

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA
SELADIS

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE PAGE
LOCK GEL EN LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
Leishmania POR EL METODO FENOL-
CLOROFORMO PARA EL DIAGNOSTICO POR LA
PCR**

POSTULANTE :

UNIV. ELEANOR LIVIA AGUILAR OCAMPO.

TESINA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA

2008

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA
SELADIS

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE PAGE
LOCK GEL EN LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
Leishmania POR EL METODO FENOL-
CLOROFORMO PARA EL DIAGNOSTICO POR LA
PCR**

POSTULANTE : UNIV. ELEANOR LIVIA AGUILAR OCAMPO.
ASESORA : DRA. SUSANA REVOLLO ZEPITA Ph.D
COASESORA : DRA. YASHIRA CERRUTO NUÑEZ.

TESINA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA
2008

El presente trabajo ha sido realizado bajo el marco del Proyecto de Enfermedades Infecciosas **ASDI-SAREC**, con la colaboración del Proyecto de Salud Río Beni **PSRB** y la Casa Importadora de Material de Laboratorio **CORIMEX**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a cada uno de los integrantes de mi gran familia, por la orientación y apoyo que siempre me brindaron y me brindan, y a mi nueva pequeña familia por comprenderme y apoyarme en la conclusión de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto SELADIS, por haber permitido la realización del presente trabajo de investigación, a la Dra. Susana Revollo Zepita, y en especial a la Dra. Yashira Cerruto Nuñez por su asesoramiento y por su amistad.

Al Proyecto de Salud Río Beni, por su colaboración desinteresada, en especial al Sr. Antonio Mendía.

A la Lic. Maria Esther Chuquimia por ser compañera y amiga en la interesante aventura de conocer nuevas zonas de nuestro país.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.- En Bolivia, actualmente la enfermedad de la leishmaniasis, tiene presencia en los nueve departamentos, presentando una tasa de prevalencia de 32,7/cada 100.000 Hab. en el 2006, constituyéndose así en un problema de salud pública que requiere una urgente atención, principalmente mejorando los métodos de diagnóstico.

JUSTIFICACION.- La PCR ha presentado una sensibilidad y especificidad próximas al 100%, en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, sin embargo su reproducibilidad se ha visto afectada por el método de extracción de ADN empleado, pues existen diversos métodos de extracción con rendimientos variables; por esta razón la industria va creando nuevos productos con el fin de permitir mejorar el rendimiento de estos métodos de extracción, tal el caso de Page Lock Gel (PLG), que ofrece mejorar el método de extracción de ADN por fenol-cloroformo, un método de bajo costo, aplicable a distintos tipos de muestras con un alto rendimiento. Lo que plantea la necesidad de EVALUAR EXPERIMENTALMENTE éste producto para su empleo en el Diagnóstico de Leishmaniasis.

OBJETIVO.- Evaluar la efectividad de PAGE LOCK GEL en la extracción de ADN de *Leishmania* por el método fenol cloroformo para el diagnóstico por la PCR.

METODOLOGÍA.- La metodología adoptada fue, el **Estudio experimental comparativo**. Se estudio un total de 29 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis, atendidos por el Proyecto de Salud Río Beni de Rurrenabaque, durante el último trimestre del 2006. Se tomo muestras de sangre (29) y de lesiones (21), cuando las lesiones estaban activas. Se extrajo ADN por el método fenol-cloroformo con y sin PLG, de cada una de las muestras, luego se evaluó las diferencias obtenidas por electroforesis en geles de agarosa y espectrofotometría UV a 260 y 280 nm; y se realizó PCR con los ADNs extraídos por fenol-cloroformo con PLG, con controles de inhibición, para el diagnóstico de Leishmaniasis.

RESULTADOS.-La aplicación de PLG durante la extracción de ADN produjo, tanto en muestras de sangre como de lesión produjo mejoras en ADN extraído, en la concentración de ADN hubo un incremento del 10 a 40% y hubo un aumento de las muestras con alto índice de pureza en un 31 a 33 % más que las obtenidas sin el empleo de PLG. No se evidencio la presencia de inhibidores para la PCR en los ADN extraídos con PLG.

CONCLUSIÓN.- PLG incrementa el rendimiento, en cuanto a la concentración y pureza, del método de extracción de ADN Fenol-Cloroformo, sin conferirle ningún inhibidor para la PCR, proporcionando así un material idóneo para la realización de la PCR aplicable al diagnóstico de Leishmaniasis.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.-	8
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-	9
3	JUSTIFICACIÓN.-	10
4	OBJETIVOS.-	11
4.1	OBJETIVO GENERAL.-	11
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-	11
5	ANTECEDENTES.-	11
5.1	SITUACIÓN DE LEISHMANIASIS EN BOLIVIA.-	11
5.2	UTILIDAD DEL DIAGNOSTICO PRESUNTIVO.-	12
5.3	PCR EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEISHMANIASIS.-	13
5.4	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.-	13
5.5	PAGE LOCK GEL.-	15
6	MARCO TEORICO.-	17
6.1	LEISHMANIASIS.-	17
6.2	PRINCIPIOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRIA.-	23
7	HIPOTESIS.-	24
8	DISEÑO METODOLOGICO.-	25
8.1	DESCRIPCIÓN DEL AMBITO DE ESTUDIO.-	25
8.2	DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN.-	26
8.3	METODOLOGIA.-	26
8.4	PROCEDIMIENTOS.-	26
8.4.1	POBLACIÓN.-	26
8.4.2	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.-	27
8.4.3	EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>Leishmania</i>	28
8.4.4	REALIZACIÓN DEL PCR.-	29
8.4.5	ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.-	31
8.4.6	CUALICUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	31
8.5	ANÁLISIS ESTADISTICO.-	32
8.5.1	T DE STUDENT POR PAREJAS.-	32
8.5.2	CHI-CUADRADO DE CONTINGENCIA.-	32
9	RESULTADOS.-	33
9.1	CUALI-CUANTIFICACIÓN EN GELES DE AGAROSA.-	34
9.2	CUALI-CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOMETRIA UV.-	35
9.3	DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS POR PCR.-	44
10	DISCUSIÓN.-	46
11	CONCLUSIONES.-	49
12	ANEXOS.-	51
13	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.-	58

1 INTRODUCCIÓN.-

La Leishmaniasis es un grupo de enfermedades que se presentan en zonas tropicales y subtropicales, como consecuencia de la infección con protozoos del genero *Leishmania* a través de la picadura de flebótomos infectados. Su distribución es mundial afectando a 88 países del mundo, 72 de ellos en vías de desarrollo, entre los que se encuentra Bolivia presentándose la mayoría de los casos en poblaciones de los departamentos de La Paz y el Beni (1,2).

Una de las formas de controlar esta enfermedad es la optimización en la aplicación de métodos altamente sensibles para su diagnóstico, lo que permitirá un tratamiento oportuno de la enfermedad así como la detección temprana de nuevos focos de infección para la toma de medidas preventivas que permitan evitar la propagación de esta enfermedad.(2,3)

En las últimas dos décadas la PCR se ha constituido en una técnica alternativa, altamente específica y sensible, que ha permitido identificar diferentes especies de Leishmaniasis a partir de muestras de pacientes; no obstante por ser una técnica basada en la amplificación de ADN es necesario contar con un método de extracción de ADN que tenga un buen rendimiento y sea aplicable a los diferentes tipos de muestra que se emplean para el diagnóstico de Leishmaniasis, tales como muestras de sangre, infiltrados de lesión, biopsias y aspirados.

Así, el método de extracción de ADN, Fenol-Cloroformo por sus antecedentes resulta ser el más indicado, pudiendo mejorar su rendimiento a través de la utilización de algunos aditivos, tal es el caso de Page Lock Gel (PLG).

Sin embargo dado que Page Lock Gel es un producto relativamente nuevo, fue necesario evaluar y comprobar los beneficios que con su utilización se logran obtener.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

En Bolivia la Leishmaniasis antiguamente era conocida como una enfermedad rural rara que tenía como foco a los Yungas de la ciudad de La Paz, pero actualmente se puede observar que esta enfermedad se va expandiendo, aumentando el número de casos año tras año, pues la tasa de prevalencia por cada 100.000 habitantes que en 1985 era de 4.1, pasa a 16,6 el año 1993 y alcanza a 32,7 para el año 2006, reportándose 3.152 casos sospechosos de leishmaniasis, ampliamente distribuidos en los nueve departamentos de Bolivia, según datos del Programa Nacional Leishmaniasis. (1,2)

A pesar de considerarse a la Leishmaniasis como un problema de salud pública, por lo antes mencionado, los esfuerzos por encarar ese problema no han sido suficientes, ya que si bien se han realizado estudios sobre esta enfermedad en Bolivia estos han sido limitados al contexto clínico, parasitológico y entomológico, descuidándose el campo del diagnóstico laboratorial. (1,2)

En nuestro país los principales métodos de referencia para el diagnóstico de Leishmaniasis que se emplean son frotis e Intradermo Reacción de Montenegro, métodos que presentan ciertas limitaciones (ver anexo 3) afectando al diagnóstico y por ende al tratamiento oportuno. (5,6)

En la actualidad la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se esta estableciendo como una herramienta muy útil para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, puesto que ha logrado superar a las técnicas de referencia para el diagnóstico de estas enfermedades, entre ellas la leishmaniasis (9,11). Como toda prueba que se basa en el empleo de ácidos nucleicos, el rendimiento del método de extracción de ADN que se empleó tiene un impacto significativo sobre los resultados de esta técnica, por lo que es de vital importancia emplear un método de extracción de ADN adecuado. (9,20)

Existen diversos métodos de extracción de ADN que presentan patrones de rendimiento variables. Con el fin de mejorar el rendimiento de estos métodos, la industria va creando nuevos productos tales como Page Lock Gel (PLG), que pretende mejorar el método de extracción de ADN Fenol-Cloroformo. (13,14)

¿El empleo de PLG mejorará realmente el rendimiento del método de extracción de ADN Fenol-Cloroformo? y el producto obtenido de la extracción ¿podrá utilizarse para el diagnóstico de leishmaniasis por la PCR? .

3 JUSTIFICACIÓN.-

Una de las formas de fortalecer las medidas en salud pública es mejorar las pruebas diagnósticas empleadas para el diagnóstico de enfermedades consideradas problemas en salud pública como la Leishmaniasis, con el fin de mejorar el pronóstico mediante el tratamiento oportuno para mitigar los efectos de la enfermedad y lograr un control de la misma. (2,3)

Hasta el momento no existe una prueba de referencia indiscutible para el diagnóstico de la leishmaniasis, por la gran variabilidad que presentan en cuanto a su especificidad y sensibilidad. Según varios estudios se ha demostrado que la sensibilidad y especificidad de la PCR presenta valores cercanos al 100%. Sin embargo, los resultados de esta prueba se ven afectados por el empleo de diferentes métodos de extracción de ADN. (4,6)

Uno de los métodos estandar para la extracción de ADN mas empleados es Fenol-Cloroformo, puesto que: es aplicable con diferentes tipos de muestras biológicas, no es costoso y tiene un buen rendimiento; sin embargo puede presentar algunos inconvenientes en cuanto a la calidad y cantidad del ADN extraído, ya que esto depende de la destreza del operador en el momento de la recuperación del ADN extraído. (9, 12,15)

PAGE LOCK GEL es un producto nuevo que tiene la finalidad de mejorar el método de extracción de ADN Fenol-Cloroformo, pero para su aplicación es necesario verificar cuales son los beneficios que da su aplicación y si se puede emplear en la realización de métodos diagnósticos como la PCR. (13,14)

4 OBJETIVOS.-

4.1 OBJETIVO GENERAL.-

- Evaluar la efectividad de PAGE LOCK GEL en la extracción de ADN de *Leishmania* por el método fenol cloroformo para el diagnóstico por la PCR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-

- Comparar la concentración del ADN extraído por el método fenol-cloroformo con y sin PAGE LOCK GEL.
- Comparar la pureza del ADN extraído por el método fenol-cloroformo con y sin PAGE LOCK GEL.
- Comprobar que el ADN extraído por el método fenol-cloroformo con PAGE LOCK GEL se puede emplear para el diagnóstico de Leishmaniasis por PCR.

