

APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE UN FOCO
ENDÉMICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN EL CORREGIMIENTO DE
PUERTO VALDIVIA, MUNICIPIO DE VALDIVIA (ANTIOQUIA)

LAURA CRISTINA POSADA LÓPEZ

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGA

ASESORES:

HORACIO CADENA, MSC

DANIEL AGUDELO, MSC

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MEDELLÍN 2013

Tabla de contenido

1	RESUMEN.....	6
2	MARCO TEÓRICO	8
2.1	Leishmaniasis.....	8
2.2	Vectores de la Leishmaniasis	9
2.3	Parásito	10
2.4	Reservorios	11
2.5	Ciclos de transmisión.....	13
	Ciclo selvático	13
	Ciclo rural.....	13
	Ciclo urbano	13
2.6	Leishmaniasis en Colombia	14
2.7	Formas clínicas de la leishmaniasis.....	17
2.7.1	Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA).....	17
2.7.2	Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).....	17
2.7.3	Leishmaniasis mucosa (LM)	17
2.7.4	Leishmaniasis visceral (LV)	17
2.8	Diagnóstico.....	18
2.8.1	Pruebas parasitológicas	18
2.8.2	Métodos inmunológicos.....	19
2.8.3	Diagnóstico molecular.....	20
3	PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	23
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	METODOLOGÍA	26
5.1	Área de estudio	26
5.2	Toma de muestras.....	27
5.2.1	Pacientes	27
5.2.2	Mamíferos silvestres y domésticos.....	27
5.2.3	Muestreo entomológico	28
5.3	Extracción de ADN	28
5.3.1	Pacientes	28

5.3.2	Mamíferos silvestres y domésticos.....	29
5.4	Aplicación de técnicas moleculares	29
5.4.1	Estandarización de LSSP-PCR.....	30
5.4.2	Estandarización de una PCR convencional para la amplificación diferencial de la región variable del minicírculo	30
5.4.3	Aplicación de PCR convencional para el diagnóstico de <i>Leishmania</i>	31
5.4.4	PCR-RFLP para la identificación de especies de <i>Leishmania</i>	32
5.5	Pruebas serológicas y parasitológicas	33
5.5.1	Pacientes	33
5.5.2	Mamíferos silvestres y domésticos.....	33
6	RESULTADOS	34
6.1	Estandarización de una LSSP-PCR para la identificación de especies de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>).....	34
6.2	Estandarización de PCR convencional con Jw13-Jw14 para la identificación de especies de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>).....	35
6.3	Aplicación de técnicas moleculares a las muestras clínicas.....	38
6.3.1	Detección de ADN de <i>Leishmania</i> por PCR convencional en pacientes	38
6.3.2	Identificación de especies por PCR convencional	38
6.3.3	Identificación de especie en cultivos aislados de pacientes de la zona de estudio	39
6.3.4	Diagnóstico e identificación de especies de <i>Leishmania</i> por PCR-RFLP	39
6.4	Diagnóstico parasitológico en pacientes	40
6.5	Detección de ADN de <i>Leishmania</i> en muestras de mamíferos	40
6.6	Flebotómíneos en el área de estudio	41
6.7	Pruebas parasitológicas y serológicas	42
7	DISCUSIÓN.....	43
8	AGRADECIMIENTOS.....	49
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
10	ANEXOS.....	57

Lista de figuras

Figura 1: Mapa de prevalencia de casos de LC en Colombia (2008).....	15
Figura 2: Número de casos de LCA reportados desde 1985 hasta 2011, para cada municipio de la subregión Norte de Antioquia.....	16
Figura 3: Casos reportados desde el año 1985 hasta el 2011, en el municipio de Valdivia.	16

Lista de fotografías

Foto 1: <i>Lutzomyia</i> spp. vector de <i>Leishmania</i>	9
Foto 2: (a) Promastigotes de <i>Leishmania</i> (b) Macrófago humano infectados con amastigotes de <i>Leishmania</i>	10
Foto 3. Manifestaciones clínicas de Leishmaniasis en Colombia.....	18
Foto 4: Corregimiento de Puerto Valdivia.....	26
Foto 5: Perfiles electroforéticos por LSSP-PCR usando los primers Jw11 y Jw12.....	34
Foto 6: Perfiles electroforéticos por LSSP-PCR usando el primer JW12 a diferentes concentraciones.....	35
Foto 7: Amplificación diferencial del ADN del minicírculo en diferentes especies de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>).....	36
Foto 8: Amplificación diferencial del ADN del minicírculo en diferentes especies de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>), en un gradiente de temperatura.....	36
Foto 9: Sensibilidad de la PCR convencional con Jw13-Jw14 en diluciones de <i>L. (V.) panamensis</i> (UA140).....	37
Foto 10: Amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo del kADN, en muestras clínicas.....	38
Foto 11: Amplificación diferencial de la región variable del minicírculo del kADN, en muestras clínicas.....	38
Foto 12: Amplificación diferencial de la región variable del minicírculo del kADN, en muestras de cultivo.....	39
Foto 13: PCR-RFLP con el gen <i>Hsp70</i> en muestras de pacientes.....	39
Foto 14: Amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo del kADN,	

en muestras de mamíferos silvestres.....43
Foto 15: Amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo del kADN,
en muestras de flebotomíneos.....43

Lista de tablas

Tabla 1: Vectores y reservorios de *Leishmania* en Colombia, 2009.....12
Tabla 2: Resultado de pruebas parasitológicas y moleculares en pacientes, Puerto
Valdivia.....40
Tabla 3: Número de especímenes capturados, por método y sitio de captura, en el
corregimiento de Puerto Valdivia.....44

1 RESUMEN

Introducción La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por tripanosomátidos del género *Leishmania*, transmitidos a través de la picadura insectos flebotomíneos. En Colombia se presentan las tres formas clínicas, siendo la más común la leishmaniasis cutánea (LC). Antioquia es uno de los departamentos que aporta el mayor número de casos en el país. Debido a que no existen síntomas únicos para este grupo de enfermedades es necesario el diagnóstico de laboratorio. Los métodos parasitológicos rutinarios tienen muchas limitaciones, además no permiten la identificación de especie; esto ha llevado al desarrollo de métodos moleculares basados principalmente en la detección de ADN del parásito por PCR para el diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania*. Para este fin se ha propuesto trabajar con múltiples moldes, siendo los minicírculos del kinetoplasto uno de los más prometedores debido al alto número de copias. El avance en estos métodos moleculares permitiría tener un diagnóstico e identificación de especie en menor tiempo; además sería de gran ayuda en estudios epidemiológicos, ya que se podría correlacionar la cepa encontrada en pacientes, vectores y posibles reservorios en focos endémicos.

Objetivo Aplicar algunas técnicas moleculares en el estudio de un foco endémico de leishmaniasis cutánea en el corregimiento de Puerto Valdivia, municipio de Valdivia (Antioquia).

Metodología Se tomaron muestras a pacientes con lesiones compatibles con LC, mamíferos silvestres y perros, se detectó la presencia de ADN de *Leishmania* en estas muestras por medio de una PCR convencional. Con el fin de identificar la especie de *Leishmania* se realizó una PCR-RFLP. Se realizó un muestreo entomológico y se identificaron flebotomíneos de importancia médica. Se utilizó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para detectar la reactividad inmunológica a la infección con *Leishmania* en los caninos.

Resultados En todas las muestras de pacientes se detectó ADN del parásito y en algunas muestras se pudo identificar *L. (V.) panamensis* como la especie causante

de la infección. Se capturaron mamíferos silvestres identificados como *Didelphis marsupialis* y *Proechimys semispinosus* siendo este último positivo para *Leishmania* por PCR. El análisis serológico en perros arrojó dos resultados positivos con títulos de 1:32 y 1:64; la PCR evidencio la presencia de ADN del parásito en una de las muestras. El muestreo entomológicos permitió la identificación de seis especies de importancia médica como *Lutzomyia trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. yuilli*, *Lu. panamensis*, *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. hartmanni*.

Conclusiones La amplificación de fragmentos de kADN de parásitos del género *Leishmania* demostró su gran utilidad como blanco molecular y mayor sensibilidad comparado con otros fragmentos obtenidos de otros genes como *Hsp70*. En el futuro el desarrollo de técnicas moleculares más específicas y sensibles permitirán una mejor correlación entre la cepa encontrada en pacientes, vectores y posibles reservorios en focos endémicos de la leishmaniasis.

Palabras clave: *Leishmania*, *Lutzomyia*, diagnóstico molecular, kinetoplasto.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 *Leishmaniasis*

Generalidades de la leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania*, transmitidos a través de la picadura insectos flebotomíneos.

Actualmente un total de 98 países reportan transmisión endémica de leishmaniasis y de acuerdo a la OMS se estima una prevalencia de 12 millones de casos en el mundo con una mortalidad de 60.000 casos anuales y un total de 2 millones de nuevos casos al año, aunque solo se reporta un número reducido de estos; asimismo se ha determinado que existen cerca de 350 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (WHO, 2010).

Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo de vida del parásito inicia con la picadura de un insecto flebotomíneo hembra infectado a un hospedero mamífero para alimentarse de sangre; cuando el insecto pica, regurgita saliva e inocular promastigotes en la dermis, estos alcanzan rápidamente las células dendríticas o los macrófagos, donde encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo y se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria al interior de las vacuolas fagocíticas (WHO, 2010), Cuando un flebotomíneo hembra ingiere sangre de un mamífero infectado, los amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino medio del vector, posteriormente migran hacia la válvula estomodeal, donde pueden ser inoculados durante otra picadura a un nuevo vertebrado sano. El tiempo aproximado que necesita el parásito para completar su desarrollo en el vector y ser infectante, es de aproximadamente 6-9 días dependiendo de la especie de *Leishmania* (Kamhawi, 2006).

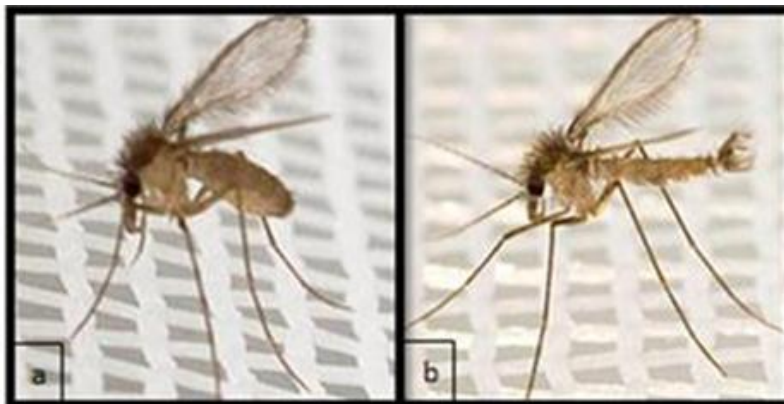
2.2 Vectores de la Leishmaniasis

Las leishmanias son transmitidas por insectos dípteros, nematóceros pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae, por lo cual se les conoce como flebotomíneos. De los seis géneros descritos sólo dos son de importancia médica, *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, dividido en 12 subgéneros, y *Lutzomyia* (Lu.) en el Nuevo Mundo (Foto 1) dividido en 25 subgéneros (Bañuls *et al.*, 2007). Son varias las razones por las cuales no todas las especies de esta subfamilia desempeñan un papel como vectores de esta enfermedad, entre estas porque es posible que sus preferencias alimentarias no incluyan un huésped reservorio, o pueden ser incapaces de permitir el desarrollo de la *Leishmania* (WHO, 2010).

De las 800 especies de flebotomíneos descritas (Maroli *et al.*, 2012), al menos 60 se consideran de importancia médica ya que 31 son vectores probados de especies patogénicas de *Leishmania* y 43 se han determinado como vectores probables (Bañuls *et al.*, 2007), otras especies de flebotomíneos se han incriminado como vectores de otros agentes patógenos como *Bartonella bacilliformis* y algunos arbovirus que causan estomatitis vesicular (Lane, 1993).

En Colombia se han identificado como vectores de *Leishmania* las especies *Lu. panamensis*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. trapidoi*, *Lu. yuilli*, *Lu. longiflocosa*, *Lu. spinicrassa* (Bejarano, 2006), *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi*, *Lu. umbratilis*, *Lu. hartmanni*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. gomezi*, *Lu. antunesi* y *Lu. ovallesi* (Ferro *et al.*, 2011).

