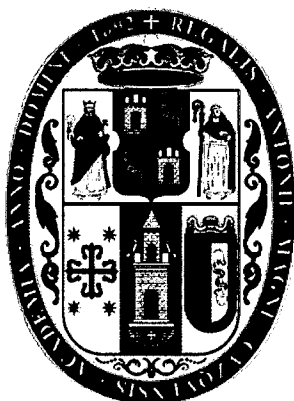


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RAPD DE  
CEPAS DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES DE LA  
MICRORED DE KITENI**

**Tesis presentada para optar al título profesional de Biólogo,  
presentado por:**

**Bach. Erika Sofía Pérez Vélez**

**ASESORA : Dra. Rosa Luz Pacheco Venero**

**CO- ASESORES: Dr. Enrique Martínez Carretero**

**Dra. María Antonieta Quispe Ricalde**

*Tesis auspiciada por el Consejo de Investigación- UNSAAC*

**CUSCO - 2011**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis es una parte de mi vida y comienzo de otras etapas, por esto y más se la dedico a Dios, por ser mi apoyo en los momentos de angustia y alegría, por haberme permitido llegar a este día y permitido conocer personas maravillosas en mi vida.

A mis padres, Victor Hugo y Blanca, personas maravillosas y llenas de amor, gracias a ustedes soy quien soy, son los que siempre han estado ahí velando por mí, creo que no hay palabras suficientes que pueda expresar todo el cariño y agradecimiento que les tengo.

A mis hermanos Sandro y Carla que con más experiencia supieron siempre darme los consejos más acertados.

**ERIKA**

## **Agradecimientos.-**

Siempre es difícil pensar en los agradecimientos ya que muchas personas han contribuido a que mi sueño se haga realidad y no quisiera obviar a alguno.

En primer lugar quisiera agradecer a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación académica y el apoyo recibido por el Consejo de Investigación -UNSAAC.

A mi asesora la Dra. Rosa Luz Pacheco Venero por darme la oportunidad y confianza, gracias por abrir mi mente al mundo de la investigación, espero haber merecido esa confianza.

Al Dr. Enrique Martínez Carretero, que al otro lado del mundo está siempre ahí apoyándonos muchas gracias por la confianza depositada en mí.

A la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde, por todas sus enseñanzas y por las facilidades para con esta tesis y haber logrado que se materialice. Toña vales oro y es un honor trabajar con personas como tú, me faltan palabras para agradecer todo lo que has hecho.

A las Biólogas: Maritza Quispe, por ser tan amiga en esos momentos de angustia. Delmy Dueñas por haberme enseñado siempre con una sonrisa en el rostro, Diana Rado, por las traspasadas en internet y Elsa Aguilar por su preocupación constante gracias por estar ahí conmigo, sus experiencias y palabras templaron mi carácter, las tengo en mi corazón siempre.

A la Blga. Griselda Muñoz Duran y al M.Sc. Gustavo Quispe Montoya, dictaminantes de la tesis, por sus observaciones y sugerencias para mejorar la presentación del trabajo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas por el apoyo y sus sabias enseñanzas a lo largo de este tiempo.

A mis amigos, mi pequeña familia, del Grupo de Investigación de *Leishmania*, Lugo Miranda, Pamela Yáñez, Mayday Soto, Yahanda Apaza, Carla Estrada; a los integrantes de las líneas de investigación de vectores, reservorios y humanos; los que

ya no están y he tenido el honor de conocer y aprender de ustedes (Wifredo, Cirna, Dennis, David, José, Hugo)

A mis amigos, los cuales me acompañan siempre y sé que puedo contar con ellos, a Giovi, Gise, Karla, Pame con las cuales vivimos todas las aventuras universitarias que más que amigas son como hermanas.

A mi Anyi querida, una persona bella por dentro y por fuera, no puedo creer que pase tan rápido el tiempo, pero marcaste una etapa en mi vida gracias Anyi.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas gracias por preocuparse por esta tesis y hacerla suya.

A los pacientes de la Microred Kiteni, por la confianza depositada en nosotros y el permitirnos tomarles las muestras, al Dr. Mario Gil gerente de esta Microred por las facilidades que siempre nos brindó en los Puestos de Salud de Kiteni, Kepashiato e Ivochote.

Finalmente, esta tesis no habría podido ver la luz sin el apoyo recibido por el proyecto "Control de la leishmaniosis en el Departamento de Cusco, Perú" financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID); con el aval del Convenio Marco de Colaboración entre la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y la Universidad de La Laguna de Tenerife, España; muchísimas gracias Dr. Basilio Valladares Hernández responsable del proyecto en Iberoamérica.

Resumen	
Introducción	
Formulación del Problema	
Justificación	
Hipótesis	
Objetivos	
Antecedentes	
<b>CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
1.1 Género <i>Leishmania</i> .-	1
1.2 Posición Sistemática.-	1
1.3 Formas y Ciclo Biológico.-	4
1.4 Aspectos Clínicos.-	6
1.4.1 Leishmaniasis Cutánea.-	7
1.4.2 Leishmaniasis cutáneo difusa.-	9
1.4.3 Leishmaniasis mucocutánea.-	9
1.5 Genética de <i>Leishmania</i> .-	11
1.6 Diagnóstico de <i>Leishmania</i> .-	12
1.6.1 Métodos Directos.-	12
1.6.1.1 Frotis de la lesión.-	12
1.6.1.2 Cultivo de <i>Leishmania</i> .-	12
1.6.1.3 Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR).-	12
1.6.2 Métodos Indirectos.-	13
1.6.2.1 Intradermorreacción de Montenegro.-	13
1.6.2.2 Enzima Inmunoensayo (ELISA).-	13
1.6.2.3 Inmunofluorescencia.-	13
1.7 Tratamiento de <i>Leishmania</i> .-	14
1.8 Caracterización de <i>Leishmania</i> .-	14
1.8.1 Técnicas fenotípicas de caracterización.-	15
1.8.2 Técnicas genotípicas de caracterización.-	15
1.8.2.1 Hibridación con sondas de DNA.-	16
1.8.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa y variantes.-	16
1.8.2.2.1 PCR-RFLP.-	16
1.8.2.2.2 Amplificación al azar de fragmentos polimórficos.-	17

## CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de Ejecución.-	20
2.2 Zona de Estudio.-	20
2.3 Materiales.-	22
2.3.1 Material Biológico.-	22
2.3.2 Materiales de Laboratorio.-	23
2.4 Metodología.-	26
2.4.1 Obtención de muestras y cultivo de parásitos.-	26
2.4.2 Aislamiento de DNA de parásitos.-	26
2.4.3 Determinación de la concentración de DNA.-	27
2.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).-	28
2.4.4.1 Amplificación al azar de fragmentos polimórficos.-	28
2.4.5 Visualización y evaluación de los productos de la PCR.-	28
2.4.5.1 Electroforesis en geles de agarosa.-	28
2.4.6 Evaluación de los productos de amplificación con el software <i>Quantity One</i>	29
2.4.7 Estimación de la similitud taxonómica.-	29

## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Muestreo y Aislamientos de cepas de <i>Leishmania</i> .-	32
3.2 Factores que favorecen la presencia de la enfermedad.-	34
3.3 Estandarización de la técnica RAPD.-	35
3.4 Productos de amplificación obtenidos mediante RAPD.-	36
3.5 Caracterización e Identificación de las cepas de <i>leishmania</i> aisladas de pacientes.-	41
CONCLUSIONES.-	52
SUGERENCIAS.-	53
Bibliografía Consultada.-	54
Anexos.-	61

## Resumen

Mediante la técnica de Amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD), utilizando el cebador OPC-20, se logró diferenciar los aislamientos provenientes de pacientes de la Microred de Salud de Kiteni, se aislaron 48 cepas de *Leishmania* a partir de lesiones cutáneas y/o mucosas. Se estandarizó la técnica a las condiciones del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC; para lo cual se utilizó el DNA de cepas de referencia correspondiente a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, y *Leishmania* (V.) *lainsoni*; los productos de amplificación se revelaron mediante el uso de geles de agarosa al 1.5%. Con ayuda del documentador de geles y el software *Quantity One*, se procedió a determinar el tamaño molecular de los productos de amplificación de cada una de las cepas problema y los patrones utilizados. Para realizar la evaluación cuantitativa, se procedió a construir una matriz básica de datos teniendo en cuenta la presencia (1) y ausencia (0) de los productos de amplificación; utilizando el software *Past* se procedió a hallar el índice de similitud utilizando el índice de Jaccard, es así que se encontraron: 18 cepas cuyos índices de similaridad se encuentran entre 0.6 y 1.0 que corresponden a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, 3 cepas cuyos índices de similaridad están entre 0.5 y 0.8 que corresponde a *Leishmania* (V.) *guyanensis*, 2 cepas cuyos índice de similaridad es 1.0 que corresponde a *Leishmania* (V.) *lainsoni* y 25 cepas cuyos índices de similaridad no se asemejaron a ningún patrón usado en el estudio y se señalan como *Leishmania spp.*

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae, es considerada como una enfermedad olvidada a nivel mundial ya que más de 12 millones de personas se encuentran infectadas y se citan 2 millones de casos nuevos cada año. Esta enfermedad afecta a las poblaciones más pobres de los países en vías de desarrollo y en 88 países la enfermedad es considerada como endémica (World Health Organization-WHO, 2007). Esta enfermedad tiene una amplia gama de síntomas clínicos y se manifiesta de diferente manera según la especie de *Leishmania* infectante (World Health Organization -WHO, 2010). *Leishmania* es el causante de severas infecciones que afectan la piel, órganos internos y mucosas. En Perú se encuentran dos formas de la enfermedad, la leishmaniosis andina (uta) y la leishmaniosis selvática (espundia) (Organización Panamericana de Salud- OPS, 1996).

La incidencia de la leishmaniosis viene en aumento debido a los cambios ambientales provocados por el hombre; la extracción de madera, minería, ampliación de áreas de cultivo, creación de sistemas de irrigación, construcción de carreteras en bosques primarios son las principales causas para el aumento de la exposición humana al mosquito vector (Vidyashankar, *et. al.*, 2002)

La Provincia de La Convención por sus características ecológicas de temperatura y humedad constituye una zona endémica de la leishmaniosis (Oficina General de Epidemiología- MINSA, 2005). Echarate continua siendo el distrito con mayor número de casos de leishmaniosis mucocutánea, notificando aproximadamente la cuarta parte de los casos reportados a la Dirección Regional de Salud de Cusco- DIRESA Cusco (Oficina General de Epidemiología-MINSA, 2004).

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos y de laboratorio. Los exámenes de laboratorio son el examen directo o frotis y cultivo, la desventaja de ambos es la baja sensibilidad, lo cual está relacionado a diversos factores entre los que se encuentran, el tiempo de la lesión, la ubicación de la misma y también la destreza del analista al realizar la toma de muestra y la respectiva lectura. Para mejorar el diagnóstico de laboratorio, a nivel mundial se vienen desarrollando



técnicas de Biología Molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas de hibridación (*Southern blot*), y otras variaciones de la PCR como PCR-Elisa.

El diagnóstico oportuno permite al paciente recibir tratamiento de forma inmediata. Al respecto Llanos, *et.al.* (2008) y Sierra, *et.al.* (2001) mencionan que uno de los factores para la falla en el tratamiento con antimoniales es la especie de parásito de *Leishmania* infectante. Es por ello que se hace necesaria la caracterización molecular de las diferentes especies de *Leishmania* que son responsables de la enfermedad en las distintas zonas endémicas. El método estándar para la caracterización de cepas de leishmania es la electroforesis de isoenzimas, además de ésta técnica se han desarrollado otros métodos inmunológicos y moleculares; en éste último grupo se encuentra la técnica de amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD) cuyas siglas provienen del inglés *Random Amplification Polymorphic dimorphism* (Hanofi, *et. al.*; 2001). El RAPD es una modificación de la PCR convencional, y es utilizado para la caracterización de diversos organismos, así como para estudios de filogenia.

En el presente trabajo de investigación se aplicó la técnica de RAPD, para la caracterización molecular de cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes de la Microred de Salud de Kiteni, Distrito de Echarate, Provincia de La Convención. La toma de muestra de pacientes se llevó a cabo en Centros de Salud de Kiteni, Kepashiato y el Puesto de Salud de Ivochote, pertenecientes a la Microred de Salud Kiteni y la parte experimental se desarrolló en el laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

## **FORMULACION DEL PROBLEMA:**

¿Cuáles son las especies de *Leishmania* responsables de la leishmaniosis en la Microred de Salud de Kiteni, Distrito de Echarate, Provincia de La Convención?

## **JUSTIFICACIÓN**

Según los reportes epidemiológicos, el Cusco ocupa el segundo lugar con mayor incidencia de leishmaniosis cutánea y el primer lugar con mayor incidencia de leishmaniosis mucocutánea (OGE, 2004), donde el Distrito de Echarate, Provincia de La Convención es el que reporta el mayor número de casos para los años 2007 y 2008. (Red Nacional de Epidemiología- RENACE, 2009)

La caracterización temprana de parásitos es importante para un mejor conocimiento del comportamiento de la enfermedad, para seguir su curso clínico y tener mejor control de la misma en la zona endémica; una de las herramientas moleculares que contribuye a este conocimiento es la Técnica de RAPD mediante la cual se puede identificar al género *Leishmania* no habiendo sido utilizada hasta el momento en nuestra región.

## **HIPÓTESIS**

El uso del cebador OPC-20 utilizando la técnica RAPD permitirá identificar las especies de *Leishmania* aisladas de pacientes con lesiones cutáneas y mucosas de la Microred de Salud de Kiteni.

## **OBJETIVOS:**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar molecularmente las especies de *Leishmania* aisladas de pacientes de la Microred de Salud de Kiteni, distrito de Echarate, provincia de La Convención mediante la técnica de RAPD

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar las cepas de *Leishmania* a partir de las lesiones de pacientes que provienen de los distintos poblados pertenecientes a la Microred de Salud de Kiteni, distrito de Echarate, provincia de La Convención.
- Estandarizar la técnica de RAPD con DNA de cepas de referencia de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, y *Leishmania* (V.) *lainsoni*.
- Caracterizar molecularmente e identificar mediante RAPD los aislamientos obtenidos en la Microred de Salud de Kiteni, Distrito de Echarate, provincia de La Convención.

## ANTECEDENTES

**Baptista, C. et. al. 2008 (Brasil)** Identificaron genotipos de *L. (V.) braziliensis* en lesiones de pacientes con manifestaciones típicas y atípicas de *Leishmania tegumentaria*, las técnicas utilizadas fueron Multilocus Enzyme Electrophoresis MLEE, Random Amplification Polymorphic dimorphism RAPD y Low Stringency Single Specific Primer LSSP-PCR. Se analizaron 34 muestras con la técnica de MLEE y se demostró similar perfil electroforético con la cepa de referencia para *L. (V.) braziliensis*, mediante la técnica RAPD se identificaron nueve perfiles genéticos. Por la técnica de LSSP-PCR se corroboró los resultados anteriores y el análisis fenético agrupó a los aislamientos en dos clados mayores que comprenden 9 diferentes genotipos. Los resultados de esta investigación apoyan la idea que existe poca diversidad genotípica en *L. (V.) braziliensis* presente en el Estado de Río de Janeiro. Demostraron así el uso de los marcadores moleculares como herramientas para estudios de variabilidad genética.

**Cuervo, P. et. al. 2004 (Brasil)** Trabajaron con diez pares de cepas de *Leishmania* del subgénero Viannia, aisladas de lesiones cutáneas y mucosas de un pacientes. El objetivo fue realizar análisis genotípicos para determinar si las poblaciones de *Leishmania* son las mismas en las lesiones afectadas. La caracterización de las cepas se hizo por la técnica MLEE y reactividad de anticuerpos monoclonales y los estudios genéticos mediante PCR – RFLP y RAPD, llegando a la conclusión que es posible mediante estas técnicas distinguir aquellas cepas de *L.(V.) braziliensis* capaces de producir metástasis, pero que se necesitan mayores estudios del polimorfismo genético.

**Zemanová, E. et. al. 2004 (Reino Unido)** Usaron RAPD para detectar la diversidad intraespecífica del complejo *Leishmania donovani*, utilizaron 15 cepas y se generaron 902 amplicones, los que produjeron perfiles específicos por especie y se armaron 3 árboles filogenéticos que demostraron una fuerte correlación entre el polimorfismo genético de las cepas estudiadas y su origen geográfico.

**Martínez, E. et. al. 2003 (España)** Utilizaron la técnica de RAPD como un método para distinguir especies de *Leishmania*. Utilizando el primer OPC-20, lograron diferenciar las

especies de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) trópica* y *L. (L.) infantum.*, demostrando la utilidad de la técnica para diferenciar especies.

**Bañuls, A. et. al. 2000 (Perú)** Realizaron un estudio con 38 muestras de *Leishmania* de los Valles Andinos de Perú que fueron caracterizados por electroforesis de isoenzimas (MLEE) y RAPD, los datos fueron analizados en términos de taxonomía y evolución genética. Los estudios mediante estas técnicas apoyaron que *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* se encuentran muy relacionadas pero presentan diferentes líneas monofiléticas (clados). Demostraron que los datos de la técnica de RAPD fueron consistentes con la hipótesis que la muestra de *L. (V.) peruviana* presenta una estructura de población clonal con intercambio limitado y no genético.

**Bañuls, A. et. al. 1999 (Ecuador)** En un estudio epidemiológico en Ecuador aislaron 28 cepas de pacientes clínicamente diagnosticados, 1 cepa proveniente de un perro y 4 cepas de vectores. Para la caracterización genética de estas muestras se utilizaron las técnicas de MLEE y RAPD; 26 de las 35 cepas fueron identificadas como *L. (V.) panamensis* o *L. (V.) guyanensis*; 2 cepas fueron caracterizadas como híbridos entre *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*, estos datos demuestran que en Ecuador la diversidad genética es alta y que *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* son el grupo dominante en ese país, los análisis de genética poblacional realizados en el grupo de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* apoyan a la hipótesis de una estructura poblacional clonal básica.

# CAPÍTULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Género *Leishmania*.-

*Leishmania* es un protozooario dimórfico perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Dentro del género *Leishmania* (orden kinetoplastida), morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica. Existen en todo el mundo cerca de 30 especies que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre. En el nuevo mundo, existen reconocidas un total de 20 especies, llamadas *Leishmanias* neotropicales, de las cuales 14 son conocidas que infectan al hombre (Herwaldt, B. 1998).

### 1.2. Posición Sistemática.-

*Leishmania* presenta pocos criterios morfológicos que ayuden a su clasificación. El criterio inicial que se utilizó fueron las características extrínsecas como por ejemplo las manifestaciones clínicas, factores geográficos, factores epidemiológicos, y otros. Sin embargo se trata de variables poco constantes que dependen del estado inmunológico del huésped humano, las especies y el comportamiento del vector (Grimaldi, G. 1993).

Dentro de los criterios extrínsecos, Lainson y Shaw utilizaron el desarrollo de *Leishmania* en el tubo digestivo del vector para diferenciar a dos subgéneros, *Suprasyllaria* (*Leishmania*) y *Peripsyllaria* (*Viannia*). Las primeras se desarrollarían en el segmento de tubo digestivo anterior al píloro y las segundas en píloro y por detrás del mismo. Una tercera sección *Hipopsyllaria* (*Sauroleishmania*) corresponde a especies no patógenas para el ser humano y propias de reptiles (Lainson, R. y Shaw, J.J., 1979).

Desde 1970, se vienen usando criterios intrínsecos para la caracterización de especies de *Leishmania* dentro de ellos se encuentran las técnicas inmunológicas, bioquímicas y genéticas. Las más utilizadas son las técnicas bioquímicas de caracterización fenotípica entre ellas la caracterización de isoenzimas y los anticuerpos monoclonales (Bañuls, A. *et. al.*; 2007).

La posición sistemática del género *Leishmania* es la siguiente:

- Reino** Protista (Haecker, 1986)
- Subreino** Protozoa (Goldfuss, 1817)
- Phylum** Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)
- Supbhylum** Mastigophora (Diesing, 1866)
- Clase** Zoomastigophora (Calkins, 1909)
- Orden** Kinetoplastida (Honigberg, 1963. Vickerman, 1976)
- Familia** Trypanosomatidae (Döflein, 1901. Grobben, 1905)
- Género** *Leishmania* (Ross, 1903)

Fuente: Lainson, R., Shaw, J.J., 1987

La organización Mundial de la Salud, distingue 7 complejos dentro del género *Leishmania*: Complejo de *Leishmania donovani*, *Leishmania trópica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* (Figura N°01) (WHO, 1990).

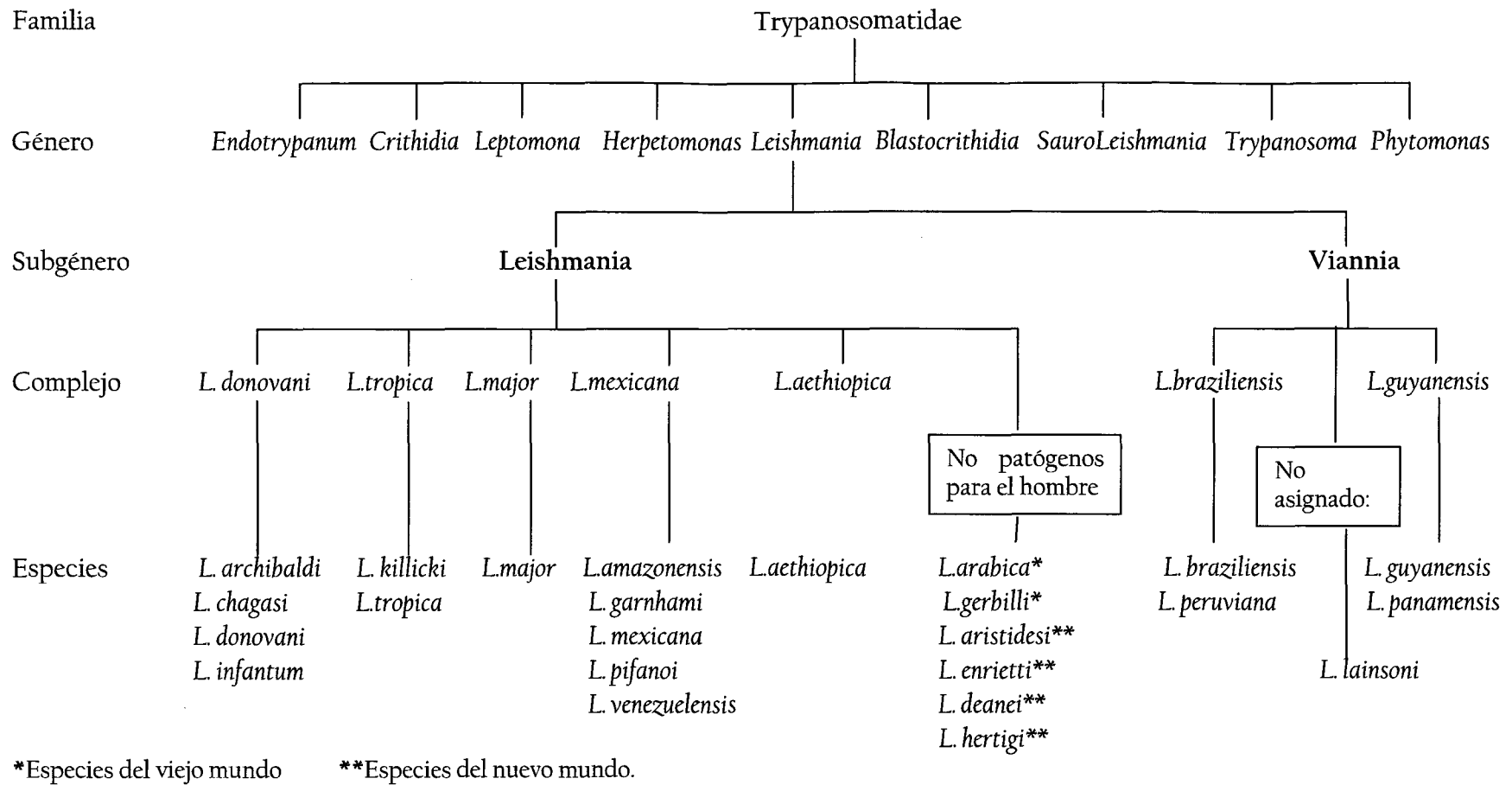


Figura N° 01: Taxonomía del género *Leishmania* (WHO 1990)



### 1.3 Formas y Ciclo biológico.-

El ciclo evolutivo de *Leishmania* transcurre en dos hospederos: un vertebrado (hombre y otros mamíferos susceptibles) y un invertebrado (insecto hembra hematófago del género *Lutzomya*, en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo). En el flebótomo se desarrollan dos formas evolutivas en el tubo digestivo: una forma flagelada llamada promastigote, con capacidad de multiplicarse por división binaria longitudinal y otra forma que se diferencia morfológica y fisiológicamente para pre adaptarse al hospedero mamífero en la forma promastigote metacíclico (Cuba, C.A., 2000).

Las dos formas morfológicas principales de *Leishmania* son, la intracelular o amastigote, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado, y la forma extracelular o promastigote localizada en el tracto intestinal del vector invertebrado (Handman, E., 1999).

Los amastigotes son intracelulares, redondeados o fusiformes, con un diámetro de aproximadamente 5µm. Tienen un único núcleo, un kinetoplasto y un reservorio flagelar donde se encuentran los rudimentos de un flagelo conocido como rizoplasto, el cual está asociado al kinetoplasto que tiene una forma bacilar. La forma amastigote es la que se encuentra en los monocitos y macrófagos, están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de este, aquí residen y se multiplican por división simple (INS, 2000; Handman E. 1999). (Figura N° 02)

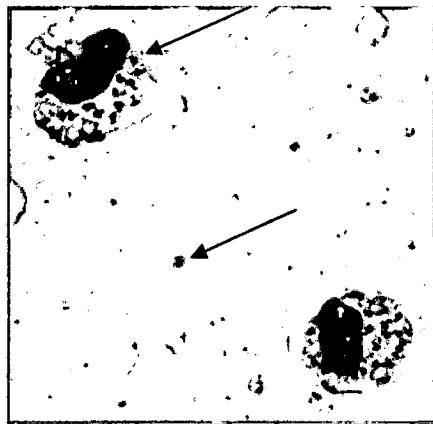


Figura N°02 Amastigotes de *Leishmania* spp. La figura muestra una tinción con el colorante Giemsa de amastigotes de *Leishmania* dentro y fuera de los macrófagos. Se puede observar el núcleo y el kinetoplasto del parásito.

Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>

Los promastigotes se encuentran en el intestino del mosquito vector. Son alargados, con un núcleo central y un kinetoplasto terminal, con un flagelo bien desarrollado que usan tanto para la propulsión como para fijarse a las microvellosidades del intestino del mosquito. Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando éstos intentan tomar sus alimentos. Tanto los amastigotes como los promastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal (Killick-Kendrick R., 1990) (Figura N° 03).



Figura N° 03 Promastigotes de *Leishmania*, teñidos con Giemsa

Fuente: [http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/G-L/Leishmaniasis/body\\_Leishmaniasis\\_il4.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_il4.htm)

El ciclo biológico (Figura N° 04), empieza cuando el insecto pica un vertebrado susceptible, las formas metacíclicas son inoculadas en la piel y dermis, y son fagocitadas por las células del Sistema Fagocitario Mononuclear (SFM). Las células invadidas permiten la transformación de las formas flageladas en formas amastigotes, en el interior de las vacuolas parasitóforas. Los amastigotes de *Leishmania* tienen la capacidad de evadir la acción parasiticida de las células del SFM y además de multiplicarse por división binaria simple asexual. Muchas de esas células liberan los amastigotes, en tanto que otras células, fagocitan los parásitos disseminando así el parasitismo en los tejidos, nódulos linfáticos y otras localizaciones tegumentarias (Cuba, C.A., 2000).

En los seres humanos la mayoría de infecciones de *Leishmania* conllevan a casos asintomáticos; sin embargo cuando se declara la enfermedad, esta se

expresa en una variedad de formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. Por estas razones *Leishmania* es un modelo biológico complejo desde los puntos ecológicos, genéticos y filogenéticos (Bañuls, A., *et. al.*, 2007).

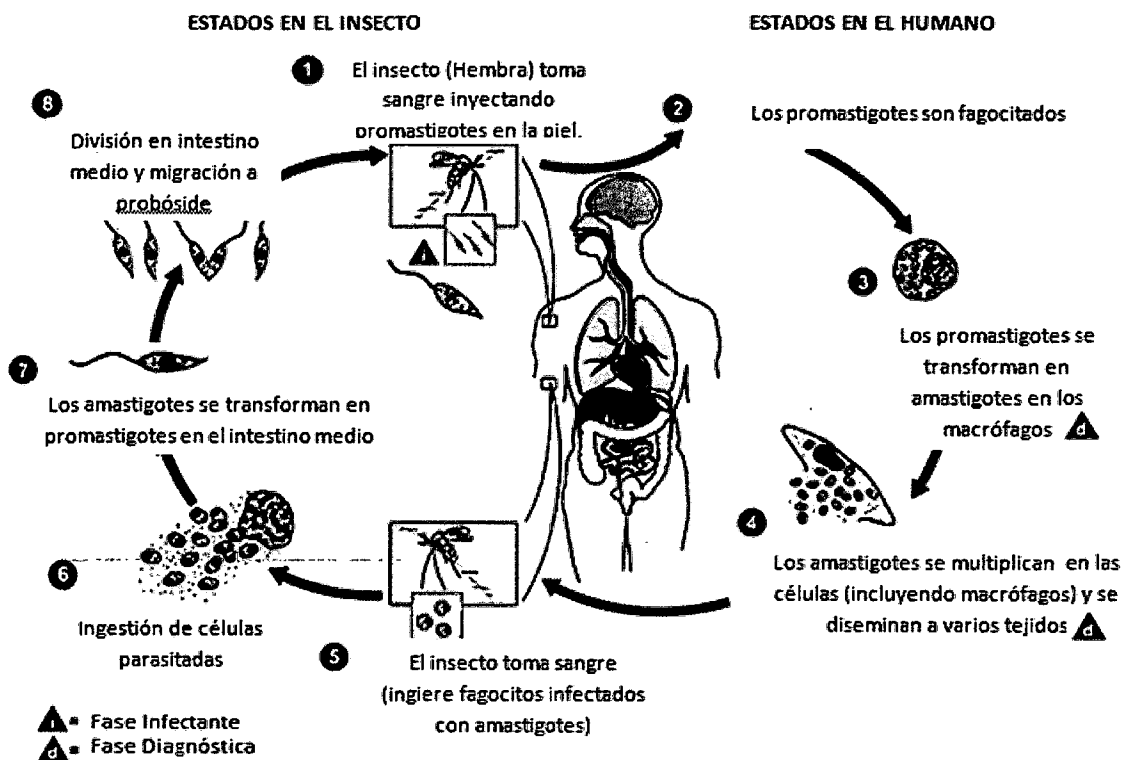


Figura N° 04 Ciclo biológico de *Leishmania*

Fuente: Center of Disease Control and prevention

## 1.4 Aspectos Clínicos

Se considera que al menos 20 especies de *Leishmania*, son responsables de las cuatro formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. Cada una de ellas con sus peculiaridades (OMS, 2000).

Teniendo en cuenta que en la provincia de La Convención predomina la presencia de las formas cutánea y mucocutánea, se describen a continuación:

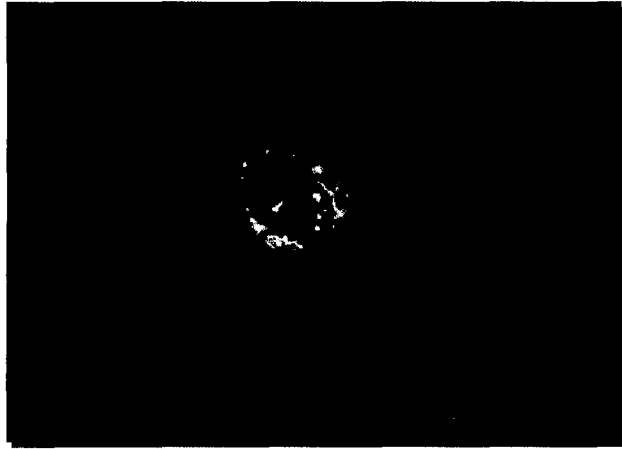
#### 1.4.1 Leishmaniasis cutánea.-

Los agentes causales más comunes de la *Leishmaniasis* cutánea son: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) mexicana*. Cada especie tiene diferentes patrones epidemiológicos y demográficos (Navin, T.R., *et. al.*, 1992). La aparición de estas lesiones está asociada a la picadura del vector, el periodo de incubación para desarrollar la enfermedad varía de semanas a meses, un trauma local puede activar una infección latente (INS, 2000). Las primeras manifestaciones son pequeñas lesiones caracterizadas por máculas rosadas o rojas, pruriginosas, del tamaño de la cabeza de un alfiler o de una lenteja, que tiene semejanza a las picaduras de los insectos. A los pocos días éstas se elevan y adquieren un carácter papuloso, con estas características de la lesión primaria, es difícil detectar esta patología en su fase inicial, pasando a veces desapercibida incluso por el propio enfermo, en promedio, después del periodo de incubación, esta lesión inicial se ulcera espontáneamente y se recubre de un líquido amarillento y adherente, que posteriormente da lugar a la costra. Debajo de esta costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad y además pueden aparecer lesiones satélites que pueden unirse a la inicial y dan lugar a una gran ulceración (INS, 2000).

La úlcera característica es generalmente redondeada, indolora (aparentemente los parásitos de *Leishmania* poseen una toxina que afecta el nervio periférico), con bordes bien definidos, levantados e indurados y cortados en forma de sacabocado (Fotografía 1), lo que hace que se asemeje a la imagen de un cráter. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granuloso de color rojizo, limpio y exudando líquido no purulento. Sin embargo, cuando se presentan infecciones bacterianas oportunistas, esta úlcera puede volverse dolorosa, exudativa y purulenta (González, A.C., 2003).

La mayoría de las lesiones se cicatrizan espontáneamente durante un periodo de unos cuantos meses (a veces suele durar más de 12 meses), la cicatriz de leishmaniosis es típica ya que en el centro de la misma presenta una despigmentación y los bordes se mantienen pigmentados, esta cicatriz presenta adelgazamiento de la piel (Reithinger, R., *et. al.*, 2007).

La forma cutánea puede producir hasta 200 lesiones y por lo tanto produce discapacidad, por otro lado el paciente se queda de forma permanente con cicatrices y puede llegar a ser excluido socialmente (WHO, 2010).



**Fotografía N°01:** Leishmaniasis cutánea: Lesión cutánea ulcerosa donde se observan los bordes definidos  
Autor: Pérez, E.; 2010

Para el año 2008, 530 distritos del Perú informaron casos probables y confirmados de leishmaniosis cutánea, la Red Nacional de Epidemiología (RENACE, 2009) indica a Cusco como una zona de alto riesgo, existen más de 300 casos por cada 100 000 habitantes y se encuentran distribuidos principalmente en el Valle de la Convención, tal como se muestra en el mapa de distribución de leishmaniasis cutánea (Figura N° 05)

Si bien es cierto se indica que el número de casos ha disminuido, también existen casos que no se notifican o no se llegan a diagnosticar; por lo tanto las estadísticas oficiales tienen un valor escaso para determinar el número real de enfermos (OMS, 1990).

