

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**“EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA
LA DETECCIÓN DE *Leishmania braziliensis* POR LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA”**

**Tesis de Grado para obtener el Título de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio
en Salud “Mención Parasitología”**

POR: Lic. María Esther Chuquimia Choque

**La Paz – Bolivia
2013**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**“EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA
LA DETECCIÓN DE *Leishmania braziliensis* POR LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA”**

**Tesis de Grado para obtener el Título de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio
en Salud “Mención Parasitología”**

POR: Lic. María Esther Chuquimia Choque

TUTOR: Dr. Esp. Luis Fernando Sosa Tordoya

ASESOR: Lic. Esp. Ruddy Luna Barrón

**La Paz – Bolivia
2013**

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Roberto

Por su amor incondicional y guía continúa en esta vida,
aun cuando no se encuentre en este mundo, siempre está a
mi lado brindándome el valor para salir adelante

A mi madre Rosa

Por su sacrificio constante, alentándome a sobrellevar
los problemas con su gran amor.

A mi hermana y sobrinas con todo el corazón

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda la vida.

Al Proyecto “Enfermedades Infecciosas” ASDI/SAREC de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) por el apoyo financiero y a través del Dr. Walter Magariños, el haber depositado su confianza en la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Genética (CINGEN) del Instituto de Investigaciones Técnico-Científicas de la Universidad Policial (IITCUP) por el apoyo técnico – científico.

Al Instituto SELADIS, por haber sido el pilar fundamental de mi formación profesional.

A mi tutor de tesis, Dr. Fernando Sosa por el apoyo brindado, por transmitirme sus conocimientos en la realización de la tesis, gracias por su intervención oportuna,

A mi asesor de tesis, el Lic. Ruddy Luna, por sus valiosas enseñanzas, su paciencia hacia mi persona, por permitirme robar parte de su tiempo y realizar este trabajo y por confiar en mí. .

Un especial agradecimiento a la Dra. María Luz Soto por su gran apoyo y motivación constante y brindarme su amistad.

A mis compañeras y amigas, Emma Torres, Aneliz Ninahuanca, Julia Molina, Vanesa Serrudo, Wendy Villarroel, Daniela Arteaga, Karina Salazar, Silvana Limache, Sadoth Pilco, Claudia Heredia, Georgia Poquechoque y Aneth Vasquez, por compartir todas las alegrías y contratiempos en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de residencia y grandes amigas, Evelin Fortún, Ana Rosa Lopez y Vanessa Delgado por su apoyo en los buenos y malos momentos.

Al proyecto OSCAR y al Hospital de Palos blancos, por brindarme los conocimientos y experiencias respecto a la enfermedad de la Leishmaniasis

A mis amigos o todas aquellas personas que creyeron en mí.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1	INTRODUCCION	1
2	ANTECEDENTES.....	2
2.1	PRIMERAS DESCRIPCIONES	3
2.2	SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA.....	5
2.2.1	MANIFESTACIONES CLINICAS.....	6
2.2.2	RESERVORIOS.....	7
2.2.3	VECTOR.....	8
2.2.4	CICLO DEL PARÁSITO.....	9
2.3	SITUACIÓN EN BOLIVIA.....	11
2.4	TAXONOMÍA.....	13
2.5	MORFOLOGIA.....	16
2.6	ORGANIZACIÓN GENÓMICA	17
2.7	DIAGNÓSTICO	19
2.7.1	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONALES.....	19
2.7.1.1	Los métodos directos o parasitológicos.....	19
2.7.1.2	los métodos indirectos o inmunológicos	20
2.7.1.3	Métodos de diagnóstico molecular	21
2.7.1.3.1	Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
2.7.1.3.1.1	Marcadores genéticos	25
A.	Marcadores kinetoplastiales	25
B.	Marcadores ADN ribosomal	27
C.	Marcadores del gen del mini exón.....	27
D.	Marcadores dirigidos a la tubuli.....	28
E.	Marcador nuclear glucosa-6-fosfato deshidrogenas.....	28
2.8	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR.....	29

2.8.1	VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR ..	29
2.8.1.1	Medidas de la validez	29
2.8.2	ETAPAS DE LA VALIDACIÓN DE ENSAYOS.....	29
2.8.2.1	1ª Etapa estudios de viabilidad	29
2.8.2.2	2ª Etapa desarrollo y estandarización del ensayo	30
2.8.2.2.1	Repetibilidad —estimaciones preliminares	30
2.8.3	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESENCIALES DE CONTROL.....	30
2.8.4	SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICAS.....	30
2.8.5	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DEL ENSAYO	31
2.8.5.1	Sensibilidad y especificidad diagnósticas	31
2.8.5.2	Repetibilidad y reproducibilidad	32
2.8.5.3	Seguimiento de la validez de la operatividad del ensayo	32
2.8.5.4	Mantenimiento y mejora de los criterios de validación.....	33
2.8.5.5	Precauciones y controles.	33
2.8.5.5.1	Precauciones para evitar resultados positivos falsos.....	33
2.8.5.5.2	Controles internos (miméticos) para evitar resultados negativos falso	34
2.9	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	36
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
4	JUSTIFICACIÓN.....	38
5	HIPOTESIS.....	39
6	OBJETIVOS.....	40
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	40
6.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	40
7	MATERIAL Y METODOS.....	41
7.1	MUESTRAS DE SANGRE:.....	41
7.2	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	41

7.3	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:.....	41
7.4	PARÁSITOS:.....	41
7.5	PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO:.....	42
	7.5.1PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES SERIADAS DE PARÁSITOS.....	42
7.6	EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO:.....	43
	7.6.1 CONCENTRACIONES SERIADAS DE PARÁSITOS.....	43
	7.6.2 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE INOCULADAS CON CONCENTRACIONES SERIADAS DE <i>Leishmania braziliensis</i>	44
	7.6.3 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE COMO CONTROLES NEGATIVOS	44
	7.6.4 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE CULTIVO DE <i>Leishmania</i> Y <i>Leishmania amazonensis</i> COMO CONTROLES POSITIVOS.....	44
7.7	REALIZACION DE LA PCR	45
	7.7.1 MARCADORES GENÉTICOS	45
	7.7.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR CON MARCADORES GENÉTICOS EVALUADOS	48
	7.7.3 MASTER MIX	48
	7.7.4 MUESTRAS USADAS EN LA EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE PCR.....	49
	7.7.5 VARIACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS KINETOPLASTIDIALES 13 A Y 13 B.....	50
	7.7.6 VARIACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS R 221 y R 332 DIRIGIDOS AL ADN RIBOSOMAL.....	50
	7.7.7 VARIACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS TUB 1 Y TUB 6 DIRIGIDOS PARA A LA TUBULINA	51
	7.7.8 VARIACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS A2 Y A 10 DIRIGIDOS PARA A LA TUBULINA	52
7.8	EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD ANALITICA PARA CADA MARCADOR GENETICO.....	53

7.9	PCR MULTIPLEX CON LOS MARCADORES DE LA TUBULINA TUB 1, TUB 6, A2 Y A10.....	53
8	RESULTADOS.....	54
8.1	EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	54
8.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR.....	56
8.3	SENSIBILIDAD ANALÍTICA	59
8.4	PCR MULTIPLEX CON LOS MARCADORES DE LA TUBULINA	63
9	DISCUSIÓN	68
10	CONCLUSIONES	77
11	COSTO Y FINANCIAMIENTO.....	78
12	RECOMENDACIONES	78
13	BIBLIOGRAFIA.....	79

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizaron ensayos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Leishmania braziliensis* en muestras de sangre periférica, en los que se optimizaron las condiciones de reacción y se evaluó la sensibilidad analítica de marcadores genéticos kinetoplastidiales ampliamente utilizados como el 13 A y 13 B, así también de otros marcadores con sitios blanco dirigidos a rRNA SSU o ADN ribosomal como R 221, R 332 y la región de la β - Tubulina como ser TUB 1 y TUB 6. En este estudio se usó como método de extracción, el kit comercial Wizard Genomic de la línea PROMEGA, que permitió obtener ADN de *Leishmania* apto para la amplificación a partir de muestras de sangre inoculadas *in vitro* con cultivos de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, este método de extracción fue útil, pero está sujeto a varios cuestionamientos sobre la concentración y pureza obtenidas, que deben ser respondidos en posteriores estudios. Se pudo evidenciar la existencia de variaciones en la sensibilidad analítica de los marcadores moleculares como los kinetoplastidiales 13 A y 13 B que dieron un límite de detección de 100 parásitos por mL de muestra, el marcador de ADN ribosomal con un límite de detección de de 10^4 parásitos por mL, ambos marcadores con límites de detección menores a los reportados por otros autores.

Los marcadores de la α -tubulina (TUB 1 y TUB 6) dieron una mayor sensibilidad analítica hasta 1 parásito por mL. En una reacción multiplex en forma conjunta con los marcadores A2 y A10 que reconocen la región de la α -tubulina específica para la identificación del subgénero *Viannia*, alcanzaron un límite de detección de hasta 10 parásitos por mL de muestra. Los marcadores dirigidos a la β - Tubulina fueron considerados en este estudio, con la mejor capacidad de detección y se recomienda continuar con las etapas de validación permitirán contribuir con la información necesaria para su uso en el diagnóstico preciso de la leishmaniosis mucocutánea.

ABSTRACT

In the present study, Polymerase Chain Reaction (PCR) tests were conducted for detection of *Leishmania braziliensis* in peripheral blood samples, optimizing PCR reaction conditions and evaluating the analytical sensitivity of the kinetoplast genetic markers widely used 13A-13B, other SSU-rRNA as R221-R332 and the region of tubulin as TUB1-TUB6. For DNA extraction we used the commercial kit Wizard Genomic PROMEGA line, which allowed to obtain DNA suitable for the amplification of *Leishmania* from blood samples inoculated with *in vitro* culture of *Leishmania braziliensis* promastigotes. This method of extraction was useful, but is subject to several questions about the concentration and purity obtained, which must be addressed in future studies.

Also is evident the existence of variations in analytical sensitivity of molecular markers as kinetoplastidiales 13 A and 13 B with a detection limit of 100 parasites per mL of sample and the DNA ribosomal marker with a detection limit of 10^4 parasites per mL, both markers with detection limits lower than those reported by other authors.

Markers of α -tubulin (TUB1 and TUB 6) had a higher analytical sensitivity up to 1 parasite per mL. In a multiplex reaction together with A2 and A10 markers which recognize the region of the α -tubulin specific identification of the subgenus *Viannia*, reached a detection limit as 10 parasites per mL of sample. The markers targeting the β -tubulin were also considered in this study with the best detection capability and is recommended to continue validation steps to contribute information to the accurate diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis.

1 INTRODUCCIÓN.

La leishmaniosis es una de las enfermedades infecciosas parasitarias de más alta incidencia en el mundo (WHO). La patología precisa de la leishmaniosis varía en todo el mundo en función a la especie y cepa del patógeno. Es el caso de la leishmaniosis visceral que generalmente produce una necrosis tisular aguda que puede ser fatal (Jackson *et al.*, 2006).

La leishmaniosis cutánea americana (LCA) está definida como una enfermedad crónica no contagiosa caracterizada por afectar piel, mucosas y cartílago. En el continente americano es causada por los complejos de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania amazonensis*. El diagnóstico de la LCA, ha sido principalmente clínico, especialmente en áreas endémicas. Es difícil de obtener un diagnóstico laboratorial definitivo ya que la detección del parásito en la lesión se torna más dificultosa a medida que se convierte en crónica. (Medeiros *et al.*, 2002). Aún hoy, la identificación microscópica y el cultivo son herramientas de diagnóstico empleadas en muchas regiones endémicas (Bensoussan *et al.*, 2006).

Nuevos métodos simples de alta sensibilidad y especificidad han sido desarrollados para el diagnóstico y el seguimiento terapéutico, mismos que se pueden aplicar también para la identificación taxonómica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha mostrado ser altamente sensible para el diagnóstico de la ACL, también para la tipificación de *Leishmania* aisladas de muestras clínicas, insectos vectores, reservorios o medios de cultivo (Cannova, 2007).

La evaluación de secuencias de ADN de regiones conservadas y variables en el genoma de un organismo, hace posible la selección de marcadores moleculares estables con un nivel apropiado de variabilidad que permiten la identificación específica de ese

organismo, así como el establecimiento de las relaciones evolutivas entre organismos (Montalvo, 2011).

Diferentes marcadores moleculares han sido usados en la identificación, algunos de estos revelan diferencias en distintos niveles. A nivel genómico, los marcadores genéticos más usados han sido diseñados en base al ADN kinetoplastidial para el diagnóstico y diferenciación de especies (Barker, 1987; De Bruijn *et al.*, 1992). Así también como los marcadores nucleares dirigidos a secuencias que codifican la β -tubulina, se encuentra presente en todas las fases del ciclo evolutivo de *Leishmania* y sus genes presentan un alto grado de conservación a lo largo de la evolución (Jackson *et al.*, 2006). Por otra parte la secuencia de la β -tubulina muestra suficiente variación para establecer una diferenciación inter e intra especies de *Leishmania* (Luis *et al.*, 2001). Por lo tanto este marcador genético y la técnica de PCR puede ser una herramienta de alta sensibilidad y especificidad, ser considerada como un método alternativo de diagnóstico de la Leishmaniosis.

2. ANTECEDENTES.

Las Leishmaniosis son un grupo de enfermedades parasitarias producidas por protozoos del género *Leishmania* que están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Atias, 1991). Estos protozoos parasitan las células del sistema retículo endotelial (Fig. 1), existiendo al menos 21 especies patógenas para el ser humano. La enfermedad es transmitida al ser humano por la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*, de los cuáles aproximadamente 30 especies son vectores demostrados, encontrándose el reservorio, generalmente, en mamíferos salvajes o domésticos, aunque también puede transmitirse mediante un ciclo antroponótico. La capacidad infectiva de estos parásitos se manifiesta de forma variada en la clínica, dando lugar a formas viscerales (conocida en la India como *kala-azar*: fiebre negra), mucocutáneas y cutáneas, que desde el punto de vista clínico, pronóstico y terapéutico, se comportan como enfermedades diferentes. En muchas ocasiones, este parásito es capaz de simular

cuadros clínicos infecciosos, inflamatorios, descamativos, hiperplásicos o tumorales que llevan a dudas en el diagnóstico (Torres, 1999).

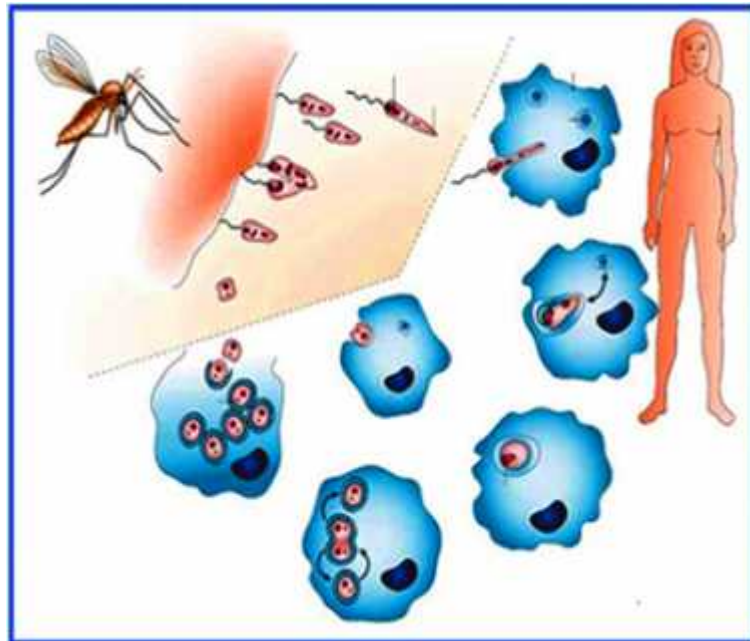


Figura 1. Mecanismo de infección de la *Leishmania* (modificada por Sacks y Noben-Trauth, 2002).

2.1 PRIMERAS DESCRIPCIONES

Los antecedentes más remotos de leishmaniosis se registran en el viejo mundo, siendo recogidos en el “Papiro de Ebers” o “Grano del Nilo” hacia el año 1600 a.c. (García, 2005), para posteriormente encontrarse datos en la biblioteca del Rey Ashurbanipal, que contenía referencias de textos asirios y acadios, hacia el 650 a.c. Por otro lado, físicos árabes como Abu Mansur y Avicena a finales del siglo X, describían la leishmaniosis cutánea, más conocida como “botón de oriente” (Hervas, 2006).

En el continente americano, su presencia fue revelada en las cerámicas antropomórficas (huacos) en las que las culturas pre-incaicas del norte peruano (Moche y Chimu, 100

a.c. -750d.c.) reflejaron las dolencias de sus enfermos, los cuáles presentan mutilaciones sobre el macizo facial, característica de la leishmaniosis tegumentaria americana (Altamirano, 2000; Mollinedo *et al.*, 2000; Topolanski, 2008). (Fig. 2).

Las primeras descripciones correctas que se realizaron del agente etiológico, fueron atribuidas a Piotr Borovsky en 1898 (Crum, 2005), quien lo identificó acertadamente como un protozoo, en un caso clínico de leishmaniosis cutánea del viejo mundo.



Figura 2. Representación antropomórfica de Leishmaniosis Tegumentaria Americana en cerámicas de la cultura mochica. (Fuente: Altamirano, 2000; Topolanski, 2008)

Leishman y Donovan, independientemente del trabajo de Borovsky refirieron un caso de Leishmaniosis visceral (Kala-zar) en la India en 1903 (Cox, 2002). Por otro lado, Ronald Ross, en ese mismo año, denomina a ese parásito causante de la enfermedad con el nombre genérico de *Leishmania* (WHO, 2010).

En 1909, Lindeberg, Carini y Parnahos, en forma independiente, describen la leishmaniosis mucocutánea sudamericana en pacientes brasileros (Rey, 2004; WHO, 2010). Tras ellos, en 1937 siguieron los investigadores Cunha y Chagas, Lainson y Shaw en 1972, Safnova en 1982, Grimaldi en 1992 entre otros que dieron sus aportes en el esclarecimiento de la clasificación y taxonomía de este protozoo (OPS, 2006).

En Bolivia, una de las primeras descripciones de esta enfermedad corresponde a un caso Leishmaniosis cutánea mucosa realizada por el Dr. Manuel Antonio Vaca Diez en 1876, quien comienza a estudiarla en la guerra del Acre, cuando se observaron muchos casos en el río Mapiri y el territorio de Colonias. Tanto como Elías Sagarnaga, Adolfo Flores en 1904 y Jaime Mendoza en 1906 utilizaron el término de “Espundia” para describir la que identificaron como úlcera tropical (Mollinedo *et al.*, 2000; Balcázar, 1956).

2.2 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

La Organización Mundial de la Salud ha identificado a la leishmaniosis como una de las enfermedades tropicales más importantes presente en 88 países, la cual afecta a 12 millones de personas, en su mayoría en situación de pobreza (Ordeñana, 2005; OMS, 2007).

Aproximadamente 2 millones de nuevos casos son reportados anualmente, de los cuáles, según estimaciones, 500.000 corresponden a casos de leishmaniosis visceral y 1.500.000 a la forma cutánea (OMS, 2007), con una morbi-mortalidad de alrededor de 50.000 muertes al año, fundamentalmente en casos de leishmaniosis visceral (OMS, 2007).

La distribución geográfica de la leishmaniosis está limitada por la distribución del vector. Sin embargo, la incursión del hombre en áreas selváticas y los cambios que induce en el medio ambiente, han aumentado la exposición al vector y por ende en el número de casos (Sánchez-Saldaña, 2004)

Entre los factores que influyen a la aparición de la enfermedad y que contribuyen a la progresión de la misma están: características biológicas del parásito, relación existente con el huésped, reservorio, vector y parásito, distribución geográfica, y el estado inmunológico del hospedero (Rey, 2004).

2.2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La leishmaniosis se ha clasificado en tres formas principales de presentación clínica:

Leishmaniosis cutánea: que se caracteriza por lesiones dérmicas que comienzan como pápulas eritematosas en el área de la picadura en un periodo de incubación 2 y 3 semanas, habiéndose observado como signo precoz la aparición de nódulos linfáticos que en algunos casos suele ser el único signo de infección pero generalmente llegan a proceso ulcerativo. Es común en esta forma clínica que la lesión sane espontáneamente y origine una fase de silencio sintomático algo prolongado, de manera que un trauma local puede activar una infección latente. Cuando existe una pobre respuesta inmune celular (paciente anérgico) se presenta una forma rara de **Leishmaniosis cutánea difusa** que se inicia con lesiones localizadas de aspecto nodular que poco a poco se diseminan a todo el cuerpo (Zerpa, 2009).

Leishmaniosis mucocutánea o cutáneo – mucosa: es una de las formas de la leishmaniasis tegumentaria americana conocida también como espúndia, se presentan generalmente con lesiones cutáneas en el área de la picadura del insecto vector presentan un tamaño que va aumentando a medida que va pasando el tiempo, se produce localmente una reacción inflamatoria caracterizada por: hiperplasia histiocitaria, edema e infiltración celular, alteraciones vasculares e hiperplasia de epitelio. La lesión se presenta como una ulcera tiende a estar llena de parásitos al inicio, a medida que se va volviendo crónica el número de parásitos va disminuyendo. La lesión puede cicatrizar espontáneamente en un plazo de 6 meses, muchas veces en 12 a 15 meses o en muchos casos aislados en años, después de haber cicatrizado las lesiones cutáneas pueden permanecer en estado de latencia esperando el momento oportuno para manifestarse. Cualquiera sea el curso y la forma de las lesiones cutáneas, la leishmaniosis tegumentaria muestra una marcada tendencia para formación de metástasis en la mucosa nasal. La propagación es probable que sea por vía hematológica o linfática según parecen demostrar los casos con lesiones ulcerativas que se complican con el

surgimiento de nódulos secundarios, el agente causal se atribuye a especies del complejo *braziliensis*.