5 ANTECEDENTES.-

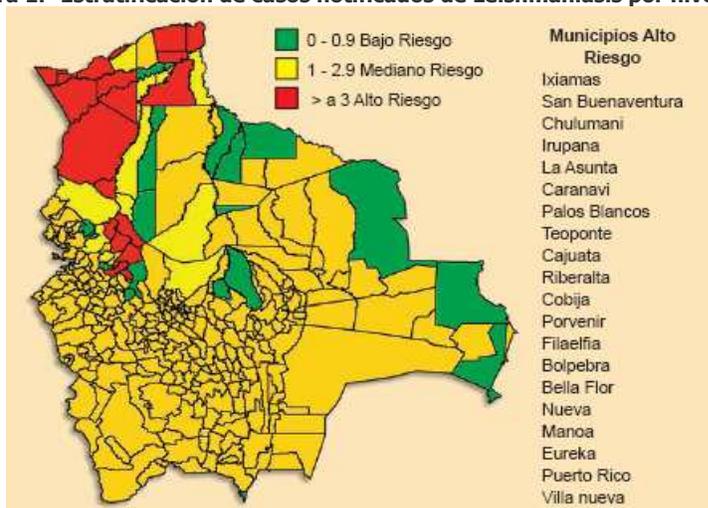
5.1 SITUACIÓN DE LEISHMANIASIS EN BOLIVIA.-

En Bolivia, la importante migración de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria del bosque tropical, son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad, haciendo que cada vez tengan mayor expansión geográfica, tanto así que el área endémica llega a más de 70 % del territorio boliviano. Esta expansión va a la par con el aumento de número de casos, puesto que en 1983 se reportaron 278 casos, la mayoría de ellos en los Yungas - La Paz y con el paso de los años se reportaron casos en 5 departamentos : La Paz, Beni, Pando, Cochabamba y Santa Cruz,

pero para el año de 1998 se certifica la ocurrencia de casos en el departamento de Tarija, aumentando así el sexto departamento a la zona endémica de Bolivia; el año 2004 el número de casos notificados bordean los 2800 personas y para el 2006 el SNIS reporta 3.152 casos sospechosos de Leishmaniasis en 80 Municipios de Bolivia, los cuales tomando en cuenta la incidencia de Leishmaniasis en todas sus formas se clasifican en (1,2) : (ver Figura 1)

- Municipios con alta transmisión.
- Municipios con mediana.
- Municipios con baja transmisión.

Figura 1.- Estratificación de casos notificados de Leishmaniasis por nivel de riesgo



Fuente: Programa Nacional de Leishmaniasis

5.2 UTILIDAD DEL DIAGNOSTICO PRESUNTIVO.-

El diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis basado en criterios clínico-epidemiológicos es útil para la captación activa de casos de Leishmaniasis, esto se demostró en un estudio realizado por Sánchez, et al el 2007 (3), en el que de 196 pacientes con diagnóstico presuntivo basado en criterios clínico-epidemiológicos, 163 (83.2%) dieron positivo y 3 (16.8%) dieron negativo según tres métodos de diagnóstico laboratorial: PCR, frotis y cultivo.

5.3 PCR EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEISHMANIASIS.-

La aplicación de la PCR como prueba diagnóstica de Leishmaniasis fue estudiada por Miranda, et al, el 2003 (6) comparando tres métodos de diagnóstico para Leishmaniasis: PCR, frotis y cultivo. Trabajó con 67 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis basado en criterios clínico-epidemiológicos, de los cuales tomó muestras de los bordes de las lesiones por raspado, el material obtenido se utilizó para los tres métodos. Del total de muestras la positividad para leishmaniasis por cada método fue la siguiente: 62 (93%) por la PCR, 57 (85%) por frotis y 48 (72%) por cultivo, determinándose que la PCR presenta mejor rendimiento como método-diagnóstico.

5.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.-

Como ya se dijo, si bien la PCR es un método muy sensible para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, esta sensibilidad se puede ver afectada por el método de extracción que se empleó, como se puede ver en los resultados obtenidos por Loayza P, el 2000 (9), que realizó una comparación de resultados obtenidos al realizar la PCR para el diagnóstico de Chagas empleando ADN extraído por tres métodos: ebullición, fenol-cloroformo y con un kit comercial QIAamp. En este estudio se obtuvo una eficiencia del 0% con el primer método, 56% por el segundo y 72% por el tercero. Concluyendo que cada método de extracción de ADN tiene distinto rendimiento y que este afecta a la PCR.

Es por este motivo que existen muchos estudios de comparación de métodos de extracción de ADN, como el realizado por Fraga, et al, el 2004 (12), quien comparó cinco métodos de extracción de ADN para evaluar su aplicabilidad en la extracción de ADN de triatomíneos, los cuales eran: calentamiento, fenol-cloroformo, acetato de potasio, acetato de potasio modificado y CTAB. Valoró la pureza y concentración del ADN extraído por cada uno de los métodos mediante electroforesis en gel de agarosa según la observación de las bandas, por su forma, la presencia de brillo en los pozos y por la intensidad de las bandas.

También realizó una evaluación por espectrofotometría a 260 y 280 nm. Según los resultados obtenidos con el método fenol-cloroformo se obtuvo ADN con un índice de pureza superior (1.96) a los otros métodos, pero en lo que respecta a concentración, esta fue menor a comparación de la obtenida con los métodos CTAB y Acetato de potasio modificado.

Así también en otro estudio realizado por Molina, et al, el 2006 (10), se compararon tres métodos: resina Chelex, solventes orgánicos y QIA amp ADN stool minikit, para la extracción de ADN de trofozoitos. La eficiencia de los tres métodos fue evaluada comparando: la concentración y la pureza del ADN extraído, obtenidas por la medición de la absorbancia a 260nm y 280 nm; también se comparó los costos y el tiempo requerido para la realización de cada método. Según los resultados que obtuvo, resina Chelex es un método rápido, económico, que permite la recuperación de grandes cantidades de ADN pero con un bajo índice (1,41) de pureza; QIA amp ADN stool minikit es un método rápido, costoso, que rinde bajas cantidades de ADN con un nivel de pureza alto (1,75); y fenol-cloroformo es un método largo, económico que rinde cantidades intermedias entre los otros métodos y con un alto índice de pureza (1,73) pero inferior al obtenido con resina chelex.

Por otro lado Bruses et al, el 2000 (7), basándose en los resultados del estudio que realizó, concluye que los kits comerciales de extracción de ADN son métodos rápidos, que demandan poco tiempo, pero a expensas de obtener una menor cantidad de ADN con un alto contenido de impurezas (tanto proteínas como lípidos) ya que no realizan la extracción con solventes que purifiquen el ADN. En su estudio comparó tres métodos de extracción de ADN para la detección de *Tripanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR, los tres métodos empleados fueron: CTAB, Salting Out y el kit comercial InstaGene.

5.5 PAGE LOCK GEL.-

Page Lock Gel (PLG) es un producto nuevo, sobre el que no se han encontrado estudios publicados en revistas científicas, contándose solo con los antecedentes que da la empresa de la línea Eppendorf que es la que se encarga de su producción. Es por este motivo que a continuación se detallan los resultados obtenidos por un estudio realizado por investigadores de la empresa y se hace una breve descripción del producto, no se menciona su composición debido a que no se tiene acceso a este por intereses de la empresa.

Figura 2.-Tubos pre-llenados con PLG

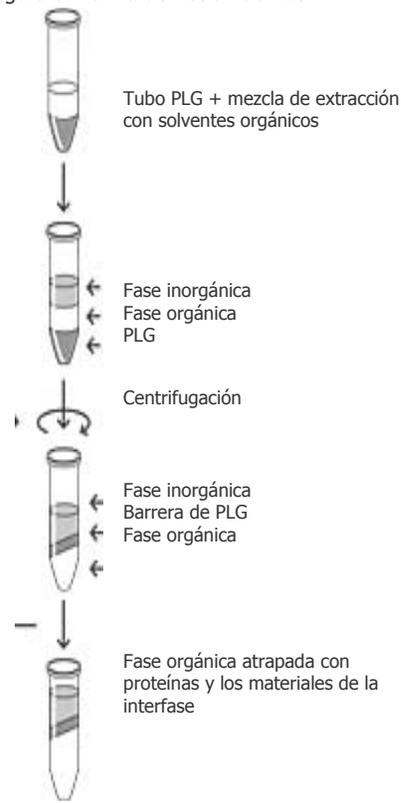


Fuente.- www.phaselockgel.com

Bauer, et al (14), realizó un estudio para comprobar la utilidad de PLG en la extracción de ADN genómico humano, con solventes orgánicos, a partir de muestras de sangre, para lo cual siguió un mismo protocolo pero con la variante de que por un lado uso los tubos standard comúnmente empleados y por otro lado uso tubos pre-llenados con PLG y determinó la pureza y concentración de las muestras de ADN extraído mediante espectrofotometría a 260-280nm, para luego comparar los resultados entre las dos formas de extracción. Según los resultados que obtuvo con el empleo de PLG se logra un ADN mas concentrado y altamente puro (con un índice de pureza entre 1.9 a 2.0).

Page Lock Gel (PLG) es una resina inerte, resistente a temperaturas bajas, no interfiere en la actividad enzimática y es aplicable a protocolos de extracción de ADN basados en la utilización de solventes orgánicos (13).

Figura 3.-Forma de Acción de PLG



Fuente.- www.phaselockgel.com

Actúa formando una barrera entre las fases inorgánica y orgánica durante la centrifugación, su habilidad se fundamenta en la diferencia de densidades, ya que tiene una densidad inferior a la fase orgánica e incluso a la fase intermedia que se forma entre la fase orgánica y la inorgánica o interfase, es por este motivo que durante la centrifugación la fase orgánica y los materiales de la interfase quedan atrapados en o debajo de la capa de PLG que es estable, permitiendo la recuperación total de la fase inorgánica en la que se encuentra el ADN, ya sea por decantación o empleando una micro-pipeta, sin correr el riesgo de contaminación por materiales de la interfase, ahorrando tiempo y optimizando la recuperación de ácidos nucleicos hasta en un 30% más (13).

PLG se comercializa en los tubos (de centrifugadora estándares) prellenados de varios tamaños como se ve en la figura 2, esta variedad de tamaños permite el empleo de volúmenes de muestra a partir de 10 μ l hasta 20 ml. (13).

6 MARCO TEORICO.-

6.1 LEISHMANIASIS.-

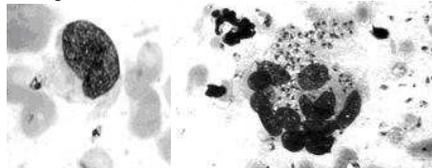
Se conoce con el nombre de Leishmaniasis a un grupo de enfermedades causadas por protozoos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*, que tiene más de quince especies y subespecies (Cuadro 1), con igual morfología pero con diferencias principalmente en la distribución geográfica y las características clínicas de la enfermedad (1,16).

Género	Subgénero	Complejo	Especies
<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>
		<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. killicki</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i>
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. equatoriensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. shawi</i>

Fuente: David Botero "Parasitosis humanas"

Las características morfológicas de estos protozoarios corresponden a dos formas parasitarias que adoptan en su ciclo de vida: amastigotes y promastigotes.

Amastigotes en frotis extracelulares e intracelulares



Amastigotes.- Es la que se halla en los hospedadores humanos y mamíferos, es un pequeño cuerpo intracelular redondeado u oval, mide de 3 a 6 um de largo por 2 a 4 um de ancho conforme a la especie, se localiza en las vacuolas del citoplasma de los macrófagos, no presenta flagelos libres, tiene un núcleo

relativamente grande y un cinetoplasto (mitocondria grande con funciones específicas) en forma de bastón o granulo redondeado próximo al núcleo (2,16).

