- Kato, H.; Calvopiña, M.; Criollo, H.; y Hashiguchi, Y. (2013). First human cases of Leishmania (Viannia) naiffi infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*, 128(3): 710-713.
- Kaur, G.; y Rajput, B. (2014). Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania. *Journal of Parasitology Research*, 2014: 1-11. Recuperado el 05 de abril del 2015 de <http://www.hindawi.com/journals/jpr/2014/726328/>
- Lemrani, M.; Hamdi, S.; Laamrani, A.; y Hassar, M. (2009). PCR Detection of *Leishmania* in skin biopsies. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(2): 115-122. Recuperado el 05 de abril del 2015 de <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/19755741/281>
- Lloveras, S.; Moreno, D.; Bava, A.; y Orduna, T. (2011). El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea: a propósito de un caso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45 (1). Recuperado el 05 de abril del 2015 de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572011000100011&script=sci_arttext
- Lukes, J.; Guilbride, D.; Votýpka, J.; Zíková, A.; Benne, R.; y Englund, P. (2002). Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*, 1(4): 495–502. Recuperado el 09 de mayo del 2015 de <http://www.parazitologie.cz/protozoologie/Personal%20homepages/Votypka/Kinetoplast%20Review.pdf>
- Luna, A.; Michelena, M.; Fleming, C.; Arena, G.; Chiavassa, A.; y Rafti P. (2012). Leishmaniasis mucocutánea con afectación laríngea. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 40(5):154-157. Recuperado el 28 de marzo del 2015 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2012/mc125d.pdf>

- Marcili, A.; Sperança, M.; da Costaa, A.; Madeirac, M.; Soares, H.; Sanches, C.; Acostaa, I.; Girottoa, A.; Minervinoa, A.; Horta, M.; Shawe, J.; y Gennari, S. (2014). Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 25: 44-51.
- Marco, J.; Uezato, H.; Mimori, T.; Barroso, P.; Korenaga, M.; Nonaka, S.; Basombrío, M.; Taranto, N.; y Hashiguchi, Y. (2006). Are cytochrome B gene Sequencing and Polymorphism-Specific Polymerase Chain Reaction as reliable as Multilocus Enzyme Electrophoresis for Identifying *Leishmania* spp. from Argentina?. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75 (2): 256-260.
- Marín, C.; Longoni, S.; y Sánchez-Moreno, M. (2012). *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogen. Chapter 8: Leishmania*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=1GvMBQAAQBAJ&pg=PA92&lpg=PA92&dq=leishmania+morphology&source=bl&ots=WNdFNqvCyx&sig=sM0FHpxlGQDcMr4ku2Z_ivjPIGE&hl=es&sa=X&ei=tf0sVYL4CsLCggTRmoAl&ved=0CEYQ6AEwBjgU#v=onepage&q=leishmania%20morphology&f=false
- Minaya, g.; Vargas, S.; Monteza, Y.; Purisca, E.; y Delgado F. (2014). Especificidad de la prueba intradérmica de Montenegro en pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* procedentes de diferentes regiones del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2): 278-281.
- Ministerio de la Protección Social de Colombia (MPS). (2010). *Guía para la Atención Clínica Integral del Paciente con Leishmaniasis*. Plan Nacional de Salud Pública. Recuperado el 28 de marzo del 2015 de <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/02%20Clinica%20Leishmaniasis.pdf>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). (2015). *Gaceta Epidemiológica Semanal-Semana Epidemiológica no. 7*, 7: 1-37. Recuperado el 20 de marzo del 2015 de <http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2015/gaceta7.pdf>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). (2013). *Manual de procedimientos del Subsistema alerta acción SIVE-ALERTA*. (Segunda edición). Quito: MSP.