Leishmaniosis visceral: es una enfermedad sistémica severa. El periodo de incubación varía de 4 a 10 meses desde la picadura del vector. En muy pocos casos se encuentran lesiones en el sitio de entrada y tiene una evolución crónica con procesos febriles, anemia, disminución del peso corporal, aumento de tamaño del hígado y el bazo y la muerte, en la mayoría de los casos (Ordeñana, 2005; Morales 2002).

2.2.2 RESERVORIOS

Los reservorios los constituyen vertebrados presentes en áreas endémicas, tales como mamíferos selváticos y domésticos; por lo que es considerada un enfermedad zoonótica, siendo evidente la relación ecológica estrecha que existe entre los vectores de un parásito y su animal reservorio. Según la OMS, se pueden distinguir tres clases de huéspedes animales: primarios, secundarios e incidentales. Los huéspedes primarios de *Leishmania* son mamíferos del orden primates, como el hombre, carnívora, como el perro doméstico (*Canis familiaris*), rodentia, ratas de campo, edentata, perezosos y marsupialia, como las zarigüeyas, entre otros (Fig. 3). Así, estos mamíferos son el refugio habitual del parásito y mantienen la enfermedad en los humanos y en otros animales.



Figura 3. Reservorios selváticos y domésticos de *Leishmania*: Foto A corresponde a *Choloepus hoffmani*, Foto B a *Canis familiaris*, Foto C a *Oryzomys spp.* y laFoto D *Didelphis marsupialis*

2.2.3 VECTOR.

Los vectores a los que se atribuyen la transmisión de esta enfermedad pertenecen a la sub familia PHLEBOTOMINAE, que son pequeñas moscas que abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano, en las zonas templadas. Se reconocen solo a dos de cinco géneros como vectores: *Phlebotomus* presente en Europa, Asia y África y en América al género *Lutzomya* (Fig. 4). Los flebotomos adultos son dípteros de 1,5 a 3 mm de longitud que generalmente se alimentan de fuentes naturales de azúcar, excepto en el momento de la ovoposición, cuando recurren a la picadura para obtener sangre de mamífero que les proporcione los suplementos alimenticios para el desarrollo de los huevos. Así, es la hembra, que al alimentarse de un individuo infectado ingiere los macrófagos con los amastigotes del parásito en su interior, comenzando de esta forma su papel de vector (Atias, 1991; Urbano, 2009).



Figura 4. Vectores de leishmaniosis. A la izquierda el vector del género *Phlebotomus* y a la derecha el vector del género *Lutzomya* (Fuente: Urbano, 2009).

2.2.4 CICLO DEL PARÁSITO.

La *Leishmania* es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes, produciéndose diferentes ciclos. Uno principalmente silvestre, en el que la *Leishmania* circula entre los reservorios naturales y mantiene el ciclo con la participación de los

vectores propios de la zona endémica. El otro, en el que los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peri- domésticos. Se puede producir un tercer ciclo antroponótico que puede ser natural, donde el hombre se constituye en huésped y reservorio. Recientemente, se ha identificado un ciclo antroponótico artificial, en el cuál el mecanismo de propagación lo constituyen el uso agujas contaminadas, que constituirían el vector de un ciclo antroponótico artificial. (Sánchez, 2004).

De esta manera, el ciclo se inicia cuando el flebótomo parasitado inyecta con su picadura los promastigotes infectantes metacíclicos en el huésped vertebrado. La *Leishmania* parasita el sistema fagocitario mononuclear y se transforma en amastigote al interior de los macrófagos de las lesiones cutáneas o de los órganos profundos (hígado, médula ósea y ganglios) en el caso de la Leishmaniosis visceral (Zurita, 2001).

El ingreso del parásito al interior de los macrófagos se da a través de la actividad fagocitaria de la célula del huésped siendo internalizados en una vacuola que se fusiona secundariamente a los lisosomas formando los fagolisosomas que resisten las hidrolasas lisosomales. Así, al encontrarse al interior de los macrófagos están protegidos de la acción lítica de los factores séricos específicos o del ataque de células tisulares. Para que se produzca la destrucción del parásito se requiere la activación de los macrófagos, donde uno de los factores implica la activación del interferón gamma (IFN- γ) producida por los linfocitos T. Sin embargo, las causas de los mecanismos íntimos de la resistencia de la *Leishmania* a la digestión celular no se han elucidado. La multiplicación y desarrollo en los macrófagos finaliza cuando la célula que contiene decenas de parásitos estalla. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, diseminándose directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar mucosas donde son arrastrados por el torrente sanguíneo junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en tejidos ricos macrófagos (médula ósea, hígado y bazo principalmente) (Urbano, 2009).

La diseminación hematogena, se encuentra más asociada a la leishmaniosis visceral, se ha demostrado que existe diseminación en la forma cutánea y es llevada a cabo por las células de Langerhans de la epidermis y otras sub poblaciones de células dendríticas cutáneas que mediante vasos linfáticos aferentes, acceden a ganglios linfáticos. La existencia de lesiones metastáticas localizadas fuera de la ruta de drenaje linfático apoyan la diseminación por vía hemática (Garcia *et al.*, 2004). El ciclo sigue su paso cuando un nuevo vector se alimenta de la sangre de un huésped infectado y a la vez introduce amastigotes que al encontrarse en el tracto digestivo del vector se transforman en promastigotes. Algunos promastigotes se transforman en promastigotes metacíclicos que son los responsables de iniciar la infección cuando el mosquito pica a un nuevo hospedador vertebrado.

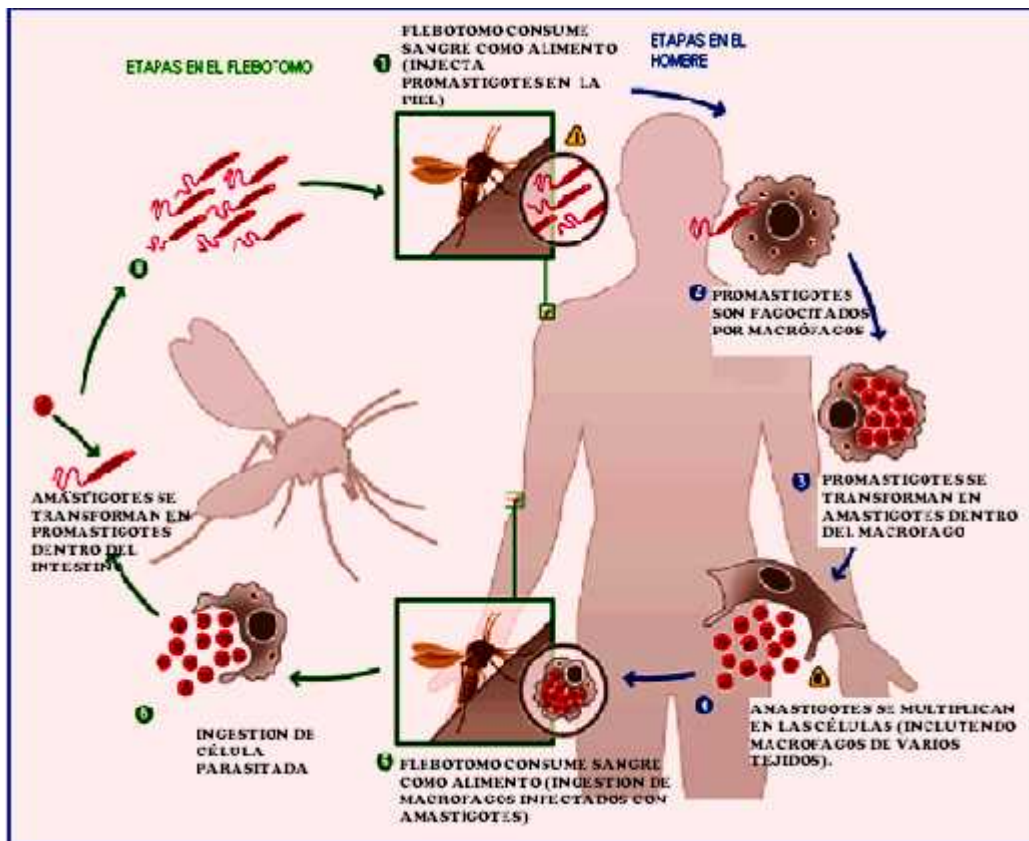


Figura 5. Ciclo vital de *Leishmania*. (Fuente: Linyard 2009)

2.3 SITUACIÓN EN BOLIVIA

Bolivia constituye uno de los 5 países que presenta una alta incidencia de la enfermedad en América (Davies *et al.*, 2000). La aparición de nuevos focos de la enfermedad se ve influenciada por 2 factores: la importante migración de la zona andina a la zona tropical en mejora de las condiciones socioeconómicas y la explotación predatoria del bosque tropical para la extracción de recursos naturales, hacen que cada vez tenga mayor expansión geográfica, y cobre notable importancia en la salud pública, de tal manera que el área endémica llega a más del 70% del territorio boliviano, que abarca el área rural de los departamentos de La Paz (zona norte y los yungas), Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. Desde el año 1992, se observó una tendencia creciente de la incidencia de la enfermedad (OPS, 2007) y para el año 2010 según el Programa Nacional de Vigilancia y Control de Leishmaniosis (PNVCL) se tienen contabilizados 1.810 casos confirmados, encontrándose en el departamento de La Paz aproximadamente la mitad de los casos reportados a nivel nacional, con 867 (47.9 % de los casos) (Ver tabla N° 1).

TABLA N° 1: CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSIS EN DIFERENTES DEPARTAMENTO DE BOLIVIA, DURANTE LA GESTION 2010.

DEPARTAMENTO	CASOS CONFIRMADOS 2010	PORCENTAJE
Beni	306	16.9 %
Chuquisaca	11	0.6 %
Cochabamba	164	9.0 %
La Paz	867	47.9 %
Pando	329	18.2 %
Santa Cruz	121	6.7 %
Tarija	12	0.7 %
Total	1.810	100 %

Fuente: Programa Nacional de Vigilancia y Control de Leishmaniosis (PNVCL). 2010

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en Bolivia están presentes principalmente las formas clínicas cutáneas y mucocutáneas, se han descrito algunos casos de leishmaniasis visceral en 1984 en la población de Chimasi (Sud Yungas) (Mollinedo *et al.*, 2000) y en 1999 en el cantón Taipiplaya (Caranavi) (Flores *et al.*, 2004) ambas en el departamento de La Paz.

Los datos proporcionados de la gestión 2011 por el PNVCL son preliminares, pero reflejan predominio de la forma de leishmaniosis cutánea sobre la forma mucocutánea. (Tabla N°2)

TABLA N°2: CASOS CONFIRMADOS DE LAS FORMAS DE LEISHMANIASIS PRESENTES EN BOLIVIA DESDE EL MES DE ENERO HASTA SEPTIEMBRE DE LA GESTION 2011

Departamento	Cutáneos	Mucosos	Mucocutáneos	Total
Beni	192	18	1	211
Chuquisaca	11	6	1	18
Cochabamba	82	18	1	101
La Paz	417	28	17	464
Pando	274	17	12	303
Santa Cruz	50	21	8	79
Tarija	23	3	4	30
Total	1049	111	44	1206

Fuente: Programa Nacional de Vigilancia y Control de Leishmaniosis (PNVCL). Casos confirmados hasta el mes de septiembre de 2011

Entre las especies de *Leishmania* circulantes en nuestro territorio se han descrito *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi*; *Leishmania amazonensis* (Martínez *et al.*, 1998) y *Leishmania lainsoni* (Bastrenta *et al.*, 2002; Mollinedo *et al.*, 2000).

Los vectores flebotomíneos circulantes son conocidos por la población a través de nombres comunes en cada región, como “Champari”, “Roco Roco” y “Plumilla”, que pueden corresponder a las especies de *Lutzomyia longipalis*, *Lutzomyia yucumensis*,

Lutzomyia llanos martinisi, *Lutzomyia carraei carraei*, *Lutzomyia nunes tovarí anglesi*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia shawi* y *Lutzomyia alerayi sp* (Bermudez et al., 1993; Mollinedo et al., 2000; Martinez et al., 1999). (Tabla N°3)

TABLA N°3: ESPECIES DE LEISHMANIA, VECTORES Y RESERVORIOS PRESENTES EN BOLIVIA

<i>Leishmania spp.</i>	FORMA CLÍNICA	VECTOR COMPROBADO 0 SOSPECHOSO	RESERVORIO COMPROBADO 0 SOSPECHOSO
<i>Leishmania braziliensis</i>	Leishmaniosis cutánea zoonótica Leishmaniosis cutáneo-mucosa	<i>Lutzomyia nuñez tovarí anglesi</i> , <i>Lu. carraei carraei</i> , <i>Lu. Llanos martinisi</i> , <i>lu. shawi</i> , <i>Lu. ayrozai</i> , <i>Lu. yucumensis</i>	Desconocido
<i>Leishmania amazonensis</i>	Leishmaniosis cutánea zoonótica Leishmaniosis cutánea difusa	<i>Lu. Flaviscutellata</i> <i>Lutzomyab nunez tovarí anglesi</i> , (*)	<i>Oryzomys spp.</i>
<i>Leishmania infantum</i>	Leishmaniosis visceral zoonótica	<i>Lu. longipalis</i>	<i>Cannis familiaris</i>
<i>Leishmania guayanensis</i>	Leishmaniosis Cutánea zoonótica	<i>Lu. shawi</i>	<i>Choloepus spp.</i> , <i>Didelphis spp.</i> , <i>Tamandúa spp.</i>
<i>Leishmania lainsoni</i>	Leishmaniosis cutánea zoonótica	<i>Lu. nuñez tovarí anglesi</i>	<i>Agouti paca</i>

Lu. = *Lutzomya*

(*) (Martinez, 1999)

Fuente: WHO. Control of Leishmaniasis.2010

2.4 TAXONOMÍA

La taxonomía del parásito ha sufrido una serie de cambios desde sus primeras descripciones. Inicialmente se creía que solo una especie de *Leishmania* causaba todas las formas clínicas de la enfermedad. Posteriormente, varios investigadores encontraron diferencias en las características extrínsecas que sirvieron para clasificarlas a través de criterios morfológicos, velocidad de crecimiento en medios de cultivo, comportamiento en inoculaciones en Hamsters, desarrollo en el tubo digestivo del vector y especies de reservorios, dando origen a una clasificación informal (OPS, 2006).

Actualmente, la investigación ha introducido una amplia variedad de métodos genético-moleculares para la caracterización intrínseca del parásito en el mundo entero: Patrones isoenzimáticos (Zimodemos), hibridación mediante sondas de ADN, polimorfismo en la longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (considerando sus variantes) y finalmente la secuenciación, que se han constituido en una herramienta primordial para obtener una clasificación formal, mejorando la comprensión de la epidemiología de la Leishmaniosis, siendo la base de la clasificación actual (Cannova, 2007) (Fig.6)

En este sentido, el género *Leishmania* pertenece a familia TRYPANOSOMATIDAE, familia que se enclava en el orden KINETOPLASTIDA, que recibe su nombre de una estructura exclusiva en miembros de esa orden denominada kinetoplasto (Grimaldi, 1993). Estos protozoos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y se han descrito al menos 30 especies presentes en todo tipo de organismos superiores, desde plantas hasta vertebrados, incluyendo invertebrados (Garnham, 1971) siendo similares morfológicamente.

Hasta el momento 21 especies y subespecies de *Leishmania* han sido consideradas infectantes para el hombre, causantes de una alta morbilidad y en algunos casos de mortalidad. (Croan, 1997). (Bensoussan *et al.*, 2006). En este sentido, en relación a las especies que afectan al hombre, la mayoría de los autores concuerda en que la identificación de estas especies patógenas debe realizarse a través de una clasificación por complejos fenotípicos agrupados en dos sub géneros: *Viannia* y *Leishmania* (Rey, 2004).

En el sub-género *Viannia* se encuentra el complejo “*Leishmania braziliensis*”, cuyos miembros producen la leishmaniosis tegumentaria americana (lesiones mucocutáneas). El sub género *Leishmania* engloba al complejo “*Leishmania mexicana*” que produce lesiones cutáneas y no suele causar metástasis nasofaríngea. Finalmente, el complejo

“*Leishmania donovani*”, muestra una tendencia a invadir vísceras, localizándose de preferencia en el sistema macrófago del bazo, hígado, médula ósea y los órganos linfoides (Rey, 2004).

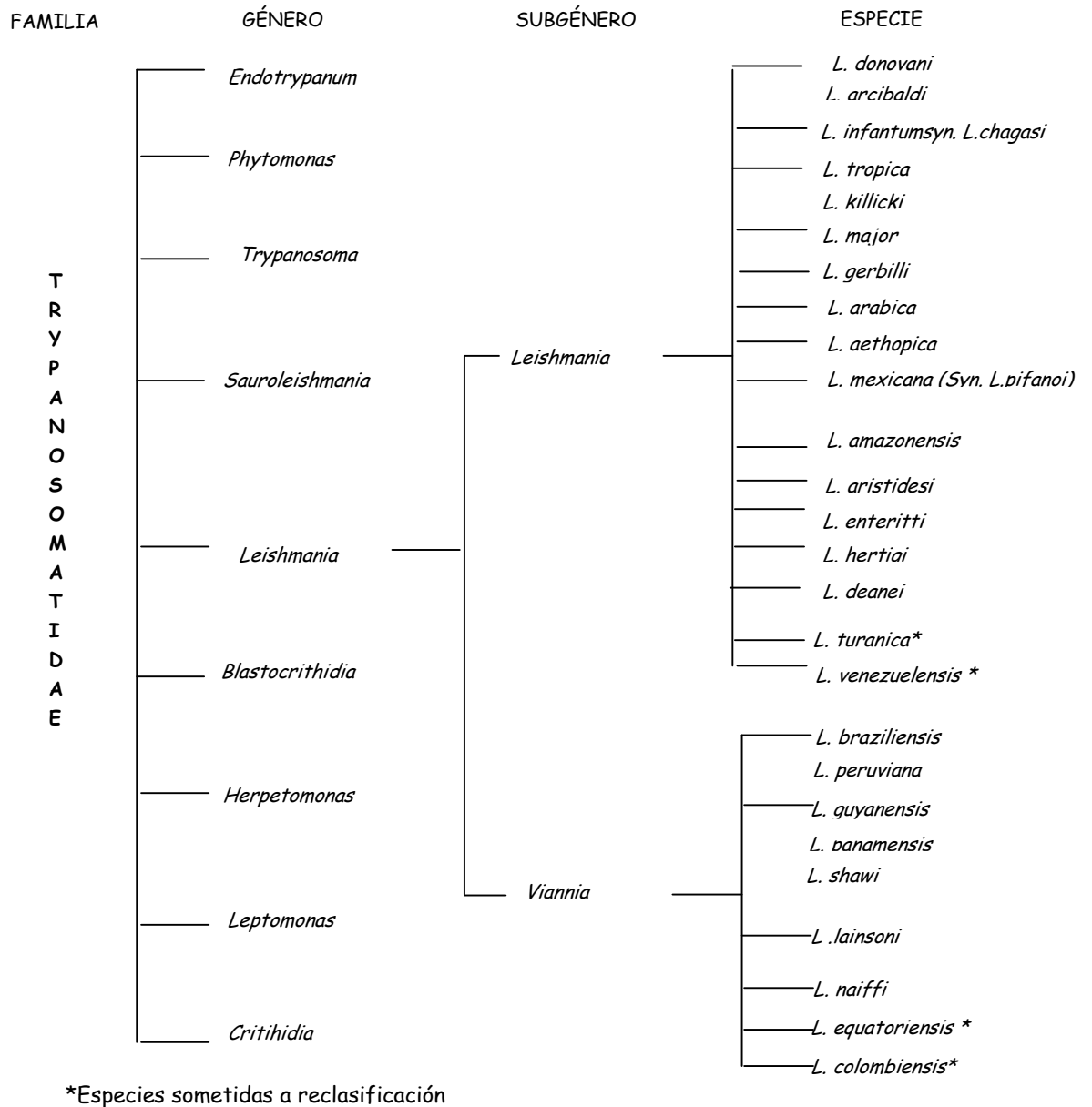


Figura 6: Clasificación del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía. (Rioux et al. 1990; Dedet 1993; Thomaz-Soccol et al.1993).

2.5 MORFOLOGÍA

Todas las especies de *Leishmania* presentan dos formas bien organizados en su ciclo de vida: promastigote, que es la forma móvil flagelada que se encuentra extracelularmente en el tracto intestinal del vector y mide de 10 a 15 μm y amastigotes, que es la forma no móvil que se encuentra en los macrófagos del huésped vertebrado y tienen un tamaño 2 – 5 μm .(Fig. 7).

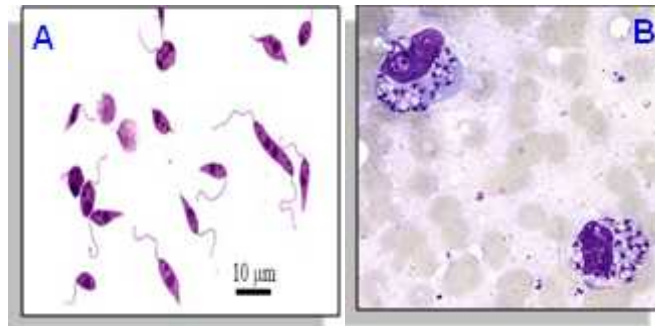


Figura 7. Formas evolutivas de *Leishmania*

Foto A corresponde a Promastigotes de *Leishmania braziliensis* y la Foto B a amastigotes de *Leishmania donovani*. (Sullivan, 2007)

Estructuralmente, *Leishmania* posee una membrana plasmática conformada por una bicapa lipídica tapizada por un glucocalix compuesto por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Englund, 1993), mismas que se encuentran relacionadas con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocalix son glicoproteínas de 63 kDa (gp63) y 46 kDa (gp46) y el lipofosfoglicano (LPG).