Foto 1: *Lutzomyia* spp. vector de *Leishmania* (a) hembra, (b) Macho. Foto: PECET



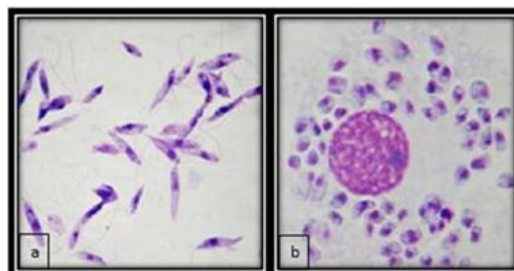
2.3 Parásito

Los tripanosomátidos del género *Leishmania* Ross, 1903 comprenden alrededor de 21 especies que han sido identificadas como patogénicas para humanos (Singh, 2006), se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* de acuerdo a la ubicación del parásito en el intestino del vector (Laison y Shaw, 1987), a la distribución geográfica y al tipo de presentaciones clínicas que produce la infección por una especie de parásitos en particular (Bañuls *et al.*, 2007).

El desarrollo de las especies del subgénero *Leishmania* se limita a las partes anteriores del píloro en el tracto digestivo de los vectores naturales, en la unión del intestino medio y el intestino posterior (desarrollo suprapilórico), mientras que las especies del subgénero *Viannia* se desarrollan en el intestino grueso (desarrollo peripilórico) (Kamhawi, 2006).

Las *Leishmanias* durante su ciclo de vida tienen dos estadios. En el aparato digestivo del vector se desarrolla la forma flagelada o promastigote, que mide entre 20-30 μm , es extracelular, alargada y posee un flagelo que le permite movilidad; tiene un núcleo oval en la región central del parásito y un kinetoplasto subterminal en la parte anterior, del cual se origina el flagelo de igual o mayor tamaño que el cuerpo (WHO 2010) (foto 2a). En el vertebrado se desarrolla la forma amastigote, que mide entre 2-5 μm , es redondeado y carece de flagelo, es intracelular obligada y se encuentra principalmente en los macrófagos (foto 2b) (Bard, 1989); en su citoplasma se observa un núcleo voluminoso y esférico, generalmente excéntrico, y un kinetoplasto, asociado a un rudimento de flagelo llamado rizoplasto (Albajar *et al.*, 2004; Alvar *et al.*, 2000).

Foto 2: (a) Promastigotes de *Leishmania* teñidos en Giemsa (40x). (b) Macrófago humano infectado con amastigotes de *Leishmania* coloreados con Giemsa (40x). Foto: PECET



En cuanto a la reproducción de este protozoo se acepta la multiplicación asexual por bipartición longitudinal de los promastigotes, con excepción de las formas metacíclicas que no se dividen. Los amastigotes pueden dividirse bien por bipartición o por división múltiple (Youssef *et al*, 1997; Courret *et al*, 2002).

A pesar de que *Leishmania* posee un núcleo rodeado por una membrana, la transcripción es policistrónica y no posee intrones (Campbell *et al*, 2003); estos transcritos pueden contener muchos genes no necesariamente relacionados funcionalmente, pero a diferencia de las bacterias, los transcritos policistrónicos son procesados a monocistrones mediante dos procesos, uno conocido como *transplicing* y otro que consiste en la adición de la cola de Poliadenina (polyA) en el extremo 3' (Cruz y Tosi, 1996). Otra de las características particulares de estos parásitos es la presencia de una sola mitocondria modificada, conocida como kinetoplasto; esta organela contiene dos tipos de ADN circular denominados minicírculos y maxicírculos, en estos últimos se encuentran los genes que codifican enzimas necesarias para la producción de energía, los cuales sintetizan transcritos no funcionales, pero se vuelven funcionales por un proceso conocido como edición del ARN, proceso en el cual intervienen los ARN guías (ARNg), sintetizados en los minicírculos, lo que hacen estos ARNg es dirigir la inserción o delección de uracilos en sitios específicos de los ARNs mensajeros que codifican estas enzimas mitocondriales, asistido por un complejo proteico denominado editosoma (Madison *et al*, 2002).

En la membrana celular de este parásito se han identificado varias moléculas implicadas en la capacidad invasiva del protozoo, la modificación de la longitud del flagelo (Wiese, 2007), y la capacidad patogénica (McConville y Handman, 2007).

2.4 Reservorios

En la leishmaniasis los reservorios son animales mamíferos donde el agente patógeno logra mantenerse de manera indefinida y que además contribuyen con la transmisión de la enfermedad al permitir que continúe la transmisión al vector

(WHO, 1984 y Ashford, 1996). Para que un vertebrado se pueda incriminar como un reservorio debe interactuar con la población intermediaria o vector y garantizar el mantenimiento de un tamaño poblacional adecuado de modo que se pueda mantener el agente etiológico largos periodos de tiempo (Ashford, 2003).

La incriminación de un animal como posible reservorio está relacionada con la especie del parásito que hospeda, y las manifestaciones clínicas en el foco natural de infección. En Colombia se han incriminado como reservorios de *Leishmania* en manifestaciones cutáneas, mamíferos silvestres como *Choloepus hoffmanni*, *Didelphis marsupialis*, *Proechimys canicolis* (Corredor et al, 1989); y cada vez hay más evidencia del papel de reservorio que juega en el hombre en la LCA (Vélez, 1990) en cuanto a la forma visceral tenemos como reservorios al perro *Cannis familiaris* (Vásquez, 2006; Vélez et al, 2001). En la tabla 1 se mencionan algunos reservorios probables de LC en el país.

Tabla 1: Vectores y reservorios de *Leishmania* en Colombia, 2009.

<i>Leishmania</i> spp.	Clinical form	Proven or suspected <i>Lutzomyia</i> vector	Proven or suspected animal reservoir
<i>L. braziliensis</i>	ZCL, MCL	<i>Lu. spinicrassa</i>	Dog, <i>Rattus rattus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i>
<i>L. panamensis</i>	ZCL, MCL	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. yuilli</i>	Dog, <i>Choloepus hoffmanni</i> , <i>Metachirus nudicaudatus</i> , <i>D. marsupialis</i> , <i>Coendou</i> spp.
<i>L. guyanensis</i>	ZCL, MCL	<i>Lu. umbratillis</i> , <i>Lu. longiflocossa</i>	Unknowm
<i>L. colombiensis</i>	ZCL	<i>Lu. hartmanni</i>	Unknowm
<i>L. amazonensis</i>	ZCL, DCL	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Unknowm
<i>L. mexicana</i>	ZCL		<i>D. marsupialis</i> ,
<i>L. infantum</i>	ZVL	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. evansi</i>	Dog, <i>D. marsupialis</i>

Tomado de WHO, 2010.

2.5 Ciclos de transmisión

Desde el punto de vista ecoepidemiológico se pueden diferenciar tres ciclos de transmisión: selvático, rural y urbano.

Ciclo selvático

Este tipo de transmisión se da cuando el hombre entra en contacto con el vector que se ha infectado por un reservorio de hábitat selvático (Vélez *et al*, 2001). Actualmente es la forma de transmisión que más se presenta en las fuerzas militares, en las personas que se dedican a los cultivos ilícitos en áreas selváticas y en actividades de minería y extracción de madera.

Ciclo rural

Se presenta cuando el vector ha logrado adaptarse totalmente al ambiente doméstico, y es capaz de tener su ciclo de vida completo en cercanías del domicilio (Vélez *et al*; 2001), evidencia de esto es la aparición de casos de la enfermedad en mujeres y niños. También se presenta en la leishmaniasis visceral producida por *L. infantum* y que afecta principalmente a niños menores de 5 años residentes en áreas rurales.

Ciclo urbano

En este caso el vector ha logrado adaptarse a ambientes urbanos como consecuencia de los procesos de deforestación y el calentamiento global (Vélez *et al*; 2001). En Colombia este proceso es más reciente pero ya se ha demostrado transmisión tanto de LC como de LV en ciudades como Sincelejo, Montería, Bucaramanga, y Cartagena (Vélez *et al*; 2001). En Medellín y Envigado se demostró la presencia de especies vectoras aunque aún no se han descrito casos autóctonos (Agudelo *et al*; 2002).

2.6 Leishmaniasis en Colombia

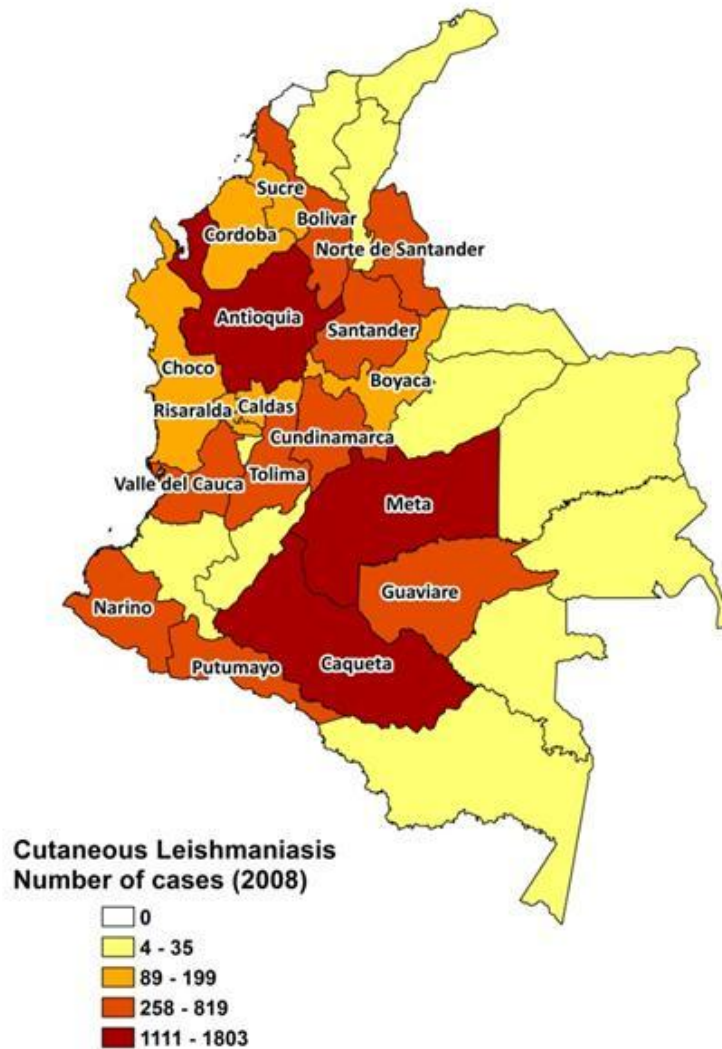
En Colombia la leishmaniasis es endémica en casi todo el territorio con excepción de San Andrés, Atlántico y Bogotá, DC; se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad: cutánea, mucocutánea y visceral. Los focos naturales de infección están localizados en una gran diversidad de regiones naturales que incluyen tanto zonas selváticas como rurales; esto se debe a la gran diversidad de especies vectoras, ya que hasta el momento se han incriminado 14 especies dentro del género *Lutzomyia*; también se ha demostrado la presencia de 6 especies de *Leishmania* a saber: *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. infantum* (Ovalle *et al*, 2006).

El número de casos de leishmaniasis en nuestro país ha aumentado en gran medida para el año 2010 según el SIVIGILA se reportaron 15.000 casos, y se acepta un gran subregistro y se estima que la población en riesgo es de cerca de 20 millones, en alturas comprendidas entre los 0 y los 1.800 msnm.

Es importante mencionar que Colombia es uno de los 3 países con mayor número de especies de *Leishmania* que afectan al humano. Cerca del 98,4 % de los casos son leishmaniasis cutánea, el 1 %, leishmaniasis visceral y el 0,6 % restante leishmaniasis mucocutánea (Alvar *et al*, 2012). Los brotes epidémicos de leishmaniasis cutánea (LC) son causados principalmente por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* y se ha reportado transmisión intra y peridomiciliaria desde 1984 (Martínez *et al*, 1995).