Promastigotes.- Presente en los hospedadores invertebrados o vectores, es extracelular, de forma alargada que mide de 10 a 15 um de largo por 2 a 3.5 um de ancho, con un núcleo central y un flagelo único de 15 a 28 um de longitud, que sale de las proximidades del cinetoplasto en la parte anterior (2,16).

La infección con este parasito corresponde a una antroponosis que llega al hombre a través de la picadura de vectores (insectos infectados) pertenecientes a los géneros: Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzomyia en el Nuevo Mundo.



Fuente: Medscape.<http://www.medscape.com>

6.1.1 TIPOS DE LEISHMANIASIS.-

Hoy en día se conocen cuatro tipos de leishmaniasis que se detallan a continuación:



Fuente: Mollinedo, "Leishmaniasis en Bolivia"

Leishmaniasis Subclínica:

Son aquellas en las que los pacientes que fueron infectados producen anticuerpos específicos para *Leishmania* pero no desarrollan la infección, por lo tanto no tienen signos ni síntomas (2).

Leishmaniasis Cutánea (LC):

En este tipo de leishmaniasis la picadura del vector es muy dolorosa y después de un periodo de incubación variable entre 2 semanas, 2 meses o más, aparece una lesión inicial que puede ser única o múltiple (localizada con frecuencia en las extremidades y la cara), que consiste en un grano elevado, rojo, que escuece y secreta un exudado seroso, esta lesión se empieza a convertir en una pequeña úlcera de forma redondeada u oval, con bordes bien definidos, elevados y levemente indurados con un fondo eritematoso y granulomatoso, que no se cura con tratamientos convencionales y va creciendo tanto en tamaño como profundidad hasta alcanzar un diámetro promedio de 4 a 6 cm.(2,16).

Solo después de un periodo variable entre 6 meses a 3 años las úlceras empiezan a autolimitarse, por la evolución de la respuesta inmune del huésped, produciéndose la cicatrización de las úlceras, lo cual no indica que la infección se haya resuelto, porque los parásitos podrían reactivarse luego de años (2,16).

Leishmaniasis Muco-Cutánea (LMC):

Generalmente se presenta después de uno o más años de la cicatrización de una Leishmaniasis cutánea, raramente se produce a los meses o en forma conjunta cuando las lesiones primarias son muy cercanas a las mucosas.

Se producen lesiones ulcerativas y pruriginosas en la mucosa nasal (por lo que hay emisión de mucosa con sangre), las lesiones van creciendo llegando a tomar el tabique nasal, destruyendo el septum, las alas de la nariz, incluso invade

la úvula, faringe y laringe, causando ardor, dolor y problemas en la fonación y deglución (2,16).

Leishmaniasis Visceral (LV):

Denominada Kala Azar, se presenta 4 – 10 meses luego de la picadura del vector comúnmente no se presentan lesiones iniciales. Cuando ocurre la invasión visceral se inicia una fiebre irregular, casi siempre progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, también de semanas (16).

Los órganos que parasita en el humano son aquellos que tienen abundante retículo endotelial como el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Se produce una esplenomegalia muy marcada en la fase crónica, lo cual abulta considerablemente el abdomen, también se produce una hepatomegalia pero no muy intensa (16).

6.1.2 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.-

El diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis se basa, generalmente, en la aplicación conjunta de métodos directos e indirectos, variando éstos en función del cuadro clínico que se presenta, visceral o cutáneo. A continuación se mencionan los métodos más empleados (2,15).

6.1.2.1 MÉTODOS DIRECTOS:

El diagnóstico directo se basa principalmente en la observación del parásito, con este fin existen varios métodos entre los que tenemos:

6.1.2.1.1 MICROSCOPIA:

El diagnóstico por microscopia se basa en la identificación directa de amastigotes. Su sensibilidad se limita aproximadamente a 50-60% (4,5,6) y no se obtiene un diagnóstico especie-específico.

Para este método se emplean frotis de: lesiones superficiales, biopsias del tejido o aspirados de médula ósea, de bazo o de nodos linfáticos (5,16).

6.1.2.1.2 CULTIVO:

La sensibilidad de este método es inconstante y depende de varios factores como: la viabilidad de los parásitos colectados, la cepa, los medios de cultivo (diferentes requisitos entre las especies), y la experiencia del investigador. Además la realización de este método es costosa, demora dos o mas semanas en dar resultados positivos y la contaminación es un problema frecuente para el crecimiento del parásito, debido a la sobre infección bacteriana de la lesión y la flora normal de la piel (5,16).

6.1.2.2 DIAGNÓSTICO INDIRECTO:

6.1.2.2.1 PRUEBA SUPERFICIAL DE LA LEISHMANINA (LST) O DE MONTENEGRO:

Análogo a la prueba de la tuberculina, corresponde a una reacción de hipersensibilidad tardía, no diferencia entre infecciones pasadas o presentes por lo que generalmente se la emplea para screening en áreas endémicas (5,16).

6.1.2.2.2 ELISA:

Esta técnica se ha adaptado sobre todo al diagnóstico de Leishmaniasis Visceral, se basa en anticuerpos específicos que compiten con anticuerpos de suero del paciente. La desventaja de este método son las reacciones cruzadas. Y dependiendo de la cepa de *Leishmania* utilizada, la sensibilidad varía del 86% al 99% (5,16).

6.1.2.2.3 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA (IFI):

Este método se basa en la detección de anticuerpos en el suero del paciente o en la identificación del antígeno, es específico de género, pero se puede producir reacciones cruzadas en individuos infectados con *Tripanosoma cruzi*. En áreas

libres de la enfermedad de Chagas, la prueba IFI para el diagnóstico clínico de Leishmaniasis tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98% (5,16).

6.1.2.2.4 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN DIRECTA (DAT):

Es una prueba de screening simple y fiable, conveniente para trabajo de campo mostrando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,9% en este tipo de trabajos. Se basa en la aglutinación de suero positivo con promastigotes marcados y puede realizarse en placas de microtiter (5,16).

6.1.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una excelente herramienta para el diagnóstico y caracterización de varios agentes infecciosos, así como para el diagnóstico de leishmaniasis (5,16).

Se basa en la duplicación enzimática de secuencias específicas de ADN, que dependiendo del objetivo de estudio deben ser secuencias conservadas dentro del género o de las especies. Ej. Para la caracterización genética de cepas individuales, se seleccionan regiones más inconstantes y por consiguiente son blancos menos sensibles (5).

Para la obtención de múltiples copias de la secuencia específica de ADN o secuencia blanco se repiten varios ciclos y cada ciclo consiste en tres pasos:

1º.-Desnaturalización por calor (93-97 °C) del ADN de la célula en la que se produce la separación física de las dos cadenas de ADN.

2º.-Hibridización de Primers (0-56 °C) es cuando dos secuencias cortas (primers o cebadores) complementarias a la secuencia blanco se unen por complementariedad de bases A-T (Adenina-Timina) y C-G (Citosina-Guanina) a la misma, delimitándola.

3º.- Extensión, elongación o polimerización: Este proceso lo realiza una enzima generalmente la Taq polimerasa, que va uniendo los desoxinucleotidos (que se encuentran en el medio de reacción) por complementaridad de bases.

6.1.3.1 Blancos de PCR.-

Para el diagnóstico y caracterización de especies de *Leishmania* existen dos tipos de blancos (5):

1. ADN del Kinetoplasto (kDNA)
2. ADN nuclear

6.2 PRINCIPIOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRIA.-

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia (A) de luz ultravioleta mediante el empleo de un espectrofotómetro.

El espectrofotómetro se funda en la transmisión de luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. El aparato funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra (17).

Las moléculas absorben energía radiante a una determinada longitud de onda, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución.

Con el arreglo a la ley de Lambert-beer, existe una relación lineal entre la absorbancia A o denominada también densidad óptica, DO y la concentración de la macromolécula, conforme a la ecuación siguiente:

$$A = DO = \epsilon/c$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración y l es el paso de luz de la cubeta. Las proteínas y los ácidos nucleicos absorben la luz en el intervalo ultravioleta a longitud de onda comprendida entre los 210 y los 300 nm. La absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN corresponden a 260 nm y las proteínas absorben a 280 nm (17).

Dado que las soluciones de ADN y ARN absorben parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes A_{260}/A_{280} respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1.8 y 2.0. Con un paso de luz de 10 mm y una longitud de onda de 260nm, una absorbancia $A=1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/mL}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos (17).

La concentración c de un ácido nucleico bicatenario presente en una solución se calcula conforme a la siguiente ecuación (7):

$$\text{Abs. 260 nm.} \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/ml.} = \mu\text{g/ml. ADN}$$

7 HIPOTESIS.-

- La utilización de PAGE LOCK GEL aumenta el rendimiento del método de extracción de ADN Fenol- Cloroformo en un 30 % más, tanto en calidad como en cantidad, permitiendo mejorar los resultados de la PCR para el diagnóstico de leishmaniasis.

8 DISEÑO METODOLOGICO.-

8.1 DESCRIPCIÓN DEL AMBITO DE ESTUDIO.-

Para la realización de este estudio, se trabajó con pacientes del Proyecto de Salud Río Beni, que es un proyecto de atención médica y medicación gratuita; sus instalaciones se encuentran ubicadas en la población de Rurrenabaque (ubicada al noroeste del departamento del Beni). Presta servicios a la misma población y también a la población de San Buenaventura (ubicada al norte del departamento de La Paz), pero principalmente a diferentes comunidades de dichas poblaciones.

Las comunidades con las que trabaja dicho proyecto se encuentran en plena selva húmeda, cercanas a las confluencias del río Beni, tienen un clima cálido tropical con un promedio de 30°C, llegando hasta 39°C.

Figura 3.-Ubicación de las Comunidades



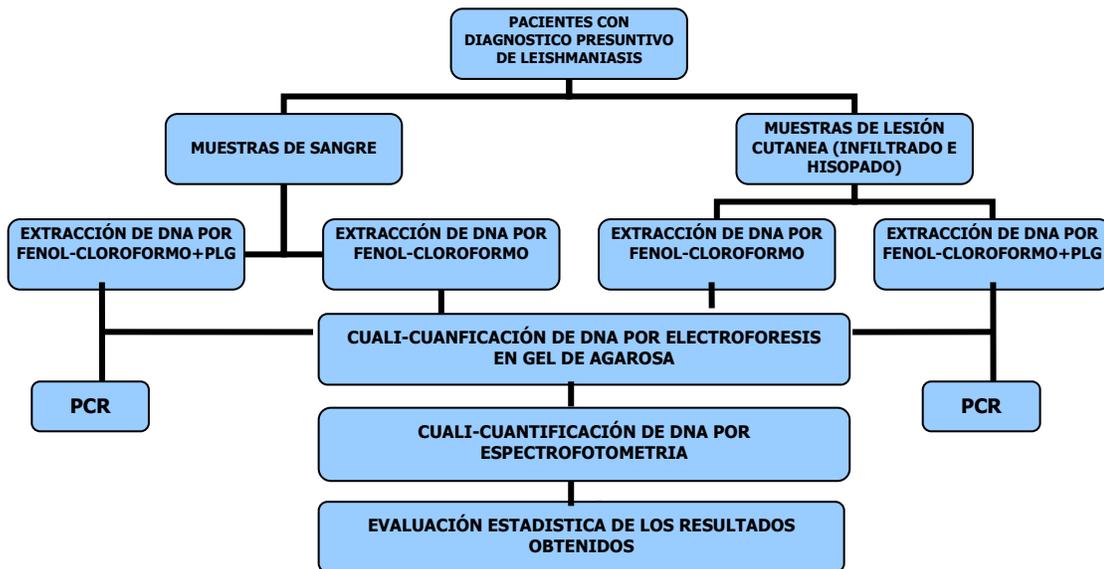
Fuente.- Proyecto Salud Río Beni

Los pacientes del Proyecto de Salud Río Beni en su mayoría son personas de escasos recursos habitantes de comunidades alejadas que en su gran mayoría son migrantes de los departamentos de Potosí, Chuquisaca, cuya principal actividad es la agricultura, dedicándose en determinadas estaciones del año a la pesca y caza.