- Recuperado el 30 de enero del 2015 de https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual_de_procedimientos_sive-alerta.pdf
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology*, 4 (1): 4-9. Recuperado el 30 de abril del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992802/>
- Montalvo, A.M. (2011). *Tipificación de especies de Leishmania de importancia médica basada en el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática*. (Tesis doctoral). Recuperado del Repositorio Digital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", el 10 de abril del 2015
- Montalvo, A.; Fraga, J.; Monzote, L.; García, M.; y Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(2): 108-131.
- Montalvo, A.; Fraga, J.; Rodríguez, O.; Blanco, O.; Llanos-Cuentas, A.; García, A.; Valencia, B.; Muskus, C.; Van der Auwera, G.; y Requena, J. (2014). Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(4). Recuperado el 03 de abril del 2015 de http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1726-46342014000400004&script=sci_arttext
- Montealegre, I. (2010). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. *NOVA*, 8 (8): 128-132. Recuperado el 30 de marzo del 2015 de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_EDITORIAL.pdf
- Montenegro, J.; Montañez, R.; Chian, C.; y Benites, C. (2014). Leishmaniasis mucocutánea en un paciente con infección por VIH: Case report. *Revista chilena de infectología*, 31(5): 610-614. Recuperado en 05 de abril de 2015, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000500015
- Monzote, L.; Ordeñana, R., Fraga, J.; Montalvo, A.; y Montano, I. (2009). Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(2).
- Mouri, O.; Morizot, G.; Van der Auwera, G.; Ravel, C.; Passet, M.; Chartrel, N.; Joly, I.; Thellier, M.; Jaureguiberry, S.; Caumes, E.; Mazier, D.; Marinach-Patrice,

- C.; y Buffet, P. (2014). Easy Identification of Leishmania Species by Mass Spectrometry. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(6): e2841-e2853. Recuperado en 01 de abril de 2015, de <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002841>
- Nocua, P.; Ramírez, C.; Requena, J.; y Puerta, C. (2011). Secuencia parcial del genoma del maxicírculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos. *Universitas Scientiarum*, 16(1): 29-50. Recuperado en 09 de mayo de 2015, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-74832011000100003&script=sci_arttext
- Nógalo, A.; Molina, S.; Norry, G.; Romano, S.; y Lorenz, A. (2012). Leishmaniasis cutánea primaria. *Dermatología Argentina*, 18 (3): 228- 230. Recuperado en 01 de abril de 2015, de <http://www.dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/article/viewfile/853/506>
- Nzelua, Ch.; Gomez, E.; Cáceres, A.; Sakuraia, T.; Martini-Roblese, L.; Uezato, H.; Mimorig, T.; Katakura, K.; Hashiguchi, Y.; y Kato, H. (2014). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*, 132(1): 1-6.
- Oliveira, L.; Schubach, A.; Martins, M.; Passos, S.; Oliveira, R.; Marzochi, M.; y Andrade, C. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118 (2): 87-96.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). *Global Health Observatory*. Recuperado el 15 de enero del 2015 de <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias - Segunda edición*. Recuperado el 15 de abril del 2015 de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.4.3.html>
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). (2013). *Salud en las Américas: Ecuador*. Recuperado el 10 de febrero del 2015 de http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?id=40&option=com_content

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2011). *Normas y Estándares en Epidemiología: Calendario epidemiológico 2000*. Recuperado el 10 de marzo del 2015 de <http://www.who.int/topics/epidemiology/es/>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2013). *Leishmaniasis en las Américas: Recomendaciones para el Tratamiento*. Recuperado el 20 de marzo del 2015 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid
- Peacock, Ch.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J.; Quail, M.; Peters, N.; Adlem, E.; Tivey, A.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Ivens, A.; Fraser, A.; Rajandream, M.; Carver, Y.; Norbertczak, H.; Chillingworth, T.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Ormond, D.; Rutter, S.; Squares, R.; Whitehead, S.; Rabinowitsch, E.; Arrowsmith, C.; White, B.; Thurston, S.; Bringaud, F.; Baldauf, S.; Faulconbridge, A.; Jeffares, D.; Depledge, D.; Oyola, S.; Hilley, J.; Brito, L.; Tosi, L.; Barrell, B.; Cruz, A.; Mottram, J.; Smith, D.; y Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39(7): 839-847.
- Prieto, L.; La Orden, E.; Guillén, S.; Salcedo, E.; García, C.; García, I.; y Ramos, J. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis visceral infantil. *Anales de Pediatría*, 72(5):347–351. Recuperado el 06 de abril del 2015 de <http://analesdepediatria.org/es/diagnostico-tratamiento-leishmaniasis-visceral-infantil/articulo/S1695403310001062/>
- Rabes, T.; Baquero, F.; y García, M. (2010). Revisiones: Leishmaniasis cutánea. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12(46): 263-271. Recuperado el 28 de marzo del 2015 de http://www.pap.es/files/1116-1062-pdf/263-271_Leishmaniasis%20cutanea.pdf
- Reveiz, L.; Maia-Elkhoury, A.; Nicholls, R.; Sierra, G.; y Yadon, Z. (2013). Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS ONE*, 8(4): e61843- e61857.
- Rios, J.; y Yuil, E. (2010). Métodos Diagnósticos Parasitológicos, Inmunológicos, Histopatológicos y Moleculares de Leishmaniasis Cutánea. *Revista Médico Científica*, 23 (2): 45-60. Recuperado el 10 de abril del 2015 de http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/260/pdf_13