En la figura 1 se muestra la prevalencia de casos de LC en Colombia para el año 2008, la enfermedad predomina en gran parte del territorio nacional, especialmente en focos selváticos y en las llanuras andinas, donde el trabajar en plantaciones de café, puede ser un factor de riesgo (Alexander *et al*, 2009), los departamentos que reportan mayor incidencia de leishmaniasis cutánea son principalmente Antioquia, Caquetá, Meta, Tolima, Santander, Norte de Santander, Nariño, Cundinamarca, Boyacá, Guaviare, Caldas y Risaralda.

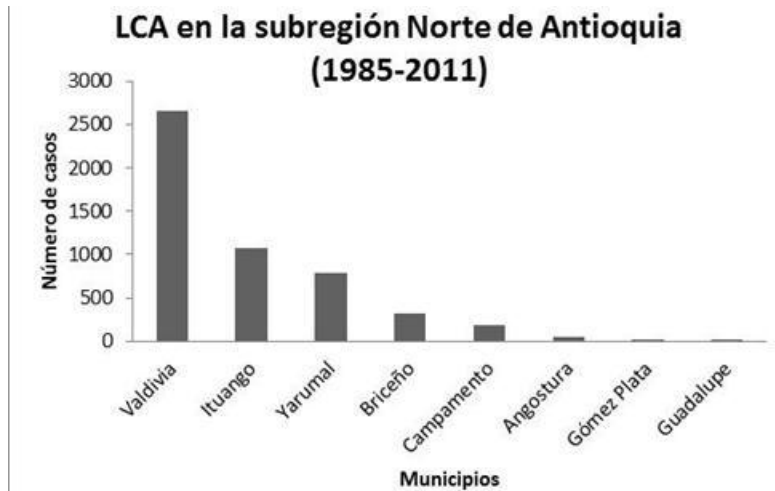
Figura 1: Mapa de prevalencia de casos de LC en Colombia (2008)



Tomado de: Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence (Alvar *et al*, 2012)

Según los reportes de la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (DSSA), Valdivia es el municipio que ha aportado el mayor número de casos de LCA en la subregión Norte de Antioquia desde 1985, (Fig. 2), y es uno de los municipios que reporta el mayor número de casos para el departamento.

Figura 2: Número de casos de LCA reportados desde 1985 hasta 2011, para cada municipio de la subregión Norte de Antioquia.



Fuente: DSSA 1985-2011.

Durante el período 1985-2011, este municipio ha mantenido una transmisión constante y se ha visto un notable incremento anual de casos de LCA (Fig.3), es por esta razón que se considera este municipio como un área hiper-endémica para leishmaniasis (DSSA, 2012).

Figura 3: Casos reportados desde el año 1985 hasta el 2011, en el municipio de Valdivia.



Fuente: DSSA 1985-2011.

2.7 Formas clínicas de la leishmaniasis

La leishmaniasis en el hombre tiene diversas manifestaciones clínicas que dependen primordialmente de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmune desencadenada por el hospedador, entre las principales tenemos:

2.7.1 Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA)

La lesión consiste en un pequeño nódulo, redondeado e indoloro. El nódulo puede aumentar de tamaño y adquirir forma de placa o como consecuencia de la necrosis en el centro de la reacción granulomatosa, convertirse en ulcera de bordes bien definidos, levantados e indurados, lo que hace que se asemeje a la imagen de un cráter (Bailey y Lockwood, 2007) (foto 3c y 3e).

2.7.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Se caracteriza por lesiones nodulares no ulceradas que se extienden a áreas tales como la cara, superficies de miembros inferiores y superiores. Esta es la forma clínica más rara y la más severa de la enfermedad; está relacionada con *L. (L) amazonensis* (Bailey y Lockwood, 2007; Silveira *et al*, 2004) (foto 3c).

2.7.3 Leishmaniasis mucosa (LM)

Causada principalmente por *L. braziliensis* y *L. panamensis*, se presenta cuando el parásito se disemina por vía linfática y sanguínea desde una lesión cutánea e invade las mucosas de la región naso-oro-faríngea (Carvalho *et al*, 2007) (foto 3b).

2.7.4 Leishmaniasis visceral (LV)

Es la forma más severa, casi siempre fatal si no es tratada; puede ser endémica o esporádica; entre los principales síntomas están fiebre irregular prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pérdida de peso, linfadenopatías y anemia. El agente etiológico es *L. infantum* (WHO, 2010) (foto 3a).

Foto 3. Manifestaciones clínicas de Leishmaniasis en Colombia. (a) Leishmaniasis visceral, (b) Lesiones de leishmaniasis mucocutánea, (c,e) Lesiones de leishmaniasis cutánea (d) Lesiones de leishmaniasis cutánea difusa. Foto: PECET.



2.8 Diagnóstico

Debido a que no existen síntomas únicos para este grupo de enfermedades es necesario el diagnóstico de laboratorio para verificar la sospecha clínica de leishmaniasis. Las herramientas diagnósticas varían dependiendo de la forma clínica de la enfermedad y se han desarrollado métodos parasitológicos, inmunológicos y moleculares.

2.8.1 Pruebas parasitológicas

Estas pruebas buscan detectar el parásito en la muestra clínica obtenida de un paciente con sospecha de leishmaniasis. Entre sus principales inconvenientes se destaca que el aislamiento es inversamente proporcional al tiempo de duración de la enfermedad, debido a que se disminuye la carga parasitaria.

Examen directo

Esta prueba pretende la demostración microscópica de amastigotes, en un extendido o aspirado de la lesión o de un órgano afectado. La sensibilidad de este

examen depende del tiempo de evolución de la lesión, la experticia de quien toma y lee la muestra y del uso de tratamientos tópicos (Ramírez *et al*, 2000).

Aislamiento del parásito en cultivo

Este método se basa en el aislamiento del parásito en cultivo, estos se pueden cultivar en medios líquidos, medios bifásicos o medios sólidos, sin embargo para el diagnóstico es más común emplear el medio bifásico conocido como NNN (Novy-MacNeal-Nicolle). El aislamiento se puede hacer a partir del aspirado de la lesión en piel o de médula ósea, macerados de hígado, bazo y ganglio linfático. La mayor ventaja de este método es que se pueden realizar estudios posteriores de identificación, genotipificación, análisis de polimorfismos, entre otros (Vélez y Agudelo, 1996).

2.8.2 Métodos inmunológicos

Estas pruebas se basan fundamentalmente en la detección de anticuerpos producidos durante la respuesta inmune contra el parásito. Es preciso mencionar que este tipo de pruebas tienen dos limitaciones importantes, los anticuerpos específicos siguen siendo detectables años después de la infección y además una proporción significativa de personas sanas que viven en zonas endémicas, sin antecedentes de leishmaniasis son positivos para anticuerpos antileishmania debido a las infecciones asintomáticas. Entre las pruebas serológicas más comúnmente empleadas están:

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La detección de anticuerpos circulante anti-*Leishmania* se realiza empleando parásitos enteros fijados sobre una placa de vidrio. Los anticuerpos están presentes muy temprano luego de la infección y son indetectables entre seis y nueve meses después de la curación. Las principales desventajas de esta técnica son, la baja especificidad y el tiempo de lectura por muestra que se debe invertir. Además se pueden presentar reacciones cruzadas (Vélez y Agudelo, 1996).

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

El resultado de esta prueba se obtiene mediante una lectura en un espectrofotómetro determinando la densidad óptica de la reacción antígeno-anticuerpo. Esta se puede llevar a cabo usando como antígeno proteínas o fracciones del parásito. Entre los antígenos empleados en la prueba de ELISA para el diagnóstico de leishmaniasis, además de los lisados totales de parásitos, está el ligando manosa-fucosa, expresado en amastigotes y promastigotes. Con este antígeno se han reportado sensibilidades del 100% y especificidad de 96%.

2.8.3 Diagnóstico molecular

Este tipo de diagnóstico se apoya principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa, más conocida como PCR (por sus siglas del inglés *polymerase chain reaction*), que consiste en la amplificación del ADN del parásito mediante el uso de diferentes secuencias de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifican. Aunque se han evaluado diferentes métodos como son la electroforesis de campo pulsado y electroforesis enzimático multilocus, la PCR es la más empleada dada su facilidad, buena sensibilidad y especificidad, además de una notable reducción en costos. Existen variaciones como la PCR en tiempo real, que la hacen mucho más sensible. El material de partida para la PCR puede ser un raspado de la lesión, un pequeño fragmento de la biopsia preservado en alcohol hasta su procesamiento, el aspirado de la lesión o también la biopsia o sangre total (Deborggraeve *et al*, 2008).

Para una mayor sensibilidad de esta técnica se ha propuesto buscar un tipo de molde que pueda tener múltiples copias, para suplir el problema de la baja carga parasitaria en algunos casos. Para resolver este inconveniente se ha sugerido trabajar con ADN del kinetoplasto (kADN), debido a que los minicírculos pueden tener de 500 a 10.000 pares de bases, concatenados entre si y un kinetoplastido puede albergar entre 5.000 y 10.000 copias por célula; además todos los minicírculos del kADN de tripanosomátidos poseen una o varias regiones altamente conservadas (RC) y una o varias regiones variables (RV) (Saravia *et al*,

2005 y Nicolas *et al*, 2002). Particularmente dentro de las especies de *Leishmania*, en la región conservada de los minicírculos, se pueden encontrar tres bloques de secuencia conservada (BSC), con una homología entre especies del 90% aproximadamente, dentro de las RCs: BSC1, BSC2 y el BSC3. El BSC1 y el BSC3 son casi idénticos en todas las especies investigadas a la fecha, mientras que el BSC2 es menos universal (Kolesnikov *et al*, 1999).

Esta organización de los minicírculos permite utilizar varias estrategias para la amplificación de kADN por PCR como método diagnóstico. Una de la estrategias es amplificar el fragmento conservado del minicírculo, utilizando los bloques de secuencia conservada como molde, con esto podría lograrse una alta sensibilidad para la detección del parásito, sin embargo, no se obtiene ninguna información acerca de la especie de *Leishmania* implicada en la infección (Nicolas *et al*, 2002).

El hecho de poseer un bloque de secuencia con cierto grado de polimorfismo (BSC2) podría ser aprovechado para la aplicación de técnicas que permitan la diferenciación de especies, este podría ser el caso de la LSSP-PCR (de las siglas en inglés Low Stringency Single Specific Primer-PCR o PCR de baja astringencia con un único primer específico), el fundamento de la técnica consiste en hacer una PCR en dos pasos, primero se amplifica el fragmento que tiene la región variable, y posteriormente se lleva a cabo una PCR usando un solo primer específico bajo condiciones de muy baja astringencia, el primer se une específicamente a una región complementaria y también en forma no específica a múltiples sitios dentro del fragmento en forma dependiente de la secuencia, produciendo múltiples productos de reacción que pueden ser resueltos por electroforesis, generando un sello genético particular, caracterizado por un único patrón de bandas (Brusés *et al*, 2004), la combinación de baja astringencia y alta concentración de primer son fundamentales para la efectiva formación de alineamientos inespecíficos del primer con el ADN molde, y sumado a una alta concentración de polimerasa, se asegura una rápida reacción de extensión antes de que ocurra la disociación del primer del ADN molde (Barreto *et al*, 1994), se plantea que si esta técnica se llevara a cabo sobre el fragmento obtenido de la amplificación de la región

conservada de los minicírculos, se podrían detectar diferencias interespecíficas debidas a la variabilidad del BSC2 (Barreto *et al*, 1994). La LSSP-PCR ha sido ampliamente utilizada para la tipificación molecular de otras especies de parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* (Mejía *et al*, 2005 y Lages *et al*, 2007).

Otra estrategia para la identificación de especies ha sido trabajar sobre la región variable de los minicírculos utilizando los BSC1 y BSC3 como molde para los primers, pero ambos orientados hacia fuera de la región conservada, de esta manera se obtiene un fragmento de entre 600pb hasta 750pb, que representa la región variable del minicírculo del kinetoplasto y que permitirían la caracterización hasta especie del parásito en las especies del subgénero *Leishmania* en función del tamaño de la banda (Nicolas *et al*, 2002 y Bailey *et al*, 1998).