8.2 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN.-

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Servicios Laboratoriales de Diagnóstico e Investigación en Salud “SELADIS” dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA del departamento de La Paz.

8.3 METODOLOGIA.-



8.4 PROCEDIMIENTOS.-

8.4.1 POBLACIÓN.-

La población en estudio estuvo constituida por 29 pacientes que presentaban manifestaciones clínicas características de leishmaniasis y con diagnóstico presuntivo de la misma, atendidos por el Proyecto de Salud Río Beni habitantes de las comunidades de: San Silvestre, La Esmeralda, San José de Uchupiamonas, Nueva Idiana y El Tigre, durante el último trimestre del año 2006. (Ver figura 3)

Solo se tomaron en cuenta aquellos pacientes atendidos durante el último trimestre del año 2006, que presentaban lesiones activas o de reciente

cicatrización y que además dieron su consentimiento por escrito para la toma de muestra, para lo cual se consideró el Código Nuremberg (Ver Anexo 2)

El tamaño muestral no fue calculado por patrones estadísticos, se lo realizó en base a la cantidad de pacientes registrados.

8.4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.-

Se recolecto 29 muestras sanguíneas por punción venosa mediante la cual se obtuvo 2.5 mL de sangre que se mezclaron con 2.5 mL de EDTA-Guanidina, en un tubo vacutainer que previamente se identificó con el nombre del paciente. Luego la muestra se conservo a 4°C hasta el día del procesamiento.

También se recolectaron 21 muestras de lesión, de las cuales 19 fueron de infiltrado de lesión que se obtuvieron mediante la inyección de 1 mL de solución fisiológica estéril en la región afectada con una jeringa de insulina, misma solución que se volvió a succionar, tratando de recuperar todo el volumen, luego la muestra obtenida fue inoculada en un tubo ependorff estandar de 1.5 que contenía tampón TE 1X (previamente identificado), se sello el tubo y se lo conservó a 4°C hasta su procesamiento. Las otras 2 muestras se recolecto por hisopado nasal, para la toma de estas muestras se les pidió a los pacientes que se limpiaran la nariz para eliminar la mucosa presente, posteriormente se visualizó la lesión dentro de la fosa, se introdujo un hisopo estéril humedecido en solución fisiológica también estéril para limpiar la lesión, luego se introdujo otro hisopo también humedecido en solución fisiológica para tomar la muestra frotando la lesión e inmediatamente la muestra obtenida se inoculó en un tubo ependorff standard de 1.5 que contenía tampón TE 1X (previamente identificado), se sello el tubo y se lo conservó a 4°C hasta su procesamiento.

Además para un respaldo al diagnostico clínico se obtuvieron 12 frotis de las lesiones raspando con un palito por debajo del borde de la lesión y se extendió la muestra obtenida en un porta-objetos haciendo pequeños círculos y se dejo

secar la lámina a temperatura ambiente, luego se las fijo con Metanol para luego teñirlas mediante la técnica de GIEMSA, y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100 X), buscando formas parasitarias (amastigotes) iniciando en un extremo y cubriendo toda la muestra en forma de zigzag (ver resultados, anexo 1).

8.4.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE *Leishmania*

8.4.3.1 MÉTODO FENOL-CLOROFORMO

Se alicuotaron 200 uL de cada una de las muestras de sangre total y de lesión en tubos eppendorf previamente identificados, se los incubó de 95 a 100°C a baño maría en aceite por 15 minutos, luego de dejarlos enfriar se añadió 100 uL de fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. Se recuperó la fase acuosa o sobrenadante en otro tubo y se le añadió 50 uL de cloroformo para luego centrifugar 5 minutos a 14000 rpm y nuevamente se recuperó el sobrenadante en otro tubo, se añadió 280 uL de Etanol Absoluto y 41 uL de Acetato de Sodio, se dejó a -20°C toda una noche. Al día siguiente luego de centrifugar 10 minutos a 14000 rpm se desechó el sobrenadante y se añadió 100 uL de etanol al 70 % para luego volver a centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm, después se desecho el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante por 3 horas, para luego agregar 50uL de agua para resuspender el pelet y se lo guardó a -20°C hasta el día del procesamiento.

8.4.3.2 MÉTODO FENOL-CLOROFORMO+PLG

Se alicuotó 200 uL de cada una de las muestras de sangre total y de lesión en tubos eppendorf previamente identificados, se procedió a incubarlos de 95 a 100°C a baño maría en aceite por 15 minutos, luego estos 200 uL se trasvasaron a un tubo pre-llenado con PLG y se añadió 100 uL de fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó 5 minutos a 14000rpm, luego se le añadió 50 uL de cloroformo y se volvió a centrifugar 5 minutos a 14000rpm, se recupero todo el sobrenadante en un tubo eppendorf, se añadió 280 uL de Etanol Absoluto y 41 uL de Acetato de Sodio para dejarlo a -20°C toda una noche. Al día siguiente luego de centrifugar

10 minutos a 14000rpm se desechó el sobrenadante y se añadió 100 uL de etanol al 70 % para luego volver a centrifugar por 10 minutos a 14000rpm, después se desecho el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante por 3 horas, para luego agregar 50uL de agua para resuspender el pelet y se lo guardó a -20°C hasta el día del procesamiento.

8.4.4 REALIZACIÓN DEL PCR.-

Para la preparación de la mezcla de reacción se usó el siguiente protocolo:

Reactivos	[c] Inicial	[c] Final	Vol. / tubo uL
Buffer	10 X	1 X	1.25
dNTPs	5mM	0.2mM	0.5
Primer 13 A	10 uM	1.0 uM	1.25
Primer 13 B	10 uM	1.0 uM	1.25
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.0
Taq	5 UI / mL	0.125 UI / mL	0.0625
H ₂ O _{dd}	-----	-----	4.5625
DTT	100 mM	1 mM	0.125
ADN muestra o ADN control +, -, I	-----	-----	2.5

Buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.8, 500mM KCl, 0.1% Triton)

ADN muestra: ADN extraído de las muestras de los pacientes.

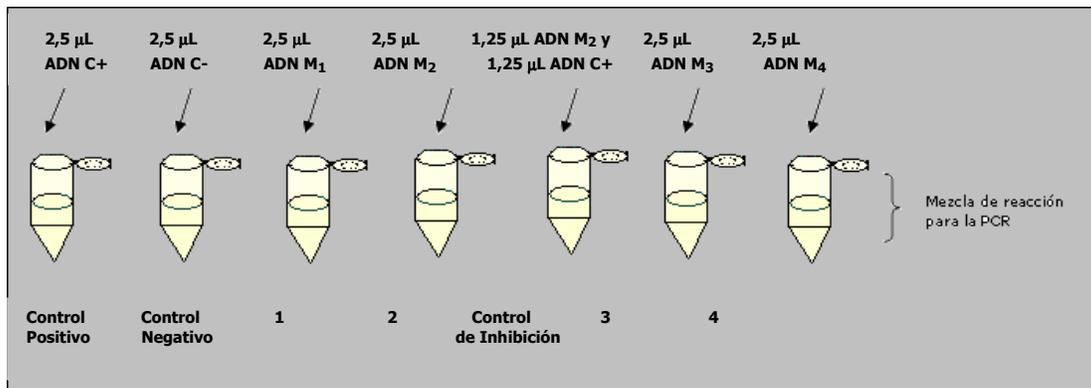
ADN control +: ADN extraído a partir de cepas de *Leishmania braziliensis* cultivadas.

ADN control -:ADN extraído a partir de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* cultivadas.

ADN control I: Control de inhibición.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó según lo descrito. Se añadieron controles de inhibición que nos permitieron controlar que el ADN muestra no contenga inhibidores para la PCR, asegurándonos de no obtener falsos negativos en los resultados.

Estos controles consisten en añadir como ADN molde una mezcla de ADNs, es decir que en lugar de añadir 2,5 µL de ADN para la realización de la PCR, se añaden 1,25 µL del ADN control+ y 1,25 µL del ADN muestra, Como se muestra a continuación.



De esta manera, aunque al ADN muestra no presentara ADN de *Leishmania*, se aseguraba la producción de una amplificación, por la parte de control positivo que se añadió, de tal forma que la ausencia de una amplificación era indicativo de la existencia de inhibidores para la PCR en el ADN muestra.

Los oligonucleótidos o primers que se emplearon, permitieron la amplificación de una secuencia de 120 bp del minicírculo en el kinetoplasto (ADNk) estos son: 13A (5'-GTGGGGGA GGGGCGTTCT-3 ') y 13B (5'-ATTTTCCACCAACCCCAAGTT-3 ') Esta secuencia se conserva en todas las especies de *Leishmania*, pero se encuentra mas conservada en *L. braziliensis* y *L. mexicana*.

Luego de preparar la mezcla de reacción la amplificación se llevó a cabo en un termociclador, en el cual se colocó el siguiente programa:

Nº de Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
1	1º Desnaturalización	94 ° C	3 minutos
35	Desnaturalización	94 ° C	1 minuto
	Alineación	54 ° C	1 minuto
	Elongación	72 ° C	1 minuto
1	Extensión final	72 ° C	10 minutos

La temperatura final fue de 4° C para guardar la muestra y luego se realizó la electroforesis para la visualización de los productos amplificados.

8.4.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.-

Para la visualización de los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1.5 %, para lo cual se peso 1.5 g de agarosa y se los disolvió en 100 ml de buffer TBE 1X (Tris- HCl pH 8, ácido bórico, EDTA) con calor en el horno de micro ondas durante un minuto, se dejó enfriar hasta 50° C aproximadamente para agregar 2 µl de bromuro de etidio (10mg/ml), luego se lo sirvió en el molde para formar el gel con los respectivos bolsillos y se lo dejó solidificar. Una vez sólido el gel se lo paso a la cubeta de electroforesis con buffer TBE 1X y en cada bolsillo se sembró 10ul del producto de PCR previamente mezclado con 3 ul del buffer colorante (Azul de bromofenol) y se puso a correr el gel a 100 voltios (350 miliamperios) durante 30 minutos. Al terminar la corrida, se visualizó los productos en un transiluminador con luz Ultravioleta y se fotografió con película Polaroid 667.

8.4.6 CUALICUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA

Se realizó la lectura espectrofotométrica de las muestras obtenidas para poder evaluar la pureza del ADN obtenido, para lo cual se midió la absorbancia de las muestras a dos longitudes de onda: UV 260 nm. y 280 nm.; debido a que las bases púricas y pirimídicas absorben a 260 nm., y las proteínas a 280 nm. Para realizar las lecturas se diluyó las muestras de ADN con agua destilada estéril. Una vez realizada la lectura de la absorbancia de las muestras de ADN extraído con y sin PLG se calculó la concentración de ADN en las muestras con la fórmula:

$$A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/ml.} = \mu\text{g/ml. ADN}$$

Luego se calculó el índice de pureza del ADN con la siguiente fórmula:

$$A_{260} / A_{280} = \text{Índice de Pureza}$$

Para la interpretación de los resultados obtenidos se tomo en cuenta que el valor que refleja el estado de pureza del ADN puede encontrarse entre 1.8 – 2.0 si

el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares o entre valores por debajo de 1.8 si el ADN tiene contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol.

8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

8.5.1 T DE STUDENT POR PAREJAS.-

Para la interpretación de los resultados se aplicó cálculo estadístico: test del t de student por parejas para probar que la diferencia de concentraciones de ADN extraído con y sin PLG por el método fenol-cloroformo no se deba al azar, para lo cual se aplicaron las fórmulas (18,19):

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad t_c = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S} \sqrt{29}$$

Las hipótesis formuladas a probar fueron:

H_0 = Las diferencias observadas en la concentración de ADN se deben al azar.

H_A = Las diferencias observadas en la concentración de ADN no se deben al azar, se deben al empleo de PLG.