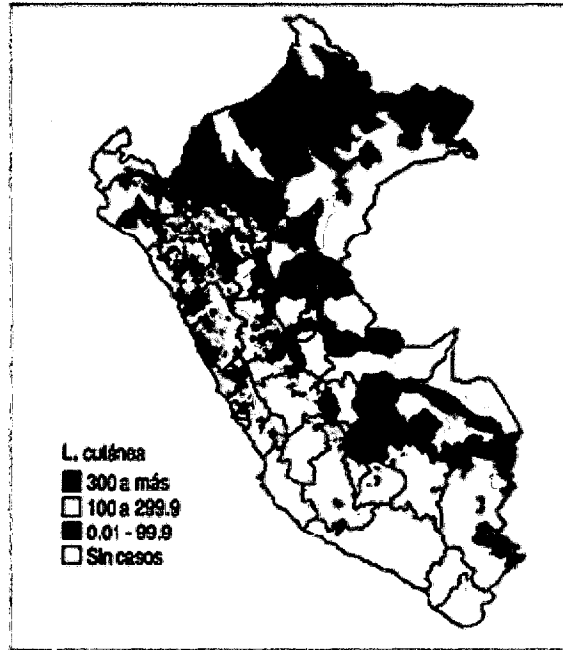


Figura N° 05: Distribución de la *Leishmaniasis* cutánea en Perú  
Fuente: RENACE; 2008

#### 1.4.2 Leishmaniasis cutánea difusa.-

Se caracteriza por la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrucosas. Las lesiones muestran generalmente límites imprecisos que da un aspecto que recuerda a la lepra lepromatosa. La enfermedad se inicia bajo la forma de lesiones localizadas y poco a poco se disemina por todo el cuerpo. Estas lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento. (INS, 2000)

#### 1.4.3 Leishmaniasis mucocutánea.-

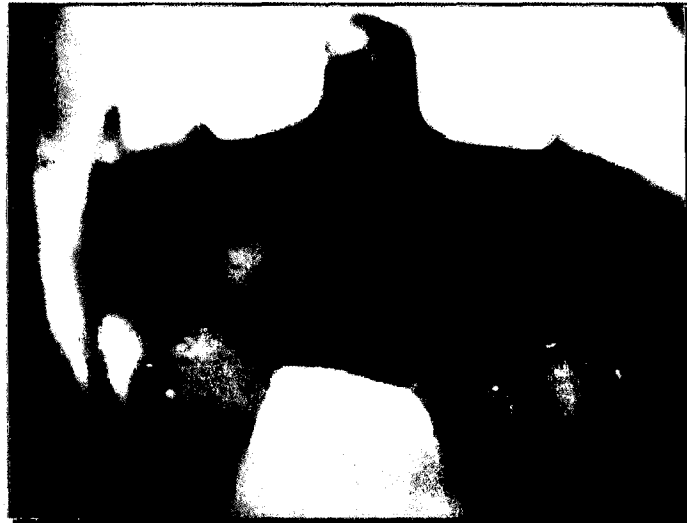
La forma mucocutánea es la forma crónica de la leishmaniasis, esta forma es la más predominante en Sudamérica, en efecto *L. (V.) braziliensis* y otras especies del parásito tales como: *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* han sido relacionadas con esta forma (González *et. al.*, 2009).

Las lesiones mucosas pueden aparecer existiendo todavía las manifestaciones cutáneas o cuando estas ya han cicatrizado que es lo más frecuente. En los

casos de lesiones mucosas ya no existe la tendencia a la cura espontánea, los pacientes que sufren de esta forma de la enfermedad generalmente son aislados y son víctimas del prejuicio y discriminación, debido a la mutilación y destrucción de los tejidos blandos (WHO, 2010).

La lesión mucosa se inicia en el septum cartilaginoso, cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación, ulceración de toda la mucosa, ulceración del cartílago, y al destruir la mucosa del otro lado se produce la perforación que puede dar destrucción parcial o total del tabique, esto determina la caída de la punta de la nariz. Las lesiones en la boca comprometen generalmente al paladar, los pilares, la úvula y secundariamente vienen los procesos destructivos, las amígdalas raramente son afectadas, las lesiones del paladar son con más frecuencia proliferativas que destructivas, la úvula suele hipertrofiarse o ulcerarse y algunas veces puede desaparecer (Fotografía N° 02) (INS, 2000).

Según datos de RENACE, la región del Cusco también notifica 100 o más casos por cada 100 000 habitantes de leishmaniosis mucocutánea tal como lo muestra el mapa de distribución de leishmaniosis mucocutánea (Figura N° 06).



**Fotografía N° 02:** Leishmaniasis mucocutánea: Se puede observar la pérdida de la úvula  
Autor: Pérez, E.; 2010

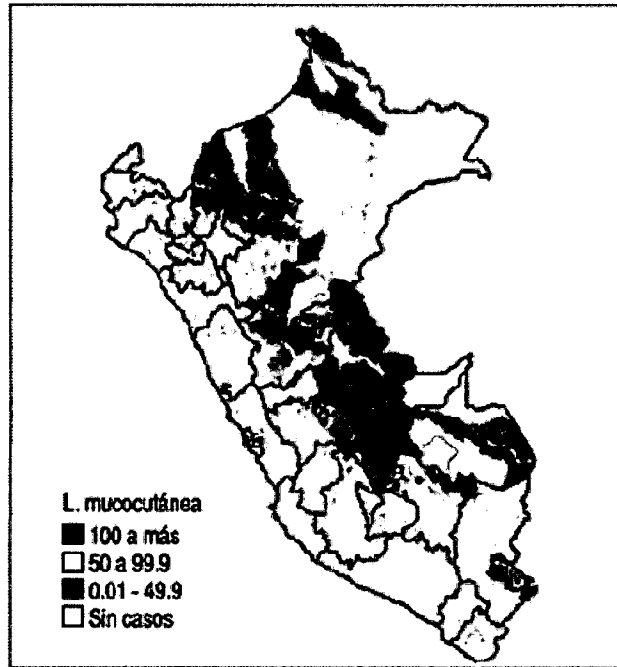


Figura N°06: Distribución de la *Leishmaniasis mucocutánea* en Perú

Fuente: RENACE; 2008

### 1.5 Genética de *Leishmania*

Los tripanosomátidos poseen dos genomas: DNA nuclear y DNA mitocondrial (DNA de kinetoplasto). El DNA del kinetoplasto constituye del 10 al 30 % del DNA celular total, es rico en A+T (72-73%) y está formado por numerosas moléculas de DNA circulares concatenadas entre sí como si fuera una red de círculos, que dependiendo de su tamaño reciben el nombre de maxicírculos y minicírculos. En los minicírculos están los RNA ribosomales (rRNA) y los RNA guías (gRNA), respectivamente. Los gRNAs juegan un papel importante en la edición de los RNA mensajeros (mRNA) mitocondriales (Bañuls, A., *et. al.*, 2007).

Las especies de *Leishmania* del nuevo mundo presentan 34 o 35 cromosomas. Los cromosomas son lineales y se encuentran entre 200 a 4000 Kb de longitud presentan centrómeros pero no están identificados y el tamaño es variable y es característico de algunas especies de *Leishmania*, complicando el uso de cariotipos para estudios de taxonomía (Bañuls, A., *et. al.*, 2007).



## **1.6 Diagnóstico de *Leishmania***

### **1.6.1 Métodos Directos.-**

#### **1.6.1.1 Frotis de la lesión.-**

En el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea la obtención de las muestras debe ser efectuada a partir de lesiones activas de la piel o mucosas, teniendo en cuenta que ésta debe realizarse en los bordes de la lesión, después de eliminar la zona superior necrosada.

Este examen consiste en la realización de un frotis de exudado de la lesión o de la extensión tras punción-aspiración con una aguja fina; la toma de muestra se lleva a cabo inyectando suero fisiológico en la lesión y aspirando después con una aguja fina. Otro procedimiento consiste en hacer una pequeña incisión con bisturí en el borde de la lesión y tomar el exudado. La tinción con Giemsa del frotis permite ver los amastigotes dentro o fuera de los macrófagos como cuerpos redondeados u ovals, de color azul claro, con un núcleo y un kinetoplasto, ambos de color púrpura, en el interior de su citoplasma (Salman, S.M., *et. al.*, 1999).

#### **1.6.1.2 Cultivo de *Leishmania*.-**

El cultivo de *Leishmania* consiste en el aislamiento de formas promastigotes in vitro a partir del material obtenido por aspirado de las lesiones mucosas y cutáneas, los medios más utilizados son los bifásicos con base de agar sangre y los medios líquidos enriquecidos con suero fetal bovino; esta técnica ofrece ventajas sobre el frotis debido a la fácil observación de formas promastigotes móviles (MINSA, 1997).

Un cultivo se hace positivo en un promedio de 6 a 21 días, en pocos casos se obtuvo crecimiento en 18 horas (Hendricks, L., Wright, N., 1979).

#### **1.6.1.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).-**

Diversas zonas del genoma del parásito de *Leishmania* han sido útiles para el diseño de cebadores, la zona más utilizada para el diagnóstico de la enfermedad ha sido la de DNA del kinetoplasto (kDNA), su sensibilidad es idéntica o superior a la técnica de referencia (cultivo); esta sensibilidad está de

acuerdo con la calidad y cantidad de muestra obtenida, respecto al frotis presenta mayor sensibilidad, y tiene la ventaja de tener los resultados de una forma rápida, actualmente esta técnica solo se usa en laboratorios especializados.

## **1.6.2 Métodos Indirectos.-**

### **1.6.2.1. Intradermorreacción de Montenegro.-**

Esta técnica utiliza la reacción inmunológica específica mediada por células. El método se basa en poner en evidencia una hipersensibilidad de tipo retardada, que se manifiesta de forma temprana (hacia la cuarta o quinta semana) y que, salvo raras ocasiones, perdura toda la vida. La prueba consiste en la inoculación intradérmica de una solución de leishmanina, formada por una suspensión estéril de promastigotes lisados, fenicada y tamponada. La lectura de los resultados se realiza, por la técnica del bolígrafo, a las 48-72 h de la inoculación y se considera positiva cuando aparece una induración de un diámetro igual o superior a los 5 mm. La reacción positiva indica contacto previo y tiene gran valor en el estudio de lesiones crónicas o evaluaciones epidemiológicas (Da Costa, C.A., *et. al.* 1996).

### **1.6.2.2. Enzima Inmunoensayo (ELISA).**

Este método utiliza un antígeno, que puede ser un extracto crudo, proteínas purificadas del parásito o antígenos recombinantes. Como segundo anticuerpo se utiliza anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, obteniéndose una reacción de color que se puede cuantificar con un lector. Es una técnica altamente sensible y específica. Tiene la desventaja de la inestabilidad de las enzimas, y como ventaja el procesamiento simultáneo de varios sueros (Zurita, A.I., 2001).

### **1.6.2.3. Inmunofluorescencia**

La técnica de inmunofluorescencia se basa en la detección de antígenos (Ag) presentes en la membrana de las células.

Las técnicas de inmunofluorescencia se dividen en inmunofluorescencia directa e indirecta:

- **Inmunofluorescencia directa.** Son las que emplean anticuerpos a los que se ha conjugado directamente un fluorocromo.
- **Inmunofluorescencia indirecta.** En estas técnicas el anticuerpo que reconoce el antígeno no está marcado sino que se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo y dirigido contra la especie del primero. Una variante de estas técnicas es la que utiliza el primer anticuerpo conjugado con biotina y posteriormente se añade avidina o estreptavidina conjugada con el fluorocromo (Roitt, I., *et. al.*, 1998).

### **1.7 Tratamiento de *Leishmania***

El tratamiento de la leishmaniasis es un tema difícil de abordar debido a los factores que influyen en la eficacia de los mismos entre estos: la variación en la sensibilidad de las diferentes especies de *Leishmania*, los factores del huésped tales como la inmunidad, la respuesta clínica variable a los tratamientos, el tiempo de las lesiones tratadas, la toxicidad de la droga, la co-infección y el cumplimiento del tratamiento (Tuon, F.F., *et. al.*, 2008).

No existe un tratamiento eficaz y único para todas las especies de *Leishmania*. La elección de la estrategia de tratamiento se basa en la ubicación geográfica y la especie infectante (Croft, S.L., *et. al.*, 2003).

El tratamiento con pentavalentes sigue siendo la primera elección para combatir la enfermedad, estos contienen compuestos como: estibogluconato sódico y antimonio de meglumina, estos fármacos presentan la desventaja de ser costosos y causan una amplia variedad de efectos adversos (Navin, T.R., *et. al.*, 1992).

### **1.8 Caracterización de *Leishmania***

Como ya se ha comentado, existen aproximadamente 20 especies de *Leishmania* capaces de causar alguna manifestación clínica de la enfermedad. La severidad de la manifestación clínica está ligada a muchos aspectos, donde uno de los principales es la especie infectante responsable. Por lo tanto desde el punto de vista epidemiológico, es importante conocer la distribución de las

especies en las diferentes zonas endémicas y desde el punto de vista clínico es importante para realizar el adecuado tratamiento a los pacientes así como realizar los controles periódicos que eviten complicaciones posteriores.

La clasificación taxonómica de *Leishmania* no está definitivamente cerrada, como se ha explicado anteriormente la clasificación se basa en métodos extrínsecos (basados en el fenotipo) y actualmente se utilizan los métodos de caracterización intrínsecos que analizan el genoma del parásito.

#### **1.8.1. Técnicas fenotípicas de caracterización.-**

El análisis isoenzimático o *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) es aún considerado el método estándar para la identificación de especies de *Leishmania*. El método se basa en la movilidad electroforética distinta de enzimas que tienen la misma función (Marker, C.L., *et. al.*, 1959)

La metodología de electroforesis de isoenzimas consiste en la preparación de extractos solubles de los microorganismos, ya sea por congelación-descongelación o por sonicación (técnica basada en ultrasonido) y posteriormente centrifugación para eliminar células que no se rompen y restos celulares. Tales extractos se colocan en una placa de electroforesis donde en contacto con la carga eléctrica de la superficie molecular, los componentes se desplazan hacia el ánodo a distintas velocidades. Al concluir la electroforesis es posible identificar bandas correspondientes a una determinada enzima si la placa se cubre con un sustrato específico (Cjuno, M., 2000).

La variación del perfil isoenzimático dentro de una misma especie se agrupa en zimodemas, esta técnica presenta muchas desventajas entre ellas es que necesita una gran cantidad de cultivo de *Leishmania* y necesita mucho tiempo para realizarse y es altamente costoso (Bañuls, A.L., *et. al.*, 2007).

#### **1.8.2. Técnicas genotípicas de caracterización.-**

Son técnicas basadas en el análisis del genoma que, en principio, permanece invariable durante toda la vida del parásito; incluso cuando ocurren cambios morfológicos a lo largo de su ciclo biológico, y aún bajo presión del sistema inmune del hospedador (Blackwell, J.M., 1992).

**1.8.2.1. Hibridación con sondas de DNA.-** La región más utilizada para la hibridación con sondas han sido los minicírculos de DNA del kinetoplasto (kDNA), puesto que contienen una región conservada, y están altamente repetidos. Este ensayo se basa en la especificidad de la interacción entre las bases complementarias, para lo cual se necesita una secuencia diana en uno de los fragmentos (obtenidas generalmente por digestión con enzimas de restricción) y un fragmento corto de DNA (sonda) que tenga una secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana y que este marcado para poder detectarlo.

En taxonomía, el uso de estas sondas de kDNA ha permitido la separación de *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*, y dentro del subgénero *Viannia* quedan incluidas las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* (Barker, D.C. y Butcher, J., 1983).

**1.8.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa y variantes.-** La PCR, es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima DNA polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el DNA (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de DNA que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (Mullis, K., *et. al.*, 1986).

**1.8.2.2.1. PCR-RFLP.-** en general, detecta pequeñas variaciones en un gen concreto, ya que el producto amplificado es digerido con diferentes enzimas de restricción que reconocerán o no su diana dependiendo de estas variaciones nucleotídicas. El patrón de bandas que se visualiza tras la electroforesis es útil para distinguir especies del subgénero *Viannia*. Uno de los genes más

utilizados en la caracterización y filogenia de *Leishmania* es el gen de la proteína de membrana de 63kDa, denominada gp63 (Victoir, K., *et. al.*, 1998).

También se entiende por PCR-RFLP la digestión de cualquier producto amplificado y que, al digerirlo, ofrece un patrón distinguible y diferente para cada especie o individuo, como pueden ser los minicírculos de KDNA. Esta aproximación ha sido útil para la detección de *L. (L.) tropica* y posteriores estudios epidemiológicos (Noyes, H.A., *et. al.*, 1998).

#### **1.8.2.2.2. Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA (RAPD)**

La amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD), es una reacción de PCR que utiliza un solo cebador de secuencia arbitraria y de longitud corta (10 bases). Es un método simple que no necesita conocer previamente las secuencias de DNA, los cebadores se unen a sus secuencias complementarias en condiciones adecuadas, generando productos de amplificación de diferentes tamaños cuya identidad se desconoce. La técnica identifica polimorfismos que son detectados como fragmentos de DNA amplificados y que están presentes en una cepa (Williams, J., *et. al.*, 1990).

Normalmente los cebadores de tamaños pequeños son probados individualmente y aquellos que presentan patrones reproducibles de bandas son usados en estudios genéticos; usando esta técnica la variación genética ha sido descrita para muchos parásitos y ha sido usada de manera extensa para estudios de estructura de poblaciones (Tibayrenc, M., *et. al.*, 1993). La técnica de RAPD ha probado ser útil en la diferenciación de especies de *Leishmania* y ha sido usada en estudios moleculares (Hide, M., *et. al.*, 2001; Cuervo, P., *et. al.*, 2004).