- Rodrigues, E.; Soares, F.; Werkhäuser, R.; de Brito, M.; Fernandes, O.; Abath F.; y Brandão, A. (2013). The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 7(6): 228-234.
- Rogers, M.; Hilley, J.; Dickens, N.; Wilkes, J.; Bates, P.; Depledge, P.; Harris, D.; Her, Y.; Herzyk, P.; Imamura, H.; Otto, T.; Sanders, M.; Seeger, K.; Dujardin, J.; Berriman, M.; Smith, D.; Hertz-Fowler, Ch.; y Mottram, J. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21(12): 2129–2142. Recuperado el 10 de mayo del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227102/>
- Rojas, E.; Guzmán, M.; Verduguez, A.; y Montaña, V. (2010). Utilidad de la prueba de Montenegro (IDRM) como herramienta para la vigilancia epidemiológica de Leishmaniasis cutánea en áreas de Bolivia donde coexiste la infección por *Leishmania spp* y *T. cruzi*. *Gaceta Médica Boliviana*, 35(82): 55-58.
- Saab, M.; El Hage, H.; Charafeddine, K.; Habib, R.; y Khalifeh, I. (2015). Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis: Why Punch When You Can Scrape? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3): 518-522.
- Sainz, O. M. (2013). *Leishmaniasis transmission biology: Role of Promastigote Secretory Gel as a transmission determinant*. (Tesis Doctoral). Recuperado del Repositorio Digital del London School of Hygiene & Tropical Medicine el 28 de marzo del 2015
- Salomón, O.; Mastrángelo, A.; Santini, M.; Ruvinsky, S.; Orduna, T.; Sinagra, A.; Luna, C.; Riarte, A.; Casas, N.; y Amiotti, P. (2012). Leishmaniasis visceral: senderos que confluyen, se bifurcan. *Salud Colectiva*, 8(1): 49-63. Recuperado el 29 de marzo del 2015 de www.redalyc.org/articulo.oa?id=73125064008
- Shapiro, L. (2012). *Leishmania donovani: Classified by NCBI Taxonomy*. Recuperado el 10 de marzo del 2015 de <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- Smith, D.; Peacock, Ch.; y Cruz, A. (2007). Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, 37 (11): 1173–1186. Recuperado el 09 de mayo del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907001919>
- Sterkers, Y.; Lachaud, L.; Bourgeois, N.; Crobu, L.; Bastien, P.; y Pagès, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in

- Leishmania. *Molecular Microbiology*, 86(1):15-23. Recuperado el 09 de mayo del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22857263>
- Sundar, S.; Singh, A.; y Singh, O. (2014). Strategies to Overcome Antileishmanial Drugs Unresponsiveness. *Journal of Tropical Medicine*, 2014: 1-7. Recuperado el 10 de mayo del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876851>
- Teixeira, D.; Benchimol, M.; Rodrigues, J.; Crepaldi, P.; Pimenta, P.; y de Souza, W. (2013). The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathogens*, 9(10): e1003594 - e1003597.
- The Center for Food Security and Public Health. (2009). *Leishmaniasis (Cutánea y Visceral)*. Iowa, Estados Unidos: Iowa State University. Recuperado el 25 de enero del 2015 de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>
- Tsokana, C.; Athanasiou, L.; Valiakos, G.; Spyrou, V.; Manolakou, K.; y Billinis, Ch. (2014). Chapter 8: Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Recuperado el 10 de abril del 2015 de <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment>
- Von Stebut, E. (2015). Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 13: 191–201. Recuperado el 10 de marzo del 2015 de <http://hinarilogin.research4life.org/uniquesigonlinelibrary.wiley.com/uniquesig0/doi/10.1111/ddg.12595/epdf>
- Weirather, J.; Jeronimo, S.; Gautam, S.; Sundar, S.; Kang, M.; Kurtz, M.; Haque, R.; Schriefer, A.; Talhari, S.; Carvalho, E.; Donelson, J.; y Wilson, M. (2011). Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (11): 3892–3904
- Wilson, A.; Dhiman, R.; Kitron, U.; Scott, T.; van den Berg, H.; y Lindsay, S. (2014) Benefit of Insecticide-Treated Nets, Curtains and Screening on Vector Borne Diseases, Excluding Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10): e3228 – e3240.
- Yang, B.; Chen, D.; Chen, J.; Liao, L.; Hu, X.; Xu, J. (2013). Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. *Parasites & Vectors*, 6: 32-43.