8.5.2 CHI-CUADRADO DE CONTINGENCIA.-

Se realizó también un análisis de la independencia de resultados en cuanto a la pureza de ADN extraído con y sin PLG por el método fenol-cloroformo mediante el cálculo del chi-cuadrado de contingencia.

Para la realización de este cálculo se organizó los datos en tablas 2x2 de la siguiente manera:

FENOL-CLOROFORMO	Puro	Contaminado	TOTAL
Con PLG	a	b	a+b
Sin PLG	c	d	c+d
TOTAL	a+c	b+d	total

El cálculo de los valores esperados se realiza sobre la base de los valores observados con las siguientes fórmulas:

$$a = \frac{(a+b) \times (a+c)}{n}$$

$$b = \frac{(a+b) \times (b+d)}{n}$$

$$c = \frac{(a+c) \times (c+d)}{n}$$

$$d = \frac{(c+d) \times (b+d)}{n}$$

Para el cálculo del chi-cuadrado de contingencia se aplicó la siguiente fórmula (9).

$$X^2 = \sum \frac{[(V \text{ obs.} - V \text{ esp.})]^2}{V \text{ esp.}}$$

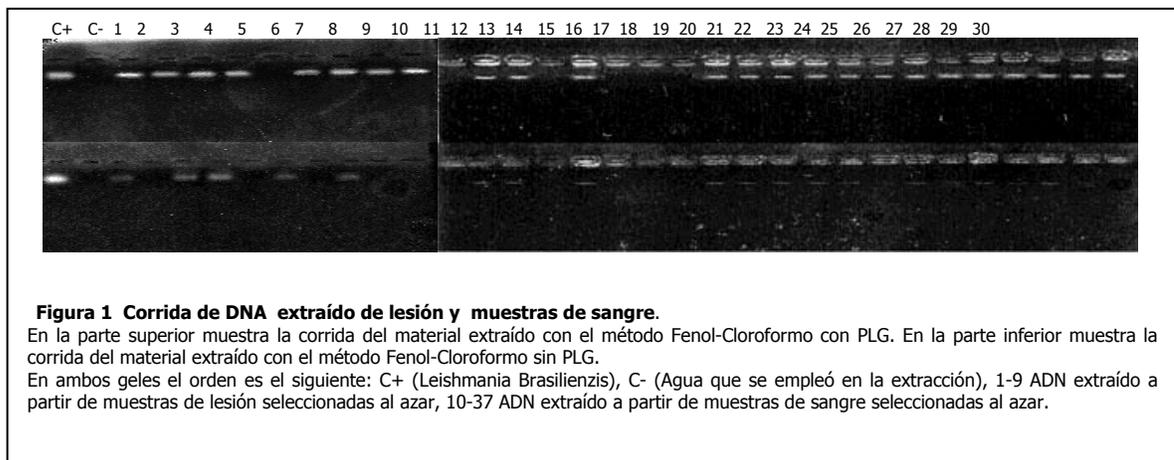
9 RESULTADOS.-

Fueron evaluados 29 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis basado en criterios clínico-epidemiológicos, diagnóstico ejecutado por el personal médico del Proyecto de Salud Río Beni, de estos pacientes 21 tenían lesiones activas durante la visita para la toma de muestra y a cada uno se les tomo tanto muestras de sangre como de lesión, los otros 8 pacientes restantes presentaban lesiones de reciente cicatrización, por este motivo solo se les tomo muestras de sangre, obteniéndose así un total de 29 muestras de sangre y 21 muestras de lesión (19 de infiltrado de lesión y 2 de hisopado nasal); la evaluación de estas muestras fue realizada en conjunto, no se procesó las muestras de hisopado por separado, se las tomó solo como muestras de lesión (Ver Anexo 1), de las cuales se extrajo su ADN por el método Fenol-Cloroformo empleando tubos standart y tubos pre-llenados con PLG (ver Anexo 4).

9.1 CUALI-CUANTIFICACIÓN EN GELES DE AGAROSA.-

Luego de la extracción de ADN de las muestras de lesión y sangre se realizó una evaluación del estado de los ADNs por electroforesis en gel de agarosa, mediante la visualización de las bandas.

En la figura 1 se presentan los resultados de la electroforesis de las dos formas de extracción de ADN por el método fenol-cloroformo, es decir Fenol-Cloroformo sin PLG y Fenol-Cloroformo con PLG. Se pudo observar que los ADNs extraídos empleando tubos pre-llenados con PLG (de los dos tipos de muestras: sanguínea y de lesión: infiltrado e hisopado) forman bandas intensas, definidas y el avance en el gel es el mismo que del patrón positivo. En los resultados del ADN extraído sin PLG también se evidenciaron bandas, con el mismo avance que el control positivo, pero con poca intensidad y en algunos casos no se pudo observar bandas que se visualizaban en la corrida de los ADNs extraídos con el empleo de PLG, sin embargo, no es posible asegurar que en dichas muestras no se haya extraído ADN, pues podrían tener bajas concentraciones de ADN que no son visibles en el gel, para aclarar esto se realizó la cuantificación por espectrofotometría UV.



Las diferencias cuantitativas se evidencian por la intensidad de cada banda basandose en el hecho de que esta luminosidad indica la presencia de ADN ya que el bromuro de etidio intercalado entre la estructura del ADN mas el empleo de luz ultravioleta producen este efecto, por lo tanto mientras más ADN esté presente mayor bromuro intercalado y por ende mayor brillo de la banda.

En cuanto a las diferencias cualitativas como degradación de ADN o presencia de proteínas, que se evidencian por brillo en el pozo, la presencia de un efecto de chorro en el recorrido de la banda y la forma de la misma, no se observan diferencias considerables como en el caso de las diferencias cuantitativas, pero al igual que las mismas, se comprobó con espectrofotometría UV a 260 y 280 nm.

9.2 CUALI-CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOMETRIA UV.-

Para una mayor comprensión de los resultados de la evaluación por espectrofotometría se los expone de forma separada según el tipo de muestra, primero se presentan los resultados de la evaluación del ADN extraído a partir de muestras de Lesión y luego los resultados de la evaluación del ADN extraído a partir de muestras de sangre; esto debido a que como son muestras distintas los resultados ya de por si son distintos, en especial por las características de la enfermedad.

9.2.1 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAIDO A PARTIR DE MUESTRAS DE LESIÓN.-

En la tabla 1 se presentan los resultados de los cálculos de la concentración de ADN en uL/dL de cada muestra evaluada, según cada forma de extracción, con y sin PLG por el método Fenol-Cloroformo.

Al comparar los resultados obtenidos se pone en manifiesto que el empleo de PLG durante la extracción de ADN por el método Fenol-Cloroformo mejora el

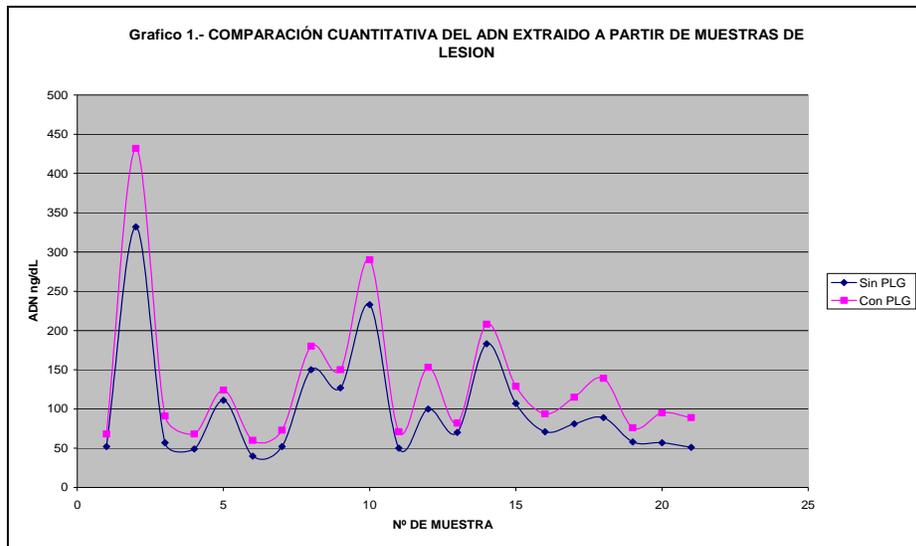
rendimiento en cuanto a la concentración del ADN, ya que el aumento de concentración en cada muestra de ADN extraído es de 10 a 40%.

TABLA 1.- CONCENTRACIÓN DE LOS ADN_s PROVENIENTES DE MUESTRAS DE LESIÓN

Código	ADN en ug/mL Extracción Sin PLG	ADN en ug/mL Extracción Con PLG
0101	52	68
0201	332	432
0301*	57	91
0402*	49	68
0503	111	124
0603	40	60
0704	52	73
0804	150	180
0904	127	150
1004	233	290
1104	50	71
1204	100	153
1405	70	82
1505	183	208
1605	107	129
1705	71	94
1905	81	115
2105	89	139
2305	58	76
2505	57	95
2905	51	89

* Muestras de hisopado de lesión

Las diferencias observadas se hacen más evidentes en el siguiente gráfico realizado con los datos de la Tabla 1. En el gráfico la línea violeta que es la línea superior esta trazada en base a los valores de las concentraciones de los ADN_s extraídos con PLG y la línea azul que es la línea inferior esta trazada en base a los valores de las concentraciones de los ADN_s extraídos sin PLG.



Análisis Estadístico de los datos.-

Para la valoración de la significancia estadística se realizó el cálculo del test de student por parejas con los datos de las tablas 1.

H_0 = Las diferencias observadas en la concentración de ADN se deben al azar.

H_A = Las diferencias observadas en la concentración de ADN no se deben al azar, se deben al empleo de tubos PLG.

Se tomo en cuenta un nivel de significancia de 0.05 y 20 grados de libertad y se busco el valor del t de tablas que es $t_t = \pm 2,09$, entendiéndose que si el resultado del t_c es menor a -2,09 o mayor a +2,09 la hipótesis nula H_0 se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa H_A .

El resultado de t_c fue: 6,81, entonces también H_0 se rechaza. Este resultado nos indica que las diferencias de concentración de ADN son estadísticamente significativas y se deben al empleo de PLG durante la extracción.

9.2.2 CUALIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE MUESTRAS DE LESIÓN.-

La cualificación de los ADNs extraídos se realizó mediante la determinación del índice de pureza, calculado mediante el cociente de las absorbancias a 260nm y 280nm, la siguiente tabla muestra los resultados obtenidos según la extracción con y sin PLG.

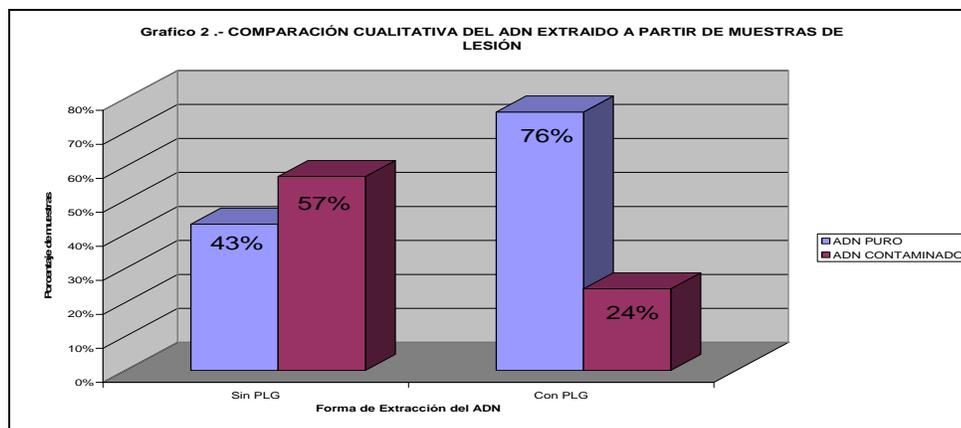
TABLA 2.- COMPARACIÓN DE LA PUREZA DE LOS ADNs PROVENIENTES DE MUESTRAS DE LESIÓN

Código	Índice de Pureza Sin PLG	Índice de Pureza Con PLG
0101	1,4	1,9
0201	1,8	1,6
0301*	1,3	1,5
0402*	1,3	1,4
0503	2	2
0603	1,5	1,9
0704	1,5	2
0804	1,8	2
0904	1,3	2
1004	1,8	1,8
1104	1,6	2
1204	2	2
1405	1,2	1,3
1505	1,6	2
1605	1,5	1,8
1705	2	2
1905	1,4	1,2
2105	2	2
2305	1,4	2
2505	1,8	1,8
2905	1,8	1,9

* Muestras de hisopado de lesión

Para una mejor comprensión de los datos obtenidos se realizó una comparación representativa de los resultados en la Gráfica 2; las muestras de ADN que presentaban un alto índice de pureza se las tomó como ADN puro y las muestras con un bajo índice de pureza se las tomó como ADN contaminado. En la comparación de los porcentajes se pudo observar que el porcentaje de muestras

puras de ADN extraídas con PLG (76%) es superior en un 33%, a las extraídas sin PLG (43%).