La técnica de RAPD es aplicable a todo tipo de organismos en aquellos donde el cruce genético no es factible, ya sea porque la reproducción sexual está ausente o no se puede comprobar de forma experimental, estos casos donde los métodos tradicionales mendelianos no pueden ser aplicados, y para ser

investigados se deben hacer por métodos indirectos. (Tibayrenc, M., *et. al.*, 1993).

Los productos de RAPD son usualmente entre 300 y 2500 pb de tamaño, esta técnica necesita poca cantidad de parásitos, ya que se puede obtener huellas tan pronto los parásitos sean detectados en el sobrenadante del medio de cultivo (Noyes, H.A., *et. al.*, 1996).

Cuando la concentración del DNA molde incrementa se ha observado amplicones de tamaño molecular elevado, es una herramienta útil para evaluar diferencias entre cepas de la misma especie (Noyes, H.A., *et. al.*, 1996; Cupolillo, *et. al.*, 2003).

Se han descrito diversos modos de evaluación de los amplicones producidos por RAPD, se pueden utilizar geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y geles de poliacrilamida coloreados con nitrato de plata. Otras forma de detección es el uso del cebador marcado con compuestos fluorescentes (Quispè, M.A., 2002). A pesar de la facilidad en la realización de la técnica, ésta se hace difícil cuando existen un gran número de muestras a ser examinadas.

#### **A. Mecanismo de Amplificación de la técnica RAPD**

Caetano-Anolles, G. y Bassam, B.J., en 1993, postularon, que este proceso se modula en dos niveles:

- i. Selección de sitios de amplificación, determinada por la secuencia del cebador e influenciada por las condiciones de reacción. Durante los primeros ciclos, el cebador “busca” los posibles sitios de unión en el DNA y se une a éstos. La unión del cebador es seguida por la actuación de la polimerasa con la consiguiente extensión de las cadenas. Así, en la primera rueda de amplificación, se selecciona un conjunto de posibles sitios para producir una población de productos de amplificación determinada. Estos productos deberían ser entonces eficientemente amplificados desde la secuencia complementaria a la del cebador.

- ii. En el segundo nivel de modulación, los productos de amplificación resultantes poseen una región terminal simétrica de, al menos, la longitud del cebador. Estos fragmentos son repetidamente amplificados en cada uno de los ciclos de la PCR. (Figura N° 07)

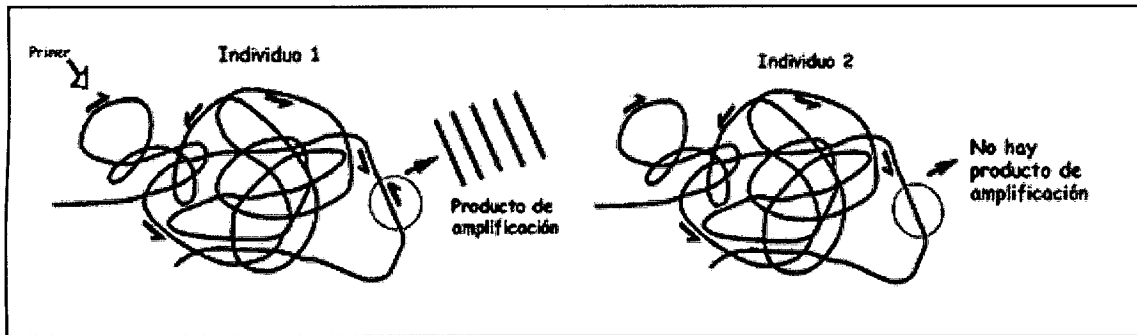


Figura N° 07 Amplificación de la técnica de PCR.

Fuente: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=69>

## B. Repetitividad de la técnica RAPD

Se han realizado diversos experimentos para determinar la repetitividad de la técnica RAPD, muchos autores indican la poca reproducibilidad de la misma y por lo tanto la descartan como una técnica fiable, otros autores por el contrario describen su utilidad y beneficios a la hora de realizar estudios de polimorfismo genético.

Los factores que determinan la reproducibilidad de la técnica son entre otros, los cambios de concentración del ión  $Mg^{2+}$ , la enzima polimerasa utilizada, el termociclador utilizado y la temperatura de hibridación del cebador. Todos estos factores deben de ser tomados en cuenta para poder lograr la reproducibilidad que la técnica requiere (Quispe, M. A., 2002).



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 Lugar de Ejecución.-

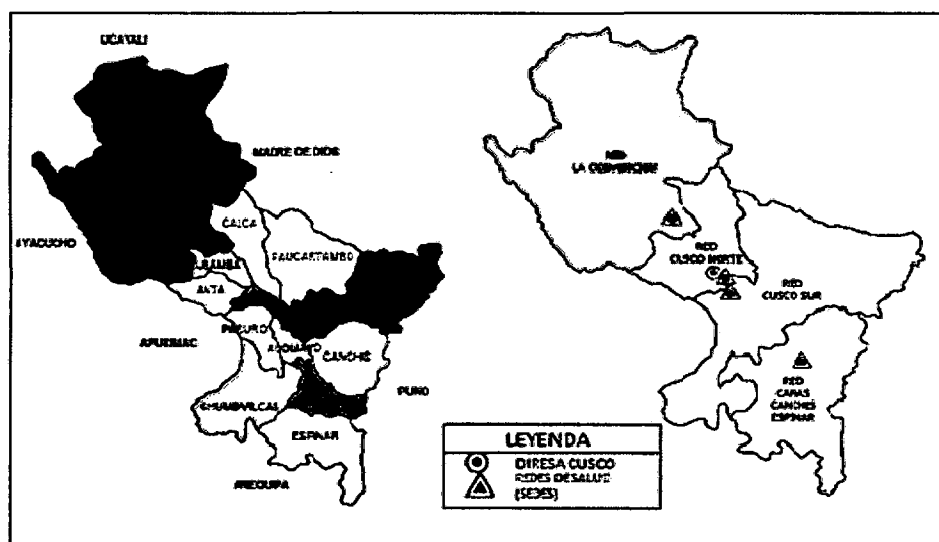
La parte experimental del presente trabajo, fue realizada en el laboratorio de Microbiología e Inmunología C – 223 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

#### 2.2 Zona de Estudio.-

La provincia de La Convención se encuentra localizada en la parte Nor-Oriental del Departamento de Cusco, ocupa la región de la Selva Alta, Selva Baja, con una superficie de 30,061.82 Km<sup>2</sup> y una población aproximada de 166, 833 habitantes, de los cuales el 29.9% pertenece al área rural y el 70.1% pertenece al área urbana. (INEI, 2007).

El Plan de desarrollo Estratégico 2005-2012 señala que Echarate es el distrito más grande de la Provincia de la Convención ubicada en ceja de selva, su extensión equivale a 65.1 % de territorio de la Convención con una superficie de 2'588,500 Ha, los poblados más resaltantes son: Palma Real, Kiteni, Kepashiato, Ivochote, Timpia, Kamisea, Kingueti, entre otros.

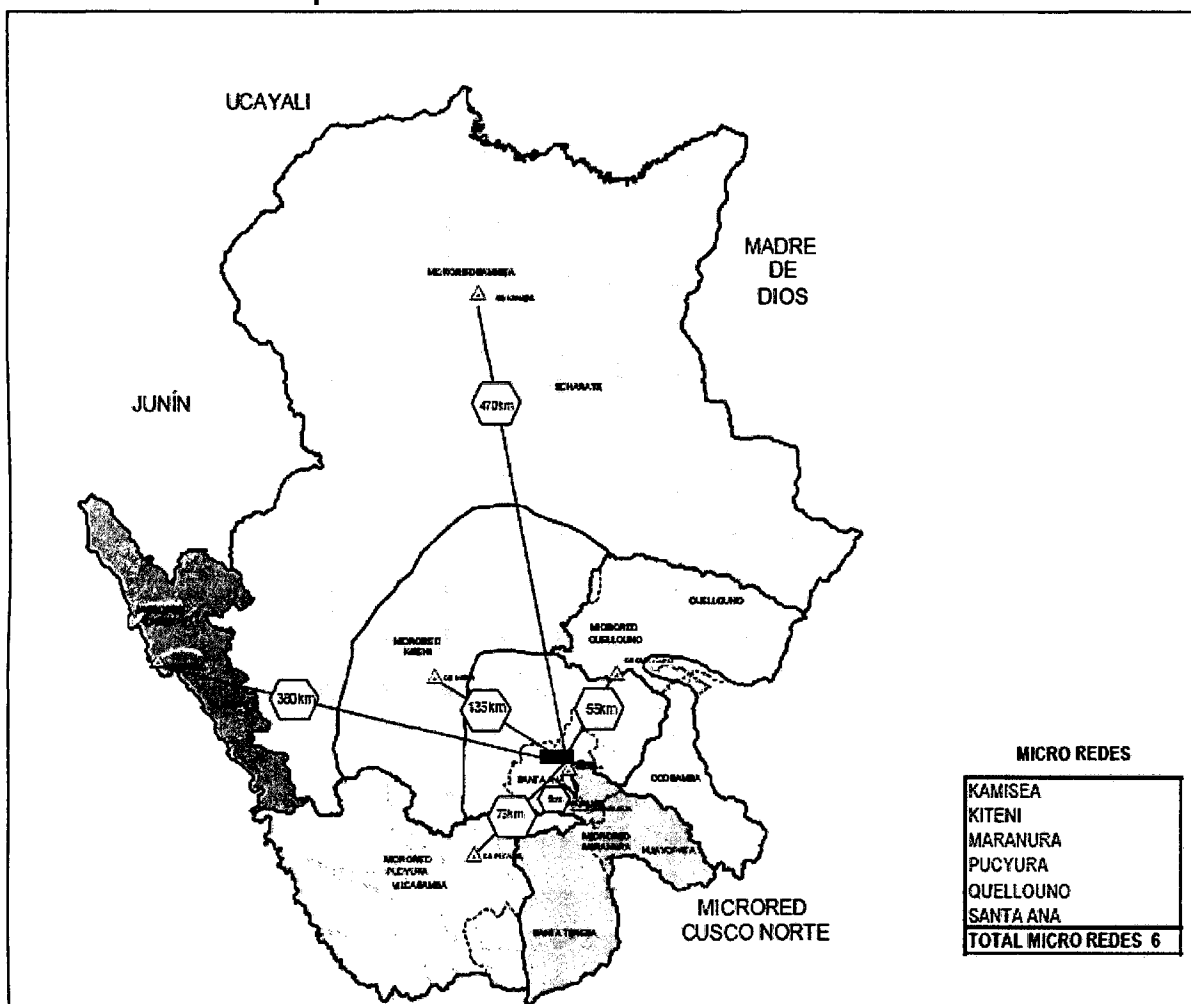
#### Mapa N° 01 División Política y Administrativa de la Dirección Regional de Salud (Diresa)- Cusco



Fuente: Diresa- Cusco. Población proyectada 2011

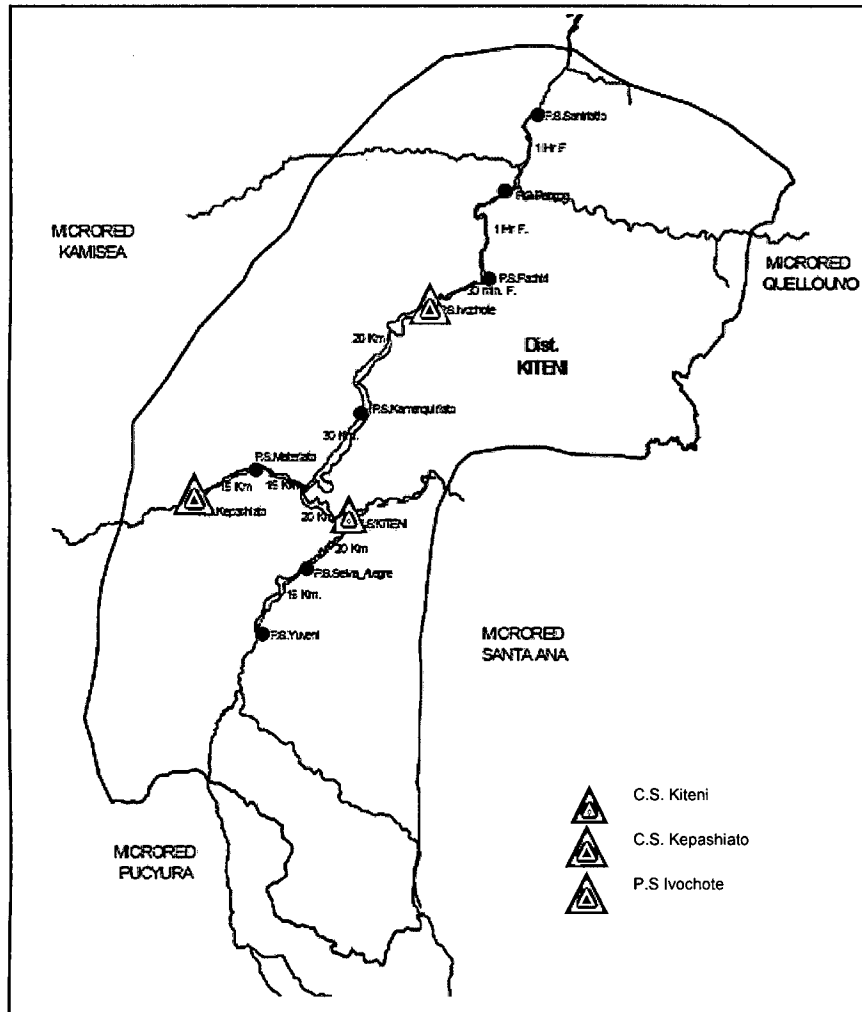
La DIRESA Cusco tiene a su cargo 4 redes de servicios de salud, entre ellas se encuentra la red de Servicios de Salud La Convención está conformada por seis Microredes de salud: Microred Santa Ana, Maranura, Quellouno, Pucyura, Kamisea y Kiteni; esta última tiene a su cargo 2 centros de salud (Kiteni y Kepashiato) con 9 Puestos de salud (Chontabamba, Kamanquiriatio, Materiatio, Pachiri, Pangoa, Saniriatio, Selva Alegre, Yuveni e Ivochote) (Diresa, 2011).

**Mapa N° 02: Red de Salud La Convención**



Fuente: Diresa- Cusco Población proyectada 2011

**Diagrama N° 01: Microred de Salud de Kiteni**



Fuente: Dirección Regional de Salud- Cusco Población proyectada 2011

## 2.3 Materiales

### 2.3.1 Material Biológico:

#### A. Cepas de Referencia Mundial ATCC (American Type Culture Collection).

El DNA de cepas de referencia utilizadas en el presente trabajo fue donado por el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC)- Universidad de La Laguna (España). Para la estandarización de la técnica utilizada en este estudio, se utilizaron DNA de cepas de referencia mundial ATCC (American Type Culture Collection). EL

DNA de cada cepa fue obtenido en el IUETSPC y donado al laboratorio (Cuadro N°01)

**Cuadro N°01: DNA de cepas de referencia**

ESPECIE	CÓDIGO
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/L677
<i>L. (L.) mexicana</i>	MHOM/BZ/82/BEL21

### **B. Otras Cepas de Referencia**

*L. (V.) lainsoni* MHOM/PAB2891, cedido por la Dra. Carmen Lucas (NAMRU Lima Perú)

*L. (V.) braziliensis* MHOM/PE/95/LQ2 aislado en 1995 en Quillabamba, Cusco Perú, caracterizada por isoenzimas y por anticuerpos monoclonales.