Debajo de la membrana citoplasmática encontramos una red de microtúbulos subpeliculares siguiendo una trayectoria helicoidal con respecto al eje longitudinal de la célula. Se extiende por el cuerpo celular dejando libre la porción flagelar. Esta red proporciona una morfología estable y cierta movilidad contráctil.

Además de los orgánulos comunes a otros eucariotas, *Leishmania* posee ciertas particularidades que le diferencian como: el glucosoma es un orgánulo único en los Kinetoplastida que alberga las enzimas de las primeras etapas de la glucólisis y guarda semejanzas con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas.

El blefaroblasto o corpúsculo basal de flagelo, aparece como una continuación de los microtúbulos de los flagelos.

El núcleo posee una configuración esférica, ovoide o elipsoide, presenta un cariosoma central y cromatina periférica. La microscopia electrónica demuestra la presencia de uno o más nucléolos. (Rey, 2004). La posición del núcleo es relativa y sirve de criterio taxonómico para la identificación de los géneros de los Trypanosomatideos.

El kinetoplasto es un organelo característico de la orden Kinetoplastida constituye un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1 a 2 μm . Está situado dentro de la membrana mitocondrial, en la base del flagelo. Posee una estructura filamentosa formada por ácido desoxiribonucleico (ADN). (Morales, 2002).

2.6 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Leishmania posee un ADN genómico (ADNg) localizado en tres compartimentos: en el núcleo, como ADN cromosómico, kinetoplasto denominado ADN kinetoplastidial (ADNk) formado por una red de maxi- y minicírculos (Simpson *et al.*, 1987) que se replica independientemente siendo inusual en la naturaleza, y en el citoplasma como ADN extracromosómico.

El ADNk es rico en A+T (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico, rico en G+C (>60%) (Álvarez *et al.*, 1994).

El material genético está organizado en cromosomas que al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico (Vickerman, 1970), no pueden ser visualizados con el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional y la asignación de un número de cromosomas exacto a cada especie, esto fue hasta el desarrollo de la técnica PFGE (Electroforesis en campo pulsante) que permitió encontrar importantes variaciones en el cariotipo, presencia de polimorfismo no solo entre especies sino también entre distintas cepas de la misma especie. (Comeau *et al.*, 1986; Scholler *et al.*, 1986). Se concuerda que *Leishmania* posee un genoma constituido por 20-36 cromosomas con un tamaño de 150 kilobases en los minicromosomas y de 4 megabases en los de mayor tamaño (Van der Ploeg *et al.*, 1984). Aunque no ha sido posible determinar con certeza el carácter diploide del genoma de *Leishmania*, en general existe un consenso sobre ello, además de aceptar que es funcionalmente asexual (agamogonia). (Wong, 1995; Ivens *et al.*, 1998).

Con la reciente publicación de la secuencia del genoma de *Leishmania major*, se ha descrito una organización similar de los genes en todos los cromosomas del parásito. Los genes codificantes para proteínas carecen de intrones a excepción del gen poli (A) polimerasa, se disponen en largas agrupaciones ordenadas en tanden separadas entre sí por regiones cortas de ADN que constituyen regiones intergénicas. Algunos genes poseen una única copia por genoma como por ejemplo como es el caso de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA) (Ruiz, 2008). Sin embargo, con frecuencia los genes presentan varias copias dispuestas en tándem, siendo habitual que exista una elevada conservación en la secuencia de las regiones conservadas como es el caso de los genes que codifican para ARN ribosomales, gp63. (Folgueira *et al.*, 2006). Asimismo, como la existencia de tres loci del gen de la β -tubulina en los cromosomas 33, 21 y 8. (Jackson *et al.*, 2006).

El ADN kinetoplastidial ha sido estudiado ampliamente (Rodgers, 1990) para su aplicación en técnicas moleculares como la PCR. Contiene aproximadamente 10^7 pares

de bases (pb), representa el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxicírculos y minicírculos) los minicírculos que son usualmente 1 kb de peso, presentes en 10 000 a 20 000 copias a diferencia de los maxicírculos que son de 20 a 40 kb, están presentes en 30 a 50 copias (Morales, 2002). En cada minicírculo existen una región muy conservada de unos 120 pares de bases y una región variable de unos 700 pares de bases. Codifican los ARN guía necesarios para la edición de los ARN mitocondriales (RNA-editing).

Los maxicírculos se asemejan al ADN convencional de los mamíferos, codifican el ARN ribosomal y enzimas mitocondriales como la citocromo oxidasa y NADH – deshidrogenasa, entre otras (Torri *et al.*, 1996).

2.7 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leishmaniosis ha sido y continúa siendo un tema de estudio por varios investigadores (Cannova, 2007) en lo referente a la búsqueda de métodos de diagnóstico en los que se observe mayor sensibilidad y especificidad, que además proporcionen confiabilidad, rapidez y accesibilidad. Entre estos tenemos a los métodos convencionales y recientemente incorporados como son los moleculares.

2.7.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Las técnicas de diagnóstico conocidas hasta hoy se agrupan en: directas o parasitológicas e inmunológicas, su aplicación en muchos casos depende de la finalidad e infraestructura del laboratorio en el que se trabaja.

2.7.1.1 Los métodos directos o parasitológicos

Considerados como métodos definitivos de diagnóstico, consisten en visualizar la presencia de *Leishmania* en las muestras del paciente, tenemos al Exámen

parasitológico directo “Frotis” y la histopatología (Attilio, 2007) (Zerpa, 2002) pero sufre variaciones en la sensibilidad que fluctúa entre 19 % y 83 %. (Cuba, 2000), esto debido a modificaciones en la metodología empleada, tiempo de la enfermedad y la forma clínica de los pacientes estudiados. Otras técnicas empleadas son: el aislamiento del parásito en Cultivos *in vitro* de las lesiones sospechosas, así también la inoculación de animales de laboratorio Hamsters (dorados) y ratones isogénicos y no isogénicos a partir de los que se puede aislar al parásito, han sido una alternativa para el diagnóstico. (Cuba, 2000).

Estas técnicas son altamente específicas pero no así lo suficientemente sensibles. Las diferentes especies de *Leishmania* no poseen la misma facilidad para ser cultivadas ya que la contaminación es una constante dificultad que se presenta conjuntamente con las variaciones en las formulaciones de los medios de crecimiento. Asimismo, los porcentajes de identificación microscópica de amastigotes en frotis teñidos varían dependiendo del número de parásitos presentes y/o la experiencia de la persona que examina el extendido (Bensoussan *et al.*, 2006)

2.7.1.2 Los métodos indirectos o inmunológicos

Se basan en la detección de la enfermedad a través de la respuesta inmune celular y/ o respuesta inmune humoral.

La respuesta inmune celular se puede detectar mediante la intradermorreacción de Montenegro que consiste en la aplicación intradérmica de un antígeno, extracto soluble preparado a partir de promastigotes procedentes de cultivo. Se ha visto que puede alcanzar una sensibilidad de 95.9 % (Minaya, 1999). La limitante de este método es que no puede aplicarse a casos de infecciones recientes, ni en casos que cursen con leishmaniosis cutánea difusa por la disminución de este tipo de respuesta y que es cuestionable aplicarlo en zonas endémicas Chagasicas.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) y las pruebas enzimáticas (ELISA) que permiten detectar la presencia de anticuerpos frente al parásito. (Ministerio de Salud de Bolivia, 2008). Las dificultades diagnósticas de estos métodos radican en la diversidad antigénica asociada a esta enfermedad causada por diferentes especies de *Leishmania* que generan reacciones inespecíficas principalmente con la enfermedad de Chagas. Pero el uso de antígenos homólogos ha demostrado aumentar la sensibilidad de la serología (Szargiki *et al.*, 2009).

2.7.1.3 Métodos de diagnóstico molecular

Entre los métodos utilizados en actualidad, están las técnicas moleculares, que han permitido avanzar en uno de los aspectos más complejos en el estudio de la etiología de las Leishmaniosis, como lo es la clasificación del parásito causante de esta enfermedad. (Cannova, 2007).

Se ha determinado que *Leishmania* presenta diversidad fenotípica y polimorfismo genético entre las especies del parásito (Zemanova *et al.*, 2004).

Entre las herramientas moleculares utilizadas en estos últimos 20 años, se encuentra sin lugar a duda la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite monitorear la presencia de material genético de *Leishmania* y sobre todo constituye una herramienta complementaria para el diagnóstico pre clínico, reincidencia y el seguimiento del tratamiento de esta enfermedad (Prina *et al.*, 2007).

Ha sido particularmente usada en regiones (nuevo mundo) donde diferentes especies de *Leishmania* coexisten en un mismo ecosistema. Ya que existe una complejidad epidemiológica de algunas áreas endémicas, con una distribución muy heterogénea de parásitos, que permiten que los ciclos de transmisión de las diferentes especies se superpongan y varias especies puedan encontrarse en un mismo foco y estar estrechamente relacionados con desplazamiento de poblaciones humanas que puedan llevar a la dispersión de *Leishmania* más allá de su distribución ecológica tradicional.

Otras técnicas moleculares fueron aplicadas sobre todo en la elucidación de la caracterización, taxonomía y epidemiología del parásito como las basadas en el perfil

enzimático mediante el Análisis de Zimodemos. Entre las técnicas basadas en el análisis de ADN del parásito se encuentran la Hibridación con sondas de ADN que permitió separar de *Leishmania braziliensis* de *Leishmania mexicana*, delimitando a varias especies en el subgénero *Viannia*. (Morales, 2002). El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) donde se producen esquizodemos que permitieron identificar la distribución geográfica de las especies de *Leishmania*. Recientemente la secuenciación ha sido utilizada para detectar el polimorfismo.

2.7.1.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la realización de la PCR de *Leishmania* se parte de una muestra biológica (ganglio, médula, piel o sangre). Tras la extracción de ADN total (nuclear y kinetoplastidial) se realiza la polimerización de un fragmento del genoma mediante la incubación con la enzima polimerasa, los cebadores y los nucleótidos a distintas temperaturas utilizando un termociclador. La técnica de la PCR posee la extraordinaria capacidad de amplificar al menos una copia de una secuencia de ADN entre millones de copias

Diferentes sitios moleculares han sido utilizados como blanco para el diagnóstico por la PCR de *Leishmania*, incluyendo el ADN mini círculo del kinetoplasto (ADN k), el mini exón (Spliced leader RNA), gene ribosomal ADN, gen de la glucosa deshidrogenasa y otros (Harris *et al.*, 1998; Cannova, 2007; Kato, 2005; Orué *et al.*, 2005; Paiva, 2004; Katakura *et al.*, 1999).

Entre los tipos de PCR desarrollados, la más utilizada es la Hot Start PCR cuyo inicio de la reacción se realiza a temperaturas elevadas a fin de evitar la amplificación de productos inespecíficos esto se logra mediante el empleo de una enzima ADN polimerasa que solo se activa a altas temperaturas.

La más conocida es la PCR propuesta por WIRTH en 1982, que utiliza los primers que permiten amplificar un segmento del minicírculo de ADN de kinetoplasto, que representa un blanco ideal para la PCR, por presentar un alto número de copias y

contener ambas regiones conservadas y variables, que permitan diferenciar entre especies de *Leishmania*. Una comparación de especies de *Leishmania* reveló que existe una región de aproximadamente 200 pb la cual es conservada entre especies y subespecies. (Rodgers, 1990).

Se realizaron PCR utilizando la región conservada de los minicírculos del kinetoplasto para la detección de especies como *Leishmania chagasi* utilizando muestras de sangre periférica de pacientes (Disch *et al.* 2003). Asimismo, la detección de *Leishmania braziliensis* (Marcussi *et al.* 2008). Otros estudios evaluaron primers kinetoplastidiales B1 – B2 específicos para la detección de *Leishmania* subgénero *Viannia* que da un producto de (750 pb) a partir de sangre periférica de pacientes con leishmaniosis cutánea activa. Al evaluarse la PCR con monocitos también se observó la amplificación de una secuencia humana de un tamaño similar (718 pares de bases) dando lugar a falsos positivos. Al realizar los análisis del primer B2 éste mostró homología con el cromosoma humano 2 región intergénica (AC010878) en las posiciones 35.881 – 36.599. (Vergel *et al.*, 2005). La posible interferencia y poca especificidad, nos conducen a buscar regiones no kinetoplastidiales para desarrollar técnicas moleculares que a la vez puedan coadyuvar a la identificación.

Una de las primeras variantes que se utilizó en estudios de genotipificación de *Leishmania* fue la PCR-Hibridación. Con la aplicación de esta técnica se logró distinguir entre los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, esto es un gran aporte para el pronóstico de la enfermedad, ya que se podrá distinguir entre los casos que sólo causan lesiones cutáneas y los que tiene afinidad por las mucosas.

La PCR múltiple (Multiplex) también ha sido utilizada para la identificación y caracterización de diferentes especies de *Leishmania* en un solo paso, obteniéndose distintos tamaños de producto amplificado lo cual se asocia con las especies involucradas. Entre los sitio blanco más utilizados son las del mini exón que permite

diferenciar las especies más frecuentes en el Nuevo Mundo: *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. chagasi*. (Harris *et al.*, 1998).

Por otra parte, ha sido muy útil la identificación de especies aisladas que infectan naturalmente vectores en distintas regiones. En estudios realizados por Jorquera el 2005 en el Estado Sucre, Venezuela, se logró comprobar la infección natural de *Lutzomyia ovallesi* y *Lutzomyia gomezi* con cepas del subgénero *Viannia* y *Leishmania*, circulando ambas en una misma localidad, además este trabajo permitió sugerir que *Lutzomyia gomezi* puede ser un vector importante en la transmisión en esa área endémica mediante el empleo de la PCR múltiple con cebadores de secuencias del mini-exón. (Jorquera *et al.*, 2005).

En la búsqueda de secuencias genéticas que permitan diferenciar los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* se determinó que las secuencias genéticas que codifican la proteína de la α -tubulina que permiten identificar al género *Leishmania* y a la vez diferenciar los subgéneros (Orué *et al.*, 2005; Orué *et al.*, 2008; Mendoza-León *et al.*, 2002)

Protocolos de PCR pueden ser aplicados a diferentes muestras clínicas en mejor manera que los métodos parasitológicos clásicos. La sensibilidad analítica de la PCR puede variar dependiendo de la secuencia genética blanco y de los cebadores utilizados, pero se reporta que puede detectar el material genético de 0.01 parásitos por reacción (Alvar *et al.*, 2008). Estos estudios en su conjunto muestran que la PCR presenta una alta sensibilidad de detección en muestras de biopsias que van del 75 al 100%. Mientras que los rangos de especificidad van del 96 al 100%. En la leishmaniosis mucocutánea la sensibilidad de detección tiene una variación del 47.4 al 83.3 %. (Oliveira *et al.*, 2005).

Esta alta especificidad y sensibilidad como identificación de diferentes especies del parásito puede contribuir a conocer en mejor manera la epidemiología de la Leishmaniosis.

2.7.1.3.1.1 Marcadores genéticos

Varias secuencias de ADN, fundamentalmente las repetitivas, se han identificado como marcadores moleculares para la detección de *Leishmania* y han sido utilizadas en la estandarización de algunos ensayos específicos de PCR. Entre los más utilizados, están los dirigidos al ADN Kinetoplastidial: minicírculo y del maxicírculo del Kinetoplasto, ADN nucleares: gen 18 s-rARN o rARN - SSU (subunidad pequeña), gen de la β -tubulina, locus del gen gp63, regiones transcritas internas del espaciador.

A. Marcadores kinetoplastidiales

El sitio blanco en el kinetoplasto, lo constituye una región conservada presente en los minicírculos de 150 pb y una región variable de 750 pb. Los minicírculos poseen los ARN guías y forman parte de la estructura y división del kinetoplasto (Fig. 8).



Figura 8. Esquema de la organización genética de un minicírculo de *Leishmania* (Morales, 2002)

La secuencia conservada está presente en todas las especies de *Leishmania*, fue base para el diseño de varios oligonucleótidos, entre los más utilizados tenemos a: 13A y 13B diseñados por Rodgers *et al.* en 1990, han sido una herramienta para varias investigaciones en el diagnóstico de *Leishmania sp.* (Bensoussan *et al.*, 2006); (Rodríguez *et al.*, 1994) ;(Belli, 1999); (Reale *et al.*, 1999); (Moaddeb *et al.*, 2008); (Medeiros *et al.*, 2002).

Para la detección del complejo de *Leishmania braziliensis* se ha utilizado la región variable los primers más utilizados son: B1 y B2 (De Bruijn *et al.*, 1992); (Vergel *et al.*, 2005); (Martins, 2010); (Michalsky *et al.*, 2002) RV1 – RV2 usados para la detección *Leishmania donovani* (Lachaud *et al.*, 2002).

TABLA N°4 : MARCADORES KINETOPLASTIDIALES MAS USADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE INVESTIGACIÓN DE DE LEISHMANIOSIS

MARCADORES GENÉTICOS	SECUENCIA 5' – 3'	SITIO BLANCO	DETECTA	PRODUCTO GENERADO
13 A	GTGGGGGAGGGCGTTCT	Región conservada del minicírculo	<i>Leishmania sp.</i>	116 - 120 pb
13 B	ATTTTACACCAACCCCAAGTT			
B1	GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG	Región variable del minicírculo	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	750 pb
B2	CTAATTGTGCACGGGGAG			
LBF1	AAATTCGCGTTTTTTGGCCTCCCCG	Región variable del minicírculo	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	534 pb
LBR1	GCATAAACTAGAGACGGAACAGAG			
MPIL	TACTCCCCGACATGCCTCTG	Región variable del minicírculo ADN	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	65 pb
MP3H	GAACGGGGTTTCTGTATG			
DeBJ8	CCAGTTTCCCGCCCCG	Región minicírculo	<i>Leishmania sp.</i>	809 pb
ASJ 3	GGGGTTGGTGTAAAA ACGC			
RV1	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	Región minicírculo	<i>Leishmania donovani</i>	145 pb
RV2	CCACCTGGCCTATTTTACACCA			

B. Marcadores ADN ribosomal

Estos marcadores, son ampliamente usados en el análisis de reconstrucción de la historia de la evolución. En especial los que están dirigidos a la secuencia que codifica el 18s rRNA ribosomal que es un componente de la pequeña subunidad ribosómica eucariota.

La secuencia de 18s rRNA ha sido altamente eficiente para el diagnóstico de la leishmaniosis. Ya que cada parasito contiene un número aproximado de 160 copias del gen 18 s RNA con un tamaño de 800 pb. Entre los primers que están dirigidos a esa regiones están: R221 y R332 que amplifica as 604 pb del segmento de 18 s rRNA (Van Eys, 1992).

C. Marcadores del gen del mini exón

El gen del miniexón está presente en el genoma nuclear en aproximadamente 200 copias distribuidas en repeticiones en tándem y consiste en tres diferentes partes: un exón, un intrón y una región intergenica. El exón tiene una secuencia de 25 a 39 nucleótidos post-transcripcionalmente (“trans-splicing”), al extremo 5’ de los ARNs mensajeros de todos los tripanosomatideos (Harris *et al.*, 1998), altamente conservada. (Fig. 9)

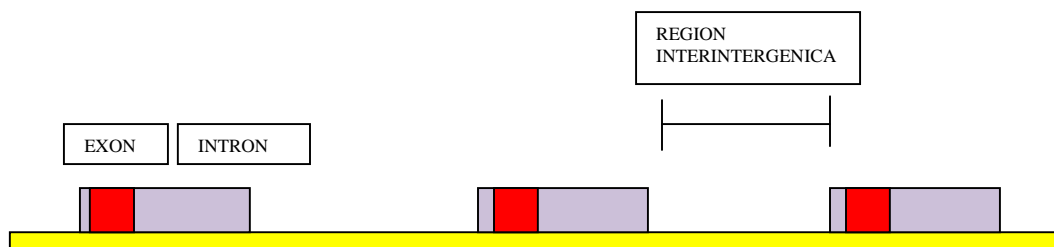


FIGURA 9. Esquema de la región del gen del miniexón

Entre los que destacan los marcadores LU- 5 A , LB- 3 C, LM- 3 A y LC- 3L que tienen como blanco el mini exón permiten diferenciar complejos: *Leishmania braziliensis*,

Leishmania mexicana y *Leishmania donovani*. (Harris *et al.*, 1998; Jorquera *et al.*, 2005; Grisard *et al.*, 2000)

D. Marcadores dirigidos a la β - tubulina

La tubulina es el componente principal de los microtubulos de las células, que comprenden la red del citoesqueleto, el huso mitótico y la motilidad generada por flagelos. Existen 2 tipos de tubulina y monómeros que al polimerizarse forman filamentos macromoleculares llamados microtúbulos (Saumitra *et al.*, 1990).

Tras la elucidación de genoma de *Leishmania major* se estableció existen tres loci de α -tubulina en los cromosomas 33, 21 y 8 respectivamente y un solo locus de β -tubulina en el cromosoma 13 a diferencia de otros kinetoplastidos (Jackson *et al.*, 2006).