Análisis Estadístico de los datos.-

El análisis de los resultados de la valoración cualitativa del ADN extraído a partir de muestras de lesión se realizó a través del cálculo del chi cuadrado, empleando los datos de la tabla 2.

Tabla 5. VALORES OBSERVADOS

FENOL-CLOROFORMO MUESTRAS DE LESIÓN	P	C	TOTAL
Con PLG	16	5	21
Sin PLG	9	12	21
TOTAL	25	17	42

P=Puro C=Contaminado

Tabla 6. VALORES ESPERADOS

FENOL-CLOROFORMO MUESTRAS DE LESIÓN	P	C	TOTAL
Con PLG	12,5	8,5	21
Sin PLG	12,5	8,5	21
TOTAL	24	18	42

Tomando en cuenta el nivel de significancia $\alpha = 0.05$ y 1 grado de libertad, se busco el valor del chi-cuadrado en tablas que en este caso es: $X^2_{1} = 3,84$.

Aplicando la fórmula del chi cuadrado de contingencia se obtuvo un valor de: $X^2_c = 4,84$, este valor es mayor al valor de $X^2_{1}=3,84$, lo que nos indica que las variables son dependientes, es decir que la obtención de un mayor número de ADNs con alto índice de pureza depende de el empleo de los tubos pre-llenados con PLG durante la extracción.

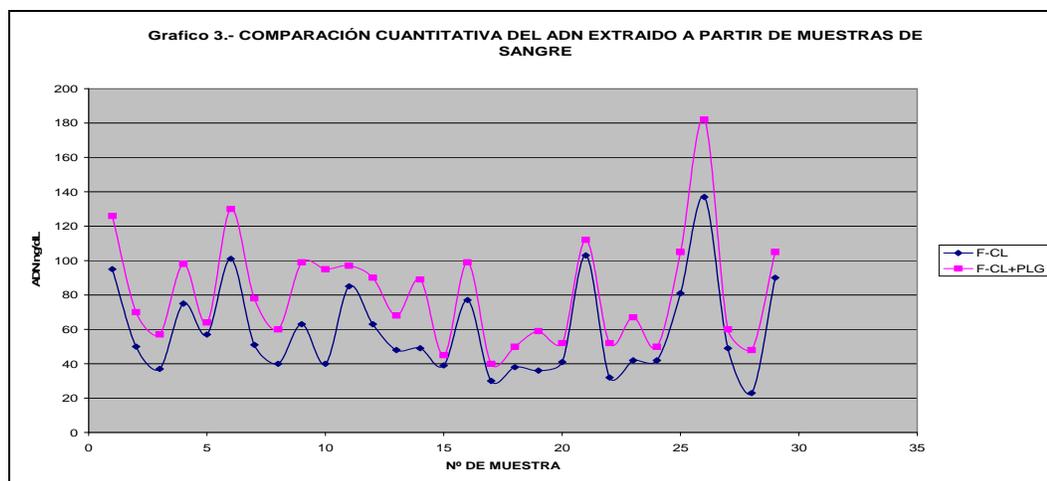
9.2.3 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE.-

Los resultados obtenidos de la evaluación de las concentraciones de los ADNs extraídos por el método Fenol-Cloroformo, con y sin PLG se señalan en la tabla 4. Comparando estos resultados se pudo ver una mayor concentración en las muestras de ADN extraídas con PLG, este cotejo se hace más evidente en la Gráfica 3

TABLA 3.-COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ADNs PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE

Código	ADN en ug/mL Extracción Sin PLG	ADN en ug/mL Extracción Con PLG
0101	95	126
0201	50	70
0301	37	57
0402	75	98
0503	57	64
0603	101	130
0704	51	78
0804	40	60
0904	63	99
1004	40	95
1104	85	97
1204	63	90
1304	48	68
1405	49	89
1505	39	45
1605	77	99
1705	30	40
1805	38	50
1905	36	59
2005	41	52
2105	103	112
2205	32	52
2305	42	67
2405	42	50
2505	81	105
2605	137	182
2705	49	60
2805	23	48
2905	90	105

Al comparar gráficamente los resultados del cálculo de concentración de ADN se evidenció claramente que el empleo de PLG, durante la extracción, incrementó la concentración del ADN, ya que la línea que une los valores de concentración obtenidos con PLG en todas las muestras está por encima de la línea que une los valores de concentración obtenidos sin PLG.



Análisis Estadístico de los datos.-

Para determinar si las diferencias de concentración de los ADNs extraídos a partir de muestras de sangre son estadísticamente significativas se realizó el cálculo del t de student con los datos de la tabla 3.

H_0 = Las diferencias observadas en la concentración de ADN se deben al azar.

H_A = Las diferencias observadas en la concentración de ADN no se deben al azar, se deben al empleo de tubos PLG.

Con un nivel de significancia de 0.05 y 28 grados de libertad el valor del t de tablas es $t_t = \pm 2,05$, por lo tanto si el resultado del t_c es menor a -2,05 o mayor a +2,05 la hipótesis nula H_0 se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa H_A .

El resultado de t_c fue: 10,03 entonces H_0 se rechaza, lo que significa que las diferencias de concentración de ADN son estadísticamente significativas y se

deben al empleo de tubos PLG durante la extracción.

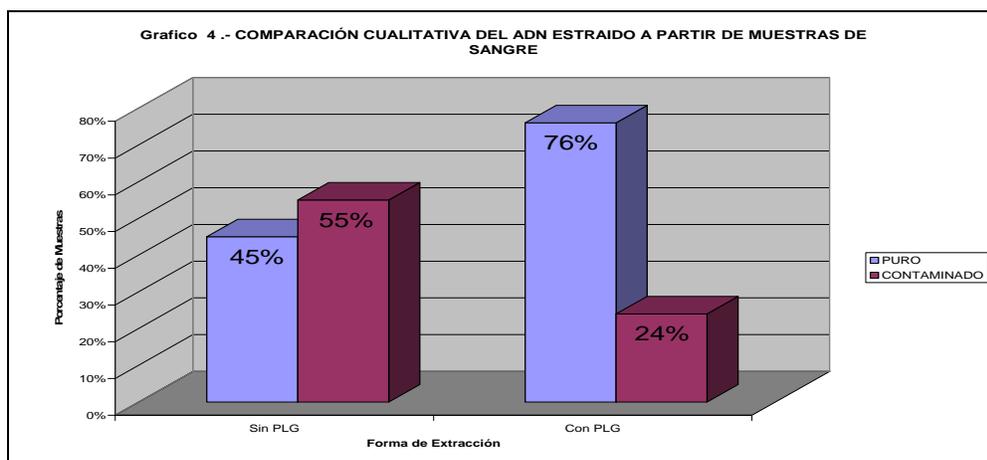
9.2.4 CUALIFICACIÓN DEL ADN EXTRAIDO A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE.-

A continuación se exponen los resultados del cálculo del índice de pureza de cada una de las muestras evaluadas, según el procedimiento de extracción, con y sin PLG por el método Fenol-Cloroformo.

TABLA 4.- COMPARACIÓN DE LA PUREZA DE LOS ADNs PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE

Código	Índice de Pureza Sin PLG	Índice de Pureza Con PLG
0101	1,3	1,9
0201	1,4	2
0301	1,8	1,9
0402	2	2
0503	1,8	1,8
0603	1,5	1,8
0704	1,7	1,9
0804	1,2	2
0904	1,3	1,6
1004	1,4	1,6
1104	1,4	2
1204	1,4	1,6
1304	1,8	1,8
1405	1,8	1,8
1505	1,4	1,3
1605	1,4	2
1705	2	1,6
1805	2	2
1905	1,8	2
2005	1,4	1,8
2105	1,4	2
2205	1,4	2
2305	1,9	1,9
2405	1,8	1,9
2505	1,7	1,9
2605	1,3	1,6
2705	1,8	2
2805	1,8	1,4
2905	1,8	1,8

Cotejando los datos de pureza obtenidos se pudo observar un aumento en porcentaje de las muestras de ADN puro con el empleo de tubos pre-llenados con PLG, disminuyendo el porcentaje de las muestras de ADN contaminado, contrario a lo que ocurrió cuando no se empleó los PLG durante la extracción.



Análisis Estadístico de los datos.-

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó el cálculo del chi cuadrado con los datos de la tabla 3, la organización de estos datos se presentan como valores observados y valores esperados en las tablas 7 y 8 respectivamente.

Tabla 7. VALORES OBSERVADOS

FENOL-CLOROFORMO MUESTRAS DE SANGRE	P	C	TOTAL
Con PLG	22	7	29
Sin PLG	13	16	29
TOTAL	35	23	58

Tabla 8. VALORES ESPERADOS

FENOL-CLOROFORMO MUESTRAS DE SANGRE	P	C	TOTAL
Con PLG	17,5	11,5	29
Sin PLG	17,5	11,5	29
TOTAL	35	23	58

P=Puro C=Contaminado

Realizando el cálculo se obtuvo un valor de: $X^2_c = 5,84$, el cual es mayor al valor del chi-cuadrado en tablas que es $X^2_{\tau}=3,84$, lo que nos indica que las variables son dependientes, esto nos indica que el emplear tubos PLG en la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo mejora la calidad del ADN extraído en cuanto a pureza.

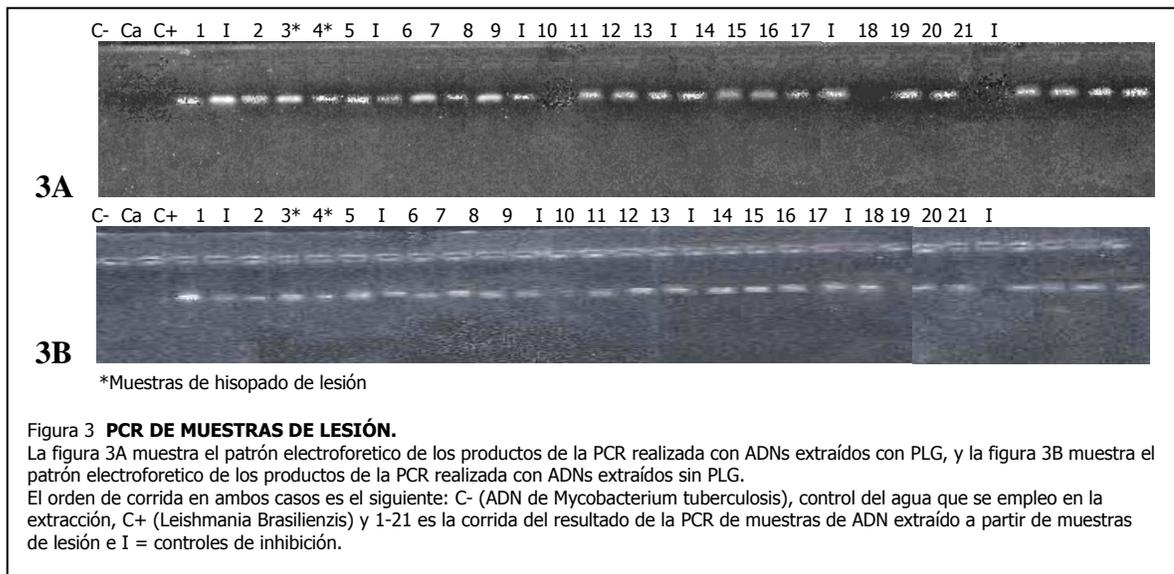
9.3 DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS POR PCR.-

Para comprobar que los ADNs extraídos por el método Fenol-Cloroformo empleando tubos pre-llenados con PLG puedan utilizarse para el diagnostico de leishmaniasis se realizó PCR con los mismos ADNs.