### **2.3.2 Materiales de Laboratorio**

#### **A. Para el aislamiento de cepas de *Leishmania***

- Tubos tapa rosca 13x100
- Jeringas hipodérmicas de 1 cc. y 3 cc.
- Medios de cultivo USAMRU (Anexo 1)
- Solución salina con antibiótico 1% (Bencil penicilina sódica y Gentamicina) (Anexo 1)

#### **B. Reactivos**

##### **a) Para el aislamiento de DNA genómico de *Leishmania*.**

- Tampón fosfato salino pH 7.4 (Anexo 1)
- Tampón TELT (Tris – HCl pH 8.0, EDTA pH 8.0, LiCl, Tritón X-100) (Anexo 1)
- RNasa \* (Anexo 1)
- Proteinasa K \* (Anexo 1)

- Fenol equilibrado de pH 8.0 \*\*
- Cloroformo \*\*\*
- Alcohol isoamílico \*\*\*
- Isopropanol \*\*\*
- Etanol \*\*\*
- Acetato de Sodio 3M \*\*\* (Anexo 1)
- Agua bidestilada estéril

\*Marca Roche

\*\* Marca Sigma

\*\*\* Marca Merck

#### **b) Para RAPD- PCR**

- Tampón 5X Colorless Go Taq Flexi buffer \*
- MgCl<sub>2</sub> 25mM \*
- Taq DNA Polimerasa 5U/μl \*
- Desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP 100 mM \*
- Primer OPC-20 (ACTTCGCCAC)\*\* Referencia (Alonso, V., 1999; Quispe, M.A., 2002; Martínez, E., 2003)

\*Marca Promega

\*\*Marca Invitrogen

#### **c) Para electroforesis en gel de agarosa**

- Tampón TAE 1X (Anexo 1)
- Marcador de peso molecular de 100 pb \*
- Tampón de carga 6X \*
- Agarosa Estándar media EEO \*\*
- Bromuro de Etidio \*\*\*

\*Marca Promega

\*\*Marca Ecogen

\*\*\*Marca Sigma

### **C. Equipos**

- Microscopio binocular (Marca: LEICA CME, Modelo: 1349522X)
- Centrifuga refrigerada (Marca: SIGMA, Modelo: 1-15K)
- Baño maría (Marca: JSR, Modelo: JSWB-11T)
- Espectrofotómetro (Marca: THERMO, Modelo: Nanodrop 2000C)
- Termociclador (Marca: PERKIN ELMER, Modelo: GeneAmp PCR System 2400)
- Cámara de electroforesis (Marca: HOEFER, Modelo: HE99X)
- Fuente de poder (Marca: CONSORT, Modelo: EV-265)
- Digitalizador de imágenes (Marca: BIORAD, Modelo: Gel Doc™XR<sup>+</sup>)
- Balanza analítica (Marca: OHAUS, Modelo: Explorer)
- Cámara de Flujo Laminar (Marca: Telstar, Modelo: BIO-11-A)
- Refrigeradora (Marca: Coldex, Modelo: CH10P)
- Congeladora -20 °C (Marca: Coldex, Modelo: CA39)

### **D. Softwares**

- Software *Quantity One 1-D Analysis versión 4.6.9* (Biorad)
- Software *Past, versión 1.92*

### **E. Materiales Complementarios**

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tubos de reacción de PCR
- Micropipetas de 20, 100 y 1000 µl
- Puntas de 10 µl, 20 µl y 1000 µl
- Puntas con filtro de 10µl. 20 µl y 1000 µl
- Papel Aluminio
- Guantes de látex

## **2.4 Metodología**

### **2.4.1 Obtención de muestras y cultivo de parásitos.-**

Las muestras problema se aislaron de pacientes clínicamente diagnosticados con leishmaniosis provenientes de la Microred de Salud de Kiteni, en los Centros de Salud de Kiteni, Kepashiato y Puesto de Salud de Ivochote, estas cepas fueron incorporadas al cepario del Grupo de Investigación en *Leishmania*, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC

- Entrevista, llenado de ficha clínica y consentimiento informado (Anexo 2) para el uso de sus muestras en el presente estudio.
- Seleccionar el área de muestreo, enumerar las lesiones en caso de tener múltiples lesiones, se tomarán tres aspirados por cada lesión.
- Limpiar la zona de toma de muestra, en caso de que existiera una costra ésta debe ser retirada.
- Cargar las jeringas de 3cc de capacidad cargadas con 0,5ml de solución salina estéril y antibiótico al 1%, escoger el área de toma de muestra con bordes engrosados e introducir la jeringa.
- Proceder al aspirado realizando movimientos de rotación tratando de evitar el sangrado excesivo.
- Sembrar los aspirados a los tubos conteniendo el medio de cultivo, medio bifásico de agar sangre (USAMRU) enriquecida con sangre desfibrinada de conejo al 15%.
- Los cultivos conteniendo las muestras se revisan cada 7, 14, 21 y 28 días.
- Una vez encontrados los parásitos se procedió al mantenimiento de las muestras., éste se realiza mediante repiques sucesivos cada semana, realizando observaciones con el microscopio para revisar la cantidad y estado del parásito.

### **2.4.2 Aislamiento de DNA de parásitos**

Basado en el método de solubilidad del DNA cromosomal de tripanosomátidos en la mezcla fenol/cloroformo/tritón/LiCl (Medina- Acosta E, Cross GA; 1993)

- Iniciar la extracción con  $10^7$  de promastigotes.

- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y agregar un volumen de PBS.
- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos.
- Repetir los pasos 3 y 4 por dos veces más.
- Resuspender el sedimento obtenido en 150µl de tampón TELT.
- Añadir RNAsa a una concentración de 300 µg/ml e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- Añadir un volumen de fenol, agitar lentamente y centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- Recoger la fase acuosa y añadirle un volumen de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), agitar suavemente y centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
- Recoger la fase acuosa y añadirle un volumen de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), agitar suavemente y centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Recoger la fase acuosa y añadirle un volumen de isopropanol. Agitar suavemente e incubar a -20° C durante 1 hora.
- Centrifugar 10 minutos a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 700 µl de etanol al 70%. Agitar suavemente y centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Eliminar el resto de etanol.
- Disolver en agua bidestilada estéril y cuantificar.

### **2.4.3 Determinación de la concentración de DNA**

El método para la determinación de la concentración de DNA se realiza midiendo la absorción de la luz ultravioleta a 260 y 280 nm. Se utiliza el equipo espectrofotómetro-Nanodrop 2000c (Thermo), el cual además da la concentración de DNA en ng/µl, indica la calidad de la muestra obtenida, esta se informa mediante la relación A260/A280 que debe presentar valores entre 1.8- 1.9 que también demuestran la fiabilidad de la cuantificación (Sambrook, J., *et. al.*, 1989).



## 2.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 2.4.4.1 Amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD)

Para la amplificación al azar de fragmentos polimórficos, se utilizó el cebador OPC-20 (5' ACTTCGCCAC 3') Referencia: (Alonso V, 1999, Quispe MA, 2002 Martínez E, 2003).

Para realizar la mezcla de reacción se toma todas las medidas de seguridad necesarias, así la preparación se realiza en una cámara de flujo laminar, la cual previamente ha tenido que ser esterilizada con luz UV.

Cuadro N° 02 Mezcla de reacción para RAPD

Componentes	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen x 1 reacción
Buffer PCR 5x	5x	1x	6
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1.5Mm	1.8
DNTPs	2Mm	200µM	3
Primer OPC- 20	10pmol/µL	20pmol	2
Agua para PCR	-	-	15,13
Taq polimerasa	5U/µL	0,37U	0,074
DNA	≈10 ng	≈10 ng	2
			30 µl

Para caracterizar a las muestras problema, se preparó una relación de muestras problema y un grupo de cepas de referencia. El DNA de cada una de las cepas control y las muestras se coloca a la mezcla de reacción previamente distribuida a tubos independientes. El control negativo de reacción no contiene muestra, en lugar de ella se coloca agua ultra pura.

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Perkin Elmer *Gene Amp PCR System 2400*. Las condiciones de amplificación son: 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 32° C y 1 minuto a 72° C, finalizando con 7 minutos a 72° C

## 2.4.5 Visualización y evaluación de los productos de la PCR

### 2.4.5.1 Electroforesis en geles de agarosa

La visualización y evaluación de los productos de la PCR, se realizó en geles de agarosa (Agarosa Estándar media EEO, ECOGEN) a una concentración de

1.5%, la electroforesis se realizó en la cámara de electroforesis (Hoefer), y se usó como tampón X Tris-ácido acético- EDTA (TAE 1X). Para la visualización de los productos de amplificación se añadió bromuro de etidio a la agarosa fundida cuando alcanza una temperatura de 60° C; (el bromuro de etidio es un componente que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y que emite fluorescencia bajo la luz ultravioleta). La electroforesis se realiza a 90 voltios durante 1 hora y 40 minutos.

Para visualizar los amplicones obtenidos utilizamos el equipo de digitalización de imágenes Gel doc XR<sup>+</sup> (Biorad). El equipo agrupa un transiluminador de luz ultravioleta con una cámara fotográfica, lo cual nos permite digitalizar la imagen del gel.

#### **2.4.6 Evaluación de los productos de amplificación con el software *Quantity One***

Los productos obtenidos en los geles de agarosa fueron evaluados mediante el software *Quantity One* (Bio-Rad) primero se calculo el tamaño en pares de bases del marcador de peso molecular utilizado; luego se procedió a calcular el tamaño de las bandas presentes en el gel para ello se comparo los productos de amplificación con los de los patrones, como existen diferencias entre la concentración de los diferentes geles se sacó el promedio y error estándar de las bandas presentes en estos patrones. Una vez definidas las bandas características para cada patrón se procedió a las identificaciones de los amplicones generados mediante RAPD.

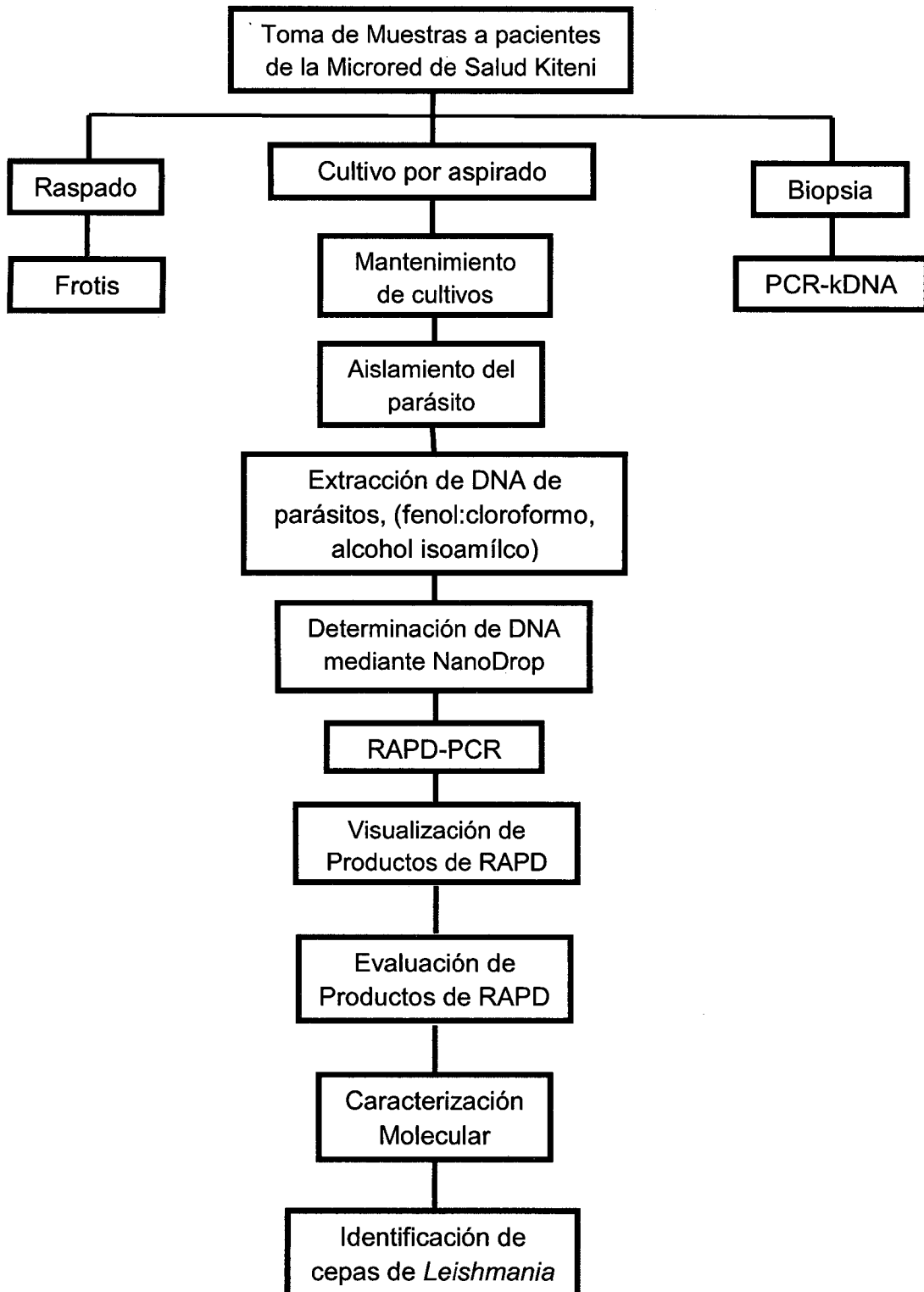
#### **2.4.7 Estimación de la similitud taxonómica**

La similitud es cuantificable aplicando los coeficientes de similitud, con el uso de estos se pueden calcular las similitudes respecto de cada Unidad Taxonómica Operativa (OTU), para ello es necesario construir una matriz cuyo objeto es sintetizar la información, el criterio para su construcción es de 1 presencia de banda y 0 ausencia de bandas; la matriz es insuficiente para expresar las relaciones entre la totalidad de las (OTUs), pues solo expone similitudes entre pares de dichas unidades. A fin de contribuir con la matriz es

necesario realizar un análisis de agrupamientos en donde se forman grupos de OTU que se asocian por su grado de similitud (Crisci J., 1983).

Después de haber realizado la matriz de similitud, se construyo el dendograma utilizando el programa Past Versión 1.92.

## Flujograma de Trabajo



Fuente: Elaboración Propia

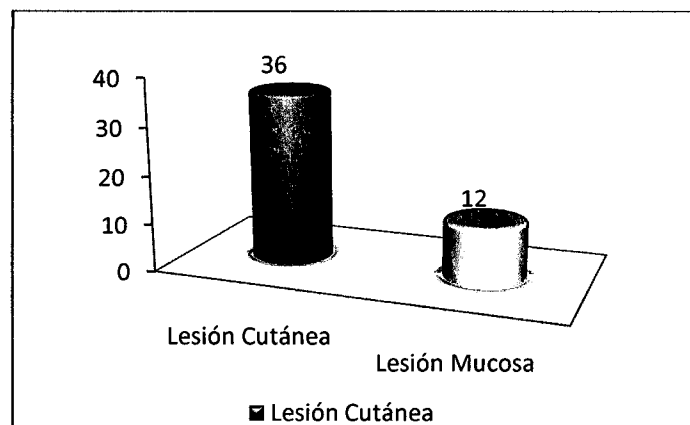
## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Muestreo y aislamientos de cepas de *leishmania*

De acuerdo a la metodología, se aislaron 48 cepas, de las cuales 36 cepas aisladas provienen de lesiones cutáneas y 12 cepas provienen de lesiones mucosas (Gráfico N° 01). Los resultados mostrados guardan relación con lo publicado en el boletín de RENACE del año 2009, en donde se menciona que la razón cutánea/mucocutánea muestra un comportamiento irregular en los últimos tres años, luego de haberse incrementado entre los años 2001 al 2005, para el año 2007 por cada caso mucoso se notificaron 24 casos cutáneos, se ha observado que existe una tendencia al incremento de los casos cutáneos y se espera que en los próximos años el número de casos de la forma mucocutánea se incremente; esto puede estar relacionado con la existencia de subregistros y/o problemas de notificación de los casos lo que hace que la enfermedad no tenga un control adecuado y no se tomen las acciones pertinentes.

**Gráfico N° 01:** Tipo de lesión de pacientes atendidos en la Microred de Salud de Kiteni

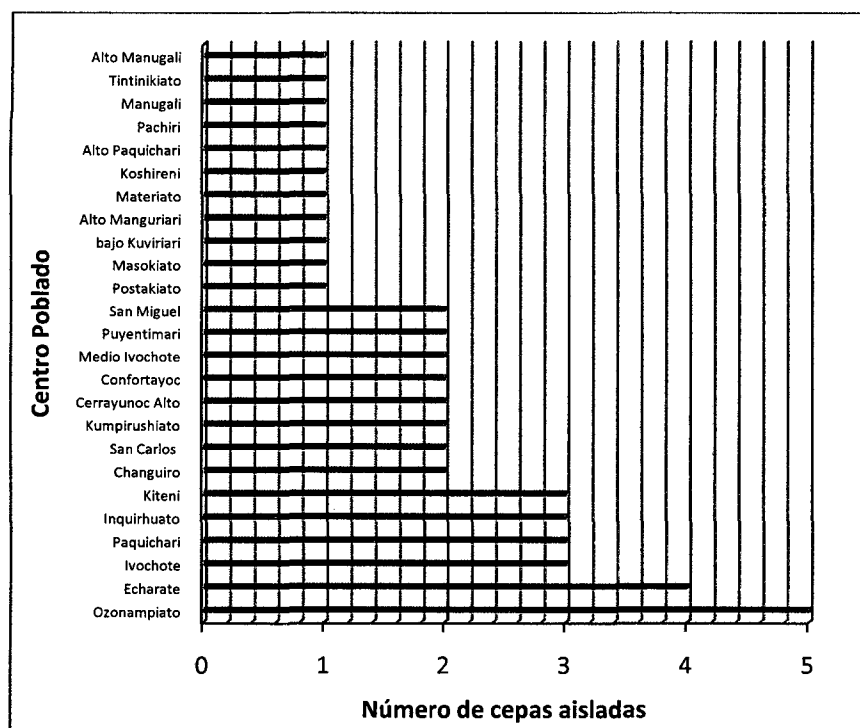


En el eje X se indica el tipo de lesión, mientras que en el eje Y se indica el número de casos

En el Plan Estratégico 2005-2012, se señala que el Distrito de Echarate es uno de los distritos más grandes de la Convención y que tiene 339 centros poblados. Para realizar el presente estudio se eligieron 3 establecimientos de

salud, de los cuales 02 son Centros de Salud y 01 es una Posta de Salud, los que están estratégicamente ubicados para poder atender a las personas de los poblados cercanos. La procedencia de los pacientes con leishmaniosis indica de forma directa la presencia del parásito en la misma zona donde habita el paciente. En el presente trabajo de investigación se han atendido a pacientes de 26 centros poblados (Gráfico N° 02). De acuerdo a los resultados, los pacientes provienen de diferentes zonas, siendo la comunidad de Ozonampiato la zona de la cual se aislaron el mayor número de muestras (5), seguida de Echarate (4), luego de Ivochote, Paquichari, Inquirhuato y Kiteni cada uno con (3) muestras, las comunidades de Changuiro, San Carlos, kumpirushiato, Cerranuyoc Alto, Confortayoc, Medio Ivochote, Puyentimari, San Miguel cada uno con (2) muestras y por último, Postakiato, Masokiato, Bajo Kuviriari, Alto Manguriari, Materiato, Koshireni, Alto Paquichari, Pachiri, Manugali, Tintinkiato y Alto Manugali cada uno con (1) muestra.