ANEXOS

Anexo 1

Formulario Consentimiento Informado Universidad de las Américas Comité de Bioética

Título de la investigación:

“Identificación de especies de *Leishmania*, en cultivos obtenidos a partir de muestras de pacientes **infectados con Leishmaniasis**”.

Versión y Fecha: 001, 10 de Junio del 2014.

Organización del investigador: Centro de Investigaciones Translacional - Universidad de las Américas (CIT-UDLA).

Nombre del investigador principal: Dr. Manuel E. Baldeón.

Co-investigadores: Dr. Paul Cárdenas (CIT-UDLA)
Ing. Stephanie Santander (CIT-UDLA)
Erika Muñoz, tesista (UDLA)

Número telefónico y correo electrónico del investigador principal: 0983356787
mbaldeon@udla.edu.ec

1. Introducción

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que pretende identificar el tipo de *Leishmania* (parásito) que está causando la llaga en su piel, mediante técnicas de laboratorio especiales. Los resultados de este estudio van a contribuir a que se conozca la especie del parásito que causa la infección en las regiones del Noroccidente de la provincia de Pichincha y su relación con la gravedad de la infección y potencial resistencia del parásito al tratamiento actual con Glucantime®.

En este estudio pueden participar voluntarios que presenten úlceras o lesiones en la piel y las mucosas por el parásito *Leishmania*.

Su participación es una elección; tome el tiempo necesario para tomar la decisión y analícela detenidamente.

Este documento incluye un resumen de la información que los investigadores analizarán con usted.

Si usted decide participar en el estudio, recibirá una copia de este formulario.

Por favor, haga todas las preguntas o inquietudes que tenga sobre el estudio.

2. ¿Por qué se está realizando este estudio de investigación?

La infección con el parásito *Leishmania* es muy frecuente en el Ecuador y en otras partes del mundo. En este estudio se pretende identificar los diferentes tipos de este parásito y su resistencia a los medicamentos que se utilizan para su tratamiento. Los resultados que se obtengan de este estudio pueden contribuir a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de esta infección.

Continuación Anexo 1

3. ¿Hay algún beneficio por participar en el estudio?

Si bien no hay un beneficio directo, usted recibirá un diagnóstico de la infección para el cual se utilizarán métodos de laboratorio muy precisos para su mejor tratamiento. Además este estudio es de gran beneficio para la sociedad ya que mediante los resultados obtenidos se podrá entender de mejor manera el parásito que causa esta grave infección. Los hallazgos de la investigación llevarían a desarrollar mejores formas de diagnóstico y tratamiento de esta infección. En el área de la salud pública, este estudio contribuirá a comprender mejor uno de los problemas infecciosos de salud pública más importantes de la sociedad.

4. ¿Cuántas personas participarán en el estudio?

En este estudio participarán todas las personas que tengan lesiones de infección por *Leishmania* que asistan al Centro de Salud de Pedro Vicente Maldonado o que vivan en sus alrededores durante el periodo del presente estudio. Se espera al menos tener 30 personas que presenten la lesión por la infección por este parásito.

5. ¿En qué consiste el estudio?

La investigación consiste en tomar una muestra de las lesiones debidas a la infección por el parásito *Leishmania*, colocar la muestra en un medio de cultivo especial, establecer el cultivo para cada parásito de cada paciente y extraer el DNA directamente de las muestras para identificar la especie de *Leishmania* utilizando métodos moleculares de laboratorio, y determinar la sensibilidad de los parásitos aislados al Glucantime® en el laboratorio.