Actualmente para la detección e identificación de especies de *Leishmania*, una de las técnicas más usadas es el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), esta técnica requiere, en primer lugar la amplificación de un fragmento de ADN, que tenga cierto grado de polimorfismo, posteriormente estas secuencias específicas son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN esto proporciona un patrón de bandas diferencial que puede discriminar entre especies (Dedet *et al*, 2006). En el PECET esta prueba ha sido estandarizada amplificando el gen que codifica para la proteína de choque térmico *Hsp70* de 1300 pb, posteriormente se hace una digestión enzimática con *HaeIII*, y debido al polimorfismo existente en esta región la enzima corta en diferentes regiones, generándose un patrón diferencial de bandeo que permite discriminar entre especies de *Leishmania* (Dedet *et al*, 2006). Esta técnica se ha estandarizado de manera que se puede aplicar no sólo en parásitos de cultivo, sino también a partir de la muestra tomada directamente de la lesión, sin embargo, muchas veces aunque la muestra es positiva por otros métodos de diagnóstico (directo o cultivo) resulta negativa por esta PCR.

3 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad reemergente y endémica en 98 países, presenta además un gran polimorfismo clínico (WHO, 2010) lo cual hace que se requiera un diagnóstico comprobado del parásito. El comité de expertos de la OMS recomienda dar tratamiento específico de acuerdo a la especie de *Leishmania* que tenga el paciente; de aquí la necesidad no sólo de un diagnóstico rápido y sensible, sino también específico a nivel especie. El tratamiento de primera elección en Colombia son antimoniales pentavalentes como el glucantime pero debido a la toxicidad de estos no se pueden prescribir sin diagnóstico comprobado.

La razón por la cual la leishmaniasis es un reto a la hora del diagnóstico se debe principalmente a la dificultad para aislar y observar el parásito, ya que los métodos rutinarios implican técnicas microscópicas para el reconocimiento del parásito y cultivos *in vitro* a partir de biopsias de lesión, pero no permiten identificar la especie del *Leishmania* causante de la infección. Estos inconvenientes incentivarón el desarrollo de métodos más sensibles.

En la actualidad se han desarrollado métodos moleculares que han sido evaluados para el diagnóstico de leishmaniasis, PCR convencional para amplificar múltiples blancos en el parásito, PCR en tiempo real, RAPD, PCR-RFLP, entre otros. Esta PCR-RFLP ha sido estandarizada en el PECET con el gen *Hsp70*, que permite una alta especificidad (hasta 100%) para identificación de la especie causante de la infección; sin embargo este método es poco sensible ya que se requiere la amplificación de una secuencia muy extensa (1300 pb), además este tiene un número de copias muy reducido en comparación con los minicírculos, que tienen 10.000 copias por célula. De otro lado, es importante mencionar que esta técnica funciona bien con aislados del parásito a partir del cultivo (con sensibilidad del 100%), sin embargo, la capacidad de detección de ADN del parásito disminuye a la hora de analizar muestras de mamíferos e insectos.

Por tales motivos se hace necesario continuar la búsqueda de una estrategia que permita una mayor sensibilidad para estudios de campo o focos endémicos de

Leishmania dirigidos a determinar la participación de flebotomíneos, mamíferos silvestres y domésticos. El interés particular en el kADN es dado al alto número de copias de minicírculos y la presencia de regiones conservadas y variables dentro del mismo, que lo convierten en un blanco ideal tanto para el diagnóstico como la identificación de especies de *Leishmania*, en aspirados de pacientes, flebotomíneos, mamíferos silvestres y domésticos con baja carga parasitaria.

El propósito de este trabajo fue estudiar un foco endémico de leishmaniasis cutánea aplicando técnicas moleculares, para demostrar la presencia del parásito tanto en pacientes, como en mamíferos silvestres y domésticos; además comparar estos resultados con los obtenidos por métodos tradicionales parasitológicos y serológicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aplicación de técnicas moleculares en el estudio de un foco endémico de leishmaniasis en el corregimiento de Puerto Valdivia, municipio de Valdivia (Antioquia).

4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar una PCR convencional para la identificación de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.
- Estandarizar una LSSP-PCR para la identificación de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.
- Diagnosticar la infección natural con *Leishmania* spp. en pacientes humanos residentes en el corregimiento de Puerto Valdivia.
- Determinar la infección natural con *Leishmania* en mamíferos silvestres y domésticos por medio de PCR.
- Establecer la composición de flebotomíneos en el corregimiento de Puerto Valdivia.

5 METODOLOGÍA

Tipo de estudio

El estudio fue de tipo descriptivo de corte transversal, debido a la descripción de los componentes que interviene en la transmisión de la leishmaniasis y la toma de las muestras se realizó una sola vez en el tiempo.

5.1 Área de estudio

El municipio de Valdivia está localizado en la subregión Norte del departamento de Antioquia, tiene un área total de 553 km², ubicado entre los 400 y los 1.200 metros sobre el nivel del mar, se encuentra en la cuenca hidrográfica del río Cauca, con un rango de precipitación anual de 3.500mm a 4.000mm, presenta un rango de temperatura entre 19-22°C y un clima cálido muy húmedo.

El presente estudio se llevó a cabo en la cabecera municipal del corregimiento de Puerto Valdivia. Se realizaron dos salidas de campo, la primera durante los días 18 y 21 de febrero y la segunda entre el 23 y el 25 de noviembre del 2012.

Puerto Valdivia está ubicado a 7° 17' 0" N y 75° 24' 0" O, tiene una temperatura promedio de 21°C, y una altura de 400 msnm (IGAC, 2007).



Foto 4: Corregimiento de Puerto Valdivia. Fotos: PECET

5.2 Toma de muestras

5.2.1 Pacientes

La búsqueda de pacientes con leishmaniasis se realizó casa a casa; en las veredas Buenos Aires, Cachirime y El tigre, del corregimiento de Puerto Valdivia, entre el 18 y el 21 de febrero. Se tomó muestras a pacientes con lesiones compatibles a leishmaniasis cutánea.

Para la toma de muestras se siguió el protocolo utilizado en la Unidad Asistencial del PECET, todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. Se tomaron dos muestras de la lesión una para el examen directo y la otra fue almacenada en medio NET (NaCl, EDTA y Tris) para el diagnóstico molecular. Estas muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento. Se hizo también un aspirado de la lesión, el cual fue inoculado en medio NNN a temperatura ambiente, a estos cultivos se les hizo seguimiento durante cuatro semanas, cuando se encontraron promastigotes se hizo un pase a medio modificado y las cepas que se lograron aislar fueron almacenadas en el banco de cepas del PECET.

5.2.2 Mamíferos silvestres y domésticos

Para la búsqueda de reservorios silvestres se instalaron trampas Tomahawk® con cebo de plátano maduro, estas trampas fueron ubicadas alrededor de las casas seleccionadas para el estudio durante cuatro días y fueron revisadas diariamente.

Los mamíferos capturados fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina y Rompun (relación 9:1). Se registraron variables en los individuos como: peso, sexo, medidas corporales (longitudinal, de la cola y de las patas) y se les identificó de acuerdo a las claves taxonómicas disponibles. Se tomaron muestras de sangre para cultivo en medio NNN y una muestra de tejido de oreja para hacer diagnóstico molecular. Posterior a la toma de muestras los animales fueron liberados en el sitio de captura, verificando que el efecto de la anestesia hubiera desaparecido.

Con el apoyo del técnico de la secretaría de la seccional de salud fueron citados los propietarios de los perros a los cuales se les tomó muestra de sangre sin anticoagulante para obtener suero y con anticoagulante para cultivo y PCR. Se llenó además una encuesta donde los datos fueron obtenidos a partir de la información brindada por el propietario del animal y por el médico veterinario que tomó las muestras en los animales.

5.2.3 Muestreo entomológico

La captura de flebotómíneos fue realizada con trampas de luz tipo CDC, estas trampas fueron ubicadas en el intradomicilio (habitaciones) y en el peridomicilio, de las 7 casas seleccionadas para el estudio, por un período de 12 horas entre las 18:00 y las 06:00 horas. Seguidamente se instaló una trampa Shannon durante una noche entre la 17:00 y las 21:00 horas. Finalmente se hizo una búsqueda en reposo donde se exploraron grietas, troncos y huecos de los árboles. Los especímenes colectados almacenaron en viales con alcohol al 70%, y fueron etiquetados con la fecha, la vereda, el propietario de la vivienda, el tipo de trampa y su ubicación. Todos los especímenes fueron llevados al laboratorio de entomología del PECET para una posterior identificación taxonómica según las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994).

5.3 Extracción de ADN

5.3.1 Pacientes

La extracción de ADN a partir del raspado de lesiones compatibles con LC, se realizó utilizando el kit comercial de (QIAGEN®) siguiendo las especificaciones del fabricante: el tejido fue macerado y posteriormente dispuesto en un vial de 1.5 ml, al cual le fue adicionado 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. El contenido del vial fue mezclado e incubado a 56°C, hasta que se completara la lisis y posteriormente se agregó 200 µl de Buffer AL y 200 µl de etanol (100 %). Todo el contenido del vial se pasó a una columna de colección, el cual fue centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto, el sobrenadante fue descartado, la columna se pasó a un nuevo tubo de colección, a la que se adiciono 500 µl de Buffer AW1,

centrifugando nuevamente a 8000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante fue descartado, las columnas dispuestas nuevamente en un tubo de colección, al cual se le adicionó 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por tres minutos. Nuevamente el sobrenadante fue descartado y la columna pasada a un nuevo vial, adicionándole 100 µl de Buffer AE e incubando a temperatura ambiente, finalmente al ADN fue recuperado centrifugando a 8000 rpm por 1 minuto.

5.3.2 Mamíferos silvestres y domésticos

La extracción de ADN de muestras de tejido (aproximadamente 10-15 mg de oreja) de mamíferos silvestres, se realizó con el kit DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN®) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para las muestras de sangre de los caninos se realizó la extracción de ADN por el método salting out: la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante fue descartado, el botón fue resuspendido en 200 µl de una solución de lisis (10 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 20 mM NaCl) y 40 µl de proteinasa K (15 ng/µl), las muestras se incubaron a 56°C durante una hora, el ADN fue precipitado con etanol absoluto y recuperado mediante centrifugación a 8.500 rpm durante seis minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado fue reconstituido con Buffer AE (10mM Tris-Cl, 0.5mM EDTA, pH 9.0) y almacenado a -20°C hasta su utilización.

En todos los casos el ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (THERMO SCIENTIFIC®).

5.4 Aplicación de técnicas moleculares

Esta parte se realizó en dos fases, en primer lugar se hizo una estandarización de LSSP-PCR y PCR convencional. Posteriormente, dependiendo de los resultados de la estandarización se procesaron las muestras de pacientes, mamíferos silvestres y domésticos, tomadas en el área de estudio.

5.4.1 Estandarización de LSSP-PCR

Primero se llevó a cabo una PCR usando los primers Jw11 Fw 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT-3' y Jw12 Rv 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA-3' descritos por Nicolas *et al* (2000), que amplifican un fragmento de 120 pb del minicírculo, se usó ADN extraído de cepas de cultivo *L. panamensis* (UA140 y LS94), *L. guyanensis* (CL007), *L. braziliensis* (UA301 y M2903). El producto de PCR, se purificó por tres metodologías diferentes con el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen® siguiendo las recomendaciones del fabricante, cortando la banda a partir del gel y punción directa con aguja hipodérmica. Posteriormente se realizó la LSSP-PCR para lo cual se probaron los primer Jw11 y J12 por separado. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo 40 pmol del primer, 0.2 mM de cada deoxi-nucleótido, y 4 unidades de *Taq* polimerasa. Se utilizó 1 µL del ADN molde correspondiente al fragmento. Las condiciones de la PCR fueron: un paso de desnaturalización durante 3 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de: 95°C durante 1 minuto, 36°C durante 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Durante la estandarización se probaron diferentes concentraciones del primer, 1.0 mM, 0.8 mM y 0.6 mM, para detectar cambios en el patrón de bandeo, además de cambios en el número de ciclos (35X y 45X).

Todos los productos obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 3% a 80 V durante 90 minutos, teñido con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio, revelándose en un transiluminador ultravioleta para verificar la presencia de los productos amplificados. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas®).