**Gráfico N° 02:** Procedencia de las cepas aisladas de la Microred de Salud de Kiteni

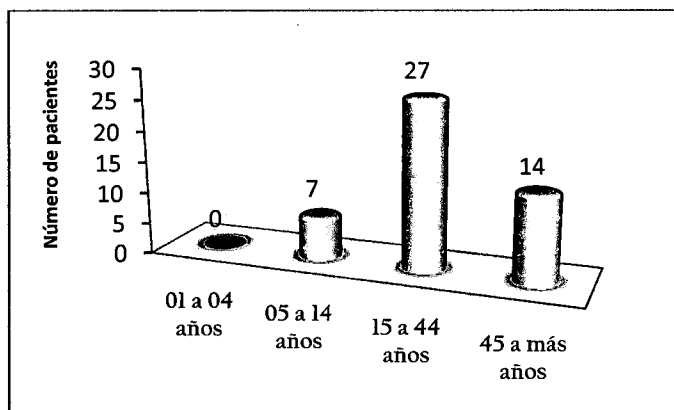


En el eje X se indica el número de cepas aisladas de los pacientes atendidos, en el eje Y se indica el centro poblado de donde provienen los pacientes

### 3.2 Factores que favorecen la presencia de la enfermedad

El 56,3% del total de pacientes atendidos se encontraron comprendidos entre los 15 y 44 años, mientras que los pacientes mayores a 45 años representan el 29,1%; por último el tercer grupo que corresponde a los 5 a 14 años representa el 14,6%. En el presente estudio no se tuvo ningún paciente menor de 4 años. (Gráfico N° 03). Cabe resaltar que la población económicamente activa es la que se dedica a labores agrícolas y es la población más expuesta a la picadura del insecto vector tal como lo señalan Dueñas, D., y Alegría, S., 2003. Sin embargo según RENACE, 2009 indica que existe un cambio en el patrón de comportamiento de transmisión de la enfermedad, las personas menores de 14 años vienen siendo las más afectadas debido al incremento de la migración de las familias incluyendo a los menores de edad para realizar labores agrícolas, el cambio climático, la urbanización y la deforestación son otros factores que influyen en este cambio; este comportamiento no se ha podido observar en el estudio debido a que muchos de los pacientes no son conscientes de la enfermedad es por ello que solo se ha registrado a 7 pacientes entre 5 y 14 años; otro punto importante es la toma de muestra que es invasiva y muchos pacientes al notar esto no acceden a que se les realice el diagnóstico de laboratorio. Motivo por el cual muchos pacientes se niegan a la toma de muestra.

**Gráfico N° 03:** Grupo etáreo de los pacientes atendidos en los Centros y Puesto de Salud de la Microred de Salud Kiteni



En el eje X se observa la división según grupo etáreo, mientras en el eje Y se observa el número de pacientes. Se observa que el grupo entre 14 a 44 años de edad es el que se han atendido más pacientes

### 3.3 Estandarización de la técnica de RAPD

La técnica utilizada para la identificación de especies de *Leishmania* ha sido descrita por Martínez, E., *et. al.* 2003 y por Quispe, M.A., 2002., de acuerdo a estos autores, en los respectivos trabajos el modo de detección de los productos de amplificación obtenidos es mediante el uso de un lector de fluorescencia, el cual es capaz de identificar al producto de amplificación porque el cebador lleva un producto fluorescente Cy5. Debido a la complejidad de la metodología y con la intención de utilizar la técnica en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC, se ha modificado la forma de detección de los productos de amplificación mediante el uso de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las condiciones de estandarización de la técnica consisten en lo siguiente:

1. Reacción de RAPD, siguiendo la metodología descrita por Martínez, E., *et. al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002
2. Modificación de la visualización de los productos amplificados, realizados mediante electroforesis usando agarosa al 1.5%
3. Determinación y evaluación de los productos amplificados utilizando el software *Quantity One*, este ayuda a determinar los productos amplificados en pares de base.

Luego de varios ensayos se logró estandarizar la técnica de RAPD en las condiciones del laboratorio de Microbiología e Inmunología de la UNSAAC, esta se realizó primero con DNA de cepas de referencia (cepas ATCC). Para evaluar las condiciones a utilizar en el laboratorio, esta se realizó mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, añadiendo 0.5µg/ml de bromuro de etidio a la agarosa fundida una vez que ha alcanzado una temperatura aproximada de 60° C, en cada gel se sembró 20µl de los productos de amplificación mezclados con tampón de carga (glicerol 30% y azul de bromofenol 0.25%), en cada experimento se utilizo los DNA patrones de *Leishmania* con el fin de tener una mejor comparación, entre experimentos. La electroforesis se realizó en la cámara de electroforesis (Hoefer), con tampón



TAE 1X. Las condiciones de la electroforesis son las siguientes: 90V, 118mA, 10W durante 1 hora y 40 minutos. La visualización del gel se hizo en el fotodocumentador de geles Gel Doc XR+ (Biorad) y el análisis se realizó mediante el software *Quantity One*.

Los trabajos de Martinez, E., *et. al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002, demostraron la utilidad del cebador OPC-20 marcado con un compuesto fluorescente para diferenciar las especies del género *Leishmania* y describieron el perfil en pares de bases para *L. (V.) braziliensis*; en el presente trabajo se utilizó el mismo cebador sin marcar y es la primera vez que se utiliza la técnica RAPD para diferenciar especies dentro del subgénero *Viannia*.

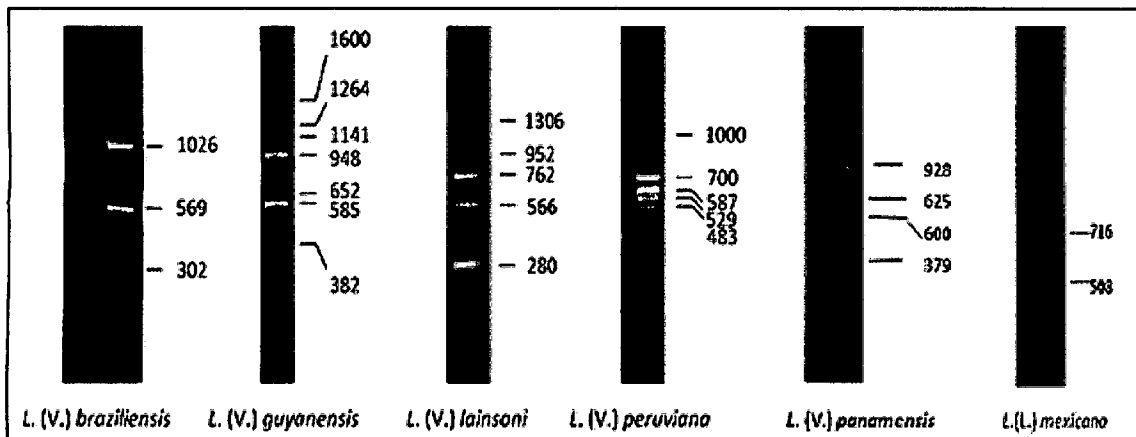
### **3.4 Productos de amplificación obtenidos mediante RAPD**

Para la determinación de los productos de amplificación se compararon todos los patrones de los geles, se estableció cuales bandas servirían para determinar la identidad de la especie.

Una vez resuelto los productos de amplificación en los geles de agarosa (1.5%), se procedió a fotografiarlos y con ayuda del software *Quantity One*, se determinó el tamaño molecular en pares de bases de cada uno de los productos de amplificación obtenidos en cada cepa estándar.

Para establecer los productos de amplificación que caracterizan a cada una de las especies de *Leishmania*, se eligen aquellos productos de amplificación que se repiten en sucesivos experimentos y son los que se muestran en la Figura N° 08

**Figura N° 08:** Productos de amplificación que caracterizan a cada una de las especies de *Leishmania* del género *Leishmania*



La evaluación de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa y su posterior análisis con el programa informático *Quantity One*, trae consigo un error +/- n pares de bases a la hora de determinar los tamaños moleculares.

Para determinar el error en la medición, se realiza un promedio del tamaño de un producto de amplificación en distintos experimentos y obtenemos el error estándar. Los resultados de estos cálculos se encuentran en las tablas N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

**Tabla N° 1: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (V.) braziliensis***

Especie	Amplicones en pb		
<i>L.(V.) braziliensis</i>	1073	600	318
	1070	605	315
	1109		
	1027	570	292
	1014	572	302
	1122	624	333
	1068	623	331
	1056	626	322
	1049	626	331
	1075	614	319
	1033	610	322
	1183	638	333
Media+/- SD	<b>1073+/-47</b>	<b>611+/-21</b>	<b>321+/-11</b>

**Tabla N° 2: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (V.) guyanensis***

<b>Especie</b>	<b>Amplicones en pb</b>						
<b><i>L.(V.) guyanensis</i></b>	1642	1302	1184	1005	690	620	405
	1662	1335	1220	1038	738	666	444
	1662		1187	993	690	617	421
	1652		1187	993	690	612	
		1264	1140	949	652	585	383
				1045	627	564	361
		1307	1211	1015	716	648	423
<b>Media+/- SD</b>	<b>1655+/-10</b>	<b>1302+/-29</b>	<b>1188+/-28</b>	<b>1005+/-32</b>	<b>686+/-37</b>	<b>616+/-35</b>	<b>406+/-30</b>

**Tabla N° 3: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (V.) lainsoni***

<b>Especie</b>	<b>Amplicones en pb</b>				
<b><i>L.(V.) lainsoni</i></b>	1314	975	791	591	276
	1343	1007	825	615	296
	1371	1020	828	617	272
	1371	1020	812	617	286
	1307	952	762	566	280
	1327	992	806	604	282
<b>Media+/- SD</b>	<b>1339+/-28</b>	<b>994+/-27</b>	<b>804+/-25</b>	<b>602+/-20</b>	<b>282+/-8</b>

**Tabla N° 4: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (V.) peruviana***

<b>Especie</b>	<b>Amplicones en pb</b>				
<b><i>L.(V.) peruviana</i></b>	1170	754	631	581	524
	1176	770	609	563	
		794	634	585	503
		784	634	585	
	1144	740	654	595	545
	1165	759	668	604	554
<b>Media+/- SD</b>	<b>1164+/-14</b>	<b>767+/-20</b>	<b>638+/-20</b>	<b>586+/-14</b>	<b>532+/-23</b>

**Tabla N° 5: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (V.) panamensis***

<b>Especie</b>	<b>Amplicones en pb</b>			
<b><i>L.(V.) panamensis</i></b>	928	625	600	379

**Tabla N° 6: Productos de Amplificación característicos de la especie *L. (L.) mexicana***

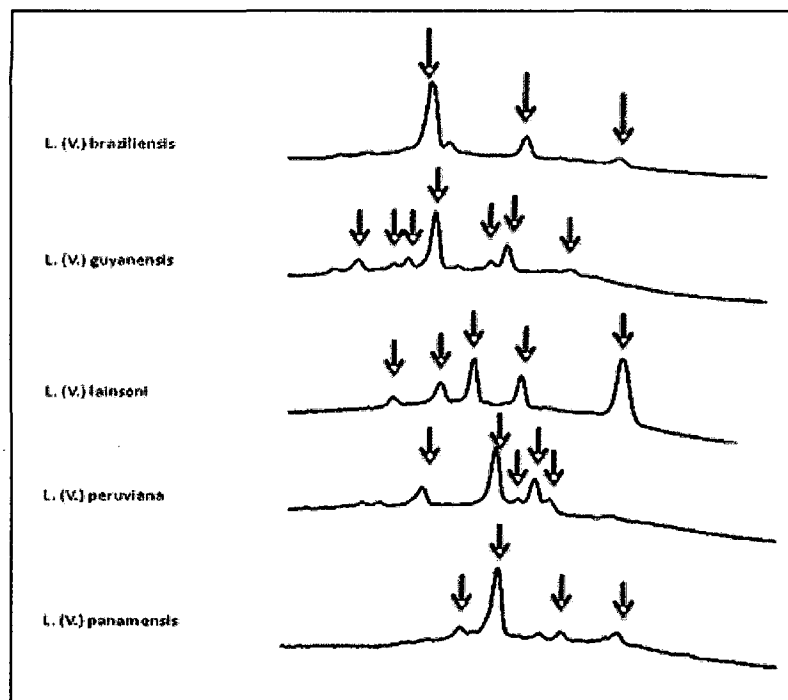
Especie	Amplicones en pb	
<i>L. (L.) mexicana</i>	716	508

Con los cálculos previos realizados, se procede a establecer los productos de amplificación característicos para cada una de las especies de *Leishmania* utilizados en el presente trabajo, los mismos que son los siguientes:

- *L. (V.) braziliensis*, presenta tres bandas definidas. La primera de 1073+/-47 pb, un segundo producto de amplificación de 611+/-21pb y un tercer producto de amplificación de 321+/-11pb.
- *L. (V.) guyanensis* presenta siete bandas. La primera de 1655+/-10 pb, la segunda y tercera banda generada es un doblete cuyos productos de amplificación son de: 1302+/-29 pb y 1188+/-28 pb respectivamente, en los geles aparecen como bandas muy cercanas (Figura N° 08); el cuarto producto de amplificación de 1005+/-32 pb, el quinto producto de amplificación de de 686+/-37 pb, el sexto producto de amplificación de 616+/- 35pb y el último producto de amplificación de 406+/-30 pb.
- *L. (V.) lainsoni* presenta 5 bandas. La primera de 1339+/-28 pb, un segundo producto de amplificación de 994+/-27 pb, el tercer producto de amplificación de 804+/-25 pb, el cuarto producto de amplificación de 602+/-20 pb, y el último producto de amplificación de 282+/-8 pb.
- *L. (V.) peruviana*, presenta 5 bandas. La primera de 1164+/-14 pb, un segundo producto de amplificación de 767+/-20 pb, las últimas tres bandas generadas se presentan en forma de triplete, cuyos productos de amplificación se encuentran entre: 638+/-20 pb, 586+/-14 pb y 532+/-23 pb muy cercanos entre si, como se observa en la figura N° 08.
- *L. (V.) panamensis*, presenta: 4 bandas, la primera en 928pb, la segunda en 625pb, la tercera en 600pb y por último una banda en 379pb.
- *L. (L.) mexicana*, presenta: 2 bandas, la primera en 716pb y la segunda en 508pb.

En los trabajos realizados por Martínez, E., *et. al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002, presentan sus resultados mediante perfiles gráficos, generando picos en donde cada uno corresponde a un producto amplificado, para comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo y con ayuda del software *Quantity One*, se realiza la visualización de las bandas generadas en los geles en forma de picos (Figura N° 09) en las cuales se pueden observar los picos característicos de cada especie. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Martínez, E., *et.al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002 donde para *L. (V.) braziliensis* se caracterizan por presentar un pico de 855, otro entre 550-650 y el último entre 300 y 350; en el presente trabajo se muestran diferencias en los cálculos de los tamaños moleculares, esta diferencia está relacionada a las técnicas utilizadas, Martínez, E., *et.al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002 utilizan geles de poliacrilamida para revelar sus resultados, la poliacrilamida tiene un alto poder de resolución y puede llegar a diferenciar fragmentos que varíen hasta en una sola base.

**Figura N° 09:** Perfil gráfico generados utilizando software *Quantity One* de las especies del sub-género *Viannia*



Las flechas indican los productos de amplificación generados para cada especie.

### **3.5 Caracterización e identificación de las cepas de *leishmania* aisladas de pacientes**

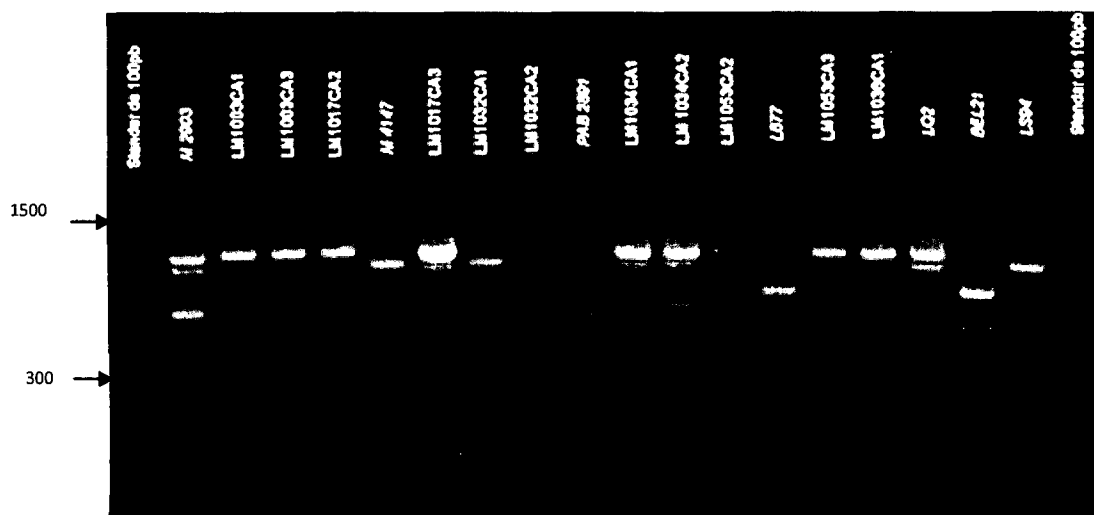
El análisis de isoenzimas continua siendo la técnica de referencia para la caracterización de cepas de *Leishmania* pero es un proceso costoso y laborioso, por lo que otros métodos basados en la PCR y sus variantes son una alternativa útil para la caracterización. La caracterización temprana de parásitos es importante para seguir el curso clínico de la enfermedad y el tratamiento adecuado. La técnica RAPD es sencilla puesto que requiere poca cantidad de parásitos por reacción y es una herramienta que permite identificar también polimorfismos que son detectados como fragmentos de DNA que son amplificados por la PCR que pueden estar presentes en uno pero no en otra cepa o individuo; ésta técnica viene siendo usada en estudios moleculares y ha probado que es capaz de diferenciar las especies de *Leishmania* tal como lo indica Hide *et. al.*, 2001.