6. ¿Cuánto tiempo durará mi participación en el estudio?

La participación durará alrededor de media hora, tiempo en el cual se tomarán las muestras de las lesiones.

7. ¿Cuáles son los riesgos de participar en este estudio?

Los riesgos son los mismos que tiene una persona cuando va a realizarse un examen para el tratamiento de esta infección y al realizarse una toma de muestra de sangre. Este estudio no cambia el tratamiento médico que usted recibiría en caso de que no participare en este estudio. En otras palabras, usted será tratado de la misma manera participe o no en este estudio.

8. ¿La información o muestras que doy son confidenciales?

Sí, su privacidad es importante para nosotros. Haremos todo lo posible para mantener en forma confidencial toda su información personal. Para proteger su privacidad la información y muestras tomadas tendrán un código el cual ingresará a una base de datos con los resultados de las pruebas realizadas, solo la persona que tomará la muestra conocerá su nombre y será la única encargada de entregarle sus resultados al final del estudio. Su nombre no será mencionado en las publicaciones o reportes de la investigación.

Continuación Anexo 1

9. ¿Qué otras opciones tengo?

Usted puede decidir NO participar ya sea porque se siente incómodo con alguno de los procedimientos o porque no resulta de su interés.

10. ¿Cuáles son los costos del estudio de investigación?

La investigación No tiene costo para usted. Las siguientes instituciones financian esta investigación: Centro de Investigación Translacional-Universidad de las Américas (CIT-UDLA).

11. ¿Me pagarán por participar en el estudio?

Usted NO recibirá dinero por participar en este estudio.

12. ¿Cuáles son mis derechos como participante de este estudio?

Su participación en este estudio es voluntaria; es decir, usted puede decidir NO participar. Además, si usted decide participar, puede retirarse del estudio en cualquier momento; para hacerlo debe ponerse en contacto con los investigadores mencionados en este formulario de consentimiento informado.

NO habrá sanciones si usted decide no participar o decide retirarse del estudio.

13. ¿A quién debo llamar si tengo preguntas o problemas?

Si usted tiene alguna pregunta acerca del estudio, llame o envíe un mensaje de correo electrónico a:

Dr. Manuel E. Baldeón, Director del Proyecto (Centro Translacional de Investigación-UDLA),
Telf:3981000/3970000 ext. 662;
Cel: 0983356787
e-mail: mbaldeon@udla.edu.ec.

Diego Chauvin, Presidente del Comité de Bioética de la UDLA,
Telf: 398-1000 ext: 116
e-mail: dchauvin@udla.edu.ec

Continuación Anexo 1

14. El consentimiento informado

Comprendo mi participación y los riesgos y beneficios de participar en este estudio de investigación. He tenido el tiempo suficiente para revisarlo y el lenguaje del consentimiento fue claro y comprensible. Todas mis preguntas como participante fueron contestadas. Me han entregado una copia del formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente el participar en este estudio de investigación.

Firma del participante o representante legal

Fecha

Nombre del investigador que obtiene el consentimiento

Firma del investigador

Fecha

Anexo 2

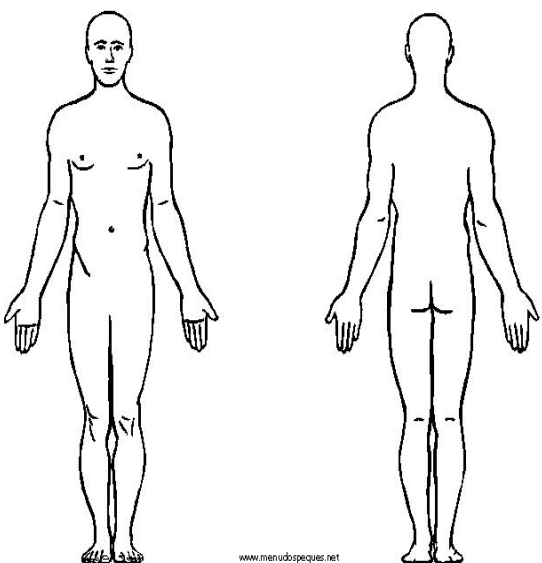
GUIA PARA RECOLECCION DE MUESTRAS DE LEISHMANIASIS

PARTE 1. Informacion del paciente

Nombre:	Genero: M F	C.I.:
*Probable lugar de adquisicion:	Edad:	
	Fecha de nacimiento:	

*Reside en el area de transmision de Leishmania, historia de viaje, etc.