5.4.2 Estandarización de una PCR convencional para la amplificación diferencial de la región variable del minicírculo

Los primers Jw13 Fw 5'-ACT GGG GGT TGG TGT AAA ATA GG-3' y Jw14 Rv 5'-TTT CGC AGA ACG CCC CTA CCC-3' descritos por Nicolas *et al* (2002), fueron utilizados para amplificar los fragmentos de la región variable del minicírculo a partir del ADN extraído de cepas de cultivo de especies de *Leishmania* (*Viannia*),

L. panamensis (UA140 y LS94), *L. guyanensis* (CL007), *L. braziliensis* (UA301 y M2903).

La reacción fue realizada en un volumen final de 25 µL, conteniendo 0,25 mM de cada uno de los primers, 0.2 mM de cada deoxi-nucleótido, 2 mM de MgCl₂, y una unidad de Taq Polimerasa (Fermentas®). Para cada reacción se usó 1 µL de ADN. El programa de amplificación se llevó a cabo usando un paso de desnaturalización durante 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de: 90°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundo y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1.7% a 70 V durante 1 hora, teñido con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) y se reveló en transiluminador ultravioleta para verificar la presencia de ADN.

Durante la estandarización de la técnica se probaron diferentes concentraciones del ion MgCl₂ (1.5, 2.0 y 2.5 mM), además de variaciones en la temperatura de hibridación del primer (50, 52.5, 55 y 57.5 °C), con el fin de hallar las condiciones ideales para la técnica.

Con el propósito de evaluar la reproducibilidad de los resultados, se trabajó con cepas de referencia internacional, 50 muestras de parásitos de cultivo aislados de pacientes identificadas con la técnica de referencia en el PECET (RFLP-PCR) y 16 muestras de parásitos de cultivo identificados por isoenzimas en el Instituto Oswaldo Cruz, en Brasil.

5.4.3 Aplicación de PCR convencional para el diagnóstico de Leishmania

Para el diagnóstico molecular de *Leishmania* se usaron los primers Jw11 y Jw12, que amplifican un fragmento de 120 pb dentro de la región conservada del minicírculo del género *Leishmania*.

Esta prueba se aplicó para las muestras de pacientes, mamíferos silvestres y domésticos.

La PCR fue realizada en un volumen final de 25 μ L, que contenían 0,5 mM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.2 mM de cada deoxi-nucleótido, 2 mM de $MgCl_2$, una unidad de *Taq* polimerasa (Fermentas®) y 1 μ L de ADN. Las condiciones de temperatura fueron similares a las descritas en el puto anterior

Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 2% a 70 V durante una hora, teñido con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas®), revelándose en un transiluminador ultravioleta para verificar la presencia de ADN.

5.4.4 PCR-RFLP para la identificación de especies de Leishmania

Para la identificación de especies del parásito en las muestras de pacientes, se realizó la RFLP-PCR usada en el PECET, utilizando los primers Fw 5'- ACG GTG CCT GCC TAC TTC AA-3' y Rv 5'- CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC-3' que amplifican un fragmento del gen *Hsp70* de 1300 pb. Las condiciones usadas fueron: 20 pM de cada uno de los oligonucleótidos, 200 μ M de cada deoxi-nucleótido, 1,5 mM de $MgCl_2$, 5% de DMSO y 1 unidad de *Taq* Polimerasa (Fermentas®). Se utilizaron 50 ng de ADN de las cepas de referencia *L. braziliensis* (UA301), *L. guyanensis* (CL007) y *L. panamensis* (UA140) y 50 ng de ADN de las cepas de cultivo aislados de pacientes de la zona de estudio y ADN extraído a partir del raspado de lesiones sugestivas de pacientes de la zona de estudio. Las condiciones de temperatura fueron: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 61°C durante 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 1% a 70V durante 1 hora, teñido con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas®) y se reveló en transiluminador ultravioleta.

Para la RFLP se tomaron 10 μ L del producto de la PCR inicial, y se adicionó la enzima (*HaeIII*), buffer Tango (Tris-acetate pH 7.9, Mg-acetate, K-acetate y BSA) y agua; esto se incubó a 37°C durante 24 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tamaño de los fragmentos productos de las digestiones (RFLP) se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 4% teñido con Bromuro de Etidio.

5.5 Pruebas serológicas y parasitológicas

5.5.1 Pacientes

La tinción directa con Giemsa y observación al microscopio óptico (100X) fue la coloración utilizada para demostrar la presencia de amastigotes en muestras de lesiones compatibles con LC. Los aspirados de la lesión fueron tomados con 0,5 ml de fase estéril suplementada con penicilina G sódica (1000 U/ml) e inoculados en medio NNN con el fin de poder aislar la cepa causante de la infección en el paciente, a estos cultivos se les hizo seguimiento durante cuatro semanas.

5.5.2 Mamíferos silvestres y domésticos

Las biopsias (oreja) de los de los mamíferos silvestres capturados fueron maceradas en PBS más antibiótico e inoculados en medios de cultivo NNN. En los mamíferos silvestres el cultivo se realizó a partir de sangre periférica en medios de cultivo NNN y los sueros obtenidos en campo fueron almacenados a -20°C, todos los cultivos se les hizo seguimiento durante cuatro semanas.

Con el objetivo de detectar anticuerpos anti-*Leishmania* se realizó una IFI, para esto se usó como antígeno promastigotes de *Leishmania panamensis* (LS94) en formol al 4% a una concentración final de 6×10^6 parásitos por mililitro. Se prepararon diluciones 1:8 de los sueros de las muestras empleando el PBS como diluyente. Posteriormente se depositaron 20 μ L de esta dilución en cada pozo y se montan los controles de los sueros de perros negativos y positivos en la misma dilución, se agregaron 20 μ L del conjugado anti-DOG IgG marcada con FITC en una dilución de 1:100, la lectura de estas placas se realizó en un microscopio de fluorescencia con lente de 40x. Cuando la muestra dio reactiva en una dilución 1:8 se montó nuevamente la prueba con diluciones seriadas 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128. Para *Leishmania* se toma como positiva cuando la fluorescencia continua hasta la dilución 1:32.

6 RESULTADOS

6.1 Estandarización de una LSSP-PCR para la identificación de especies de *Leishmania* (*Viannia*)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de cada primer para unirse al fragmento molde con la LSSP-PCR se probó con cada uno de los primers Jw11 y Jw12, encontrándose que con Jw11 no se visualizó ningún producto amplificado, caso contrario ocurrió con Jw12 donde fueron observadas bandas de diferentes tamaños para cada especie (foto 5).

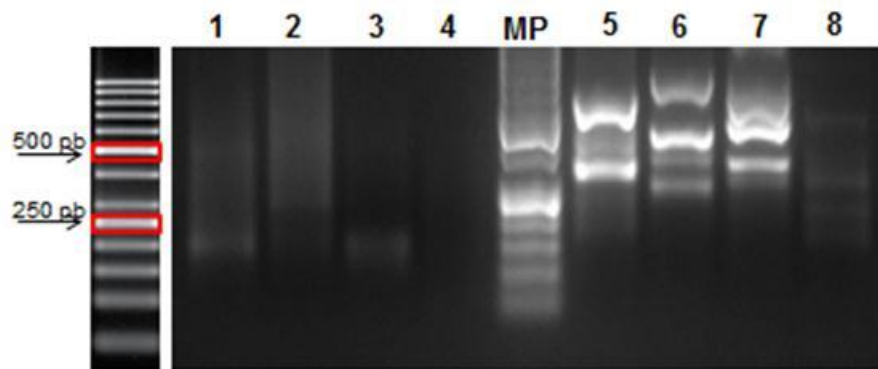


Foto 5: Perfiles electroforéticos por LSSP-PCR usando los primers Jw11 y Jw12.

Los carriles 1, 2, 3 y 4 usando el primer Jw11 y los carriles 5, 6, 7 y 8 usando Jw12. MP: marcador de peso molecular de 50 pb; carriles 1 y 5: *L. guyanensis*; 2 y 6: *L. panamensis*; 3 y 7: *L. braziliensis*; 4 y 8: control negativo (muestra sin ADN). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Una vez el producto de la PCR inicial (120 pb) purificado con el kit comercial, obtuvimos tres bandas de tamaños aproximados a 350, 400 y 550 pb, este patrón de bandeo se mantiene entre las especies *L. guyanensis* (carriles 1, 5 y 9), *L. panamensis* (carriles 2, 6 y 10) y *L. braziliensis* (3, 7 y 11).

Cuando se usaron diferentes concentraciones de primers (1.0 mM, 0.8 mM y 0.6 mM), se observó que la mejor intensidad de bandas se obtuvo con la concentración de 0.8 mM del primer (carriles 5, 6 y 7 de la foto 7).

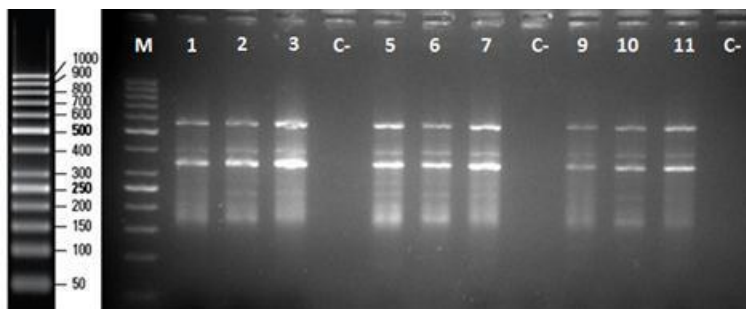


Foto 6: Perfiles electroforéticos por LSSP-PCR usando el primer JW12 a diferentes concentraciones.

Carriles 1, 2, 3: concentración del primer en la reacción 1.0 mM; carriles 5, 6, 7: concentración del primer en la reacción 0.8 mM; carriles 9,10, 11: concentración del primer en la reacción 0.6 mM. Carriles 1, 5 y 9 *L. guyanensis*; carriles 2, 6 y 10 *L. panamensis*; carriles 3, 7 y 11 *L. braziliensis*. C-, control negativo (muestra sin ADN). M, marcador de peso molecular de 50 pb. Gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Resultados similares fueron obtenidos cuando usamos otras técnicas de purificación donde no se evidenció un patrón diferencial ni reproducible entre las especie *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

6.2 Estandarización de PCR convencional con Jw13-Jw14 para la identificación de especies de Leishmania (Viannia)

En la foto 7, se muestra la amplificación diferencial de la región variable del minicírculo en las especies de *Leishmania (Viannia)*, para *L. guyanensis* se obtuvieron dos bandas, una de un tamaño de 300 pb y otra de 750 pb; para *L. panamensis* se obtuvo sólo una banda de 700 pb, y para *L. braziliensis* no se obtuvo ningún producto. En la PCR de gradientes se encontró que la temperatura de hibridación de los primers adecuada es 55°C y se observa un mejor producto usando una concentración de MgCl₂ de 2 mM (foto 8).

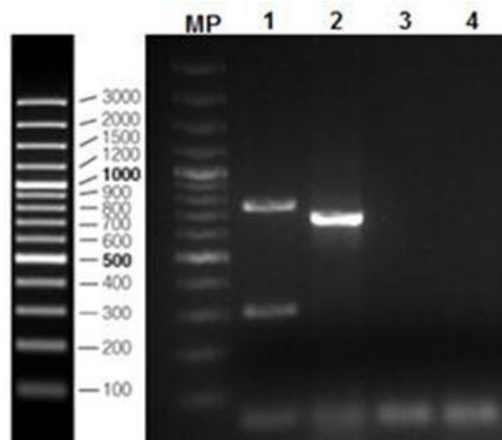


Foto 7: Amplificación diferencial del ADN del minicírculo en diferentes especies de *Leishmania (Viannia)*.