Los genes que codifican la tubulina tienen relativamente un alto grado de conservación a lo largo de la evolución. En *Leishmania* los genes de la tubulina son repetitivos, organizados en tándem. (Mendoza, 2002). La β -tubulina está constitutivamente expresada a lo largo del ciclo de vida del parásito (Gallo, 1988) presente en ambos estadios y por lo se demostró que podía servir como un control de referencia (normalización) para estudios Real time PCR de expresión de Gen en estos microorganismos. (Byre *et al.*, 2011). Se utilizan secuencias del gen de β -tubulina (500) para identificar especies de *Leishmania* mediante los oligonucleótidos Tub1 y Tub 6, la región denominada β -500 permite identificar al sub género *Viannia* con los oligonucleótidos A2 y A10, F1 y B2 de la región de 280 pb (L280) para el sub género *Leishmania*. (Orué *et al.*, 2005; Orué *et al.*, 2008).

E. Marcador nuclear glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

Es una de las enzimas ampliamente usadas como marcador para identificar zymodemos de *Leishmania*. Las secuencias que codifican para la G6PD fueron usadas para identificar entre especies. (Castillo *et al.*, 2003).

2.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

2.8.1 VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Cuando se realizan análisis diagnósticos de material clínico es importante producir datos de buena calidad. Para esto, hay que cumplir algunos criterios clave. Es necesario establecer los sistemas de garantía de calidad (GC) y de control de calidad (CC), es decir, un juego de protocolos de calidad, incluyendo el empleo de muestras de control, que aseguren que el sistema está funcionando adecuadamente y que confirme la calidad de los datos obtenidos.

La validación es la evaluación de una prueba de diagnóstico con el fin de determinar su idoneidad para una utilización concreta. Para esto se determinan tienen los siguientes parámetros:

2.8.1.1 Medidas de la validez

Las características operativas (o parámetros del ensayo) proporcionan información sobre la eficacia de un método bajo condiciones específicas.

2.8.2 ETAPAS DE LA VALIDACIÓN DE ENSAYOS

2.8.2.1 Primera etapa: Estudios de viabilidad

El estudio de viabilidad constituye la etapa preliminar en la validación de un nuevo ensayo. El objetivo de esta etapa es determinar si en un ensayo se puede detectar o no una gama de concentraciones sin alguna interferencia. Se eligen, al menos, diez muestras (por ejemplo, agentes infecciosos producidos en cultivo celular o bacteriano dentro el laboratorio), que comprendan desde concentraciones bajas hasta niveles altos

del agente infeccioso. También hay que incluir, al menos, diez muestras que no contengan la muestra diana.

La selección del cebador es crítica y debería tenerse en cuenta la naturaleza del agente infeccioso, su estructura genómica y la diversidad de secuencias genéticas existentes entre diferentes cepas.

El resultado obtenido por la PCR puede verse influenciado por el funcionamiento del termociclador que por ello se debería supervisar de forma continua. Es crucial la calibración de la temperatura regular.

2.8.2.2 Segunda etapa: Desarrollo y estandarización del ensayo

2.8.2.2.1 Repetibilidad —estimaciones preliminares

El ensayo antes de que se lleve a cabo una validación posterior. Si se encuentra una excesiva variabilidad, habrá que corregirla antes de continuar con el proceso de validación.

2.8.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESENCIALES DE CONTROL

Durante la optimización de la prueba PCR, también se puede estimar la estabilidad del método al ser afectado por pequeños cambios en los parámetros principales. La introducción de variables intencionadas en el proceso de validación caracterizará los parámetros fundamentales de la prueba. Los ejemplos de tales parámetros son: los tiempos y temperaturas de incubación, las concentraciones de tampones, los cebadores, $MgCl_2$, etc., pH, cantidades de otros componentes añadidos (por ejemplo desoxiribonucleotidos, albúmina de suero bovino, etc.). La caracterización de dichos

parámetros de control es crucial para la identificación de los puntos críticos que deben controlarse correctamente en el ensayo.

2.8.4 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICAS

La sensibilidad analítica (o límite de detección) se define como la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que puede detectarse. Para determinar la sensibilidad analítica se utiliza una dilución de punto final hasta que el ensayo ya no pueda detectar la diana en cuestión. Los fragmentos clonados de los productos de la PCR en estudio se pueden usar como muestras estándar, bien como ADN o para dianas de ARN, transcribiéndose el ARN *in vitro* a ADN.

La especificidad analítica se define como la capacidad de un ensayo para distinguir entre el agente diana y otros agentes infecciosos. Esa capacidad se determina analizando los patógenos estrechamente relacionados mediante la prueba en cuestión.

2.8.5 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DEL ENSAYO

2.8.5.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

La sensibilidad diagnóstica (proporción de animales de referencia que se sabe que están infectados, y que dan respuesta positiva en el ensayo) y la especificidad diagnóstica (proporción de individuos de referencia que se sabe que no están infectados, y que dan respuesta negativa en el ensayo) son los parámetros más importantes obtenidos durante la validación de un ensayo. Constituyen la base para el cálculo de otros parámetros y son, por lo tanto, cruciales para el conjunto del proceso de validación. Se puede calcular el número de muestras de referencia que se requiere para determinar las estimaciones y

el error admisible de la sensibilidad y de la especificidad diagnósticas. Para hacer esto, debe utilizarse en una predicción razonable de la sensibilidad y de la especificidad diagnóstica. Normalmente, la confianza de la estimación se establece en el 95%. Sin embargo, ninguna fórmula puede tener en cuenta los numerosos factores del hospedador/organismo que pueden afectar al resultado de la prueba. Se sabe que el conseguir esta cantidad de ensayos moleculares puede ser difícil y costoso. La comprobación de pequeñas cantidades dará como resultado una reducción en la confianza de la estimación. El estado que se sabe que están infectados y el de los que no lo están, debería establecerse mediante comparaciones con otros ensayos.

2.8.5.2 Repetibilidad y Reproducibilidad

La repetibilidad y la reproducibilidad son dos parámetros importantes de la precisión de un ensayo. La repetibilidad se mide como el grado de concordancia entre las réplicas probadas durante la realización de un ensayo y las probadas en distintas realizaciones del mismo ensayo. La reproducibilidad se determina utilizando un ensayo idéntico (protocolo, reactivos y controles). Tradicionalmente, muchos laboratorios han utilizado pruebas de elaboración propia, probablemente por razones prácticas. Deben aplicarse los métodos estandarizados y validados que se hayan publicado. Tienen que llevarse a cabo los procesos de validación entre laboratorios, incluso si es costoso y requiere un trabajo intenso.

2.8.5.3 Seguimiento de la validez de la operatividad del ensayo

Es preciso estimar la prevalencia del agente infeccioso en la población para calcular el valor predictivo de los resultados positivos (VP+) o negativos (VP-) de la prueba. Esto se aplica por igual a los métodos de ensayos moleculares y a otros métodos tales como el enzimoimmunoensayo.

Se insta a los laboratorios de referencia a determinar los valores de la sensibilidad y especificidad diagnósticas de la forma más precisa posible, ya que éstas son muy importantes para valorar el rendimiento real de un ensayo cuando se usa en el campo. También, es importante estimar los valores predictivos (VP+ o VP-) en las circunstancias locales.

2.8.5.4 Mantenimiento y mejora de los criterios de validación

Cuando el ensayo se utiliza como una prueba rutinaria, es importante mantener el Control de calidad interno. Es preciso supervisar de forma constante la repetibilidad y precisión del ensayo. La reproducibilidad entre laboratorios (prueba del anillo) se debería realizar al menos, dos veces al año.

Si el ensayo se va a aplicar en otra región geográfica y/o población, podría ser necesaria una revalidación del mismo bajo las condiciones nuevas. Esto es especialmente cierto para los ensayos de la PCR ya que es muy común que en muchos agentes infecciosos tengan lugar mutaciones puntuales (esto es particularmente importante en virus ARN). Las mutaciones que se pueden producir dentro de las secuencias del cebador pueden afectar la eficacia de un ensayo y, de ser así, la validación establecida ya no es válida. También es recomendable secuenciar de forma regular las regiones genómicas seleccionadas en los aislamientos nacionales o regionales de los agentes infecciosos. Esto es especialmente cierto en el caso de los cebadores si se quiere garantizar que los mismos permanezcan estables con el fin de que no pueda cuestionarse la validez de la prueba.

2.8.5.5 Precauciones y controles.

2.8.5.5.1 Precauciones para evitar resultados positivos falsos

Los resultados positivos falsos (muestras negativas que presentan una reacción positiva), pueden originarse, bien de restos de productos de muestras positivas o, más

comúnmente, de la contaminación cruzada por los productos de la PCR de experimentos anteriores. Se han utilizado varias prácticas y herramientas para prevenir los resultados positivos falsos. Las muestras y las mezclas se deben manejar en campanas de flujo laminar, que se descontaminan de forma regular utilizando luz UV y soluciones de hipoclorito de sodio. La construcción y utilización de soportes de tubos y abridores especiales ayuda a evitar resultados positivos falsos de la PCR. Además, se deberían aplicar prácticas de laboratorio seguras, esto es, realizar las etapas básicas de la PCR. También es muy importante incluir controles negativos, es decir, muestras que sean tan parecidas a las muestras de prueba como sea posible, pero sin la diana. Debería usarse al menos un control negativo por cada cinco muestras de diagnóstico.(Burkardt, 2000).

2.8.5.5.2 Controles internos (miméticos) para evitar resultados negativos falsos

Los resultados negativos falsos (muestras infectadas que han resultado negativas) se deben en su mayor parte a los efectos inhibidores y/o a los errores de pipeteo. Por tanto los controles internos (denominados “miméticos”), se utilizan como indicadores de la eficacia de la amplificación. Los miméticos tienen las mismas secuencias de unión a los cebadores que las del molde, pero flanquean un fragmento de ADN heterólogo de diferente tamaño. Las secuencias idénticas de nucleótidos de unión al cebador permiten la co-amplificación simultánea del molde y del mimético en el mismo tubo con una competición mínima. Las diferencias de tamaño permiten una discriminación fácil. Los controles internos aumentan la fiabilidad del diagnóstico por PCR. Se debe tener precaución al diseñar y validar los miméticos. Es necesario realizar muchas pruebas para garantizar que el mimético añadido, junto con su amplificación no compite con la PCR de diagnóstico y de este modo disminuye la sensibilidad analítica. El mimético se utiliza en una concentración ligeramente mayor que el límite de detección de la PCR de diagnóstico a fin de garantizar la eficacia de la prueba.(Ballagui,1996).

Para la validación de un método de extracción y PCR, se recurre en primera instancia a la determinación del límite de detección de método evaluado para proseguir con las fases de validación restantes. Su uso es frecuente, incluso para realizar estudios de

comparación de métodos de extracción como los descritos por Moaddeb el 2008, donde utiliza concentraciones seriadas de parásitos para hacer un cotejo de métodos de extracción donde propone un método *in house* basado en la aplicación de un buffer de lisis con triton, sucrosa, Tris y cloruro de magnesio, comparándolo con métodos que utilizan el boiling, Proteinasa K, chelex y fenol-cloroformo mediante el uso de los primers kinetoplastidiales 13 A y 13 B. Lachaud *et al* el 2002, evaluaron 6 métodos de PCR con distintos marcadores en los que se encontraba el 13 A y 13 B, en muestras de sangre contaminadas artificialmente con promastigotes de *Leishmania* para comparar su sensibilidad y sus respectivas ventajas uno frente a otro (Lachaud *et a.*, 2002; Moaddeb *et al.*, 2008). (Ver Tabla N° 5).

Tabla N° 5: Comparación de resultados de sensibilidad analítica obtenidos por Lachaud *et al.* 2002 y Moaddeb *et al.* 2008 usando el mismo marcador genético 13 A y 13 B con diferentes métodos de extracción

CARACTERÍSTICAS	LACHAUD <i>et al</i> (2002)	MOADDEB <i>et al</i> (2008)	MOADDEB <i>et al</i> (2008)
Método de extracción	Fenol cloroformo	Método de extracción <i>in house</i>	Métodos de extracción A,B,C
Sensibilidad Número de Parásitos /ml	0.003 p/ml	10 p/0.02mL Por tubo de reacción	100p/0.02 mL Por tubo de reacción
Sensibilidad en relacionado al volumen de muestra en la extracción	0.0004p/133 ul	Sin descripción	Sin descripción
Presencia de artefactos en condiciones optimizadas	(+)	Sin descripción	Sin descripción
Facilidad en la interpretación	(+)	Sin descripción	Sin descripción

Método de extracción A: Boiling y fenol- cloroformo

Método de extracción B: Proteinasa K y fenol-cloroformo

Método de extracción C: Chelex 100 y fenol cloroformo

2.9 METODOS DE EXTRACCION DE ADN

Para el uso de técnicas moleculares es necesario tener un material genético de óptima calidad que dependerá de buen proceso de extracción. Es una de las etapas importantes para el estudio de secuencias del material genético. El proceso parte de una muestra biológica que puede ser aspirados de lesiones cutáneas, ganglios, médula ósea; biopsias de piel e incluso sangre entera.

El ADN para su extracción requiere ser separado de los componentes de membrana, proteínas residuales y polisacáridos para evitar la degradación del material genético.

Los métodos de extracción utilizadas para la obtención del material genético del parásito fueron fases de lisis mediante, ebullición (Boiling), lisis química, Chelex -100 o proteinasa K. La fase de degradación y precipitación proteica mediante fenol – cloroformo, precipitación salina (salting out) y la fase de purificación alcohólica que permite recuperar ácidos nucleicos a partir de soluciones acuosas. (Moaddeb *et al.*, 2008); (FIOCRUZ, 2009); (Belli *et al.*, 1999).

Recientemente se incorporó el uso de Kits comerciales como ser: **Wizard Genomic DNA Purification** Kit de Promega, **Genomic Prep Blood DNA** Isolation Kit de Amersham Phamacia Biotech Inc y **QIAmp DNA Mini** Kit Qiagen, para la extracción de ADN de *Leishmania* a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con leishmaniosis que permite obtener material genético más purificado a diferencia de los métodos convencionales (Disch *et al.*, 2003; Vergel *et al.*, 2005).

El uso de sangre periférica ha demostrado que puede ser una alternativa eficiente para el diagnóstico, siendo probada en la Leishmaniosis visceral, que para el diagnóstico utilizaban muestras de aspirados de medula ósea, cuya toma de muestra es considerada altamente agresiva (Da Silva *et al.*, 2004).

En el diagnóstico de Leishmaniosis cutánea también se utilizó muestras de sangre periférica para la detección del parásito de esta manera permitió evidenciar la existencia de diseminación hematogéna del mismo (Venazzi *et al.*, 2007). Asimismo se utilizó en la detección infecciones subclínicas producidas por *Leishmania* de subgénero *Viannia*. (Fagundes *et al.*, 2007).

Este proceso de diseminación se realiza a través de células de Langerhans y células dendríticas foliculares cutáneas que emigran a dermis (24 – 96 horas en modelos experimentales) y fagocitan a los promastigotes y trasladándose por las vías linfáticas aferentes hacia los ganglios linfáticos.

El uso de muestras de sangre total requiere de un buen proceso de purificación, por los inhibidores (hemoglobina, inmuglobulinas) que representa para la enzima ADN polimerasa (Moadeb *et al.*, 2008). El manejo de EDTA. K3 como anticoagulante ha sido frecuente en investigaciones para la conservación de la muestra sanguínea (Moadeb *et al.*, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro medio las técnicas de diagnóstico disponibles consisten solamente en pruebas parasitológicas directas como lo son los extendidos (frotís) realizados de lesiones activas y biopsias que permite demostrar la presencia del agente infeccioso, pero sufre limitantes en la sensibilidad que varía entre 32.7% a 90.4 %, ya que pueden presentar problemas en la lectura microscópicas en casos que se presenten cantidades mínimas de amastigotes. Las pruebas serológicas, revelan la respuesta inmune humoral, son fáciles de realizar, relativamente rápidas y accesibles, pero presentan baja especificidad por la reactividad cruzada con parásitos que comparten epítopes homólogos como *Trypanosoma cruzi* que causa la enfermedad de chagas, describiéndose también reacción

cruzada con malaria, tuberculosis, lepra y brucelosis (Cuba *et al.*, 2000; Zerpa *et al.*, 2002).

Las pruebas moleculares que se realizan en nuestro medio consisten en la detección del parásito utilizando marcadores kinetoplastiales (13A y 13B), y actualmente otros estudios utilizaron marcadores moleculares con regiones blancas distintas para llegar a un diagnóstico alternativo a esta enfermedad (Venazzi *et al.*, 2007; Lachaud *et al.*, 2002). Por lo antes mencionado, surge la necesidad de buscar métodos de diagnóstico alternativos que coadyuven con la detección del parásito evaluando otros marcadores moleculares, cuya sensibilidad analítica que es una fase importante de la validación de un método de diagnóstico, permita detectar al agente infeccioso en cantidades mínimas y es por esto que nos planteamos dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la sensibilidad analítica de los marcadores nucleares de la tubulina TUB 1, TUB 6, A2 y A 10, kinetoplastiales 13 A, 13 B y ribosomales R221 y R332 para la detección de *Leishmania braziliensis*?

4. JUSTIFICACION

Una significativa parte del territorio boliviano es endémica para la leishmaniosis, en algunas regiones del país la enfermedad se va extendiendo, reemergiendo y adaptándose al medio urbano surgiendo una antropización del ciclo. El diagnóstico se basa en técnicas parasitológicas directas (frotís) y pruebas serológicas, las cuales no son suficientes para dar un diagnóstico preciso de la enfermedad especialmente cuando existe una carga parasitaria baja, una respuesta inmune deficiente, o personal no calificado en la identificación microscópica del parásito.

Es así que surgió como alternativa, el uso de pruebas moleculares como la PCR para coadyuvar el diagnóstico. Por lo descrito, es imperioso poner a prueba distintos

marcadores moleculares que brinden alta sensibilidad al diagnóstico de Leishmaniosis estableciendo en primera instancia su capacidad de detección que constituye una etapa preliminar de la validación de un método.

De esta manera contribuiremos con la información necesaria para tener un pronóstico, selección adecuada de tratamiento, medidas de control y prevención eficaz.

El presente trabajo, se enmarcó en los objetivos del proyecto “Enfermedades Infecciosas” ASDI/Sarec-UMSA con el apoyo técnico - científico del Centro de Investigación Genética (CINGEN) del Instituto de Investigaciones Técnico-Científicas de la Universidad Policial (IITCUP), en el que se propuso evaluar cuatro marcadores moleculares para la detección de la leishmaniosis: kinetoplastidiales (13A, 13B) y nucleares dirigido a la región de la β -tubulina (TUB1, TUB6, A2 y A10) y ribosomales (R221 y R332), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, disponibles para la detección y tipificación de *Leishmania*. Además tiene el propósito de establecer que marcador brinda mejor límite de detección.

5. HIPOTESIS

Los marcadores dirigidos al gen β -tubulina, al ADN kinetoplastidial y ribosomales, permiten la detección de *Leishmania braziliensis* con variabilidad a nivel de la sensibilidad analítica en muestras inoculadas *in vitro*.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad analítica de tres marcadores genéticos para la detección de Leishmaniosis en muestras inoculadas *in vitro*.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Optimizar el protocolo de obtención del material genético a partir de cultivos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* y de muestras sanguíneas, mediante el uso del kit comercial Wizard Genomic DNA Purification kit de línea Promega.
- 2) Optimizar las condiciones de trabajo de la PCR para los marcadores kinetoplastidiales (13 A - 13B), genómicos dirigidos a la β -tubulina (TUB1- TUB 6, A2 – A10 y ribosomales (R221- R 332) con los extractos de ADN provenientes de muestras inoculadas *in vitro*.
- 3) Determinar la sensibilidad analítica de detección de la PCR en diluciones seriadas de cultivos de *Leishmania braziliensis* y muestras de sangre inoculadas con diferentes concentraciones de promastigotes para cada marcador genético evaluado.
- 4) Determinar la sensibilidad y especificidad analítica para una PCR Multiplex con los marcadores de la β -tubulina en cultivos de promastigotes de *Leishmania amazonensis* y en muestras de sangre inoculadas con promastigotes de *Leishmania braziliensis*

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 MUESTRAS DE SANGRE:

Las muestras de sangre periférica provinieron de personas sin enfermedad que no presentaron antecedentes de haber cursado Leishmaniosis o encontrarse en áreas no endémicas en caso de presentar infección subclínica.

7.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Los criterios que se tomaron en cuenta fueron los siguientes:

- Personas sin manifestaciones clínicas de la enfermedad que no habitan áreas endémicas.
- Consentimiento para el uso de su muestra sanguínea.

7.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Para delimitar la población del grupo de control de personas sin la enfermedad se tienen los siguientes criterios de exclusión:

- Antecedentes de haber cursado la enfermedad
- Provenir de áreas endémicas o con un tiempo de permanencia prolongada en alguna de ellas.

7.4 PARÁSITOS:

Se utilizaron cultivos de promastigotes de 2 diferentes especies de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania amazonensis* en fase logarítmica de crecimiento (Ver Tabla N°6), cultivados “*in vitro*” en medio Schneider suplementado con glutamina, los cuales se mantuvieron congelados a una temperatura de – 20 °C hasta el momento de su

procesamiento para las pruebas de sensibilidad analítica para todos los marcadores y especificidad analítica parcial en la evaluación de marcadores dirigidos a la β -tubulina.

Tabla N°6: Cepas de Leishmania utilizadas como referencia para de determinación de la sensibilidad y especificidad analítica con los marcadores genéticos en estudio.