Por el costo que implicaba la prueba no se efectuó la PCR con todos los ADNs obtenidos, se dio prioridad a los ADNs provenientes de muestras de lesión, realizándose la PCR con el total de estos, ya que se considero que los parásitos estaban localizados en las lesiones porque estas se encontraban activas al momento de la toma de muestra, y por ello se incrementaban las probabilidades de obtener resultados positivos más que con los ADNs extraídos de las muestras de sangre. Por lo mismo se realizó la PCR con solo algunos ADNs extraídos de las muestras de sangre.

9.3.1 PCR CON LOS ADNs DE LAS MUESTRAS DE LESIÓN.-

Se realizaron dos PCRs: una en la que se empleó los ADNs extraídos con PLG (Fig. 3A) y otra con los ADNs extraídos sin PLG (Fig. 3B). En ambos casos se empleó los 21 ADNs de muestras de lesión (19 infiltrados y 2 hisopados), y se puso controles de inhibición después de cada cuatro muestras.



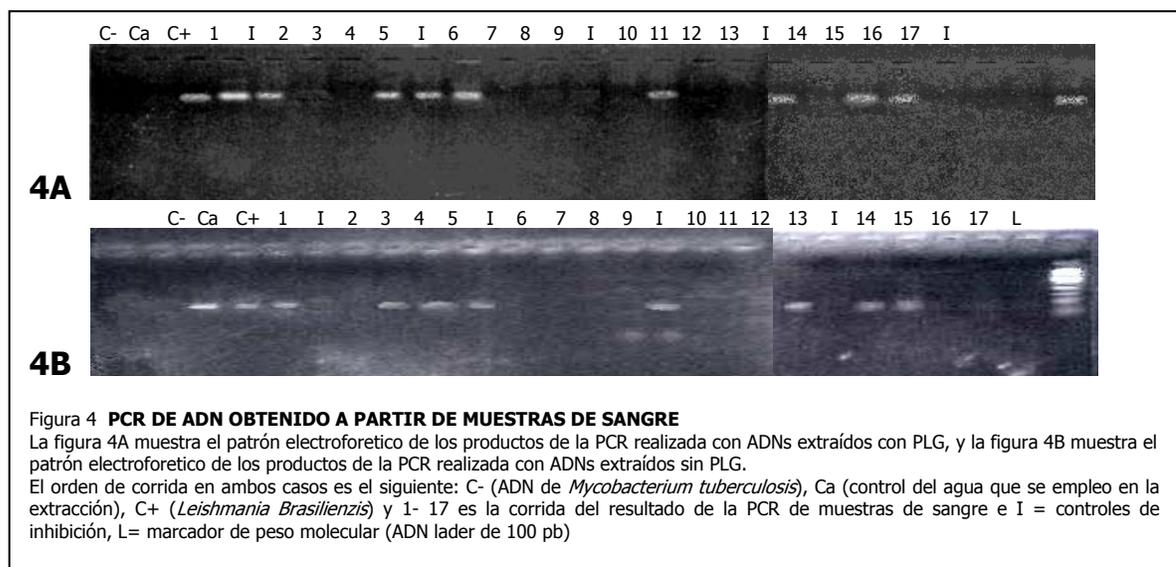
En ambos PCRs se obtuvo 18 casos positivos y 3 negativos, no se observó inhibición en los controles.

La única diferencia que se observó al comparar los resultados de ambas PCRs fue la intensidad de las bandas que era mayor en la que se empleó los ADNs extraídos con PLG, en cambio las bandas de la amplificación de los ADNs extraídos sin PLG eran tenues.

9.3.2 PCR CON LOS ADNs EXTRAIDOS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.-

Con los ADNs obtenidos a partir de muestras de sangre también se realizaron dos PCRs, una con los ADNs extraídos con PLG (Fig. 4A) y otra con los ADNs extraídos sin PLG (Fig.4B). Para la realización de estas PCRs por lo mencionado anteriormente solo se utilizaron 17 muestras de ADN de las 29 que se obtuvo en cada caso (con y sin PLG).

De los 17 ADNs empleados, 8 eran procedentes de las muestras de los pacientes a los que solo se les había tomado muestras de sangre y las nueve restantes se eligieron al azar (Ver anexo 1). Para poder realizar la comparación de los resultados de estas PCRs, se trabajó con ADNs extraídos de muestras provenientes de los mismos pacientes.



En los resultados de estas PCRs realizadas con ADNs extraídos con PLG y sin PLG observó que solo 9 de las 17 muestras empleadas dieron resultados positivos, como se muestra en la figura 4. En cuanto a los controles de inhibición no se observó y la única diferencia que se observó en la comparación de los resultados de estas PCRs fue la intensidad de las bandas que se mostraban mas intensas en la corrida de la PCR realizada con los ADNs extraídos con PLG.

10 DISCUSIÓN.-

El desarrollo de los métodos moleculares y la aplicación de estos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas a llevado a la necesidad de crear métodos de extracción de ADN mas eficientes, hoy en día existen muchos métodos standard y Kits comerciales y por lo mismo es que se han realizado estudios de comparación del rendimiento de estos métodos de extracción (9,11) , pero concordando con lo que menciona Molina et al (10), los resultados de estos estudios son difíciles de comparar porque se emplean distintas muestras y obtienen distintos resultados. No obstante, un detalle muy importante que podemos señalar, según nuestros resultados y los obtenidos por Dudenhausen, et al (5); Saldana, et al (15); Fraga, et al (12), es que en el rendimiento del método fenol cloroformo no influye el tipo de muestra que se empleé. Esta observación es también un justificativo para su empleo como un paso previo a la PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, además que este método no es muy estricto con los volúmenes de muestra.

Coincidiendo con los resultados de Bauer, et al (14), los resultados de la evaluación por electroforesis en geles de agarosa y espectrofotometría ultravioleta a 260 y 280 nm de los ADNs extraídos, la comparación de estos, más los cálculos estadísticos que se realizaron revelan que el empleo de los tubos pre-llenados con PLG en la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo mejora el rendimiento de este método.

En la comparación de las concentraciones de los ADNs extraídos tanto de muestras de sangre como de lesión se observó que con el empleo de PLG las concentraciones aumentaron en un 10 a 40% más de lo que sin el empleo de PLG se pudo obtener.

Los ADNs extraídos por el método fenol-cloroformo sin PLG presentaban altos índices de pureza superiores a 1, coincidiendo con los resultados de los estudios realizados por Saldaña, et al (15) y Fraga, et al (12). Sin embargo con el empleo de PLG se obtuvo una mayor (33%-31% más) proporción de muestras con alto índice de pureza y el cálculo del chi cuadrado de contingencia nos permitió determinar que el aumento observado se debía al empleo de los tubos PLG, por lo mismo es que señalamos que evidentemente mejora el rendimiento del método fenol –cloroformo en cuanto a pureza, porque aumenta las probabilidades de extraer muestras con alto índice de pureza.

Además de las mejoras en cuanto a la pureza y concentración del ADN que ofrece el empleo de tubos PLG, también permite la reducción de costos ya que para la realización de este trabajo se modificó el protocolo de acuerdo a la capacidad de los tubos PLG, por lo que solamente se empleo 200 μ l de muestra, siendo 500 μ l el volumen normalmente empleado; esta reducción del volumen de muestra hizo que también se reduzca el volumen de los reactivos empleados a la mitad, realizándose dos extracciones con la cantidad de reactivos que se usaba para una sola extracción. Al emplear tubos pre-llenados con PLG también se reduce la cantidad de material empleado ya que para la purificación del ADN no es necesario trasvasar a otro tubo eppendorf como en el protocolo normal.

En el diagnóstico de leishmaniasis por la PCR de las muestras de lesión el 76% dieron resultados positivos como se esperaba, ya que las lesiones estaban activas (Anexo 1), entendiéndose que el parásito estaba presente en ellas. Se consideró la posibilidad de obtener resultados negativos al inicio del trabajo pues para la selección de la población en estudio solo se tomo como base el

diagnóstico presuntivo, y como se demostró en el estudio de Sanchez, et al (3), este es válido para la captura de casos en zonas endémicas, por tener una sensibilidad de 52% a 98% pero su especificidad es de 9% a 55% y es por ello que en este tipo de diagnóstico pueden haber excepciones ya que es posible confundir las manifestaciones clínicas e incluso las lesiones, que tienen otro origen pero son similares a las producidas por esta enfermedad (16,21).

Al evaluar los resultados de la PCR con los ADNs extraídos de muestras de sangre solo el 31% de los casos dió negativo, lo cual también es atribuible al hecho de que los parásitos estaban localizados en las lesiones activas y podría asumirse que también estaban aún localizados en las lesiones de reciente cicatrización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cáceres, et al (21) que también trabajo con lesiones activas. Además se debe considerar que no se han realizado estudios seriados que determinen si la presencia de macrófagos parasitados en sangre es de forma permanente en el tiempo o esta sujeta a fluctuaciones, algo difícil de determinar ya que este punto esta sujeto al tipo de respuesta inmune de la persona infectada, la cual esta determinada por el genotipo del parásito, tamaño del inóculo, zona de inoculación, número de picaduras recibidas, saliva del flebotomino y el estado inmunológico de la persona (16,22). Esto no quiere decir que el empleo de las muestras de sangre para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea no sea adecuado, sino que es necesario un seguimiento de la evolución de la infección para de acuerdo a esto determinar el tipo de muestra que se ira a tomar para realizar el diagnóstico laboratorial.

Según los resultados de los controles de inhibición de las PCRs realizadas utilización de PLG durante la extracción no confiere ningún inhibidor para la PCR, resultado que se esperaba ya que al ser este producto una resina inerte no tiene ninguna interacción directa con el ADN.

Las diferencias observadas en la comparación de los resultados de las PCRs realizadas con ADNs extraídos con y sin PLG tanto en las muestras de

lesión como las de sangre, son atribuibles a las mejoras en la concentración de ADN que se obtiene con el empleo de PLG.

Los resultados del diagnóstico por microscopía solo 4 dieron resultado positivo y 8 dieron negativo, no apoyando el diagnóstico presuntivo, esto podría deberse a que las condiciones en las que se tomo las muestras no eran las apropiadas ya que no se pudo realizar una buena limpieza de las lesiones, la presencia de mosquitos era abundante, se pegaban a las lesiones y durante el viaje de salida de las comunidades visitadas se desarrollaron hongos en las placas que obstaculizaron la visualidad de las mismas en la búsqueda de los parásitos. Además como se menciona en varios trabajos la sensibilidad de este método de diagnóstico es muy variable va desde 20% al 70% que depende de muchos factores, entre ellos la calidad de la muestra (4,16). Por lo ya citado no se tomo muy en cuenta estos resultados.

11 CONCLUSIONES.-

Según los resultados obtenidos en la evaluación de PLG podemos concluir que la utilización de tubos PLG incrementa el rendimiento del método fenol cloroformo, en cuanto a la concentración y pureza del ADN extraído, proporcionando así un material idóneo para la realización de la PCR aplicable al diagnóstico de leishmaniasis.

Los resultados de la comparación de las concentraciones de los ADNs extraídos con y sin PLG y el análisis estadístico de estos nos permiten concluir que el incremento que proporciona el empleo de PLG es de 10 a 40% más.