MP: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1: *L. guyanensis* (CL007) dos bandas: de 300 y 750 pb; carril 2: *L. panamensis* (UA140) 700 pb; carril 3: *L. braziliensis* (UA301); carril 4: control negativo (muestra sin ADN). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

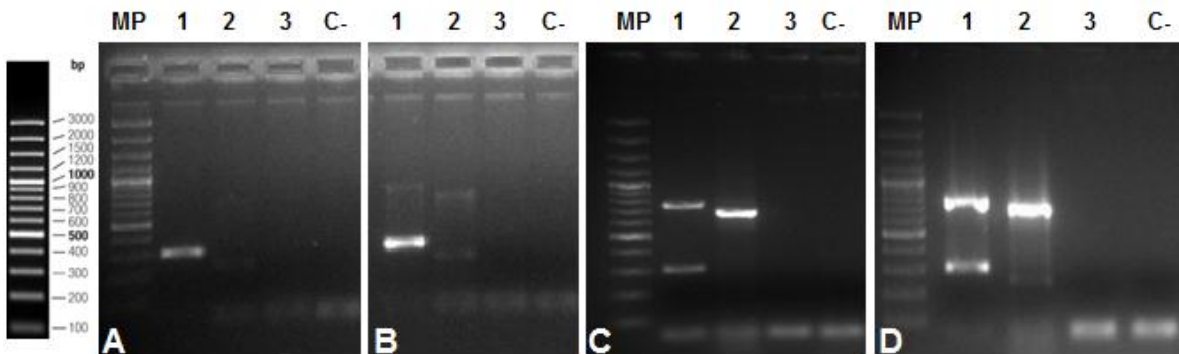


Foto 8: Amplificación diferencial del ADN del minicírculo en diferentes especies de *Leishmania (Viannia)*, con gradiente de temperatura.

MP: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1: *L. guyanensis* (CL007) dos bandas: de 300 y 750 pb; carril 2: *L. panamensis* (UA140) 700 pb; carril 3: *L. braziliensis* (UA301); carril 4: control negativo (muestra sin ADN). El grupo A muestra la hibridación a 50°C, el grupo B a 52,5°C, el grupo C a 55°C y el grupo D a 57,5°C. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

Con el fin de establecer la sensibilidad de los primers Jw13-Jw14 en la PCR convencional se realizaron diluciones de ADN *L. panamensis*, encontrándose que hasta la concentración de 0.29 ng/μl se obtiene una banda visible (foto 9).

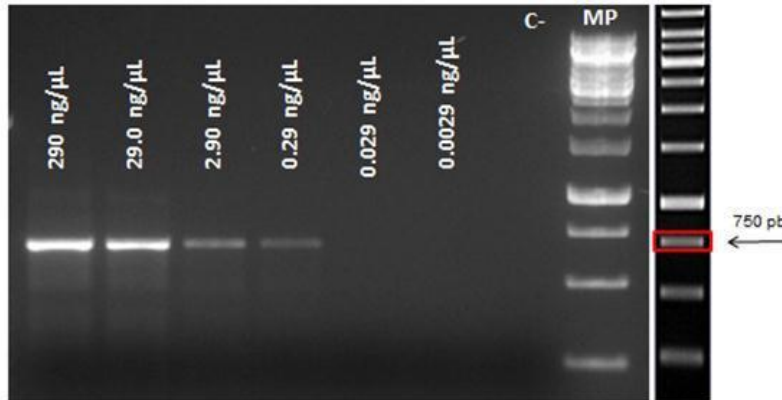


Foto 9: Sensibilidad de la PCR convencional con Jw13-Jw14 en diluciones de *L. (V.) panamensis* (UA140).

MP: marcador de peso molecular de 1 kb. C-, control negativo (muestra sin ADN). Gel de agarosa al 1.7%, teñido con bromuro de etidio.

Comparación de resultados con PCR convencional vs RFLP-PCR

La comparación de la PCR convencional (Jw13-Jw14) con la RFLP-PCR, amplificando el gen de la proteína de choque térmico (*Hsp70*) o cisteín proteasa tipo 1 (Cpb), demostró una correspondencia del 90.0% (45 /50) en la muestras evaluadas que incluyeron cepas de referencia y aislados de pacientes registrados en el banco de cepas del PECET. De otro lado, el 100 % (16/16) de las muestras identificadas por isoenzimas coincidió con el resultado obtenido por esta PCR (Jw13-Jw143) (Anexo 1).

6.3 Aplicación de técnicas moleculares a las muestras clínicas

6.3.1 Detección de ADN de *Leishmania* por PCR convencional en pacientes

El 100 % (8/8) de las muestras de pacientes del corregimiento de Puerto Valdivia, fueron positivas para *Leishmania* por medio de la PCR convencional usando los primers Jw11-Jw12, el fragmento amplificado fue de 120 pb (foto 10).

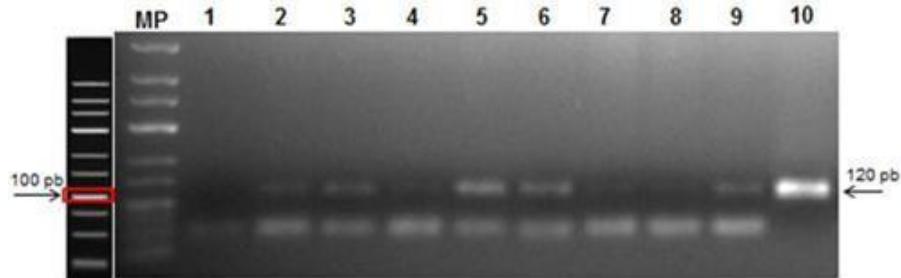


Foto 10: Amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo del kADN, en muestras clínicas.

MP: Marcador de peso molecular de 25 pb, carril 1: Control negativo (muestra sin ADN), carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: Muestra de raspado de lesiones de pacientes; 10: Control positivo (muestra con ADN de promastigotes de cultivo). Los productos se corrieron en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

6.3.2 Identificación de especies por PCR convencional

Cuando se realizó la PCR convencional (Jw13-Jw14) para la identificación de especie en las muestras clínicas se obtuvo que el 87.5 % (7/8) pertenecían a la especie *L. (V) braziliensis* ya que no se registró ninguna banda y el 12.5 % (1/8) pertenece a la especie *L. (V) panamensis* donde se observó una banda de 700 pb (foto 11).



Foto 11: Amplificación diferencial de la región variable del minicírculo del kADN, en muestras clínicas.

MP: Marcador de peso molecular de 100 pb, 1: *L. guyanensis* (CL007); 2: *L. panamensis* (UA140); 3: *L. braziliensis* (UA301); 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: Muestras de pacientes; 12: Control negativo (muestra sin ADN). Los productos se corrieron en gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

6.3.3 Identificación de especie en cultivos aislados de pacientes de la zona de estudio

Se realizó el aislamiento de dos cepas proveniente de pacientes, a las cuales les fueron asignados los códigos UA3332 y UA3337, en la foto 12 puede verse el producto de un tamaño de 700 pb en ambas muestras, lo cual indica que estas cepas son de la especie *L. (V) panamensis*.

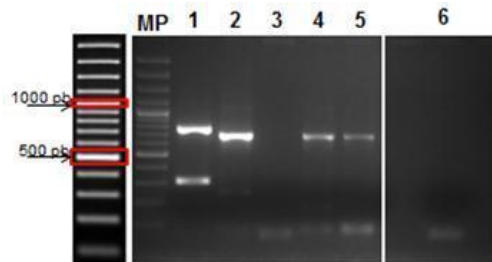


Foto 12: Amplificación diferencial de la región variable del minicírculo del kADN, en muestras de cultivo.

MP: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1: *L. guyanensis* (CL007); carril 2: *L. panamensis* (UA140); carril 3: *L. braziliensis* (UA301); 4: ADN de promastigotes UA3332; 5: ADN de promastigotes de UA3337; 6: Control negativo (muestra sin ADN). Los productos se corrieron en geles de agarosa al 1.7% teñidos con bromuro de etidio.

6.3.4 Diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania* por PCR-RFLP

El 37.5 % (3/8) de las muestras tomadas de raspado de lesiones de pacientes fueron positivas por PCR para el gen *Hsp70* (foto 13a) y con la digestión enzimática se identificaron como *L. (V) panamensis* (foto 13b).

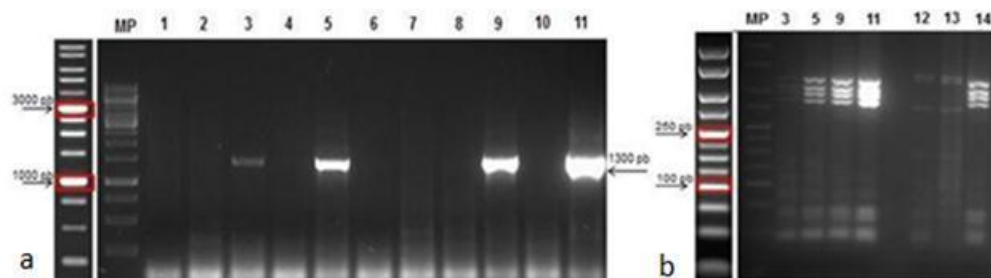


Foto 13: PCR-RFLP con el gen *Hsp70* en muestras de pacientes.

MP: Marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1: Control negativo (muestra sin ADN), carriles 2, 4, 6, 7, 8, 10: Muestra de pacientes, carril 11: Control positivo (ADN *Leishmania*). Los productos se corrieron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. b perfiles electroforéticos obtenidos por digestión enzimática con *Hae III*, MP: Marcador de peso molecular de 25 pb, 3, 5, 9: Muestras de pacientes positivos para *Leishmania*; 11, 14: Control positivo (*L. (V) panamensis*); 12, 13: Control positivo (*L. (V) braziliensis*). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.

6.4 Diagnóstico parasitológico en pacientes

Se realizaron exámenes directos en las 8 muestras de raspado de lesiones evidenciándose por microscopía, la presencia de amastigotes en cuatro muestras de raspado. Se realizó el aislamiento de dos cepas proveniente de pacientes, a las cuales les fueron asignados los códigos UA3332 y UA3337 (tabla 2)

Tabla 2: Resultado de pruebas parasitológicas y moleculares en pacientes, Puerto Valdivia.

Código	Pruebas			
	Directo	Cultivo	RFLP-PCR Hsp70	PCR (Jw11-Jw12)
W6994	Positivo	Positivo	Positivo- <i>L. panamensis</i>	Positivo
W6995	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
W6996	Positivo	Negativo	Positivo- <i>L. panamensis</i>	Positivo
W6998	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
W6999	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
W7000	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
W7001	Negativo	Negativo	Positivo- <i>L. panamensis</i>	Positivo
W7002	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

6.5 Detección de ADN de *Leishmania* en muestras de mamíferos

Durante la búsqueda de potenciales reservorios de *Leishmania* se logró la captura de cuatro mamíferos silvestres; 3 *Didelphis marsupialis* (2 machos y una hembra) y 1 *Proechimys semispinosus* (macho). Todos los animales fueron capturados en el peridomicilio de una de las viviendas de la vereda de Buenos Aires. El 25 % (1/4) de los mamíferos silvestres resultó positivo para *Leishmania* por PCR convencional, este ejemplar fue identificado como *Proechimys semispinosus* (foto 14).

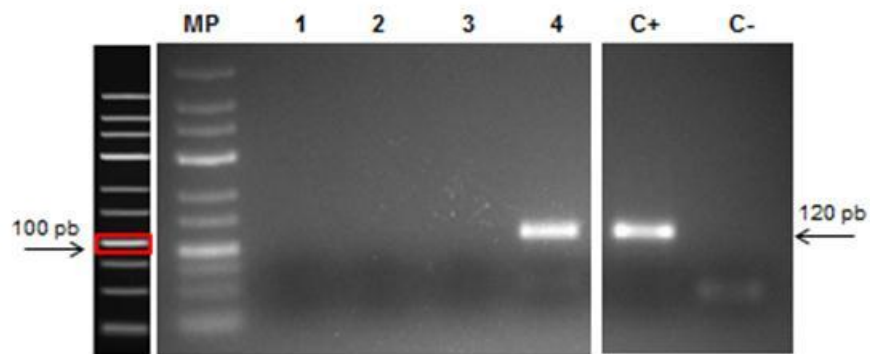


Foto 14: Amplificación por PCR de la región conservada del minicírculo del kADN, en muestras de mamíferos silvestres.

MP: Marcador de peso molecular de 25 pb, 1, 2, 3: *Didelphis marsupialis*, 4: *Proechimys semispinosus*; C+, *L. braziliensis*; C-, control negativo. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio.