ESPECIE	CÓDIGO INTERNO	CODIGO INTERNACIONAL	PROCEDENCIA
<i>Leishmania braziliensis</i>	IP	M2904 C192 RJA	Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas – UMSA
<i>Leishmania amazonensis</i> Clon 1	CA	LMA (MHOM/BR/76/LTB-012)	Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas – UMSA

7.5 PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO:

7.5.1 PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES SERIADAS DE PARÁSITOS

Una alícuota de cultivo con promastigotes de *Leishmania braziliensis* IP fue utilizada para realizar el recuento en la cámara de Neubauer y hallar la concentración de parásitos por mL de la solución total, de la cual se procedió a diluir con la solución Buffer fosfato salino (PBS) a pH 7 hasta alcanzar la concentración de 10^8 p/mL. A partir de esa solución se realizaron diluciones seriadas equivalentes a: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 1 p/mL

El mismo procedimiento se aplicó para inocular *in vitro* promastigotes de muestras de sangre periférica con EDTA de donadores sin la enfermedad, donde el diluyente lo constituye la sangre anticoagulada, con el fin de simular las condiciones de muestras sanguíneas provenientes de pacientes con leishmaniosis y establecer si el método de extracción puede aislar ADN del parásito a pesar de obtener ADN de las células sanguíneas presentes en las muestras.

7.6 EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO:

7.6.1 CONCENTRACIONES SERIADAS DE PARÁSITOS

El ADN fue extraído usando el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification” de la línea Promega, específico para muestras de sangre. Así, la extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante considerando las siguientes modificaciones para lograr la extracción del material genético del parásito.

Se tomó un volumen 300 μL de cada concentración de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en un tubo Eppendorf con capacidad para 1.5 mL, se centrifugó a 8000 g (gravidades) por 5 min a 8 °C, se observó la presencia de pellet y se adicionó 900 μL de solución (PBS) mezclándose suavemente por inversión para centrifugarla posteriormente a 14000 g por 30 segundos, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y al precipitado se le agregó 300 μL de solución de lisis nuclear y se mezcló por 10 segundos en el vórtex, dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación se agregó 100 μL de solución de precipitación de proteínas y se mezcló cuidadosamente, y se dejó a – 20 °C por 5 minutos. Se volvió a centrifugar a 14000 g por 4 minutos, se tomó cuidadosamente 380 μL del sobrenadante y se transfirió a otro tubo Eppendorf.

Los ácidos nucleicos se precipitaron con 304 μL de isopropanol dejándolo a – 20 °C por 5 minutos. El precipitado se obtuvo por centrifugación a 14000 g durante 4 minutos, el cual se lavó con 608 μL de etanol a 70% y se volvió a centrifugar por 2 minutos y decantando el sobrenadante, dejándolo secar a 56 °C por 10 minutos y se re hidrató con 50 μL de agua libre de nucleasas a 56 °C por 1 hora.

7.6.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE INOCULADAS CON CONCENTRACIONES SERIADAS DE *Leishmania braziliensis*.

Se tomó un volumen 300 μ L de cada muestra de sangre inoculada con concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en un tubo Eppendorf se adicionó 900 μ L de solución lisis celular que proviene del Kit, se mezcló suavemente por inversión para centrifugarla posteriormente a 14000 g por 30 segundos, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y al precipitado se le agregó 300 μ L de solución de lisis nuclear y se siguió los pasos descritos en el paso 7.6.1

7.6.3 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE COMO CONTROLES NEGATIVOS

Las muestras de sangre provinieron de personas sin la enfermedad que dieron su consentimiento para el uso de material genético, fueron procesadas con el mismo protocolo optimizado de extracción mediante kit comercial descrito en el punto 7.6.2

7.6.4 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE CULTIVO DE *Leishmania braziliensis* Y *Leishmania amazonensis* COMO CONTROLES POSITIVOS

Se utilizaron cultivos saturados de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania amazonensis* en fase logarítmica, se colocó 100 μ L de cada cultivo en cada tubo Eppendorf correspondiente y se procedió a centrifugar a 8000 g por 5 min a 8 °C, se observó la presencia de pellet y se adicionó 900 μ L de solución (PBS) mezclándose suavemente por inversión para centrifugarla posteriormente a 14000 g por 30 segundos, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y al precipitado se le agregó 300 μ L de solución de lisis nuclear y se mezcló por 10 segundos en el vórtex, dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación se agregó 100 μ L de

solución de precipitación de proteínas y se mezcló cuidadosamente, y se dejó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Se volvió a centrifugar a 14000 g por 4 minutos, se tomó cuidadosamente 380 μL del sobrenadante y se transfirió a otro tubo Eppendorf. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 304 μL de isopropanol dejándolo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. El precipitado se obtuvo por centrifugación a 14000 g durante 4 minutos, el cual se lavó con 608 μL de etanol a 70% y se volvió a centrifugar por 2 minutos y decantando el sobrenadante, se lo dejó secar a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y se re hidrató con 50 μL de agua libre de nucleasas a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

El material genético obtenido de las extracciones de las diferentes muestras biológicas evaluadas, fueron revelados en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Para ver la calidad del material genético extraído, y también se hizo una lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm para determinar la concentración y la pureza.

7.7 REALIZACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR utilizada para la evaluación de la sensibilidad analítica de los 4 marcadores fue la **Hot Start**, para la especificidad analítica parcial de los primers de la β -tubulina se utilizó una Reacción PCR Multiplex y utilizó el sistema MIX de componentes premezclados de la Línea Promega GREEN Go -Taq.

7.7.1 MARCADORES GENÉTICOS

Con el fin de evaluar los marcadores genéticos, se seleccionaron 4 marcadores de diferentes regiones del genoma de *Leishmania*

Los marcadores genéticos o primers kinetoplastidiales denominados 13 A y 13 B permiten la amplificación la región conservada del minicírculo del kinetoplasto (ADNk)

presente en todas las especies de *Leishmania*, por lo que constituye un marcador para la detección de género de estos protozoos, al igual que el marcador de ADN ribosomal R221 y R332.

Otros marcadores que se utilizaron para el genoma nuclear fueron los primers Tub 1 y Tub 6, que amplifican la región de la β tubulina, presente en todas las especies de *Leishmania* y en todos los estadios de su ciclo de vida, constituyendo un marcador para la detección de género. Se evaluaron dos marcadores dirigidos a la región β tubulina como son A2 y A10 que son específicos para el subgénero *Viannia*

Estos marcadores fueron sintetizados por la línea Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT). Sus características se detallan en la Tabla (N° 7).

Tabla N°7. Secuencias y sitios blanco de marcadores genéticos en estudio para los ensayos de amplificación de ADN de *Leishmania* mediante PCR

MARCADORES GENÉTICOS	SECUENCIA 5' – 3'	SITIO BLANCO	IDENTIFICA	pb	% G-C	Tm °C	Tamaño del producto
13 A	GTGGGGGAGGGGCGTTCT	ADN kinetoplastidial	Género	18	72	58	120 pb
13 B	ATTTTACACCAACCCCAAGTT	ADN kinetoplastidial		21	42	58	
R221	GGTTCCTTTCCTGATTTACG	ADN ribosomal	Género	20	45	51	603 pb
R332	GGCCGGTAAAGGCCGAATAG			20	65	58	
Tub 1	ATGCGTGAGATCGTTTCC	ADN nuclear	Género	18	50	54	900 pb
Tub 6	GGCGGCCTGCATCAT			15	66	40	
A 2	GACACGCGCTTGCGCACTCGT	ADN nuclear	Sub género : <i>Viannia</i>	20	65	70	375 pb
A 10	CCCCCTGCCTCGCCTGC			17	82	69	

A= adenina, C= citosina, T= timina, G= guanidina

Los marcadores kinetoplastidiales denominados 13 A y 13 B permiten la amplificación de una secuencia de 120 pb y el marcador del ADN ribosomal R221 y R332 que da un producto de 603 pb.

Los marcadores genéticos Tub 1 y Tub 6 dan un producto de 900 pb (Luis, 2001); (Orúe *et al.*, 2005); (Orúe *et al.*, 2008). Los A2 y A10 da un producto de 375 pb. (Ver Tabla N°8)

Se evaluaron las posibles interacciones de estos primers kinetoplastidiales (13A, 13B) y nucleares (Beta tubulina, ADN ribosomal) con secuencias genómicas humanas mediante comparación con la base de datos del Gene Bank y también con secuencias del genoma del género *Leishmania* y especie de *Leishmania braziliensis* (NCBI.2011) a manera de corroborar el sitio blanco y el tamaño de los productos de PCR que generan.

Se hizo simulaciones con software (*in silico*) FAST – PCR en los que se obtuvo las condiciones teóricas de trabajo como ser: temperaturas de hibridación para los oligonucleótidos y el tamaño de los productos esperados siendo una herramienta auxiliar para este trabajo. Para comenzar la evaluación se tomó en cuenta los datos hallados con el software y las condiciones descritas por los artículos científicos que usaron estos primers (Lachaud *et al.*, 2002; Orúe *et al.*, 2005; Orúe *et al.*, 2008). (Ver Tabla N° 8)

Tabla N°8.- Temperatura de hibridación y tamaño del producto de PCR obtenidas teóricamente mediante el programa FAST- PCR para cada marcador genético evaluado.

		MARCADORES GENETICOS EVALUADOS			
Condiciones de PCR	de	13 A - 13 B	TUB 1-TUB 6	A2 – A 10	R221—R332
Temperatura de hibridación	de	54°C	58.1 – 59.9 ° C	67.1 –70.0 °C	58°C
Producto esperado		120 pb	909 pb	378 pb	603 pb

7.7.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR CON MARCADORES GENÉTICOS EVALUADOS

La optimización de las condiciones de la PCR para cada marcador se basó en los artículos referencia (Orué *et al.*, 2005; Orué *et al.*, 2008; Lachaud *et al.*, 2002) y las obtenidas por el programa FAST –PCR.

Para obtener las condiciones de amplificación de cada marcador, se realizó variaciones en los números de ciclos y la temperatura de Hibridación con el tiempo de duración, dejando constantes las temperaturas de desnaturalización inicial, desnaturalización, elongación y elongación final según las descritas en los artículos de referencia.

Solo en el caso del marcador genético kinetoplastidial 13 A y 13 B se hizo variaciones en el tiempo de elongación del ciclo de amplificación para obtener el producto del tamaño esperado.

7.7.3 MASTER MIX

Para la PCR de cada uno de los marcadores genéticos se utilizó un sistema del MASTER MIX de componentes premezclados denominado Go Taq Green Master Mix 2X de la línea PROMEGA (Go Taq ADN polimerasa 2X, 3 mM Mg Cl₂, Buffer de Reacción (pH 8.5) , 400 uM dATP, 400 uM dGTP , 400 uM dCTP , 400 uM dTTP) . Con la finalidad de reducir las variaciones en concentraciones de los componentes del Mix sobre todo con el Cloruro de magnesio y dNTPs.

El volumen de reacción fue de 15 uL, variando en la concentraciones de primers para las diferentes reacciones de amplificación de cada marcador (Ver Tabla N°9).

Tabla N°9.- Concentraciones finales de los componentes del máster MIX para cada marcador genético evaluado.

COMPONENTES DEL MIX	MARCADORES GENETICOS							
	Tub 1	Tub 6	A 2	A 10	13 A	13 B	R221	R332
CONCENTRACIÓN DE PRIMERS	0.55 uM	0.55 uM	0.55 uM	0.55 uM	0.66 uM	0.66 uM	0.33 uM	0.33uM
GREEN – GO TAQ	0.44 X		0.44 X		0.44 X		0.44 X	
CLORURO DE MAGNESIO	1.3 mM		1.3 mM		1.3 mM		1.3 mM	
d NTPs	177 mM		177 mM		177 mM		177 mM	

7.7.4 MUESTRAS EMPLEADAS EN LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR

Para realizar la evaluación de las condiciones de PCR de cada uno de los marcadores genéticos se utilizaron los siguientes controles:

- Control Negativo: Material genético de personas sin la enfermedad
- Control Positivo: Material genético del cultivo de *Leishmania braziliensis*.
- Control Blanco Mix: H₂O libre de nucleasas.

Para determinar los tamaños de los productos de PCR de cada primer, se utilizó un marcador de Peso molecular de un rango de 50 pb a 800 pb de la línea PROMEGA (50 bp DNA Step Ladder).

7.7.5 VARÍACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS KINETOPLASTIDIALES 13 A Y 13 B

Las variaciones que se realizaron en las condiciones de la PCR en la evaluación de los marcadores kinetoplastidiales 13 A y 13B, fueron a partir de las propuestas por Rodgers en 1990 y que han sido utilizadas en el Instituto Servicios y Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS). Se ven en la Tabla N° 10.

TABLA N°10: Variación de las Condiciones de amplificación de la PCR para marcadores genéticos kinetoplastidiales 13 A y 13 B.

	MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>Leishmania sp</i> 13 A - 13 B			
Condiciones de PCR Temperatura y tiempo	Rodgers 1990	Segunda variación	Tercera variación	Ultima variación
Desnaturalización inicial	94 ° C 3 min	94 ° C 5 min	94 ° C 5 min	94 ° C 10 min
Desnaturalización	94 ° C 1 min	94 ° C 30 s	94 ° C 30 s	94 ° C 15 s
Hibridación	54 ° C 1 min	62 ° C 30 s	62 ° C 30 s	62 ° C 15 s
Elongación	72 ° C 1 min	72 ° C 45 s	72 ° C 30 s	72 ° C 8 s
Elongación final	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min
Número de ciclos	35	33	28	26

7.7.6 CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS R 221 y R 332 DIRIGIDOS AL ADN RIBOSOMAL (rRNA – SSU)

En la Tabla N° 11 se observan las condiciones utilizadas para los marcadores que tienen el sitio blanco de ADN ribosomal. Las condiciones están basadas en las condiciones descritas por Lachaud el 2002, en la que obtuvimos el producto esperado.

TABLA N° 11: Condiciones de amplificación de la PCR para marcadores genéticos de ADN ribosomal R221 –R332

	MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>Leishmania Sp</i> R221-R332
Condiciones de PCR Temperatura y tiempo	Lachaud <i>et al</i> , 2005
Desnaturalización inicial	94 °C 5 min
Desnaturalización	94 °C 1 min
Hibridación	62 °C 1 min
Elongación	72 °C 1 min
Elongación final	72 °C 10 min
Número de ciclos	30

7.7.7 VARÍACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS TUB 1 Y TUB 6 DIRIGIDOS PARA A LA TUBULINA

Se evaluó las condiciones proporcionadas por los artículos de referencia (Orué *et al.*, 2005; Orué *et al.*, 2008) (Ver tabla N° 12) y se realizaron modificaciones hasta hallar el producto esperado.

TABLA N°11: Variación de las Condiciones de amplificación de la PCR para marcadores genéticos TUB 1 y TUB 6

MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>Leishmania sp.</i> TUB 1- TUB 6				
Condiciones de PCR Temperatura y tiempo	Primera variación	Segunda variación	Tercera variación	Cuarta variación
Desnaturalización inicial	94 ° C 3 min	94 ° C 5 min	94 ° C 5 min	94 ° C 5 min
Desnaturalización	94 °C 1 min	94 °C 30 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Hibridación	54 °C 1 min	62 ° C 30 s	62 ° C 30 s	62 ° C 30 s
Elongación	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 45 s	72 °C 30 s
Elongación final	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
Número de ciclos	33	33	36	42

7.7.8 VARÍACIONES EN LAS CONDICIONES PARA LOS MARCADORES GENÉTICOS A2 Y A 10 DIRIGIDOS PARA A LA TUBULINA

Se evaluó las condiciones proporcionadas por los artículos de referencia (Orué *et al.*, 2005; Orué *et al.*, 2008), tuvieron una evaluación similar a la de los primers de TUB 1 y TUB 6 las condiciones evaluadas se observan en la Tabla N° 12.

TABLA N° 12: Variación de las Condiciones de amplificación de la PCR para marcadores genéticos A2 y A 10

MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DEL SUBGÉNERO <i>Viannia</i> A₂ – A₁₀				
Condiciones de PCR Temperatura y tiempo	Primera variación	Segunda variación	Tercera variación	Cuarta variación
Desnaturalización inicial	94 °C 3 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min
Desnaturalización	94 °C 1 min	94 °C 30 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Hibridación	54 °C 1 min	62 °C 30 s	62 °C 30 s	62 °C 30 s
Elongación	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 45 seg	72 °C 30 s
Elongación final	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
Número de ciclos	33	33	36	42

7.8 EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD ANALITICA DE CADA MARCADOR GENETICO

Se determinó la sensibilidad analítica de detección de cada marcador evaluado, en los extractos de ADN provenientes de las muestras de sangre inoculadas con concentraciones seriadas de cultivos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* con concentraciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 y 1, p/mL.

7.9 PCR MULTIPLEX CON LOS MARCADORES DE LA β - TUBULINA TUB 1, TUB 6, A2 Y A10

Las condiciones halladas para los marcadores TUB 1, TUB 6, A2 y A10 fueron las utilizadas para realizar una reacción Multiplex con muestras de cultivo de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania amazonensis* como controles positivos y muestras de sangre de personas sin la enfermedad como controles negativos.

Asimismo se evaluaron las muestras de sangre inoculadas con las concentraciones seriadas de *Leishmania braziliensis*.

Cada proceso de PCR fue realizado adicionando estos controles y por lo menos con 3 repeticiones en diferentes días con los controles incluidos.

Todos los productos de la PCR realizados con todos los marcadores genéticos obtenidos fueron revelados en gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con Bromuro de Etidio.

8. RESULTADOS

8.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La extracción de material genético de mediante el Kit Wizard Genomic Purification de la línea PROMEGA, a partir de muestras de sangre contaminadas experimentalmente con inóculos de cultivo que van de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 p/mL, dieron bandas visibles en el gel de agarosa al 1%. Con una concentración promedio de 200 ug/mL y un índice de pureza del 1.4 a 1.6 (Fig.10)

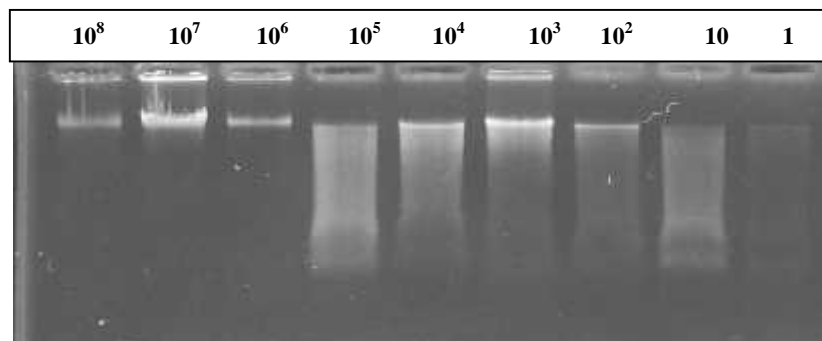


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % de productos de extracción procedentes de muestras de sangre inoculadas con concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* usando el método de extracción del Kit Wizard Genomic

En la extracción de muestras de sangre de personas sin la enfermedad que constituyeron los controles negativos (CN), se observaron la presencia de bandas visibles de ADN (Fig. 11).

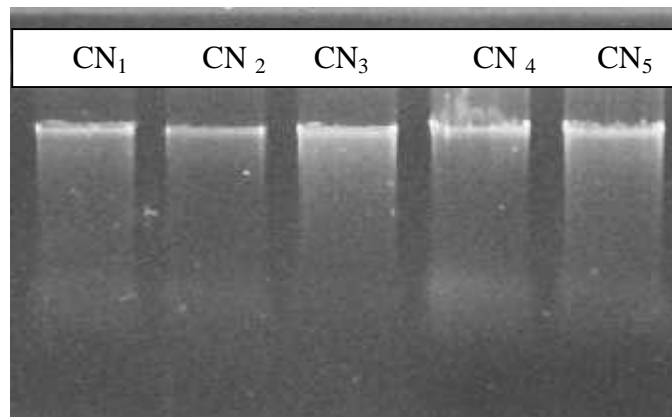


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % de productos de extracción de muestras de sangre de personas sin la enfermedad extraídas con el método modificado de Kit Wizard Genomic.

A fin de evaluar el método de extracción en diluciones seriadas de cultivos de *Leishmania braziliensis* que van de 10^8 a 1 p/ml, los resultados muestran una banda de ADN visible en la dilución con 10^8 p/ml y no así en las demás diluciones. Para evitar dudas en la corrida electroforética se usó un control de corrida (CC) que constituye en ADN humano el cual al ser visible validó la corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. . (Fig. 12)

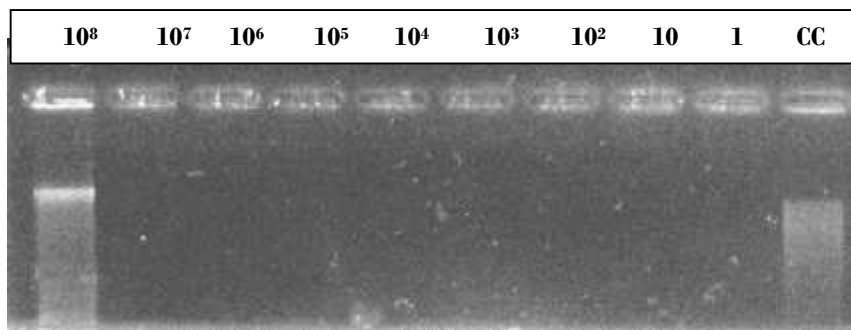


Figura 12. Evaluación de extractos de ADN procedentes de diluciones seriadas de promastigotes que van 10⁸ hasta 1 p/mL, revelados en gel de agarosa al 1.0 % con bromuro de etidio.