PARTE 2. Informacion Clinica

Número de lesiones:	Duracion de lesiones antiguas:
Localizacion de lesion:	Mucosas comprometidas*: SI NO
	Signos y Sintomas: Pruritus (Picason) Dolor Sangrado Exudado/drenacion Otros:
	Tamaño de Lesion: cm
	Caracteristicas de lesion:
	Ulcera Nodulo Papula Ovalada Redonda Con bordes Sin bordes

*Evidencia de comprometimiento de mucosas incluye cualquiera de las siguientes: eritema/infiltracion de la mucosa nasal, labios, paladar; hipo o disfonía; disfagia; epistaxis recurrente; estridor; dispnea

PARTE 3. Informacion de la muestras

FECHA:	LUGAR:	Observacion:
Metodo de colleccion:		
Aspirado	Raspado	biopsia

PARTE 4. Información de contacto

Nombre:		
Domicilio:	Ciudad, Provincia:	Email:
	Teléfono:	

Continuación Anexo 2

<u>Instructions for Specimen Collection</u> Collection Method	Necessary Materials	Instructions
I. Lesion Aspirate	<ol style="list-style-type: none"> 1. Topical antiseptic 2. Sterile gloves 3. 25-27 gauge needle 4. 1-3 cc syringe 5. Sterile normal saline 6. Sterile gauze pads 7. Band-aid 8. Transport medium and container 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Clean skin lesion with topical antiseptic, and allow to air dry 2. Draw 0.1 – 0.2 mL sterile NS into syringe, and insert needle tangentially into ulcer base or border 3. Rotate needle back and forth, gently, and slowly aspirate tissue fluids (should be pink tinged) 4. Transfer aspirated fluid from syringe to transport medium 5. Label transport container with patient name, MRN, date, and specimen site 6. Complete Parts I – IV of specimen collection guide
II. Lesion Scraping	<ol style="list-style-type: none"> 1. Topical antiseptic 2. Sterile gloves 3. 25-27 gauge needle 4. 1-3 cc syringe 5. 1-2% lidocaine ± epinephrine (or suitable local anesthetic) 6. 10-blade scalpel 7. Sterile gauze pads 8. Band-aid/tape 9. Transport medium and container 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Clean skin lesion with topical antiseptic, and allow to air dry 2. Infiltrate lesion superficially with local anesthetic, and wait ~5 minutes to achieve anesthesia of the lesion 3. Scrape the ulcer/lesion base with scalpel <u>superficially</u>, but do not incise the lesion 4. Dress lesion appropriately (bleeding should be minimal; oozing may occur) 5. Transfer scraped material from scalpel blade to the transport medium 6. Label transport container with patient name, MRN, date, and specimen site 7. Complete Parts I – IV of specimen collection guide
III. Biopsy	<ol style="list-style-type: none"> 1. Topical antiseptic 2. Sterile gloves 3. 25-27 gauge needle 4. 1-3 cc syringe 5. 1-2% lidocaine ± epinephrine (or suitable local anesthetic) 6. Small (~4 mm) punch biopsy 7. Suture materials (needle driver, sutures) 8. Sterile gauze pads 9. Band-aid/tape 10. Transport medium and container 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Clean skin lesion with topical antiseptic, and allow to air dry 2. Infiltrate lesion completely with local anesthetic, and wait ~5 minutes to achieve anesthesia of the lesion 3. Using a small (~4 mm or less) punch biopsy, sample outer/rolled border of ulcer down to the level of the dermis, at least 4. Transfer biopsy specimen to transport medium 5. Close and dress wound as appropriate 6. Label transport container with patient name, MRN, date, and specimen site 7. Complete Parts I – IV of specimen collection guide

Anexo 3

Universidad de las Américas - Centro de Investigación Traslacional

Proyecto: Identificación de especies de *Leishmania*, a partir de muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis

Nombre:	Edad: años
C.I.:	Género: M F
Domicilio:	Lugar de nacimiento:

¿Enfermedades importantes?	SI	NO
Hipertensión Diabetes Sobrepeso Mal nutrición Cáncer Problemas inmunológicos Otros:		

¿Infección previa por Leishmaniasis?