En relación al muestreo en mamíferos domésticos fueron incluidos en total 33 perros (*Canis familiaris*), el 54,5% (14 caninos) fueron machos; los rangos de edad de los individuos oscilaron entre 0 y 1 año (30,3 %), entre 1-3 años (48,5 %), entre 3-5 años (12,1 %) y mayores de 5 años (9 %). La encuesta realizada a los propietarios de los animales, estimo que el 45,4 % eran animales de compañía, el 42,4 % animales de compañía en el monte y el 12,1 % eran utilizados como caninos de caza. Se logró la amplificación del fragmento de la región conservada del minicírculo del kADN (120 pb) en 1 de las 32 muestras procesadas.

6.6 Flebotomíneos en el área de estudio

Se colectaron 555 individuos, de los cuales 363 (65,4 %) fueron hembras, agrupadas en 13 especies del género *Lutzomyia* y 1 como *Brumptomyia* sp. El 92,4 % del total de los ejemplares colectados pertenecieron a 6 especies distribuidas así: a *Lutzomyia trapidoi* (26,3 %), seguido de *Lu. gomezi* (19,3 %), *Lu. yuilli* (16,8 %), *Lu. panamensis* (12,2 %), *Lu. olmeca bicolor* (10,4 %) y *Lu. hartmanni* (7,4 %) (Tabla 3).

Tabla 3: Número de especímenes capturados, por método y sitio de captura, en el corregimiento de Puerto Valdivia.

Especie	Método de captura						Sitio de captura			Pi (%)	Total
	CDC		Shannon		Reposo		I	P	E		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂					
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	100	34	11	-	-	1	21	113	12	26,3	146
<i>Lutzomyia gomezi</i> *	39	42	25	1	-	-	20	61	26	19,3	107
<i>Lutzomyia yuilli</i> *	50	13	28	-	-	-	13	52	28	16,8	93
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	26	41	1	-	-	-	5	62	1	12,2	68
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i> *	31	27	-	-	-	-	1	57	-	10,4	58
<i>Lutzomyia hartmanni</i> *	15	4	14	3	2	3	3	16	22	7,4	41
<i>Lutzomyia triramula</i>	6	3	1	1	-	-	2	7	2	2	11
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	4	4	-	-	-	-	1	7	-	1,4	8
<i>Lutzomyia micropyga</i>	-	7	-	-	-	-	-	7	-	1,3	7
<i>Lutzomyia camposi</i>	4	2	-	-	-	-	1	5	-	1,1	6
<i>Brumptomyia sp.</i>	1	2	-	-	-	-	-	3	-	0,5	3
<i>Lutzomyia vespertilionis</i>	1	2	-	-	-	-	-	3	-	0,5	3
<i>Lutzomyia shannoni</i>	2	-	-	-	-	-	-	2	-	0,4	2
<i>Lutzomyia saulensis</i>	2	2	-	-	-	-	-	2	-	0,4	2
Total	281	183	80	5	2	4	67	397	91	100	555

6.7 Pruebas parasitológicas y serológicas

El aislamiento de promastigotes a partir de las muestras de mamíferos silvestres y domésticos resultó negativo luego de tres semanas de seguimiento

En los mamíferos domésticos, se logró hallar una frecuencia de títulos contra *Leishmania* de 6,3% (2/32), con títulos de 1/32 para una muestra y 1/64 para la otra.

7 DISCUSIÓN

Para la LC no existe un método lo suficientemente sensible y específico que pueda ser adoptado como definitivo en la detección y diagnóstico de infecciones con *Leishmania*. Los métodos moleculares son una alternativa específica, Y sensible en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. La PCR es la herramienta molecular más comúnmente utilizada permite amplificar diferentes secuencias en el genoma de *Leishmania* como genes rRNA (18S rRNA y la subunidad ribosomal SSU-rRNAmal), además de regiones tanto conservadas como variables de los minicírculos del kADN (Singh, 2003), siendo este último uno de los más prometedores debido a que se encuentran en un alto número de copias en el genoma del parásito (10.000 copias por parásito) (Nicolas *et al*, 2002).

Los minicírculos del kADN de *Leishmania* poseen una región altamente conservada donde se pueden encontrar tres bloques de secuencia (BSC): BSC1 (AGGGGCGTTC), BSC2 (CCCCGTTC) y el BSC3 (GGGGTTGGTGTA) (Ray, 1989). El BSC1 y el BSC3 son casi idénticos en todas las especies investigadas a la fecha, mientras que el BSC2 no es tan conservado (Yurchenko *et al*, 1999). Usando primers que amplificaron la región conservada de 120 pares de bases, se obtuvo el mismo fragmento para todas las especies, sin embargo Yurchenko y colaboradores (1999) habían discutido la existencia de un bloque menos conservado.

Pena y colaboradores (1994) propusieron que la LSSP-PCR debido a la baja astringencia de la técnica, permitía detectar uno o múltiples variaciones en el ADN, sin embargo, la reproducibilidad de los resultados obtenidos con esta técnica parecen depender de la longitud del fragmento inicial (Pena *et al*, 1994; Carvalho *et al*, 2003; Baptista *et al*, 2008; Mejía y Triana, 2005 y Assuncao *et al*, 2003).

Este trabajo pretendía aplicar esta técnica (LSSP-PCR) para evidenciar el polimorfismo al interior de la región conservada, sin embargo, lo que se obtuvo fue un patrón electroforético que no fue reproducible y los fragmentos eran de mayor tamaño. Pena y colaboradores (1994) encontraron fragmentos de mayor tamaño

que el molde (569 pb) utilizado para la LSSP-PCR. Carvalho y colaboradores (2003), trabajando sobre un fragmento inicial de aproximadamente 530 pb, lograron identificar dos grupos de bacterias resistentes (en bacterias *Mycobacterium tuberculosis*) y susceptibles a un antibiótico por medio de esta técnica. Baptista y colaboradores (2008) utilizando un fragmento de 750 pb, lograron agrupar subpoblaciones de la misma especie de *Leishmania*. Salazar y colaboradores (2006), trabajaron sobre un fragmento de 330 pb para determinar la posible asociación genética entre *T. cruzi* de diferentes regiones geográficas de Colombia. Mejía y Triana (2005) trabajaron con un fragmento de 330 pb encontraron productos de mayor tamaño en comparación con el fragmento molde. Assuncao y colaboradores (2003) trabajaron con un molde inicial de 285 pb y obtuvieron fragmentos de aproximadamente 100 a 700 pb. Nuestros resultados fueron muy similares ya que obtuvimos bandas de mayor tamaño (350, 400 y 550 pb) en comparación al tamaño del fragmento molde (120 pb). Estas diferencias en la reproducibilidad de la técnica resultan de la posibilidad del producto inicial de funcionar como primer en los ciclos posteriores de la LSSP-PCR y del primer que se utilice (Pena *et al*, 1994; Assuncao *et al*, 2003). Es posible encontrar productos por LSSP-PCR mucho mayores al fragmento molde, pero debe haber reproducibilidad en los patrones observados, lo que no fue posible observar en este estudio.

Parece ser que el polimorfismo existente al interior de la región conservada reportado por Yurchenko *et al* (1999) y Ray D (1989) no fue suficiente para generar patrones electroforéticos que pueden diferenciar especies de *Leishmania* por medio de la LSSP-PCR.

Con la LSSP-PCR no se obtuvieron resultados que pudieran servir para la identificación de especies de *Leishmania* (*Viannia*) probablemente por el tamaño del fragmento inicial o porque no hay suficiente polimorfismo en la región conservada para generar un patrón de bandeo diferencial.

Otra estrategia fue utilizar primers orientados hacia afuera de la región conservada (Jw13-Jw14), con lo que obtuvimos una amplificación muy variable en especies del subgénero *Viannia*, para *L. guyanensis* dos bandas, una de 300 pb y otra de 750 pb de peso, para *L. panamensis* sólo una banda de 700 pb y finalmente para *L. braziliensis* no se evidenció ningún producto. Esto permitió diferenciar las especies de acuerdo al tamaño del producto, este resultado fue reproducible, ya que el 92,4 % de las muestras procesadas coincidió con el resultado obtenido por RFLP-PCR. Es importante mencionar que el 100 % de las muestras identificadas por isoenzimas, que continua siendo la prueba de oro para este fin, coincidió con el resultado obtenido por la PCR convencional.

Caso contrario ocurre en especies del subgénero *Leishmania*, donde Nicolas *et al* (2002), usando los mismos primers (Jw13-Jw14) obtuvieron un fragmento de un tamaño aproximado de 600-750 pb en especies del subgénero *Leishmania*, este fragmento representa la región variable del minicírculo del kinetoplasto y permitió la identificación de especies de este subgénero.

Por otro lado, nuestro trabajo permite evidenciar mayor sensibilidad en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR convencional en pacientes, cuando se trabajó con primers que amplificaron una región del minicírculo del kADN, ya que hubo mayor detección de ADN del parásito de la región conservada de los minicírculos, en comparación con la amplificación del gen *Hsp70*, en muestras tomadas directamente de la lesión, en pacientes del corregimiento de Puerto Valdivia.

La amplificación de la región variable de los minicírculos (con los primers Jw13-J14) , ha permitido la diferenciación de especies de *Leishmania (Leishmania)*, en función del tamaño de la banda, sin embargo, es necesario el cultivo del parásito para un diagnóstico correcto, esto se evidenció con las muestras obtenidas en Puerto Valdivia, cuando se procesaron las 8 muestras provenientes de pacientes se determinó una muestra como *L. panamensis* y otras siete como *L. braziliensis*, sin embargo, cuando se procesaron dos de estas muestras de las cuales se pudo obtener cultivo, se determinó que ambas muestras pertenecían a la especie *L. (V.)*

panamensis, se espera poder obviar este paso, ya que en muchas ocasiones resulta complejo obtener el aislamiento de la cepa.

Para lograr determinar la especie causante de la infección en las muestras donde no fue posible obtener el cultivo se hizo la PCR-RFLP en las muestras tomadas directamente de la lesión y se logró identificar la especie *L. (V.) panamensis* en 3 muestras. Estos resultados coinciden con Ovalle *et al* (2006), quienes reportan que la especie circulante en Antioquia es principalmente *Leishmania (V) panamensis*.

Del total de especies de flebotomíneos colectados, cerca del 43 % presentan reportes de comportamiento antropofílico y antecedentes vectoriales como transmisores de *Leishmania* en Colombia. Entre estas y en orden de abundancia aproximada se encuentra, *Lutzomyia trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. yuilli*, *Lu. panamensis*, *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. hartmanni*. Todas estas especies han sido reportadas a nivel de departamento (Antioquia), sin embargo no se han reportado específicamente para el municipio de Valdivia.

Este trabajo permite señalar a *Proechimys semispinosus*, como portador de *Leishmania*, esto podría sugerir su incriminación como reservorio, sin embargo se requieren otros estudios para este fin. En 2002, Travi y colaboradores encontraron infección natural con *Leishmania Viannia* por PCR en el 15 % (5/33) de los animales capturados pertenecientes a esta especie (*Proechimys semispinosus*), ellos también lograron infectar en condiciones de laboratorio, individuos jóvenes de la especie *P. semispinosus* con *L. panamensis* y *L. Chagasi*, demostrando la persistencia y diseminación del parásito en este mamífero silvestre.

Los caninos han sido ampliamente incriminados en el Nuevo Mundo como el principal reservorio doméstico de la Leishmaniasis Visceral (Zuleta *et al*, 1999; Reithinger y Davies, 1999; Travi *et al*, 2001), sin embargo su papel como reservorio de leishmaniasis cutánea es controversial, Reithinger y Davies (1999), reportan una importante relación entre los casos de humanos y caninos, aislando el parásito e identificándolo por pruebas serológicas y moleculares en ambos,

además encontrando vectores en el ambiente familiar, estando implicadas en la mayoría de los casos *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*. En nuestro caso, encontramos ADN de *Leishmania*, por medio de la PCR que amplificó la región conservada del minicírculo (120 pb) en una de las muestras caninas.