8.2 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE PCR

Las condiciones del PCR que fueron halladas para cada marcador genético se resumen en la Tabla N° 13. La temperatura de desnaturalización inicial establecida fue la de 94°C en todos los marcadores con tiempos similares, con excepción de los marcadores genéticos 13 A y 13 B, cuyo tiempo que extendió a 10 minutos de desnaturalización. En cuanto a la temperatura de hibridación, esta coincide en todos los marcadores siendo de 62°C, pero con una variación de tiempos. Para los marcadores 13 A y 13 B el tiempo de elongación fue reducido a 8 segundos para que obtener el producto de 120 pb.

En los otros casos se mantuvo los tiempos de elongación de referencia.

TABLA N°13: CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMIZADAS PARA CADA MARCADOR GENÉTICO EVALUADO

	MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>Leishmania</i>			
Condiciones de PCR Temperatura y tiempo	13 A - 13 B	TUB 1-TUB 6	A2 – A 10	R221—R332
Desnaturalización inicial	94 ° C 10 min	94 ° C 5 min	94 ° C 5 min	94 ° C 5 min
Desnaturalización	94 ° C 15 s	94 ° C 30 s	94 ° C 30 s	94 ° C 1 min
Hibridación	62 ° C 15 s	62 ° C 30 s	62 ° C 30 s	62 ° C 1min
Elongación	72 ° C 8 s	72 ° C 30 s	72 ° C 30 s	72 ° C 1min
Elongación final	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min	72 ° C 10 min
Número de ciclos	26	42	42	30

Con las condiciones optimizadas para los primers 13 A y 13 B se obtuvo un producto del tamaño de aproximado de 120 pb con extractos de ADN de cultivos de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania. amazonensis*. (Fig.13). No se observó ninguna banda en el control negativo y ni en el control de mix (H₂O).

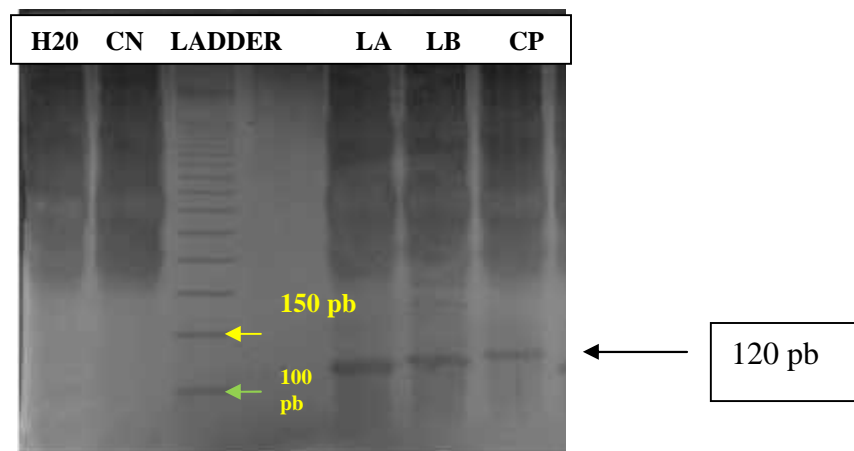


FIGURA .13 Productos de PCR con las condiciones de Reacción optimizadas para los marcadores 13 A y 13 B, usando muestras de cultivo de *Leishmania braziliensis* (LB), *Leishmania amazonensis* (LA), controles negativo (CN) y control positivo de *Leishmania braziliensis* (CP).

Para el marcador R221 y R332 se obtuvo la banda esperada correspondiente a 603 pb, sin presencia de artefactos o bandas de tamaños similares, pudiendo amplificar las muestras de cultivos de las cepas de *Leishmania amazonensis* como la de *Leishmania braziliensis*. (Fig. 14)

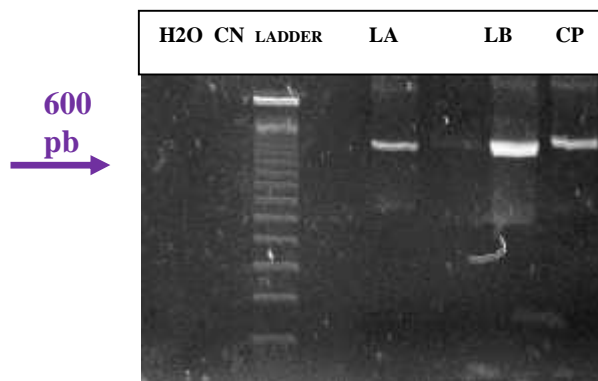


FIGURA 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR de muestras cultivo de *Leishmania braziliensis* (LB), *Leishmania amazonensis* (LA), controles negativos y positivos respectivos, con las condiciones optimizadas de Reacción para los marcadores R221 y R 332.

En cuanto a los marcadores Tub 1 y Tub 6 se obtuvo la banda esperada correspondiente a 900 pb, según en el negativo de la foto de la corrida que permite observar con mayor resolución la presencia de artefactos o bandas de tamaños similares como es en este caso, no se presentan bandas inespecíficas para los controles positivos que corresponden a las cepas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* y controles negativos. (Fig. 15).

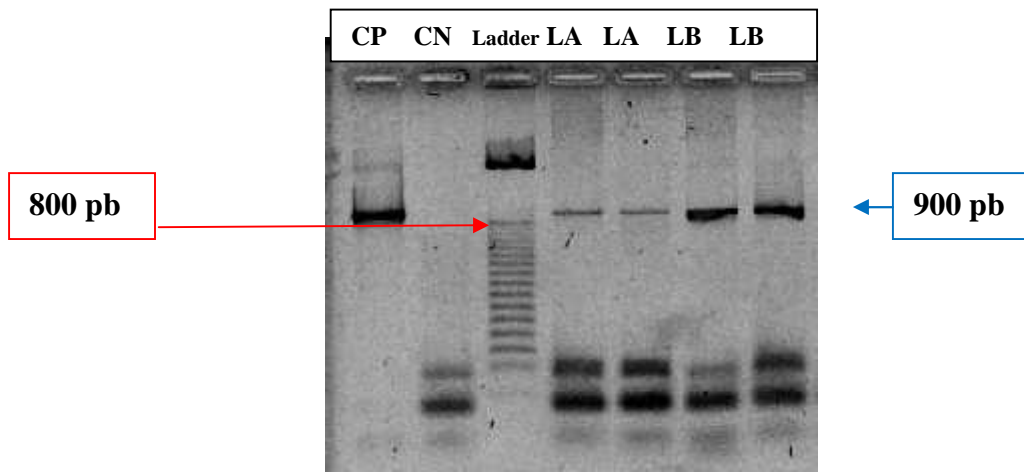


FIGURA 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR de muestras cultivo de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* y controles negativos respectivos, con las condiciones optimizadas de Reacción para los marcadores TUB 1 y TUB 6

8.3 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD ANALITICA

Los resultados de la PCR con muestras de sangre infectadas artificialmente con concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* para el marcador kinetoplastidial 13 A y 13 B dieron una sensibilidad analítica de hasta 100 p/ ml de sangre en la que se observa la presencia de una banda débil pero visible. (Fig. 16)

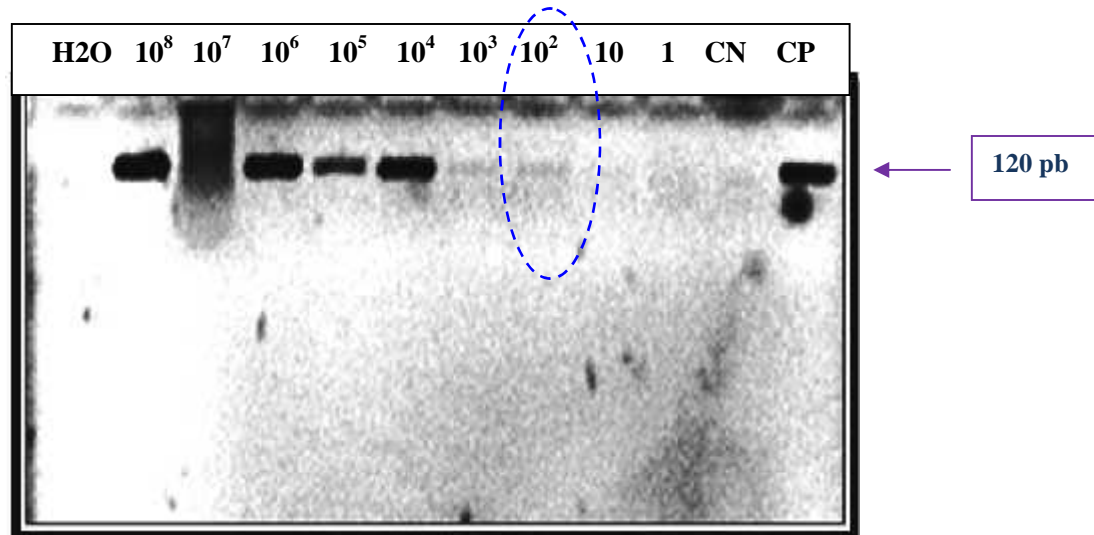


FIGURA 16. Evaluación de la sensibilidad analítica del marcador 13 A y 13 B con inoculos de concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* que va 10⁸ a 1 p/mL.

En cuanto a la evaluación de la sensibilidad analítica del marcador ribosomal R221 y R332 con muestras de sangre inoculadas con concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, alcanzó un límite de detección de hasta 10⁴ p/ml (Fig. 17).

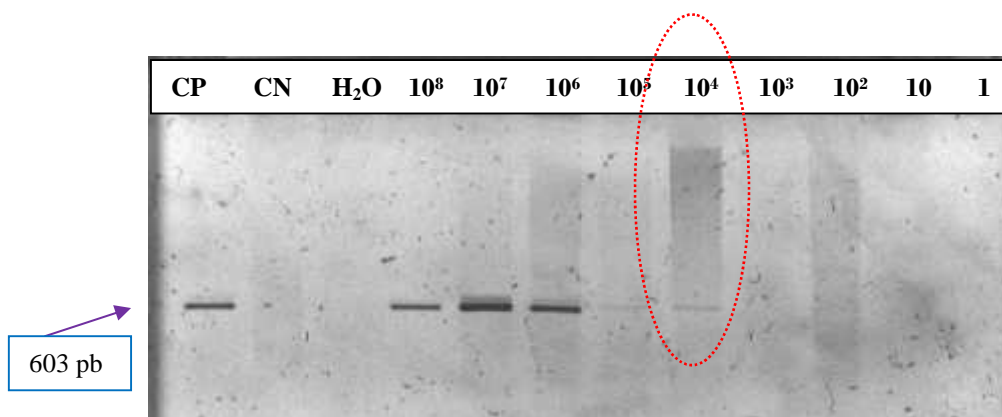


FIGURA 17. Evaluación de la sensibilidad analítica del marcador R221 y R332 con inoculos de concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* que va 10⁸ a 1 p/mL.

Con el marcador genético para la Beta tubulina (TUB 1 y TUB 6) se evaluó la sensibilidad analítica con el mismo sistema de concentraciones seriadas de promastigotes inoculados en muestras de sangre, género un solo producto de 900 pb y alcanzó un límite de detección hasta 1 p/mL. (Fig. 18).

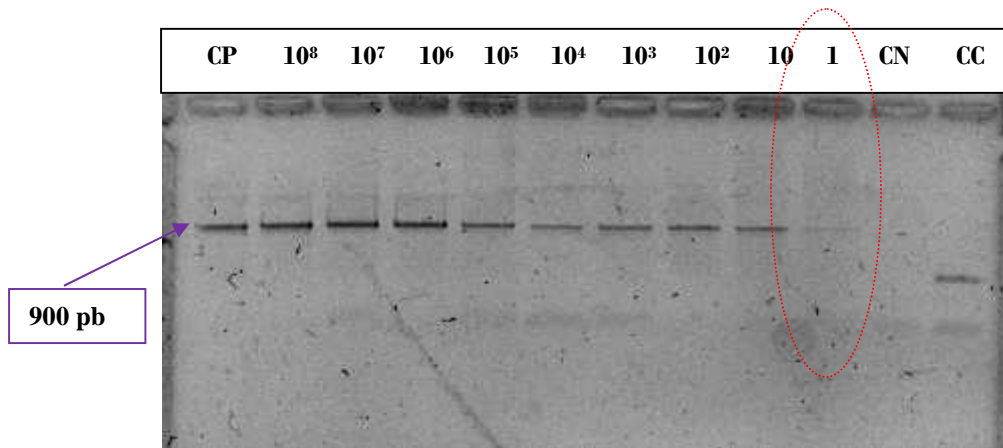


FIGURA 18. Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR usando el marcador TUB 1 y TUB 6 con inoculos de concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en muestras de sangre que van 10⁸ a 1 p/ml

Con el marcador genético para la β -tubulina específico para el subgénero *Viannia* A 2 y A10 se observa la presencia de la banda esperada de 375 pb, alcanzando un límite de detección hasta 10 p/mL. Pero también se observó la presencia de una banda inespecífica de un peso aproximado de 550 pb.

Esta banda de 550 pb, se encuentra presente en el control negativo y en las muestras de sangre inoculadas con concentraciones del parásito, pero con menos intensidad en las concentraciones 10⁸ y 10⁷p/mL.

En el control positivo que consiste en ADN de cultivo de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, solo se observó una sola banda correspondiente al tamaño del producto esperado. (Fig. 19)

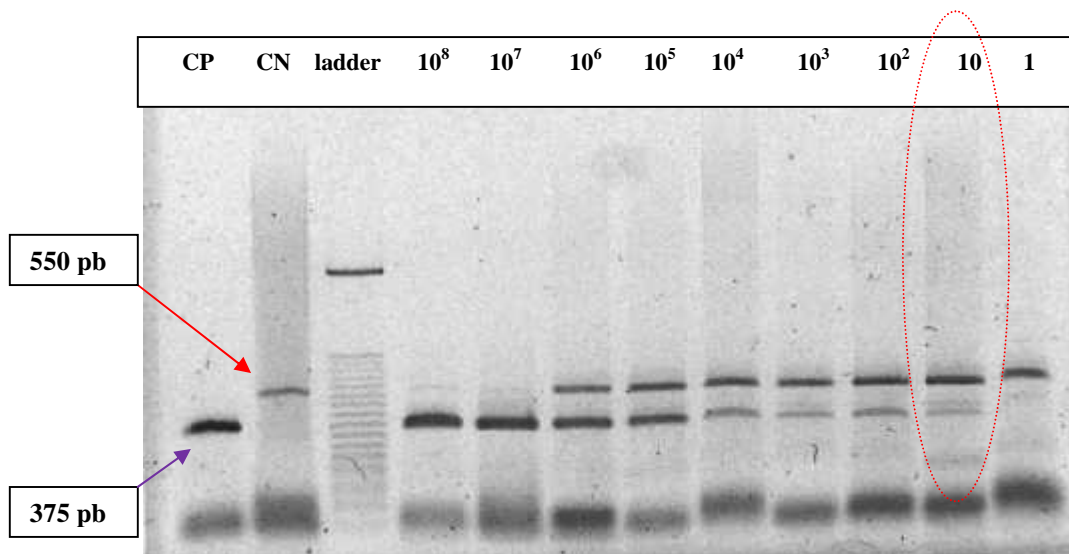


FIGURA 19. Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR usando el marcador A2 y A10 con inóculos de concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en muestras de sangre que van 10^8 a 1 p/ml

Al realizar la comparación de la sensibilidad analítica de cada marcador genético evaluado (Tabla N° 13) se observó que el marcador kinetoplastidial 13 A- 13 B alcanzó una sensibilidad promedio de 100 parásitos por ml. El marcador ribosomal alcanzó una menor sensibilidad llegando a detectar solo 10^4 parásitos / mL, siendo que el marcador dirigido a la Beta-tubulina el que pudo detectar hasta 1 parásito / ml.

La sensibilidad de cada marcador en la PCR fue evaluada de acuerdo a la presencia del producto cuya intensidad de señal frente a la tinción de bromuro de etidio en gel de agarosa, debería ser nítida para un fácil interpretación (+ o -).

La presencia de artefactos como bandas inespecíficas, también fueron un factor para la evaluación de la PCR, en la que presencia de bandas inespecíficas son consideradas como (+) y ausencia (-).

TABLA N^o 14: Comparación de resultados de sensibilidad analítica de los marcadores genéticos 13 A - 13 B, TUB 1 – TUB 6, A2 – A 10 y R221- R332.

Características	13 A – 13 B	R221-R332	TUB1 – TUB6	A2- A10
Sensibilidad Número de Parásitos /ml	100 p/mL	10⁴ p/mL	1 p/mL	10 p/mL
Sensibilidad en relacionado al volumen de muestra en la extracción	50p/500 ul	5000 p / 500 ul	0.5 p / 500 ul	5 p/500ul
Presencia de artefactos en condiciones optimizadas	(-)	(-)	(-)	(+)
Facilidad en la interpretación	(+/-)	(+)	(+)	(+)

8.4 PCR MULTIPLEX CON MARCADORES DE LA β - TUBULINA

Para realizar la reacción Multiplex con los primers TUB 1, TUB 6, A2 y A 10 se utilizaron las condiciones halladas por separado, siendo que estas son las mismas para los dos marcadores.

En la PCR Multiplex se observó la presencia bandas correspondientes a los productos esperados de 900 pb para TUB1 - TUB 6 y 375 pb para A2 – A10 en el control positivo de ADN de *Leishmania braziliensis*. En el control negativo, se observó la presencia de una banda nítida que corresponde a un tamaño aproximado de 550 pb. En la muestra de sangre inoculada con 10⁸ p/ml se detectó la presencia bandas correspondientes a los productos esperados y una banda nítida de 550 pb. (Fig. 20).

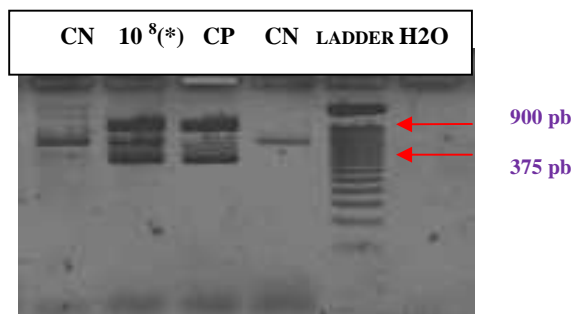


FIGURA 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR Multiplex con los marcadores TUB1, TUB 6, A2 y A 10 en muestras cultivo de *Leishmania braziliensis*, controles negativos respectivos y muestra contaminada con 10⁸ p/ml.

A fin de evaluar la especificidad analítica de la reacción Multiplex con las condiciones halladas en la identificación de especies del subgénero *Viannia* se utilizó material genético de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania amazonensis* y controles negativos que corresponden a ADN humano. Dio como resultado en la muestra de *Leishmania braziliensis* la presencia de 2 bandas correspondientes a los productos esperados de 900 pb y 375 pb que identifica sub género *Viannia*. En la muestra de *Leishmania amazonensis*, una sola banda de 900 pb que identifica el género. Los controles negativos se observa la presencia de varias bandas que no corresponden al tamaño de los que amplifican los marcadores de la β -tubulina. (Fig. 21)

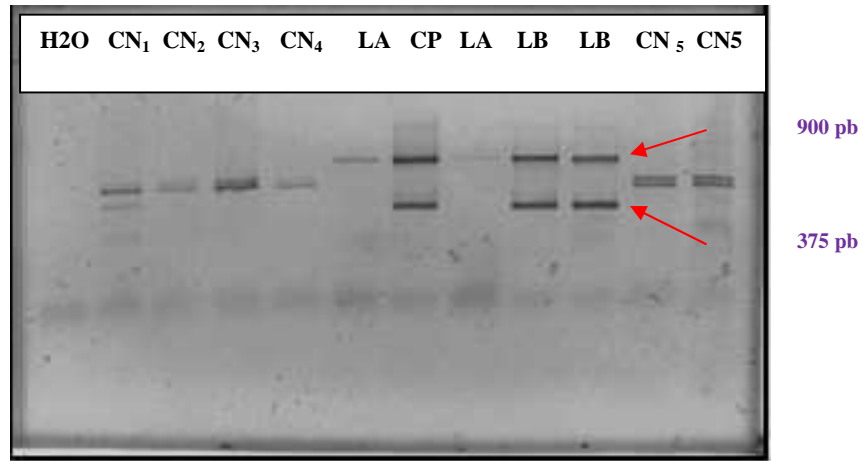


FIGURA 21. Evaluación de la especificidad analítica parcial de la Reacción Multiplex de los marcadores TUB 1, TUB 6, A2 y A 10 en muestras cultivo de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* y controles negativos de ADN humano.

Se evaluó la sensibilidad analítica de la reacción Multiplex con concentraciones seriadas de 10^8 a 1 p/mL de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en muestras de sangre, en la que se halló un límite de detección de 10 p/mL. (Fig 22).

En la electroforesis se observó además de los productos esperados, la presencia de bandas inespecíficas que no correspondían a los tamaños de los productos de amplificación de los marcadores utilizados, especialmente de dos bandas nítidas que corresponden a los pesos de 550 a 650 pb. Tal como ocurrió con los controles negativo en la prueba de especificidad analítica parcial con los controles negativos.