Para la caracterización de las cepas problema se utilizó la técnica RAPD siguiendo la metodología descrita por Martinez, E., *et. al.*, 2003 y Quispe, M.A., 2002, la visualización de los productos de amplificación generados con el cebador OPC-20 se realizó en geles de agarosa al 1.5%. Con ayuda del documentador de geles y el software *Quantity One*, se procedió a determinar el tamaño molecular de los productos de amplificación de cada una de las cepas problema y los patrones utilizados, en algunos casos la evaluación se realiza de manera sencilla mientras que en otros la evaluación se complica esto quiere decir que los productos de amplificación pueden presentar una señal alta o baja, Noyes, H.A., *et. al.*, 1998 y Quispe M.A., 2002 señalan que este comportamiento puede estar relacionado con la concentración, cantidad y calidad de DNA, al usar el espectrofotómetro Nanodrop 2000c, nos proporciona un valor de pureza de la extracción de DNA, nuestras cepas problema presentan en promedio una pureza de 1.84+/- 0,29; otros autores como Caetano-Anolles, G. y Bassam, B.J., 1993., señalan que esta producción de bandas extras se da por la preferencia que tiene el cebador hacia una zona blanco, esto podría explicar que en las cepas: LM1003-27-CA1, LM1003-27-CA3, LM1017-24-CA2, LM1017-24-CA3, LM1034-16-CA1, LM1034-16-CA2,

LM1082-18-CA2, LM1073-27-CA3, , LM1032-08-CA2, LM 901, LM903, LM 910, LM 911, LM 913, LM 915, LM 922, LM 926, LM 928, LM 932, LM 934, LR 2023, LR 2064, LR 2084, LR 2110, LR 2125, LR 2126; la ausencia de bandas.

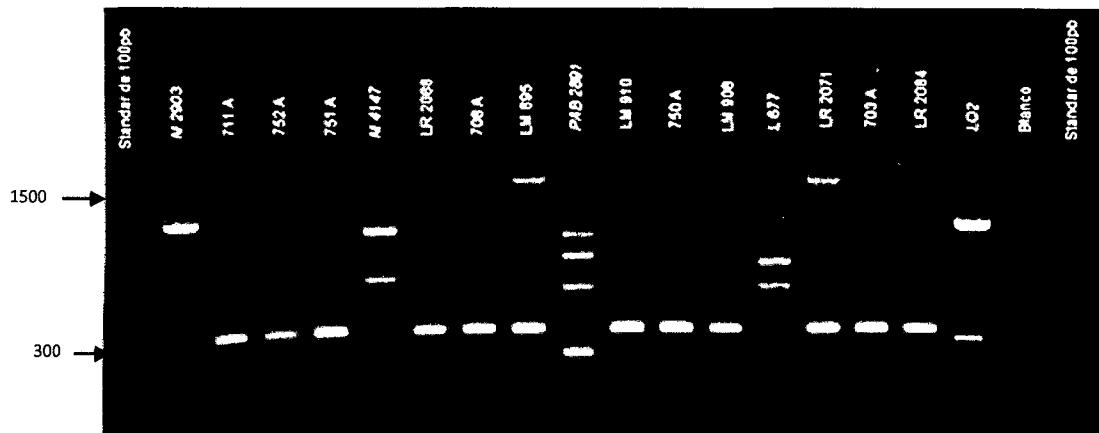
En las figuras N° 10, 11, 12, 13, 14, 15, se muestran los productos de amplificación producidos por el cebador OPC-20 Con el documentador de geles y el software *Quantity One*.

**Figura 10:** Productos de Amplificación generados mediante RAPD



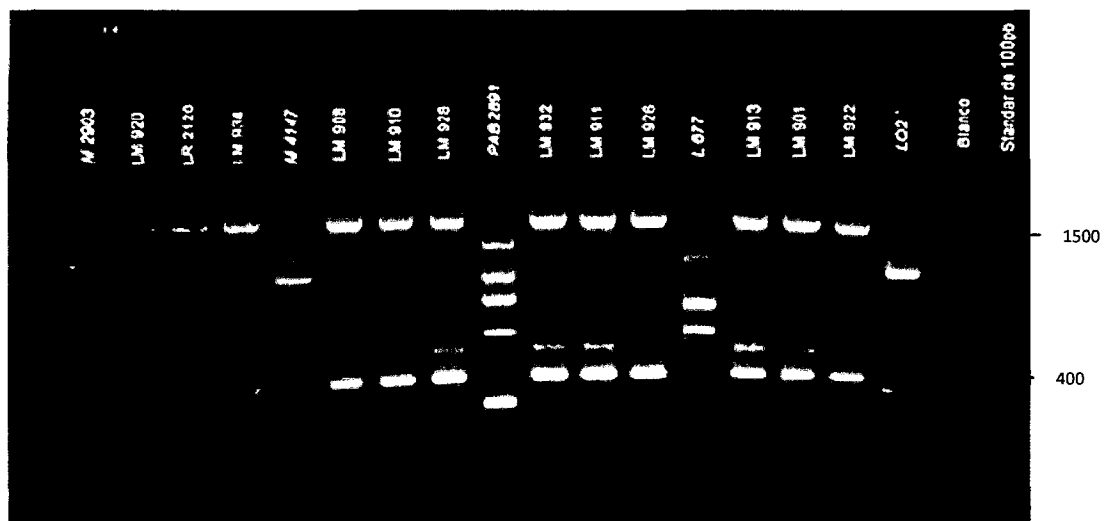
**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 3:** LM 1003-27- CA1; **Carril 4:** LM 1003-27- CA3; **Carril 5:** LM 1017-24-CA2; **Carril 6:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 7:** LM 1017-24-CA3; **Carril 8:** LM 1032-8-CA1; **Carril 9:** LM 1032-8-CA2; **Carril 10:** Patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 11:** LM 1034-16-CA1; **Carril 12:** LM 1034-16-CA2; **Carril 13:** LM 1053-CA2; **Carril 14:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 15:** LM 1053-CA3; **Carril 16:** LM 1036-CA1; **Carril 17:** Patrón *L. (V.) braziliensis* LQ2; **Carril 18:** Patrón *L. (L.) mexicana* BEL 21; **Carril 19:** Patrón *L. (V.) panamensis*.

**Figura N° 11: Productos de Amplificación generados mediante RAPD**



**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 3:** 711 A; **Carril 4:** 752 A; **Carril 5:** 751 A; **Carril 6:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 7:** LR 2086; **Carril 8:** 708 A; **Carril 9:** LM 895; **Carril 10:** Patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 11:** LM 910; **Carril 12:** 750 A; **Carril 13:** LM 908; **Carril 14:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 15:** LR2071; **Carril 16:** 703 A; **Carril 17:** LR 2084; **Carril 18:** Patrón Patrón *L. (V.) braziliensis* LQ 2; **Carril 19:** Blanco; **Carril 20:** Estándar 100pb.

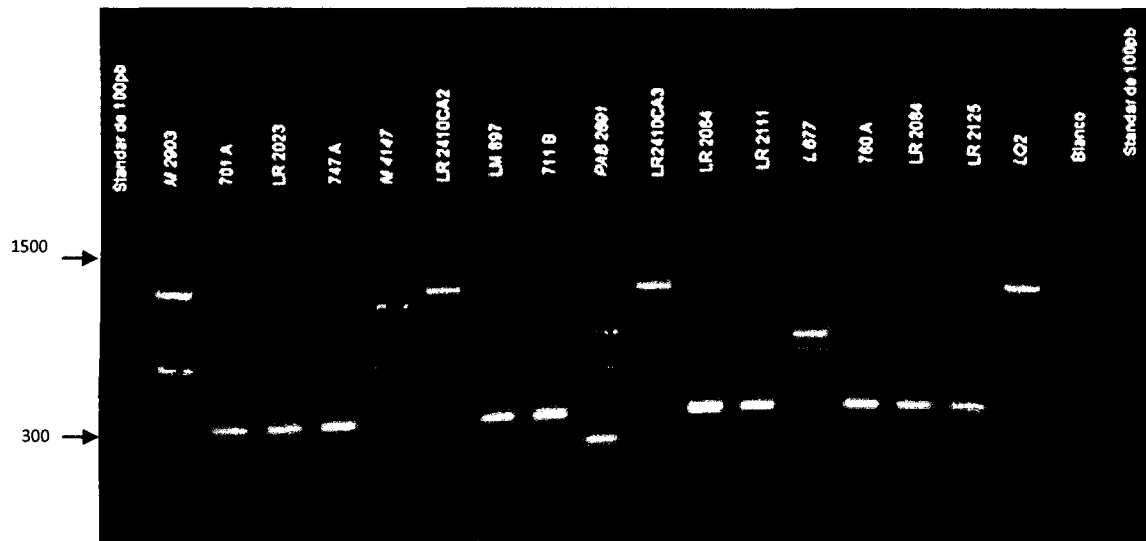
**Figura N° 12: Productos de Amplificación generados mediante RAPD**



**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 3:** LM 920; **Carril 4:** LR 2126; **Carril 5:** LM 934; **Carril 6:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 7:** LM 908; **Carril 8:** LM 910; **Carril 9:** LM 928; **Carril 10:** Patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 11:** LM 932; **Carril 12:** LM 911; **Carril 13:** LM 926; **Carril 14:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 15:** LM 913; **Carril 16:** LM 901; **Carril 17:** LM 922; **Carril 18:** Patrón Patrón *L. (V.) braziliensis* LQ 2; **Carril 19:** Blanco; **Carril 20:** Estándar 100pb.

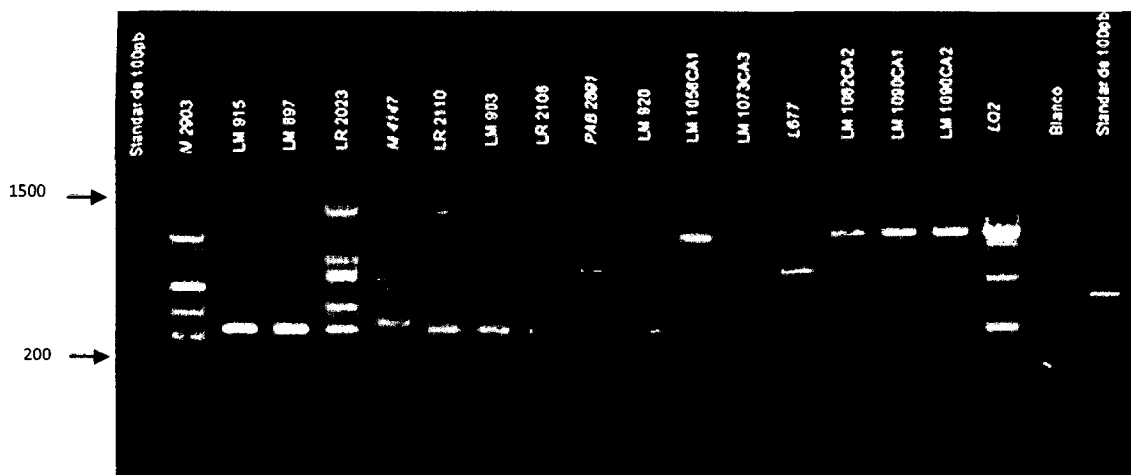


**Figura N° 13: Productos de Amplificación generados mediante RAPD**



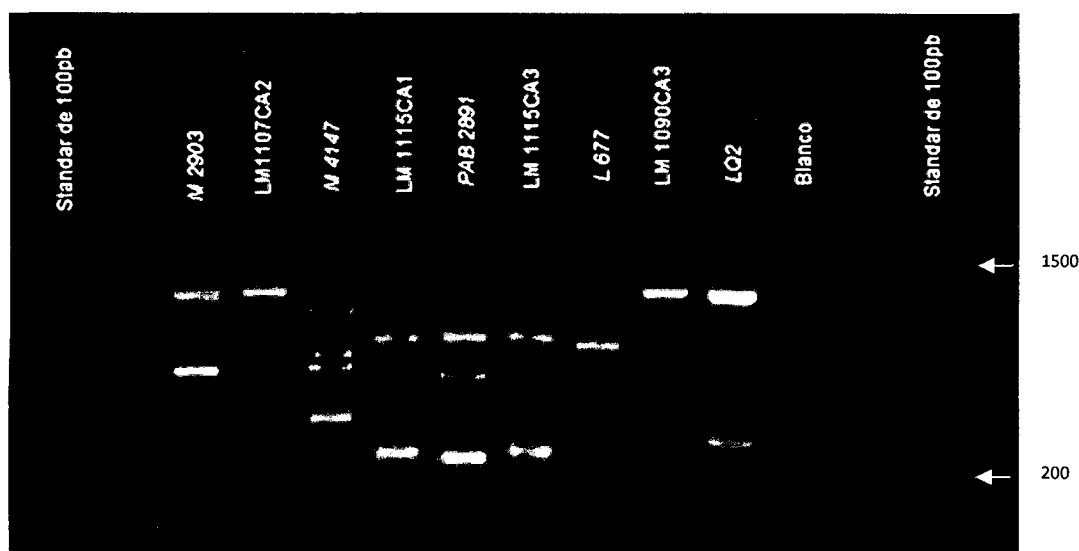
**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 3:** 701 A; **Carril 4:** LR 2023; **Carril 5:** 747 A; **Carril 6:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 7:** LR 2410-CA2; **Carril 8:** LM 897; **Carril 9:** 711B; **Carril 10:** Patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 11:** LR 2410-CA3; **Carril 12:** LR 2064; **Carril 13:** LR 2111; **Carril 14:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 15:** 760 A; **Carril 16:** LR 2084; **Carril 17:** LR 2125; **Carril 18:** Patrón Patrón *L. (V.) braziliensis* LQ 2; **Carril 19:** Blanco; **Carril 20:** Estándar 100pb.

**Figura N° 14: Productos de Amplificación generados mediante RAPD**



**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 3:** LM 915; **Carril 4:** LM 897; **Carril 5:** LR 2023; **Carril 6:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 7:** LR 2110; **Carril 8:** LM 903; **Carril 9:** LR 2106; **Carril 10:** Patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 11:** LM 920; **Carril 12:** LM 1056-51-CA1; **Carril 13:** LM 1073-27-CA3; **Carril 14:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 15:** LM 1082-18-CA2; **Carril 16:** LM 1090-51-CA1; **Carril 17:** LM 1090-51-CA2; **Carril 18:** Patrón *L. (V.) braziliensis* LQ 2; **Carril 19:** Blanco; **Carril 20:** Estándar 100pb

**Figura N° 15:** Productos de Amplificación generados mediante RAPD



**Carril 1:** Estándar de 100pb; **Carril 2:** Vacio; **Carril 3:** Patrón *L. (V.) braziliensis* M2903; **Carril 4** LM 1107-28-CA2; **Carril 5:** Patrón *L. (V.) guyanensis* M4147; **Carril 6:** LM 1115-CA3; **Carril 7:** patrón *L. (V.) lainsoni* PAB 2891; **Carril 8:** LM 1115-CA3; **Carril 9:** Patrón *L. (V.) peruviana* L677; **Carril 10:** LM 1090-CA3; **Carril 11:** Patrón *L. (V.)braziliensis* LQ 2; **Carril 12:** Blanco; **Carril 13:** Vacio; **Carril 14:** Estándar 100pb

Con el objeto de facilitar la evaluación cuantitativa, se procedió a construir una matriz básica de datos (Anexo N° 4), teniendo en cuenta la presencia y ausencia de los productos de amplificación; utilizando el software Past se determinó el índice de similitud de las mismas (Anexo N° 5), utilizando el índice de Jaccard, donde los valores obtenidos mediante el uso de este estadístico varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud).

Las cepas LM 901, LM903, LM 910, LM 911, LM 913, LM 915, LM 922, LM 926, LM 928, LM 932, LM 934, LR 2023, LR 2064, LR 2084, LR 2110, LR 2125, LR 2126; LR 2106 LR 2071, LM 895, LM920, LM897 y LR2111. Presentan diferencias entre sí, esta diferencia está ligada a la presencia de bandas en las mismas. En el dendograma (Figura N° 16) es el grupo mayoritario, con respecto a los patrones utilizados presentan una mínima similitud (< a 1.0). Este grupo de cepas las señalamos como *Leishmania* spp., cuya identificación está pendiente, estas serán evaluadas por otros sistemas de tipificación en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSP-España).

Las cepas LR 2410-15-CA2, LR 2410-15-CA3, LM1036-51-CA1, LM1053-02-CA2, LM1053-02-CA3, LM1056-51-CA1, LM1082-18-CA3, LM1090-51-CA1, LM1090-51-CA2, LM1090-51-CA3, LM1107-28-CA2, presentan los mismos productos de amplificación que las cepas estándar por lo tanto en la caracterización molecular las identificamos como *L. (V.) braziliensis*, la correlación entre ellas es máxima (1.0).; en cambio existen 7 cepas LM1003-27-CA1, LM1003-27-CA3, LM1017-24-CA2, LM1017-24-CA3, LM1034-16-CA1, LM1034-16-CA2, LM1082-18-CA2 estas cepas no presentan la totalidad de productos de amplificación pero a correlación entre estas cepas y la cepa patrón es alta (0.6) por lo que se las agrupa e identifica como *L.(V.) braziliensis*. Muchos son los autores que indican que esta especie es responsable de las formas cutáneas y mucosas Llanos-Cuentas, A *et. al*, 2008; Navin, T.R., *et. al.*, 1992 y Gonzáles, U., *et. al.*, 2009. En este trabajo se ha podido verificar este dato teniendo 14 cepas de carácter cutáneo y 4 cepas de carácter mucoso caracterizadas como *L. (V.) braziliensis*.