En cuanto a las mejoras que brinda el empleo de PLG según nuestros resultados concluimos que existe un aumento del 31% al 33% de la cantidad de muestras de ADNs con alto índice de pureza, es decir que aumenta las probabilidades de que durante la extracción se obtengan ADNs altamente puros, sin importar el tipo de muestra que se empleó.

El ADN extraído con PLG puede ser empleado para el diagnóstico de Leishmaniasis por la PCR, ya la utilización de este producto durante la extracción no le confiere inhibidores para dicha prueba. Además que la obtención de un ADN más concentrado con el empleo de PLG nos facilita la visualización de las bandas al momento de la lectura de los resultados de la PCR, ayudando de esta manera a mejorar este método diagnóstico para la Leishmaniasis.

En base a las conclusiones anteriores y tomando en cuenta que la calidad del ADN es crucial para la realización de la PCR concluimos que la utilización de los tubos PLG en la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo aportaría a la optimización de este método de extracción para el diagnóstico de leishmaniasis por la PCR.

ANEXOS

Anexo 1.-REGISTRO DE PACIENTES Y RESULTADOS DE PCR Y FROTIS

CODIGO	COMUNIDAD	ORIGEN	SEXO	EDAD	TIPO DE LESIÓN	TIPO DE MUESTRA	RESULTADOS	
							PCR	FROTIS
0101	La Esmeralda	Cochabamba	M	24 a	Cutánea-Brazo	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Positivo
0201	La Esmeralda	La Esmeralda	M	8 a	Cutánea-Rodilla	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Positivo
0301	La Esmeralda	Potosí	M	37 a	Moco-Cut.-Nariz	Sangre Hisopado	NSR Positivo	Negativo
0402	San José de Uchupiamonas	San José de Uchupiamonas	M	14 a	Moco- Cut.-Nariz	Sangre Hisopado	Positivo Positivo	S/M
0503	San Silvestre	San Silvestre	M	25 a	Cutánea-Glúteo	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Negativo
0603	San Silvestre	San Silvestre	F	8 a	Cutánea-Pie	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Negativo
0704	Nueva Idiama	La Paz	M	21 a	Cutánea-Pie	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Negativo
0804	Nueva Idiama	Potosí	F	34 a	Cutánea-Pie	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Negativo
0904	Nueva Idiama	Potosí	M	37 a	Cutánea-Rodilla	Sangre Infiltrado	Negativo Negativo	S/M
1004	Nueva Idiama	Potosí	F	14 a	Cutánea-Pie	Sangre Infiltrado	Inhibido Inhibido	S/M
1104	Nueva Idiama	Argentina	F	11 a	Cutánea-Pie	Sangre Infiltrado	Positivo Positivo	S/M
1204	Nueva Idiama	Chuquisaca	M	11 a	Cutánea-Rodilla	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Positivo
1304	Nueva Idiama	Chuquisaca	F	12 a	Cutánea-Pierna	Sangre	Positivo	
1405	El Tigre	Potosí	F	25 a	Cutánea-Pierna	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	S/M
1505	El Tigre	Potosí	M	66 a	Cutánea-Pierna	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	S/M
1605	El Tigre	Potosí	M	11 a	Cutánea-Muslo	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	S/M
1705	El Tigre	El Tigre	F	40 a	Cutánea-Pierna	Sangre Infiltrado	Negativo Negativo	S/M
1805	El Tigre	El Tigre	F	3 a	Cutánea-brazo	Sangre	Negativo	
1905	El Tigre	Potosí	M	21 a	Cutánea-brazo	Sangre Infiltrado	NSR Positivo	Negativo
2005	El Tigre	Potosí	F	27 a	Cutánea-Pie	Sangre	Negativo	
2105	El Tigre	Potosí	M	18 a	Cutánea-Pierna	Sangre Infiltrado	Negativo Negativo	Negativo
2205	El Tigre	Potosí	M	27 a	Cutánea-Brazo	Sangre	Negativo	
2305	El Tigre	El Tigre	M	4 a	Cutánea-Brazo	Sangre Infiltrado	Negativo Negativo	S/M
2405	El Tigre	Potosí	M	17 a	Cutánea-Tobil	Sangre	Positivo	
2505	El Tigre	Potosí	M	27 a	Cutánea-Pierna	Sangre Infiltrado	Negativo Positivo	Positivo
2605	El Tigre	Potosí	M	14 a	Cutánea-Pie	Sangre	Positivo	
2705	El Tigre	Potosí	F	52 a	Cutánea-Pie	Sangre	Negativo	
2805	El Tigre	Potosí	F	42 a	Cutánea-Brazo	Sangre	Negativo	
2905	El Tigre	Potosí	M	15 a	Cutánea-Brazo	Sangre Infiltrado	Negativo Positivo	Negativo

NSR: No se realizo; F: Femenino, M: Masculino

Anexo 2.- ASPECTOS ETICOS

Para realización de un trabajo de investigación debido a que se emplean muestras procedentes de personas se tomo en cuenta el **Código de Nuremberg**, que indica lo siguiente:

- a) El sujeto de experimentación debe dar un consentimiento voluntario y debe conservar su libertad y poder de autoconservación permanentemente.
- b) El experimento debe ser necesario, preparado correctamente, con riesgos muy bajos de producir daño, invalidez o muerte.
- c) El investigador debe ser calificado, para no producir daño y poder suspender el experimento en caso de peligro.

Por lo que para la recolección de las muestras se consiguió el consentimiento previo en forma escrita de las personas que formaron parte del estudio, para lo cual se les hizo firmar el siguiente escrito.

<p>UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS Proyecto Enfermedades Infecciosas ASDI-SAREC</p>
<p>Rurrenabaque__ de Diciembre del 2006.</p>
<p>El Paciente.....da su entera conformidad para la extracción de muestras sanguíneas y de lesión tendientes al estudio de la enfermedad infecciosa denominada Leishmaniasis. Con el compromiso de los que realizamos este estudio de que los resultados del diagnostico que se realizara por la PCR le serán entregados a través del Proyecto de Salud Río Beni.</p>
<p>----- Firma del Paciente</p>

Anexo 3.-PRINCIPALES DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DE REFERENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS

Método	Desventajas
MICROSCOPIA	<ul style="list-style-type: none">* La sensibilidad es inconstante.* El diagnostico no es especie- especifico.
CULTIVO	<ul style="list-style-type: none">* Se requiere condiciones de esterilidad muy estrictas.* La sensibilidad es inconstante.* Es un método costoso.* Se requiere 2 o mas semanas para obtener resultados.
IDRM	<ul style="list-style-type: none">* No diferencia entre infecciones pasadas o recientes.* Requiere 2 a 3 días para obtener resultados.
ELISA	<ul style="list-style-type: none">* Pueden presentarse reacciones cruzadas.
IFI	<ul style="list-style-type: none">* Pueden presentarse reacciones cruzadas.

Anexo 4.- CARACTERISTICAS DE LOS TUBOS EMPLEADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN



Anexo 5.-ALGUNAS DE LAS COMUNIDADES VISITADAS.-



UNA VISTA DE LOS CAMINOS PARA LLEGAR A LAS COMUNIDADES



Anexo 6.-LESIONES DE LOS PACIENTES



Anexo 7.-TOMA DE MUESTRA



Anexo 8.-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



13 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.-

- 1.- Mollinedo. S, et al. "Leishmaniasis en Bolivia", en Revista Médica. Vol. 7 N° 1 de Oct-Dic 2000; disponible en www.revistaciencias.com/publicaciones/EEFyulppV/ocOLwwHJ.php
- 2.- Ministerio de Salud y Deportes, Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis; "Leishmaniasis, Guía operativa para el control en Bolivia"; 1ª Edición; disponible en smollinedo@sns.gov.bo
- 3.- Sánchez J, Orozco L, Buendía J, Muñoz G. Validez del diagnóstico presuntivo de leishmaniasis cutánea realizado por mediadores comunitarios en Colombia. Rev Panam Salud Pública. 2007; 21(6):335-44. Disponible en: www.scielo.br/pdf/rp/v21n6/01.pdf
- 4.- Zerpa, Olga, et al; " Borges*, "Comparación de cinco Métodos para el Diagnostico de Leishmaniasis Cutánea", Dermatología Venezolana, Vol. 40, N° 4, 2002
- 5.- Prof. Dr. Dudenhausen, Joachim W; "PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies"; Disponible en <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/anders-gerlind-2003-02-05/HTML/front.html#front>
- 6.- Miranda Hernan, et al; "Estudio Comparado de Métodos de Diagnóstico de la Leishmaniasis y Caracterización Molecular de los Agentes Etiológicos en la Libertad"; Folia Dermatológica Peruana; 2003; 14 (2) : 18-23 ISSN versión electrónica: 1609-7254
- 7.- Brusés B L, et al.; "Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de Trypanosoma cruzi mediante la técnica de PCR ; Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000; Disponible en: http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf.
- 8.- Calderón, et al; "Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y microscopía en la detección de malaria después del tratamiento para infecciones con P. vivax y P. falciparum"; Mosaico Científico; Vol.3 N° 1 Lima-Perú ene.-jun. 2006; Disponible en: Calderonsanchez@hotmail.com / dpatchp@upch.edu.pe
- 9.- Loaysa, Elizabeth, "Evaluación de la Eficiencia de Tres Métodos de Extracción de ADN de Tripanosoma Cruzi para su uso en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); Tesina para Licenciatura en bioquímica, La Paz-Bolivia, 2000.
- 10.- Molina. N, et al ; "Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de Giardia lamblia"; Parasitología Latinoamericana 61: 133 - 137, 2006 FLAP
- 11.- V. M. Jewtuchowicz, et al; "Comparación de métodos de extracción de ADN de sangre para detectar ADN fúngico por PCR"; Revista Argentina de Microbiología (2007) 39: 15-18; ISSN 0325-7541. Versión on-line
- 12.- Fraga Jorge, Rodríguez Jinnay. et al; "Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)"; Rev. Cubana Med Trop v.56 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2004; ISSN 0375-0760 versión on-line
- 13.- Folleto de descripción del producto PAGE LOCK GEL disponible en: www.eppendorf.com
- 14.- Bauer Christian , Klotzsche Oliver, et al , "Convenient preparation of genomic DNA from whole blood using Eppendorf Phase Lock Gel" , Disponible en: application-hotline@eppendorf.com

- 15.- Saldaña, et al; "Extracción y cuantificación de ADN de bovinos"; Tierra Tropical (2006); Vol 3 N° 1; 61-70; ISSN: 1659-2751; Versión on-line.
- 16.- Botero, David;"Parasitosis Humanas"; 4ª Edición; Medellín-Colombia; 2003; 238-261.
- 17.- Peñalosa, Rosario; Guía de Practicas Análisis Instrumental; FCFB; La Paz-Bolivia; 2002.
- 18.- Pita, Salvador; Asociación de Variables cualitativas: Test del Chi Cuadrado; 2004; disponible en: <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/chi/chi.asp>.
- 19.- Milton, Susan;"Estadística para Biología y Ciencias de la Salud"; 2ª Edición; Iberoamericana Mc Graw-Hill; España-Madrid; 1994; 109-111.
- 20.-Arévalo, Jorge, "El ADN y el Diagnostico Molecular de Enfermedades Infecciosas", Revista Medica Diagnostico, Vol. 39 N° 6 de Nov-Dic.2000
- 21.-Cáceres, Omar; "Diseño y Evaluación de Tres Oligonucleótidos para la Detección de *Leishmania* por PCR"; Revista Peruana Medica Exp Salud Publica 2002; Vol. 19 N° 3; p109-115; Disponible en: www.scielo.org.pe/pdf/rins/v19n3/a02v10n3.pdf.
- 22.- Gallego Montserrat, et al; "Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis Autóctona Por *Leishmania Infantum*"; Barcelona - España; Control y Calidad CEIMC, Biblioteca virtual de salud; Disponible en www.seimc.org/control/revi-Para/leish.htm-25k