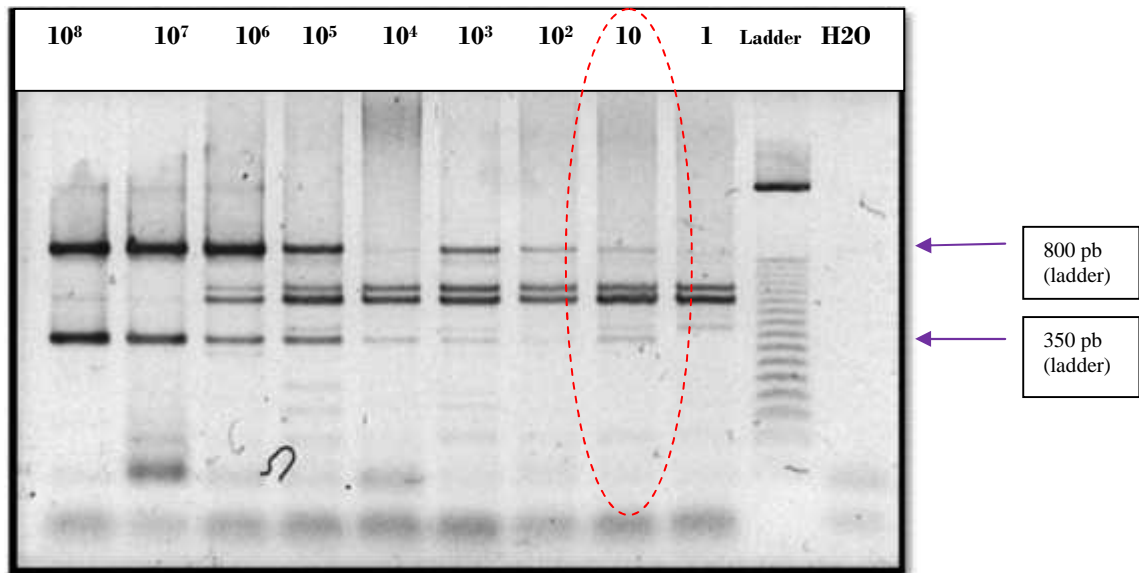
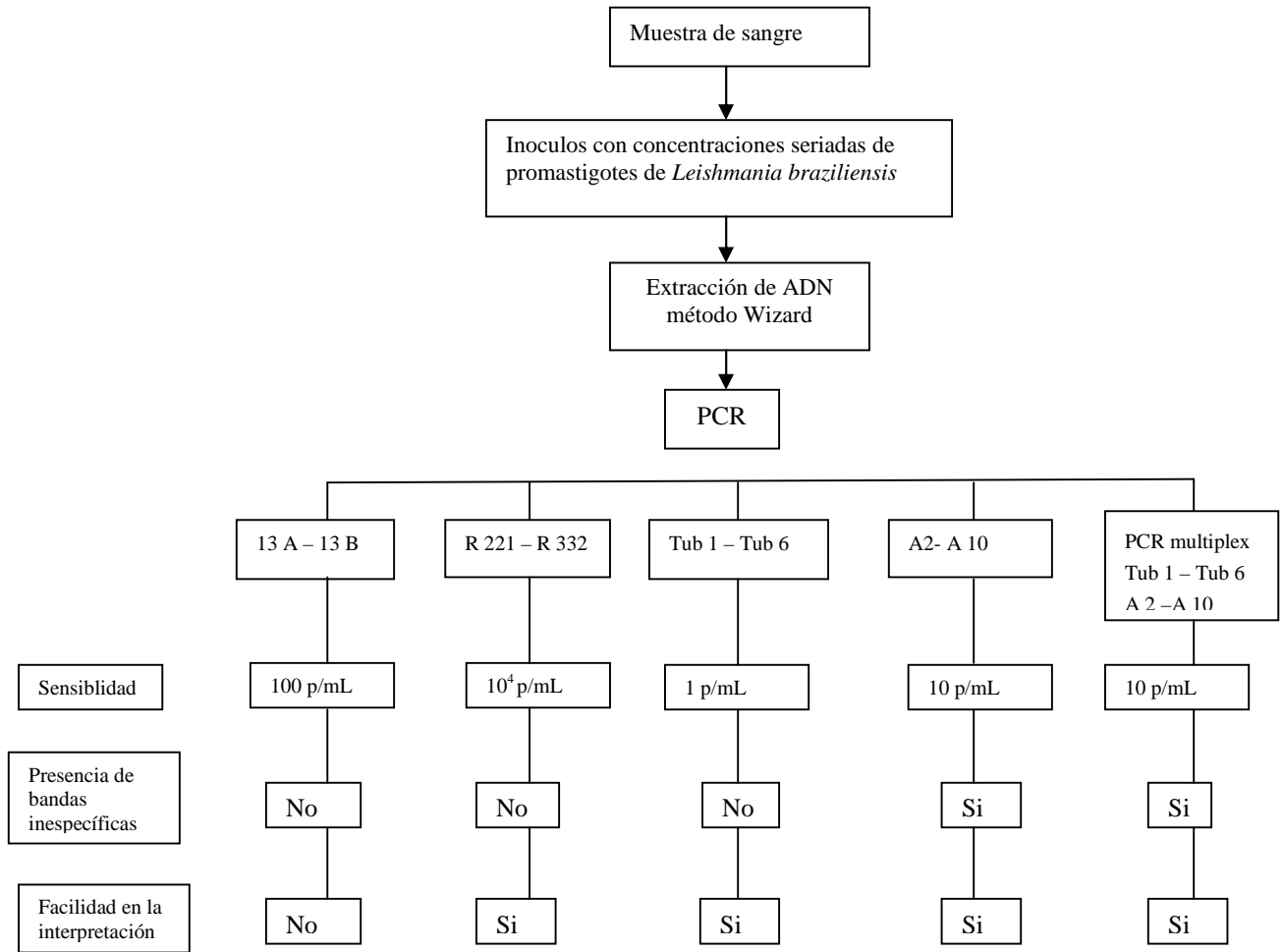


FIGURA 22. Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR Multiplex con inóculos de concentraciones seriadas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* que va 10⁸ a 1 p/mL de muestras sangre.

En un esquema, se resumen los resultados obtenidos para cada marcador genético, describiendo los pasos hasta a hallar la sensibilidad analítica expresada en la cantidad de parásitos por mililitro de muestra de sangre contaminada con inóculos de *Leishmania* que puede detectar cada marcador. Esquema N° 1.

Esquema N° 1: Resumen de Resultados



9. DISCUSIÓN

La leishmaniosis al ser una enfermedad compleja debida a la infección producida por protozoos del género *Leishmania*, que se caracteriza por evadir la respuesta inmune. Clínicamente se manifiesta en formas de lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales (Rey, 2004) similares a las manifestaciones clínicas producidas por infecciones bacterianas, fúngicas o procesos metastásicos, lo que hace que el diagnóstico se complique y que solo una técnica no sea suficiente para su identificación.

La identificación del agente etiológico es el punto clave en el diagnóstico de laboratorio para la asociación con una determinada enfermedad. Es de vital importancia que esta identificación sea realizada en base a técnicas y métodos estandarizados u optimizados y finalmente validados para tener una certeza de los resultados.

Actualmente los métodos de laboratorio para la identificación del agente causal de la leishmaniosis son realizados por observación por microscopia óptica (frotís directo) (Cuba, 2000). El frotís es considerado como técnica “Gold estándar” a pesar de variación en sensibilidad, es utilizado como método de comparación de otros métodos que son utilizados también como diagnóstico (Medeiros *et al.*, 2002; Bensoussan *et al.*, 2006) como los moleculares y las técnicas inmunológicas (de menor uso por sus limitantes) (Cuba *et al.*, 2000).

Entre los métodos moleculares de mayor uso, está la PCR para la identificación y detección de *Leishmania* (Kato *et al.*, 2005; Jorquera *et al.*, 2005, Harris *et al.*, 1998; Orué *et al.*, 2008) y por consecuencia se usa en el diagnóstico de la Leishmaniosis.

Una razón por la que el uso de la PCR se convirtió en un método de diagnóstico, es que resulta altamente sensible ya que tiene como sitio blanco una molécula de ADN que puede estar presente aún cuando el agente infeccioso este muerto. El hecho que dé un

resultado positivo no significa que el paciente este cursando con la enfermedad, si no que por su sensibilidad le permite detectar material genético residual del agente infeccioso. La PCR podría dar analíticamente un resultado verdadero positivo pero clínicamente el agente causal está muerto, por lo que se trataría de un resultado falso positivo, clínicamente hablando. (Burkardt *et al.*, 2000). Por lo tanto, al momento de hacer la valoración clínica de un paciente se debe tomar en cuenta estos aspectos.

Los valores de sensibilidad de la PCR en la leishmaniosis mucocutánea varían entre 47.4 a 83.3 % (Uezato *et al.*, 1998; Piñero *et al.*, 1999; Onuma *et al.*, 2001), esto se debe a las variaciones de sensibilidad del método de comparación que es usado como “Gold estándar” que constituye el frotís y también a la secuencia del primer usado, región genética que se amplifica en el genoma del parásito. (Medeiros *et al.*, 2002; Bensoussan *et al.*, 2006). En otros trabajos similares, la comparación de los resultados de la PCR fueron realizados con los resultados proporcionados por el frotís de lesión activa, biopsias, histopatología y métodos inmunológicos como el Test de Montenegro para determinar la sensibilidad y especificidad como es en el caso Leishmaniosis Mucocutánea que obtuvo una especificidad del 100% pero una sensibilidad de 3.4 % y en la leishmaniosis visceral una especificidad del 100 % y sensibilidad de 81 % (Venazzi, 2007 ; Disch *et al.*, 2003).

El uso de muestras de sangre periférica para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis cutánea americana se debió a varias razones: La primera fue la verificación de la circulación hematógena responsable de la presencia de formas diseminadas, la segunda fue la determinación de la persistencia de la infección, que se refiere a la presencia oculta del parásito después de la cura clínica; algunos autores la definen como infección encriptada y es característica en las infecciones producidas por *Leishmania braziliensis*, que tiene la tendencia a la diseminación a diferentes partes del cuerpo, con particular preferencia a la zona nasofaríngea o mucocutánea, pudiendo ocurrir después

de meses o años de haberse curado la primera lesión cutánea. (Guevara *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 1997).

Los ensayos de PCR a partir de muestras de sangre periférica se han ido incrementando por ser menos invasivas frente a otro tipo de muestras. (Reale *et al.*, 1999; Moaddeb *et al.*, 2008; Disch *et al.*, 2003), sobre todo para el diagnóstico de leishmaniosis visceral.

La extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica resulta más compleja por los interferentes que se deben eliminar, como la hemoglobina y lactoferrina e inmunoglobulina IgG presentes en la sangre. En un estudio realizado por Disch *et al.*, el 2003 en la identificación de *Leishmania chagasi*, utilizaron muestras de sangre periférica, para la extracción del ADN, compararon los métodos de extracción fenol-cloroformo y kits comerciales como Wizard Genomic de la línea PROMEGA y Genomic PREP de la línea AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, donde obtuvieron ADN correspondiente a 1.65 fg (1.65×10^{-9} ug) sin diferencias en ambos kits, pero observando presencia de contaminantes para la PCR con el método de extracción fenólica, este estudio permitió determinar la factibilidad de utilizar Kits comerciales de extracción para la PCR de *Leishmania*. En el presente estudio, se obtuvo ADN visible y amplificable usando el Kit Wizard Genómico de la línea PROMEGA en muestras de sangre inoculadas *in vitro* con cultivos de *Leishmania* dando una concentración promedio de 200 ug/mL y un índice de pureza en un rango aceptable de 1.4 a 1.6.

En cuanto al uso de muestras de sangre en el diagnóstico de leishmaniasis mucocutánea. Venazzi *et al.*, el 2006, demostraron la presencia del ADN de *Leishmania* en muestras de sangre utilizando marcadores moleculares del kinetoplasto (MP1L, MP3H) que son específicos para la detección de *Leishmania braziliensis*, encontrando una presencia del parásito de 3.4 % de pacientes del noreste de Paraná- Brasil con lesiones activas, probablemente se deba a una diseminación hematogena (Venazzi *et al.*, 2007). Martins *et al.*, en el 2010, encontró un porcentaje mayor al 39.8 % PCR positivos en 93 pacientes

con lesiones cerradas utilizando como marcador molecular del kinetoplasto (B1 y B2). Sin embargo Vergel el 2005, demostró la amplificación de una secuencia humana de un tamaño similar (718 pares de bases) con los marcadores moleculares del kADN (B1 y B2) los mismos utilizados por Martins el 2010, dando lugar a falsos positivos demostrándose que existía una homología con el cromosoma humano 2 región intergénica (AC010878) (Vergel *et al.*, 2005). Lo que produce una incertidumbre en la especificidad del último marcador.

Existe una gran gama de marcadores moleculares utilizados para la detección de *Leishmania* (Cannova, 2007), su elección se basa específicamente en los siguientes factores: el número de repeticiones y el sitio blanco de la secuencia genética q debe estar presente en todas las formas evolutivas del parásito. Para utilizar un marcador genético en el diagnóstico por métodos moleculares, previamente debe ser validado.

La Validación constituye una serie de pasos necesarios para la estandarización comenzando con la determinación de la sensibilidad analítica, que permite evaluar el límite de detección del proceso completo que va desde la extracción del ADN hasta el revelado de la PCR utilizando concentraciones seriadas del agente infeccioso. Lachaud *et al.* 2002 y Moaddeb el 2008 usaron cultivos de promastigotes *Leishmania infantum* para hallar el límite de detección al evaluar marcadores genéticos, aunque no son las formas de diagnóstico, constituyen las formas evolutivas más fácilmente cultivables que los cultivos de amastigotes axenicos. En el presente estudio se utilizaron cultivos de promastigotes en fase logarítmica de *Leishmania braziliensis* por las mismas razones y su accesibilidad para los ensayos.

Tal como ocurre en la validación de la PCR con otros tipos de muestras y marcadores moleculares, no existe una técnica de referencia o “gold estándar” que permita confirmar la presencia del parásito en sangre para la identificación de la infección con leishmaniosis cutánea americana (Medeiros, 2002).

Entre los marcadores genéticos para el estudio de *Leishmania* están los que tienen como sitio blanco secuencias del kinetoplasto como el 13 A y 13 B descrito por Rodgers en 1990, fueron utilizados por otros estudios tales como el realizado por Reale *et al.* en 1999 y en otro realizado en Venezuela por Rodríguez *et al.* en 1994, que evaluaron la capacidad de detección de parásitos y discriminación entre especies mediante hibridación.

Para realizar una evaluación de un marcador genético las condiciones de la PCR resultan importantes como la rigurosidad (en inglés - stringency) un término usado para describir las condiciones de hibridación que determinan la especificidad de la reacción de hibridación entre dos moléculas de ácidos nucleicos. Al variar las condiciones (especialmente la temperatura) una secuencia de nucleótidos pueden hibridar con una perfecta complementariedad (astringencia alta). (Lemon *et al.*, 1993; Lyons, 1998)

Las condiciones de PCR reportadas en el trabajo de Rodríguez con los marcadores 13 A y 13 B, son de baja rigurosidad con una Temperatura de hibridación de 50 °C por 1 min y una temperatura de extensión 72°C por 1 minuto, por 40 ciclos. Medeiros en Brazil el 2002 optimizó condiciones a una alta rigurosidad con una temperatura de desnaturalización de 93 °C por 30 segundos, Temperatura de hibridación de 60°C por 1 min y una Temperatura de extensión 72°C por 1 minuto, por 25 ciclos. Lachaud *et al.*, el 2002 obtuvieron condiciones de mediana rigurosidad y redujo los tiempos de duración de la temperatura de desnaturalización de 93 °C por 30 s, Temperatura de hibridación de 58°C por 30 s y una temperatura de extensión 72°C por 30 segundos, aumentado el número de ciclos a 40. En el presente estudio se obtuvo condiciones de alta rigurosidad y se redujeron los tiempos de duración con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 15 segundos, temperatura de hibridación de 62°C por 15 segundos y una temperatura de extensión 72°C por 8 segundos, con el fin de eliminar bandas inespecíficas que se presentaban en los controles negativos con el mismo tamaño del producto esperado, una vez descartada la posible contaminación de reactivos y muestras mediante el uso de controles negativos en cada proceso desde la extracción hasta la

PCR . Se usaron las condiciones halladas para establecer la sensibilidad analítica del marcador sin el riesgo de la presencia de bandas interferentes.

Lo descrito anteriormente nos conduce a pensar que estos oligonucleótidos kinetoplastidiales 13 A y 13 B, no presentan condiciones de amplificación delimitados y estables.

En cuanto a su sensibilidad analítica, este marcador alcanzó un límite de detección de 100 parásitos /ml de muestra de sangre, distinto al hallado por Lachaud *et al.*, que fue de 0.001parásitos/ml este resultado puede deberse al método de extracción usado que no es lo suficientemente sensible para extraer ADN kinetoplastidial y las condiciones de amplificación de alta rigurosidad optimizados que evitan la presencia de bandas inespecíficas en los controles negativos utilizados que correspondían al ADN de persona sin la enfermedad. Lachaud *et al.*, al utilizar el método de extracción basado en proteinasa K y fenol-cloroformo pudieron extraer ADN kinetoplastidial más eficientemente de muestras sanguíneas. Moaddeb en 2008 al evaluar métodos de extracción de ADN, basados en los protocolos clásicos de “boling” - fenol cloroformo y proteinasa K - fenol cloroformo y Chelex - fenol cloroformo, denominados A, B y C respectivamente, obtuvieron una sensibilidad analítica por cada método de extracción respectivamente que fueron de 10^3 , 10^4 y 10^4 copias de ADN del parásitos en 20 ul de volumen de reacción de Mix de PCR, con el método de extracción *in house* propuesto por los autor que consistía en solución de sucrosa, Tris, cloruro de magnesio, alcanzó una sensibilidad de 10 copias de ADN de parásitos por tubo de reacción. Lo que corrobora que la sensibilidad de este marcador depende del método de extracción utilizado.

Otra explicación es que el sistema de electroforesis basado en gel de agarosa al 1.5% no posee la suficiente resolución para observar bandas de menor intensidad que irán disminuyendo en orden decreciente de acuerdo al número de parásitos presentes tamaño es de 120 pb. Para aumentar la sensibilidad del método se sugeriría utilizar un sistema

de electroforesis que permita visualizar las bandas de menor intensidad como es el gel de acrilamida, pero en este caso reduciría las posibilidades de que esta PCR sea económicamente accesible.

Las condiciones de amplificación obtenidas para el marcador de ADN ribosomal R221 y R222 fueron de alta rigurosidad con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 min, Temperatura de hibridación de 62 °C por 1 min y una temperatura de extensión 72°C por 1 min, por 30 ciclos a fin de evitar la presencia de bandas inespecíficas. Lachaud *et al.*, el 2002, al evaluar a este marcador obtuvo condiciones de baja rigurosidad con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 30 s, Temperatura de hibridación de 50 °C por 30s y una temperatura de extensión 72°C por 45 s, por 40 ciclos. La optimización de este marcador fue más rápida que con los otros marcadores teniendo solo una variación ya que presentan condiciones de amplificaciones delimitadas y estables. Al ser un marcador de Género se evaluó con cepas de *Leishmania*: *L. braziliensis* y *Leishmania amazonensis* el cual produjo bandas del tamaño esperado sin la presencia de bandas inespecíficas.

En cuanto a su sensibilidad analítica este marcador alcanzó un límite de detección de 10⁴ p/ml de muestra de sangre, mucho menor al hallado por Lachaud que fue de 0.05p/ml. Una posible explicación de esta diferencia es que se deba al método de extracción empleado que es poco sensible aunque se trate de material genético nuclear.

Los ensayos de PCR para la optimización de las condiciones de amplificación para el marcador genético TUB 1 y TUB 6, nos dieron condiciones de alta rigurosidad con una Temperatura de hibridación de 62 °C por 30s y una temperatura de extensión 72°C por 30s, por 42 ciclos. A estas condiciones se eliminó la presencia de bandas inespecíficas que se presentaban en las condiciones de referencia descritas por Orué el 2008, que describe una temperatura de Hibridación de 60-65 °C por 2 min y extensión de 72 °C por 3 min. La variación se reduce más que en el tiempo de duración de cada temperatura de reacción.

Este marcador nos dio sensibilidad analítica de hasta 1 parásito por mL a diferencia del marcador kinetoplastidial 13 A y 13 B que nos dio una sensibilidad de 100 parásitos /mL. Siendo el marcador más sensible para la identificación de *Leishmania* sp. en las condiciones halladas, con muestras de sangre inoculadas con el parásito, a pesar de que el gen de la β tubulina posee de 11 a 15 copias en el genoma de *Leishmania* a diferencia del ADN kinetoplastidial que posee de 50 a 250.

La ventaja que ofrece el método basado en el marcador de la β -tubulina es por la presencia de un sitio blanco constante en ambos estadios del ciclo evolutivo del parásito, además es suficientemente variable para la discriminación a nivel de subgénero (Luis *et al.*, 1998) convirtiéndolo en un marcador aplicable para diagnóstico y estudios epidemiológicos.

En cuanto a los marcadores de la β -tubulina, A2 y A 10 que nos permite detectar el sub género *Viannia*, las condiciones halladas son similares a la de los marcadores de TUB1 y TUB 6, a pesar de las descritas por Orué el 2008 contemplan una temperatura de Hibridación de 60 - 65 °C por 2 min y extensión de 72 ° C por 3 min. Existiendo una diferencia de 2 °C en la temperatura de hibridación y los tiempos utilizados son más cortos, ya que en el proceso de optimización se observó la presencia de multibandas de distinto tamaño e intensidad, con el fin de eliminar esa interferencia se redujo los tiempos de duración y aumento el número de ciclos mantener la banda de 375 correspondiente al subgénero *Viannia*. Como resultado de estas modificaciones se llegó a obtener el producto esperado y se redujo el multibandeo a una sola banda inespecífica de 550 pb presente tan en muestras de sangre lo sugiera su origen humano. En la evaluación de la sensibilidad analítica se obtuvo un límite de detección de 10 p/mL en muestras sanguíneas.

Las condiciones halladas para ambos marcadores genéticos permitieron realizar una reacción Multiplex tal como lo realizó Orué el 2005 y el 2008.