Para el diagnóstico de *Leishmania*, la amplificación de la región conservada del minicírculo, permite ampliar el panorama y aumentar en gran medida el poder de detección de ADN del parásito por medio de la PCR; sin embargo la amplificación diferencial de la región variable del minicírculo para la identificación de especies, no arrojó buenos resultados cuando se hizo en la muestra tomada directamente de la lesión, es importante continuar trabajando con este blanco molecular (minicírculo del kDNA) para la identificación de especies a partir de la muestra tomada directamente de la lesión, ya que estos arrojan mejores resultados.

Rodríguez y colaboradores (2002) en un estudio de un foco endémico de leishmaniasis en Venezuela a través del uso de técnicas moleculares lograron amplificar ADN de *Leishmania* en todos los componentes de la triada (paciente, vector, reservorio), en este trabajo también se logró comprobar la existencia de ADN de *Leishmania* spp. tanto en pacientes, como flebotomíneos, mamíferos silvestres y domésticos. Resultados similares se han encontrado en este estudio donde pudimos amplificar ADN de *Leishmania* tanto en flebotomíneos, como en mamíferos silvestres y domésticos, además se logró identificar la especie en algunas muestras de pacientes.

Todo lo anterior señala la necesidad de avanzar en el diagnóstico molecular tanto para la detección del parásito, como para la identificación de la especie, además el comité de expertos de la OMS, reunido en el 2010 recomendó ofrecer un tratamiento específico de acuerdo a la especie. El avance en estos métodos permitiría también realizar estudios epidemiológicos más precisos, en el sentido de que se podría identificar la especie que circula en la zona de estudio no sólo en pacientes, sino en vectores y posibles reservorios.

Los métodos de diagnóstico tradicionales (parasitológicos y serológicos) aunque proporcionan un resultado positivo muy confiable, tienen un poder de detección menor, es por esto que es importante avanzar en las técnicas moleculares, ya que lo ideal sería obtener un resultado a partir de la muestra tomada de la lesión y no esperar el aislamiento del parásito en cultivo, que muchas veces se ve afectado por factores externos.

8 AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su inmenso amor, a mi padre por convertirse en mi eterna inspiración, a mi madre y hermanas por su apoyo incondicional.

Agradezco enormemente a mis compañeros Andrés Vélez, Karina Mondragón, Luz Adriana Acosta, porque sin su colaboración no hubiera sido posible concluir el proyecto, Eugenia Cardona, Rafael Villarreal, Gustavo Blandón y a todos los compañeros del PECET, al doctor Iván Darío Vélez por permitirme hacer parte del grupo.

A Horacio Cadena y Juan Carlos Quintero por su paciencia y sus consejos brindados a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de universidad Diana, Viviana, Laura, Sandra, Edilson y a mis profesores por contribuir con mi formación.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo LA, Uribe J, Sierra D, Ruíz F, Vélez ID. 2002. Presence of American Cutaneous Leishmaniasis Vectors Surrounding the City of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(5): 641-642*, July 2002.

Albajar P, Simarro P y Alvar J. 2004. Infecciones causadas por protozoos flagelados hemotisulares. Leishmaniosis. Tripanosomiasis Africana. Tripanosomiasis Americana (Chagas). *Tratado S.E.I.M.C. de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1 ed.: Ed Méd Pan.

Alexander B, Agudelo LA, Navarro JF, Molina J Ruiz JF, Aguilera G y Quiñones ML. 2009. Relationship between coffee cultivation practices in Colombia and exposure to infection with *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(12):1263-8.

Alvar J, Moretti ML y Corachán M. 2000. Infecciones causadas por protozoos flagelados hemotisulares. *En: Farreras P, Rozman C (eds)*. Medicina Interna, 14^a ed. Madrid: Ed Harcourt. Pág. 2749-2757.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

Ashford RW. 1996. Leishmaniasis Reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*. 14(5): 523-532.

Ashford RW. 2003. When Is a Reservoir Not a Reservoir? *Emerg Infect Dis*. November; 9(11): 1495–1496.

Assuncao MA, Caballero OL, Vago AR, Harskeerl RA, Romanha AJ, Pena SD, Simpson AJ y Cota M. 2003. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 127–135.

Bailey MS, Lockwood DN. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 25(2): 203 –211.

Bailey JE, Noyes HA, Reyburn H y Smith D. 1998. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol.* 36(10): 2877-2881.

Bañuls AL, Hide M, Prugnotte F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 64:1-109.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. 2008. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* 121 (2009) 317–322

Bard E. 1989. Molecular biology of *Leishmania*. *Biochem Cell Biol.* 67(9): 516-524.

Barreto G, De Marco L, Días NE, Pena SD, Reinach FC, Simpson AJ y Vago AR. 1994. Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1946-1949

Bejarano EE. 2006. Lista actualizada de los Psicodidos: (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia entomológica de Mexicana.* 45(1):47-56.

Brusés BL, Gorodner JO y Lucero RH. 2004. Genotipificación de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de LSSP-PCR. *Universidad Nacional del Nordeste, Argentina Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* Resumen M-040. 4 pp.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes Infect.* Nov;5(13):1231-40.

Carvalho WS, De Miranda SS, Costa KM, Araújo JG, Augusto CJ, Pesquero JB, Pesquero JL y Gomes MA. 2003. Low-Stringency Single-Specific-Primer PCR as a Tool for Detection of Mutations in the rpoB Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* July 2003, p. 3384–3386

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR. 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 29(5): 251 – 258.

Corredor AJ, Gallego JF, Tesh AB, Morales A, Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Pelaez D. 1989. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 40(5): 480 -486.

Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine JC. 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 115(Pt 11): 2303 -2316.

Cruz AK, Tosi LR. 1996. Molecular Biology. *Clin Dermatol.* Sep-Oct; 14(5):533-40.

Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. 2008. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. Volume 13, Issue 11, pages 1378–1383, November.

Dedet J, Couppie P, Nacher M, Pratlong F, Ravel C y Rotureau B. 2006. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* (44): 459-467.

Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004 Sep;27(5):305-18.

Dirección Seccional de Salud de Antioquia, 2012.

Ferro C, Fuya P, Pérez S, Lugo L y González C. 2011. Valoración de la Ecoepidemiología de la leishmaniasis en Colombia a partir de la distribución espacial y ecológica de los insectos vectores. *Biomedica* 31 (sup. 3): 3-315.

IGAC e IDEA. 2007. Antioquia Características geográficas. *Bogotá: Imprenta nacional de Colombia*. 320 pp. DB – IGAC 1-00872.

Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. Vol: 22:439-45.

Lages-Silva E, Marquez DS, Moreno J, Pedrosa AL y Ramírez LE. 2007. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Exp Parasitol*. 117: 35-42.

Lainson R y Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. *Academic Press, London*. pp. 1-120.

Lane RP. 1993. Sand flies (Phlebotominae). In *Medical Insects and Arachnids* (eds. R.P. Lane RP, and Crosskey RW). Chapman and Hall, London, pp. 78-119.

Madison-Antenucci S, Grams J, Hajduk SL. 2002. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell*. Vol. 108:435–8.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN y Gradoni L. 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol*. Doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

Martínez G, Uribe S, Vélez ID. 1995. Behavior and intradwelling-vertical-distribution of *Lutzomyia (L) gomezi*, Nitzulesco 1931 in Montebello, Antioquia, Colombia. *Bol Dir Malariol y San amb*. Vol XXXV Supl. 1 (1995): 197-204.

McConville MJ, Handman E. 2007. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. *Int J Parasitol*. Feb;37(10):1047-51.

Mejía AM y Triana O. 2005. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica*. 25: 76-86.

Nicolas L, Sidjanski S, Colle JH, Milon G. 2000. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study in laboratory mice. *Infect. Immun.* 68, 6561–6566.

Nicolas L, Milon G y Prima E. 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Meth.* 51: 295-299.

Ovalle CE, Porras L, Rey M, Rios M, Camargo YC. 2006. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomédica.* Vol.26 suppl.1 Bogotá Oct.

Pena S, Barreto G, Vago A, De Marco L, Reinach F, Dias E y Simpson A. 1994. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 1946-1949, March 1994.

Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. 2000. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* Oct; 38(10):3768-73.

Ray D. 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 1989 March; 9(3): 1365–1367.

Reithinger Ry Davies C. 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(4), pp. 530–541

Rodríguez N, De Lima H, Aguilati C, Rodríguez A, Barker D y Convit J. 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The royal society of tropical medicine and hygiene(2002)96, supplements 1/105-S1/109

Ruiz J. 2006. Review: CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud pública Méx* v.48 n.5 Cuernavaca sep./oct.

Salazar A, Schijman AG, Triana O. 2006. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Tropica* 100 (2006) 110–118

Saravia NG, Vergel C y Walker J. 2005. 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.* 72(4): 423-429.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil —a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(3): 239 - 251.

Singh S, Sivakumar R. 2003. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49:55-60.

Travi BL, Arteaga LT, León AP y Adler GH. 2002. Susceptibility of Spiny Rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 887 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 887-892.

Singh S. 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* Mar;123(3):311-30.

Vásquez A. 2006. Registro de LC en caninos presentes en zonas peri-urbanas de Villavicencio, Meta y su importancia en salud Pública. *Rev Orinoquía Universidad de los Llanos.* 10(2): 79-86.

Vélez ID. 1990. Leishmaniasis cutánea en Montebello, Antioquia: Determinación del riesgo epidemiológico de contraer la enfermedad. *Actas XI Congreso Colombiano de Medicina Interna. Acta Médica Colombiana*, Sup.:99-105.

Vélez ID, Agudelo S. 1996. Leishmaniosis: manual de procedimientos para el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea americana. *Ed. Universidad de Antioquia* pp36.

Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. 2001. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cad. Saúde Pública* vol.17 no.1 Rio de Janeiro.

Vera M, Galindo F, Zambrano P, Méndez J, Bello B, Olano V. 2004. Informe de enfermedades transmitidas por vectores (ETV). *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2005; 10: 38-48.

Wiese M. 2007. *Leishmania* MAP kinases—Familiar proteins in an unusual context. *Int J Parasitol.* 37(10): 1053-1062.

World Health Organization (WHO). 1984. The Leishmaniasis. *WHO Technical Report* ISBN 92 4 1207019.

World Health Organization (WHO). 2010. Control of the leishmaniasis. Report of meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *WHO Technical Report Series* 949.

Young DG, Duncan MA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst.* 54; 1-881.

Youssef MY, Eissa MM, el Mansoury ST. 1997. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* of the Old World. *J Egypt Soc Parasitol.* 27(3): 651 -657.

Yurchenko VY, Merzlyak EM y Kolesnikov AA. 1999. Structure of *Leishmania* Minicircle Kinetoplast DNA Classes. *J Clin Microbiol.* 1999 May; 37(5): 1656–1657.

Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri M, Reyes O, Rodriguez V, Centeno M, Barrios RM, Ulrich M. 1999. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 61: 945-950.

10 ANEXOS

Anexo 1: Resultados RFLP-PCR, isoenzimas y PCR convencional (Jw13-Jw14)

consecutivo	RFLP		Isoenzimas	Convencional Jw13-Jw14
	Cpb	Hsp70		
M2903	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA301	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
CL007	NP	<i>L. guyanensis</i>	NP	<i>L. guyanensis</i>
UA140	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
LS94	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
P38	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
P46	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
P60	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
P71	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
P86	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA218	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA837	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3107	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3132	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3174	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3175	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3213	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. panamensis/L. braziliensis</i>
UA3216	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3217	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3218	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis/L. panamensis</i>
UA3219	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3220	NP	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3224	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3225	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3226	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3227	<i>L. braziliensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3229	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3234	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3247	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3269	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3270	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3285	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3298	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3301	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3303	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3305	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>

UA3306	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3307	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3308	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3319	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3320	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
UA3327	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
UA3334	<i>L. panamensis</i>	NP	NP	<i>L. braziliensis</i>
W6951	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
W6958	NP	<i>L. braziliensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
W6975	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
W6975	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
W6982	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
W7017	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. panamensis</i>
W7018	NP	<i>L. panamensis</i>	NP	<i>L. braziliensis</i>
1	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
2	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
3	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
4	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
5	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
6	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
7	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
8	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
9	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
10	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
11	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
12	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
13	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
14	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
15	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>
16	NP	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>

NP: la muestra no fue procesada por esa técnica