Cuándo:	Duración:
¿Tratamiento recibido? SI NO	Tipo de Tratamiento:
Dosis:	¿Culminó el tratamiento? SI NO
¿Tratamiento exitoso? SI NO	¿Otro tratamiento recibido a la par con el tratamiento de Leishmaniasis? SI NO
¿Identificación especie de Leishmania? Especie:	Cuál:
Efectos indeseables del tratamiento:	Dosis:
Duración:	
¿Reincidencia? SI NO	Número de veces:

Infección Actual

Cuándo:	Duración:
¿Tratamiento recibido? SI NO	Tipo de Tratamiento:
Dosis:	Efectos indeseables del tratamiento:

¿Parientes inmediatos infectados con Leishmaniasis? SI NO
¿Quién/es? SI NO
¿Habitan en los alrededores? SI NO
Lugar: SI NO

Anexo 4

Descripción de los pacientes, sus lesiones y el tipo de muestra obtenida

	# Paciente	Edad (años)	Género	Posible lugar de infección	Tratamiento	Lesiones		Tipo de muestra clínica		
						Número	Características	S	R	A
Santo Domingo de los Tsáchilas	1	6	M	Vía a Recinto Mulaute	Ninguno	3 en rostro; 1 en pierna y en hombro dcho.	Úlceras de hace 3 meses; presenta dolor			x
	2	6	M	Recinto 12 de Octubre	Ninguno	1 en quijada y 1 en antebrazo dcho.	Úlceras, costrosas, con bordes definidos; de hace 2 semanas			x
	3	27	F	Recinto 12 de Octubre	3 dosis Glucantime®; hace 1 año	1 en codo izq.	Reactivación úlcera de hace más de 1 año; embarazo 5 meses			x
	4	10	M	Recinto 18 de Noviembre	Ninguno	4 en pantorrilla dcha.	Nódulo sin bordes definidos; hace 1 semana			x
	5	15	F	Recinto Mangaloma	1 mes de pastillas para hinchazón y dolor	1 en frente	Úlcera de hace 5 semanas; presenta prurito y dolor			x
	6	6	M	Recinto Mangaloma	Ninguno	1 en pantorrilla izq.	Úlcera con bordes definidos; de hace 3 semanas			x
	7	8	M	Recinto Mangaloma	Ninguno	1 entre labio superior y fosa nasal dcha.	Úlcera sin bordes definidos; de hace 4 días			x
	8	5	M	Recinto La Lorena	10 dosis de Glucantime®	1 en pelvis dcha.	Úlcera sin bordes definidos; de hace 3 semanas			x
	9	11	M	Recinto La Lorena	Ninguno	1 en pantorrilla dcha.	Úlcera con bordes definidos; de hace 9 días			x
	10	9	M	Recinto La Lorena	2 dosis Glucantime®	1 en empeine pie dcho.	Úlcera con bordes definidos; de hace 1 mes			x
	11	9	F	Recinto La Lorena	Ninguno	1 en antebrazo dcho.	Nódulo sin bordes definidos			x
	12	41	M	Recinto Mangaloma	1 dosis Glucantime®	1 en empeine pie izq.	Úlcera con bordes definidos; de hace 22 días			x
	13	27	F	Barrio El Placer	1 pastilla para el dolor hace 1 mes	1 en antebrazo izq.	Úlcera con bordes definidos; de hace 6 semanas; presenta prurito y dolor			x