Se obtuvo una sensibilidad analítica de hasta 10 p/mL, en las que se observan las bandas correspondientes a los productos de 900 pb que define el género y 375 pb que define el subgénero. La presencia de multibandas de menor intensidad y diferente tamaño al de los productos persistió a pesar de las condiciones de alta rigurosidad, pero no constituían una causa de dificultad en la detección.

La presencia de 2 bandas intensas de 550 y 650 pb en el PCR multiplex a partir de muestras de sangre inoculadas con parásitos y presentes en el control negativo donde se tiene ADN de personas sin la enfermedad, puede ser que estos productos son derivados de ADN no relacionado con secuencias del ADN de *Leishmania* y posiblemente derive de ADN humano. Como ocurrió en el trabajo de Rodriguez *et al.* 2002 al evaluar a un marcador kinetoplastidial (Rodriguez *et al.*, 2002). Por lo que resulta necesario realizar estudios complementarios para definir su origen y definir a que secuencia del ADN humano corresponde en caso de que su presencia sea confirmada. Su presencia serviría como control de interno de extracción e inhibición de la PCR en muestras de sangre.

Al evaluar la especificidad analítica de esta PCR multiplex con cultivos de *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* se observó su capacidad de distinción entre estas cepas pertenecientes a diferentes subgéneros.

Muchos estudios se realizaron para la identificación de *Leishmania* desde que se desarrollaron los métodos moleculares, en los cuales se pusieron a prueba métodos de extracción convencionales y comerciales para obtener material genético apto para amplificación por PCR, marcadores genéticos con distintos sitios blancos y en la PCR se hicieron variaciones de las condiciones de reacción como también en las concentraciones del MIX.

El método de extracción mediante kit comercial Wizard Genomic de la línea Promega que fue usado en este estudio a pesar de permitir obtener ADN de *Leishmania* apto para la amplificación, está sujeto a varios cuestionamientos sobre la concentración y pureza

que deben ser respondidos en posteriores estudios para aseverar su utilidad. Se pudo evidenciar que existe una variación en la sensibilidad analítica de los marcadores moleculares como los kinetoplastidiales 13 A y 13 B que dieron un límite de detección bajo a diferencia de lo descrito por otros autores, siendo los marcadores de la α -tubulina los que dieron una mayor sensibilidad analítica a pesar de requerir material genético integro para poder generar un producto de 900 pb a diferencia de los kinetoplastidiales que generan productos de 120 pb y que son usados en diagnóstico. Todos estos esfuerzos contribuyen de amplia manera en hallar un método de diagnóstico molecular que permita identificar al parásito de manera fiable.

10. CONCLUSIONES

- 1) Se logró optimizar método de extracción basado en el kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification de línea Promega realizando las modificaciones al protocolo original, que permitieron recuperar el material genético de *Leishmania braziliensis* a partir de muestras sanguíneas inoculadas experimentalmente y amplificado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa de 200 ug/mL de concentración de ADN de *Leishmania* y humano
- 2) Se optimizó las condiciones de amplificación de la PCR para los marcadores genéticos 13A, 13B, R 221, R 332, TUB1, TUB 6 , A y A10, al obtener productos de los tamaños esperados
- 3) Se determinó que los marcadores kinetoplastidiales (13A - 13 B) y ribosomales (R221 – R332) presentan menor sensibilidad analítica en muestras de sangre infectadas *in vitro*, a diferencia de los marcadores nucleares de la beta tubulina TUB1 – TUB 6 que presentaron una sensibilidad mayor de hasta 1 parásito por ml para la detección del género *Leishmania*.

- 4) Se pudo determinar que los marcadores dirigidos a la β -Tubulina (TUB 1-TUB6) presentan mayor sensibilidad para la detección del genero *Leishmania* con relación a los otros marcadores evaluados.

11. COSTO Y FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue financiado con cargo a presupuesto del proyecto “Enfermedades infecciosas ASDI-SAREC” de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas – UMSA y del Centro de Investigación Genética (CINGEN) del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP).

12. RECOMENDACIONES

La evaluación de la sensibilidad analítica constituye un paso importante en el proceso de validación de un método, por lo que recomienda continuar con la evaluación de las fases restantes para el marcador de la β -Tubulina en muestras de sangre que constituye un aporte a las ventajas que ofrece este marcador en el diagnóstico.

Para este caso se sugiere realizar un Test diagnóstico que permita determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, así como también conocer los valores predictivos positivos y negativos que se esperarían al usar los marcadores TUB 1 y TUB6 dirigidos contra el gen de la β -tubulina en el diagnóstico de la leishmaniosis

13. BIBLIOGRAFIA

1. Altamirano J. Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del Antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentaria de forma mucosa. [Doutorado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 2000. Disponible en:http://portaldesicict.fiocruz.br/transf.php?script=thes_chap&id=00010801&lng=pt&nrm=iso
2. Alvar J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology review*. 2008. 21 (2): 334-59
3. Alvarez, F, Robello C, Vignali M. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.* 1994; 11: 790-802.
4. Aramayo J. L., Batista R. Atlas de salud OPS/OMS Bolivia. 2005; 91.
5. Ashford R.W. Leishmaniasis reservorios and their significance in control. *Clin dermatol.* 1996; 14: 523-32.
6. Atias A. Parasitología clínica. 3 ed. edición. Santiago de Chile: Mediterraneo; 1991. p. 248-254.
7. Attilio de Carli G. Parásitología Clínica. Sao Paulo: Atheneu. 2007; 343-350.
8. Ballagi-pordany A, Belak S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes.* 1996; 10: 159–164
9. Balcazar J. Historia de la Medicina en Bolivia. La Paz: Ediciones Juventud; 1956.
10. Barker, D.C. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today.* 1987; 3: 177-184.
11. Bastrenta B. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) lainsoni* in sub andean región of Bolivia. *Acta trópic.* 2002; 83: 249-53
12. Byre M, Fraulino D, Di Lorenzo J, Shakarian A. Cloning, sequencing and evaluation of the B tubulin Gene from *Leishmania donovani* as a reference Gene for RT-qPCR. *The Journal of young investigators.* 2011 (219): 3

13. Belli A, Garcia D, palacios X, Rodriguez B, Valle S, Videa E, Tinoco E, Marin F, Harris E. 1999. Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) Chagasi* in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(3), 380-385.
14. Beltran M. La Biología Molecular de *Leishmania spp.* Como punto de partida para nuevas alternativas de tratamiento. *Investigaciones andinas.* 2008; 10(16): 108.
15. Benne R , De Vries BF, Van denBJ, Klaver B. The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11: 6925-6941.
16. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur L, Jaffe Ch. Comparasion de PCR Assays for Diagnosis Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology.* 2006; 44(4): 1435-39.
17. Bermudez H, Garcia AL, Troncoso F. Leishmaniasis in the lowlands of Bolivia. Entomological studies on sandflies of the "Valle del Sacta". Tropical Carrasco of the Department of Cochabamba. *Inst Pasteur.* 1993; 83(4): 455-63.
18. Burkardt W. Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38(2): 87-91.
19. Cannova D. Técnicas de caracterización de *Leishmania spp* y su aporte en la Leishmaniasis. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.* 2007; 11(1): 62-65.
20. Castillo T, Shaw J, Floeter-Winter L. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41(2): 540–546.
21. Cox, F. History of human parasitology. *Clinical microbiology review.* 2002;15(4): 595-612.
22. Comeau S, Miller S, Wirth D. Chromosome location of four genes in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986; 21:161-169

23. Croan T, Morrison A, Ellis T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997; 89: 149–159.
24. Crum N. History of U.S. military contributions to the study of parasitic diseases. *Military medicine*. 2005; 170(4): 17-29.
25. Cuba C. Diagnóstico parasitológico de la Leishmaniasis tegumentaria americana. *Rev. Med. Exp*. 2000; 1(4): 39 – 51.
26. Da Silva E, Ferreira C, Da Silva R, Pecanha R. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research*. 2004 (acceso 13 noviembre 2011) Disponible en : http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2004/vol2-3/gmr0082_full_text.htm
27. Davies C, Reithinger R, Campell- Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N, The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saude publica*, Rio de Janeiro. 2000; 16(4): 925 -950.
28. Dawson – Saunders B. *Biostatística médica*. Mexico: Manual Moderno. 1997: 275-294.
29. De Brujin E, Barrer C. Diagnosis of the New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 1992; 52: 145-158.
30. Dedet, P. *Leishmania et Leishmanioses du continent américain*. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1993; 4: 3-25.
31. Disch J, Maciel F. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans Royal Soc Trop Med and Hyg*. 2003; 97: 391-395.
32. Englund T. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem*. 1993; 62: 121-138.

33. Fagundes A, Marzochi M. First encounter of subclinical human *Leishmania* (*Viannia*) infection in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. (Rio de Janeiro). 2007; 102(8): 1003-1005.
34. FIOCRUZ. Leishmaniasis epidemiology network south america Manual molecular de procedimientos. Instituto Oswaldo Cruz. 2009.
35. Folgueira C, Garcia D. Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II. (Tesis doctoral) Madrid: Universidad Autónoma de Madrid. 2006.
36. Flores M, Postigo J, Mita N, Cruz Israel, Alvar J, Bastrenta B. Leishmaniasis visceral subclinica en 123 individuos de un cantón de la provincia Caranavi – La Paz. Arch Pediatric. 2004; 75 (4): 338-344.
37. Garcia D. Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. (Tesis doctoral) Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2004.
38. Garcia D. Leishmaniasis cutánea Actas. Dermo.sifili.ogr. 2005; 96(1): 1-24
39. Garnham P. The genus Leishmania. Bull. Org. mond. Santé. 1971; 44: 477-489.
40. Gordis L. Epidemiologia . Baltimore: Elseiver. 2005; 71-95.
41. Grimaldi G. Leishmaniasis of the new World: Current concepts and implications for future research. Clinical microbiology review. 1993; 6(3): 230-50
42. Grisard C. Characterization of Leishmania sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. Acta Tropica. 2000; 74, 89–93.
43. Guevara E. Presence of Leishmania braziliensis in Blood Samples from Cured Patients or at Different Stages of Immunotherapy. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1994; 1(4): 385-389
44. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998; 36:1898-1995.

45. Hervas J. Desarrollo histórico y nuevos paradigmas en la leishmaniasis canina. *Anales real academia de ciencias veterinarias de Andalucía oriental*. 2006;19(1), 13-21.
46. Ivens C, Lewis M, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan M, Smith F. A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res*. 1998; 8: 135-145.
47. Jackson A. Comparative genomics and concerted evolution of β - tubulin paralog in *Leishmania spp*. *BMC genomics*. 2006; 7:137
48. Jorquera A, González R, Marchan-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia spp*. captured in an endemic region for cutaneous Leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Memo Inst.Oswaldo Cruz*. 2005; 100:43-46.
49. Katakura K, Kawazu S, Sanjyoba C, Naya T, Matsumoto Y, Ito M, Nagakura K, Aikawa M, Hashiguchi Y. *Leishmania* Mini-exon Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis in China and Ecuador. *TokaiJ Exp Clin Med* 1999;23(6): 393-99.
50. Kato H. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a PCR. *J. Trop. Med*. 2005; 72(1):87-93.
51. Lachaud L, Marchergui – Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet J, Bastien P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(1): 210–215.
52. Lemon S, Barbour A. A glossary of terms commonly used in Molecular Biology. 1993. (Acceso en 12 de junio 2012) Disponible en : <http://www.med.unc.edu/wrkunits/3ctrpgm/pmbb/mbt/GLOS.htm>

53. Lyons R. A quick and dirty reference to term used in molecular Biology.1998. (Acceso en 12 de junio 2012) Disponible en : <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/educ/dnapr/mbglossary/mbgloss.html>
54. Luis L, Ramirez A, Ramirez R, Vélez I, Mendoza- Leon A . Nuclear DNA sequence specific to *Leishmania (Viannia)* subgenus: a molecular marker for species identification. *Parasitology*. 2001; 122: 405-14.
55. Luis L, Ramirez A, Aguilar C, Eresh S, Barker C, Mendoza – Leon A. The genomic fingerprinting of the coding region of the – tubulina gene in *Leishmania* identification. *Acta Tropica*. 1998; 69: 193-204.
56. Marcussi M. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using PCR. J. homepage. 2008; 1-6.
57. Martinez E, Le Pont F, Torrez M, Telleria J, Vargas F, Muñoz M, De Donker S, Durjardin JC, Durjardin JP. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta tropica*. .1998; 71: 97-106.
58. Martinez E, Le Pont F, Torrez M, Telleria J, Vargas F, Durjardin JC, Durjardin JP. *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (lePont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean leishmaniasis focus of Bolivia. 1999; 61(5): 846-49.
59. Martinez E, Torrez M. Visceral leishmania in Bolivia: an underestimated disease. *International Congress for Tropical Medicine and Malaria*. 2000: Abstract 2: 38.
60. Martins L, Altmirano A, Gumaraes G. The detection of *Leishmanibraziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. *Saude Publica* . 2010; 44(3)
61. Medeiros A. Rodrigues S, Roselino A. Comparison of the specificity of PCR and the histopathology detection of *Leishmania* for diagnosis of american cutaneous

- leishmaniasis. Brazilian journal of medical and biological research. 2002; 35: 421-24.
62. Mendoza – Leon A, Luis I, Martinez C. The B tubulin gene region as a Molecular Marker to distinguish *Leishmania* parasites. Methods in Mol Biol. 2002; 179: 61-83
63. Michalsky E, Fortes- Dias C, Pimenta P, Segundino N, Dias E. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. In experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: phlebotominae). Inst. Med .Trop S. Paulo. 2002; 44 (5): 255-259.
64. Ministerio de Salud de Bolivia. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de las leishmaniasis. Serie de documentos Técnico-Normativos. 2008; 82.
65. Minaya G. Evaluación de la intradermorreacción con antígenos de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (Viannia) braziliensis* en áreas endémicas de Leishmaniasis en el Perú. Rev. Med. Exp. 1999; 5 -14.
66. Moaddeb A, Behzad- Behbahani A. A simple and rapid DNA purification method for *Leishmania* DNA in peripheral Blood of patients with visceral leishmaniasis. Shiraz E-Medical Journal. 2008; 9 (2): 75- 81
67. Mollinedo S. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Leishmaniasis. 2002.
68. Mollinedo S. torrez M, Holguin E, Vargas F. Revista médica – Organo oficial del Colegio Médico de La Paz. 2000; 7(1), 23-34.
69. Montalvo A. Tipificación de especies de *Leishmania* de importancia médica basadas en el gen que codifica para la proteína HSP 70 citoplasmática. (Tesis doctoral). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. La Habana. 2011.

70. Morales Hernandez M. Epidemiología molecular de la confección por “Leishmania”-VIH. (Tesis doctoral) Madrid: Universidad Complutense. 2002
71. Oliveira J, Novais F, Oliveira De C, Da Cruz A, Campos L, Da Rocha A, Boaventura V, Noronha A, Costa J, Barral A. Polymerase Chain Reaction (PCR) is highly sensitive for Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2005; 94: 55 – 59.
72. Onuma H, Matsui C, Inou K, Nonaka S, Hashiguchi Y, Morohashi M. A case of mucosal Leishmaniasis: beneficial isage of Polymerase chain reaction for Diagnosis. *Int.J. Dermatol*. 2001; 40 : 765-767
73. OMS. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis.Neglected Tropical Diseases. 2007. 1-25.
74. OPS. Atlas de Salud 2005 Bolivia. 2007; 90-91.
75. OPS Epidemiologia y Control de la Leishmaniasis en las Americas, por Pais o Territorio. 2006. 1-63.
76. Ordeñana R, Optimizacion de la técnica del ADN Polimorfico Amplificado al azar (RAPD) para la identificación de especies de Leishmania. (Tesis doctoral). Instituto de Medicina tropical “Pedro Kouri”.2005.
77. Orué A, Hidalgo M, De Abreu N, Luis L, García H, Rodriguez N. Marcadores moleculares en *Kinetoplastida*: secuenciación diagnóstica de DNA nuclear de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* y el desarrollo de un ensayo múltiple de PCR (Multiplex PCR) en la identificación del parásito. *Memorias del Instituto Biología Experimental*. 2005; 4, 121-124.
78. Orué A, Hidalgo L, De Abreu N, Luis L, García H, Rodríguez N. Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* especifica del subgénero *Leishmania*. *Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2008; (28), 6-13

79. Passos V, Fernandes O, Lacerda P, Volpini C, Gontijo C, Degraive W, Romanha A. *Leishmania (viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*. 1999; 72 : 251-258.
80. Paiva B, Passos L, Falqueto A, Malafronte R, Andrade H. Single Step Polymerase chain reaction (PCR) for the Diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2004; 46 (6): 335- 338.
81. Pineda J, Macias J, Garcia J. Leishmaniasis e infección por el VIH. Disponible en: saei.org/hemero/libros/c25.pdf. consultado en 25 de abril 2011.
82. Piñero J, Martinez E, Pacheco R, Aragon Z, De Armas F, Del Castillo A, Valadares B. PCR – Elisa for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. 1999; 73: 21-29.
83. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real – time PCR. *Microbes and Infection*. 2007; 9: 1307-1315.
84. Programa FAST PCR (acceso 10 de junio 2011) Disponible en: www.primerdigital.com/fastpcr.html.
85. Ramírez JL, and Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (vianna) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 1997, 92(3) 333-338
86. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso S, Carapacca S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node aspirates and Blood. *Journal of clinical Microbiology*. 1999; 37(9): 2931-2935.
87. Rey L. *Parasitología*. Tercera edición. Guanabara- Koogan. 2004.

88. Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Huma Comp*. 1990; 65: 111-125.
89. Rodríguez N, De Lima H, Rodríguez A, Brewster & Baker DC. Genomic DNA repeats from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellite. *Parásitol*. 1997; 115: 349-358.
90. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom B, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of clinical microbiology*. 1994; 32(9): 2246-52.
91. Rodgers M, Popper S, Wirth D. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*; 1990;71: 267-275.
92. Rogers W, Wirth D. Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem Parasitol*. 1998; 30: 1-8.
93. Ruiz A, Morillo L. *Epidemiología clínica*. Bogotá: Ed. Panamericana. 2004; 111-128.
94. Ruiz D. Control de la expresión génica de las histonas de *Leishmania* asociado al ciclo celular. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 2008
95. Ruiz R. Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test *Epidemiología clínica*. Bogotá. 2009. (acceso 10 de julio 2011). Disponible en: http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1736/30/00300032_LR.pdf
96. Sanchez – Saldaña L, Saenz E. Leishmaniasis. *Dermatología peruana*. , 2004; 14(2): 82- 98.

97. Scholler J, Reed S, Stuart K. Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. Biochem Parasitol.* 1986 ; 36: 161
98. Szargiki R, Alcantara de Castro E, Luz E, Kowalthuk W, Machado M, Thomaz – Soccol V. Comparison of serological and Parasitological for cutaneous Leishmaniasis diagnosis in the State of Paraná, Brazil. *The Brazilian Journal of Infections Diseases.* 2009; 13(1): 47-52.
99. Saumitra D. Samit Adhya. Organization and chromosomal localization of β -tubulin genes in *Leishmania donovani*. *J. Biosci.* 1990; 15(4): 239-248
100. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription replication and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987 ; 41:363-82.
101. Sullivan J. *A color atlas of Parasitology* . University of San Francisco. 2007 p.15
102. Thomaz-Soccol. Tubulin expression in trypanosomes. *Biology of the Cell.* 1993; 64: 137-143.
103. Thomaz –Soccol V, Lanotte G, Rioux J, Pratlong F, Martini- Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania Ross*. *Ann. Parasitolo. Hum. Comp.* 1993; 68:107-8.
104. Topolanski R. *El arte y la Medicina*. Montevideo: Arena.2008 (acceso en 10 enero 2012). Disponible en:
<http://www.smu.org.uy/publicaciones/libros/textocompleto/arte-y-medicina/arte-y-medicina8.pdf>
105. Torres R. Leishmaniasis, la enfermedad de las mil caras. *Kasmera.* 1999; 27(9):103 -14.

106. Torri A, Carpenter L, Englund P. Kinetoplast DNA replication in eukaryotic cells. *Spring Harbor Laboratory* .1996; 31:1029- 1042
107. Urbano J. Identificación fenotípica y genotípica de 74 nuevos aislados de tripanosomátidos de seis países de Latinoamérica y España. Tesis doctoral. Editor: editorial de la universidad de Granada. 2009.
108. Uezato H, Hagiwara K, Hosokawa A, Maruno M, Nonaka S, Oshiro M, Nakashima Y, Furaya M, Hashiguchi Y. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, Ethanol- fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and Southern Blotting. *J. Dermatol.* 1998; 25: 623 – 631.
109. Van der Ploeg, Cornelissen W, Barry D, and BorstP. Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.* 1984; 3: 3109- 115.
110. Venazzi E, Roberto A. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2007; 399-402.
111. Vergel C, Walker J, Saravia N. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and Post- Genome considerations in the detection of parasites by a Polymerase chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72(4) : 423-429.
112. Vickerman V, Preston P. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.* 1970; 6: 365-383.
113. World Health Organization. Control of the leishmaniasis, technical report series 397. Geneva. World Health Organization. 1990.
114. World Health Organization. Control of the Leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva: 2010; 22– 26.

115. Zerpa O. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermatología venezolana*. 2002; 40(4): 106-110.
116. Zerpa O, Convit J. Leishmaniasis cutánea difusa en Venezuela. *Gazeta médica da Bhaia*. 2009; 79(3): 30- 34
117. Zemanova E, Jirku M, Mauricio IL, Miles MA., Lukes J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70: 613-7.
118. Zurita A. Búsqueda de proteínas antigénicas de *Leishmania braziliensis*. Aislamiento, caracterización génica y utilidad serodiagnóstica de la proteína de choque térmico. 2001.