Continuación Anexo 4

	# Paciente	Edad (años)	Género	Posible lugar de infección	Tratamiento	Lesiones		Tipo de muestra clínica		
						Número	Características	S	R	A
Centro de Salud No. 17 Pedro Vicente Maldonado	14	45	F	Recinto Eloy Alfaro	22 dosis Glucantime®	1 diseminada por toda la espalda	Úlcera con bordes definidos; desde hace 4 meses	x	x	x
	15	14	M	Recinto La Celica	2 dosis Glucantime®	1 en muñeca dcha.	Úlcera sin bordes sobreelevados; desde hace 1 mes	x	x	
	16	12	M	Recinto El Cisne	4 dosis Glucantime®	1 junto a comisura dcha. de los labios	Úlcera con bordes definidos; desde hace 3 semanas	x	x	x
	17	25	F	Visita a PVM-Recinto El Cisne	1 pastilla (antibiótico)	1 en brazo superior derecho	Úlcera con bordes definidos y sobreelevados; desde hace 1 meses	x	x	x
	18	12	M	Recinto Industria	3 dosis Glucantime®	1 encima de ceja dcha.	Úlcera sin bordes sobreelevados; desde hace 7 semanas	x	x	x
	19	60	M	Recinto La Conda	11 dosis Glucantime®	1 en muñeca dcha.	Úlcera sin bordes sobreelevados; desde hace 3 meses	x	x	x
	20	7 meses	M	PVM-Recinto Monte Olivo	18 dosis Glucantime®	1 junto al ombligo; 2 en rodilla dcha.	Úlcera sin bordes sobreelevados; desde hace 2 meses	x	x	x
	21	61	M	Lago Agrio	2 dosis Glucantime®	2 en pierna izq.	Úlceras con bordes irregulares; presentan exudado y drenacón; desde hace 2 semanas. NOTA: paciente con tumor cervical	x	x	x
	22	22	F	Recinto Cielo Verde	8 dosis Glucantime®	1 diseminada por sobre las cejas, sobre la nariz y parte de las dos mejillas	Úlcera con bordes irregulares; presenta dolor; desde hace 3 meses. NOTA: embarazo de 2 meses y leve retraso mental	x	x	x
	23	9	M	Recinto La Celica	12 dosis Glucantime®	1 en muñeca dcha.	Úlcera con bordes definidos y sobreelevados; desde hace 5 meses	x	x	x
24	26	F	Recinto El Progreso	7 dosis Glucantime®	3 en brazo superior derecho	Úlcera con bordes definidos; presenta exudado; desde hace 3 semanas	x	x	x	

Continuación Anexo 4

	# Paciente	Edad (años)	Género	Posible lugar de infección	Tratamiento	Lesiones		Tipo de muestra clínica		
						Número	Características	S	R	A
Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas No.1	25	23	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	2 dosis Glucantime®	1 en antebrazo izq.	Úlcera sin bordes sobreelevados; presenta dolor por contacto; desde hace 3 meses	x	x	x
	26	26	M	Viaje a Santo Domingo de los Tsáchilas	1 dosis Glucantime®	1 en antebrazo dcho.	Úlcera con bordes sobreelevados y definidos; desde hace 2 meses	x	x	x
	27	11	F	Viaje a Quinindé	Curaciones con suero fisiológico y Sablón; por una semana	1 en dedo índice izq.	Pápula, presenta dolor e hinchazón; desde hace 1 mes	x	x	x
	28	22	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	Ninguno	2 en la coyuntura de la rodilla izq.	Úlcera con bordes definidos; desde hace 5 meses	x	x	x
	29	24	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	Ninguno	1 en mejilla dcha.	Úlcera con bordes definidos; desde hace 1 mes	x	x	x
	30	23	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	Ninguno	1 en antebrazo izq.	Úlcera sin bordes definidos; presenta dolor; desde hace 5 semanas	x	x	x
	31	25	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	Ninguno	1 en muñeca dcha.	Úlcera con bordes definidos; desde hace 3 mes	x	x	x
	32	27	M	Viaje a Pedro Vicente Maldonado	Ninguno	1 en muslo dcho.	Úlcera con bordes definidos; desde hace 2 meses	x	x	x
	33	30	M	Reactivación lesión de hace 6 meses	Posible reactivación luego de terminadas 28 dosis de Glucantime®	1 en sien izq.; junto a lesión previa ya cicatrizada	Úlcera en proceso de cicatrización, de bordes definidos; desde hace 1 meses	x	x	x
	34	25	M	Viaje a Santo Domingo de los Tsáchilas	Ninguno	1 en omóplato	Úlcera con bordes definidos; desde hace 4 mes	x	x	x
35	41	M	El Coca-Base Militar Shangrilá	Ninguno	1 en brazo dcho.	Úlcera sin bordes definidos; desde hace 1 semana	x	x	x	

Nota: la letra M corresponde al género masculino y la F al género femenino; la letra S corresponde a la muestra de sangre periférico, la R a la muestra por raspado, y la letra A corresponde a la muestra por aspirado.