Las cepas LM1073-27-CA3, LM1032-08-CA1, LM1032-08-CA2 estas cepas presentan una correlación de (0.5), (0.8) y (0.7) con el patrón de referencia para *L. (V.) guyanensis* por lo que las identificamos como tal. Esta especie ha sido reportada por Navin, T.R., *et. al.*, 1992 y Gonzáles, U., *et. al.*, 2009 como responsables de las formas cutáneas y mucosas, en el trabajo se ha verificado que estas cepas pertenecen a lesiones cutáneas.

Finalmente las cepas LM1115-41-CA1 y LM1115-41-CA2, presentan una correlación de (1.0) con el patrón de referencia para *L. (V.) lainsoni* por lo que se identifican como tal; es la primera vez que son descritas por el Grupo de Investigación de *Leishmania*, mas aún utilizando una técnica genotípica de caracterización como es RAPD; cabe resaltar que el grupo de investigación viene trabajando más de 15 años en los cuales ha demostrado la presencia de *Leishmania* en humanos, vectores y reservorios. Corrêa J., *et. al.*, 2005 señala que *L. (V.) lainsoni* fue descrita por primera vez en Brasil y un factor importante en la distribución de esta especie en Perú es que no se extiende a los departamentos fronterizos, Lucas, C., *et. al.*, 1998 describió esta especie en la

Provincia de La Convención utilizando electroforesis de isoenzimas, esta especie ha sido indicada como responsable de lesiones cutáneas, en la experiencia estas cepas fueron obtenidas de una lesión cutánea en la boca que se encontraba inflamada.

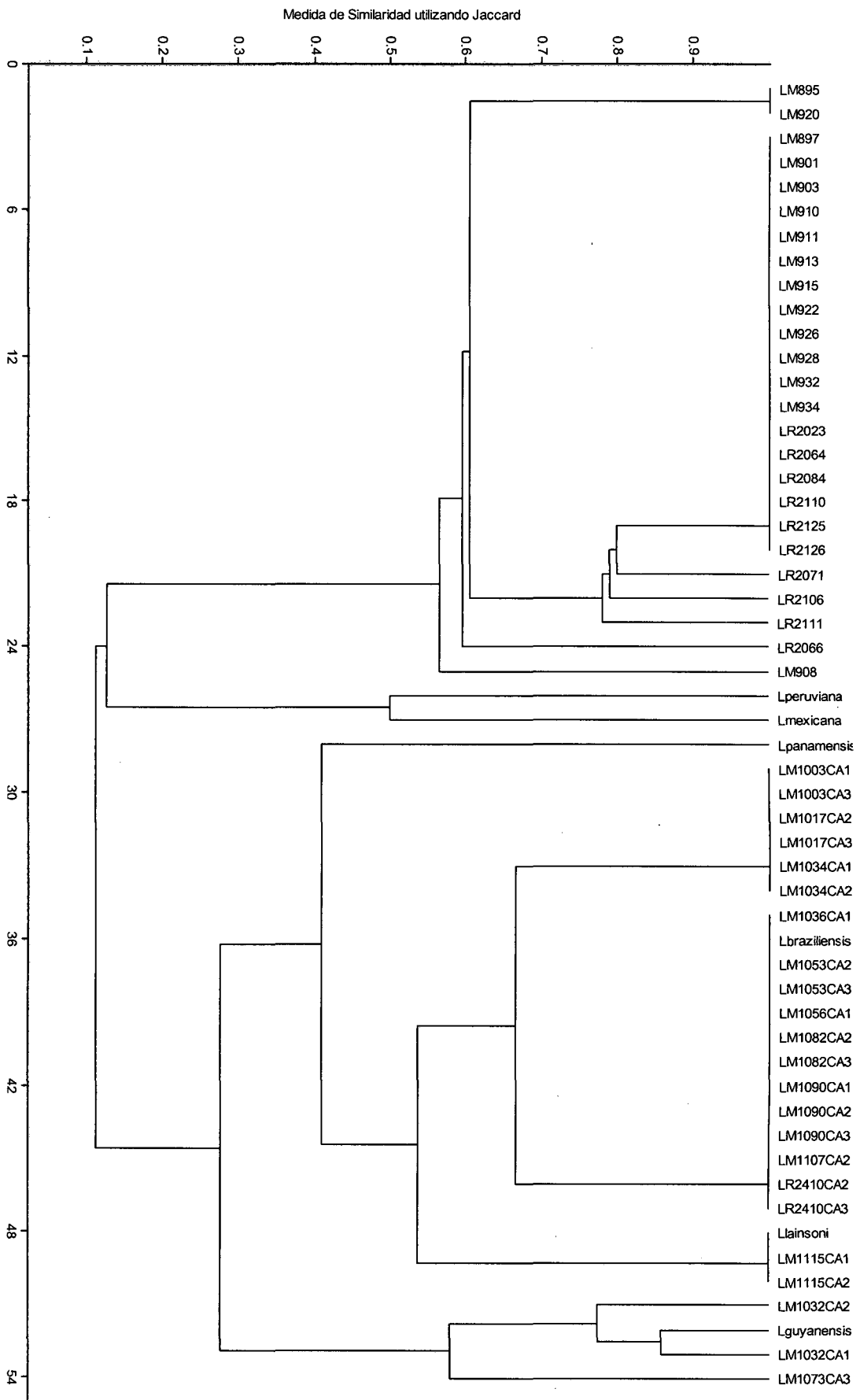


Figura N° 16: Dendrograma generado mediante el software *Past*, utilizando el índice de similitud de Jaccard.

Es importante señalar los datos clínicos ya que se ha advertido la coexistencia de especies de *Leishmania* causantes de la enfermedad en nuestra zona de estudio, es así que se construyó un mapa de distribución donde se indican los centros poblados de donde provienen los pacientes y las especies de *Leishmania* caracterizadas usando la técnica de RAPD. (Figura N° 17). El mapa fue proporcionado por la Subgerencia de Ordenamiento Territorial del Gobierno Regional de Cusco, un tema importante a abordar son las vías de acceso ya que los pacientes se trasladan a los puntos donde se toman las muestras: Centro de Salud de Kiteni, Kepashiato y Puesto de Salud de Ivochote, es por ello que en el mapa se puede apreciar que la distribución de los pacientes atendidos se encuentran en los centros poblados que tienen acceso a una carretera.

Se debe señalar que en el mapa mostrado no se describen los centros poblados de San Carlos y Cerranuyoc Alto, por no contar con los puntos GPS.

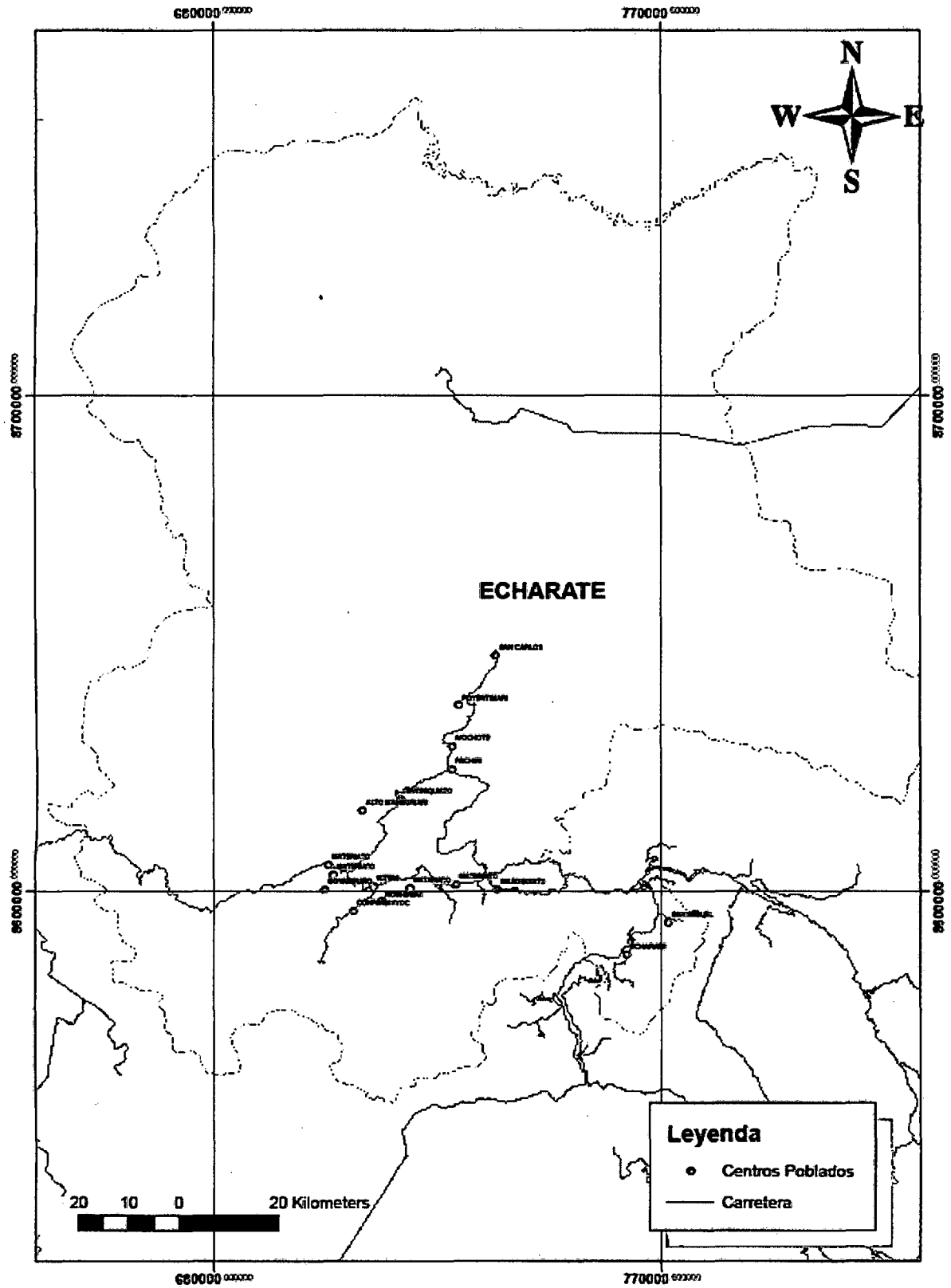


Figura N° 17 Mapa de Distribución de especies de *Leishmania*. Cada color indica la presencia de especies en los centros poblados.

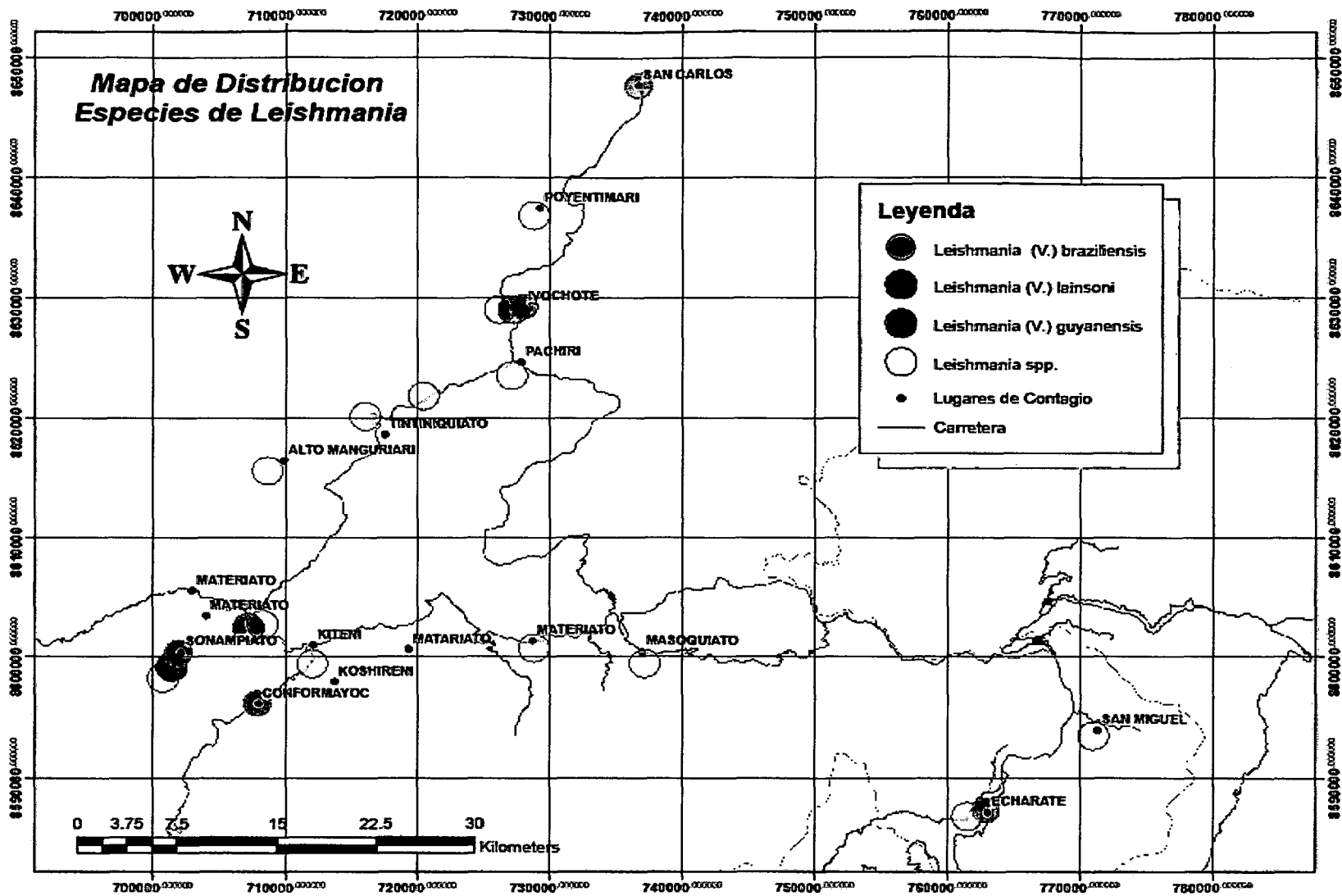


Figura N° 18 Mapa de Distribución de especies de *Leishmania*. Cada color de la leyenda indica la presencia de especies en los centros poblados.



## CONCLUSIONES

- Se aislaron 48 cepas de *Leishmania* provenientes de la Microred Kiteni entre los años 2008 y 2010 en la provincia de La Convención, 38 cepas provienen de lesiones cutáneas mientras que 10 cepas provienen de lesiones mucosas.
- Se consiguió estandarizar la técnica de RAPD para la caracterización e identificación de especies de *Leishmania*. La técnica se estandarizó en las condiciones del laboratorio, utilizando el primer OPC-20, 10ng de DNA y la reacción de PCR se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 Perkin Elmer.
- Con la técnica de RAPD estandarizada se caracterizó e identificó 3 especies responsables de la leishmaniosis en la zona de estudio Microred De Salud de Kiteni, en el Distrito de Echarate, Provincia de la Convención. Las especies identificadas son *Leishmania*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, por otro parte se encontraron un grupo de cepas de *Leishmania*, las cuales presentaron un patrón RAPD similar entre sí, pero diferente a las especies estándar utilizadas en este trabajo, es decir *Leishmania*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) peruviana*, *L.(V.) panamensis*, *L.(L.) mexicana*. Tales cepas no se lograron identificar, por lo que únicamente se señalan como *Leishmania* spp.

## SUGERENCIAS

1. Realizar estudios utilizando y complementando con otros métodos de caracterización a las 25 cepas cuyos perfiles de amplificación no se parecen a los patrones utilizados en el trabajo.
2. Realizar estudios de polimorfismo utilizando la técnica RAPD extendiendo el área de estudio dentro o fuera del distrito de Echarate, porque se obtendrían resultados importantes.
3. Probar la técnica RAPD con la totalidad de las cepas patrón del género *Leishmania*, para comparar los perfiles de amplificación producidos.

## Bibliografía Consultada

- Alegría, S. y Dueñas, D. (2003).** Sensibilidad y Especialidad de los cebadores MP-3H, MP-1L, L14-A Y L14-C mediante la técnica de PCR en cepas de *Leishmania*. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, pp., 28.
- Bañuls, A.L., Jonquieres, R., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverría, R., Tibayrenc, M. (1999).** Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania* (V.) *panamensis* and *Leishmania* (V.) *guyanensis* distinct taxa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5), pp 838-845.
- Bañuls, A. L., Dujardin, J. C., Guerrini, F., De Doncker, S., Jacquet, D., Arevalo, J., Noël, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M. (2000).** Is *Leishmania* (Viannia) *peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol.* 47(3):197-207
- Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F. (2007).** *Leishmania* and *Leishmaniasis*: A parasite genetic update and advances in taxonomy, Epidemiology and pathogenicity in humans *Adv Parasitol* 64: 1–109
- Baptista, C., Schubach, A.O., Madeira, M., Leal, C., Pires, M., Oliveira, F., Conceiacao, F., Rosalino, C., Salgueiro, M., Pacheco, R.S. (2008).** *Leishmania* (V.) *braziliensis* genotypes identified in lesión of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary *Leishmaniasis*: Evaluation by two molecular markers. *Experimental parasitology* 121, pp 317-322
- Barker, D.C., Butcher, J. (1983).** The use of DNA probes in the identification of *Leishmanias*: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 285-297.
- Blackwell, J.M. (1992).** *Leishmaniasis* epidemiology: all down to the DNA. En MORALES MA., *Epidemiología molecular de la coinfección por "LEISHMANIA"*-VIH. [Tesis Doctoral] Universidad Complutense de Madrid, pp., 23.
- Caballero, M. (2002).** Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* sp., aisladas a partir de pacientes y vectores provenientes del distrito de Echarate- provincia de la Convención- Cusco. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de san Antonio Abad del Cusco.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. (1993).** DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. En ORTEGA A., *Aplicación de la técnica de Rapd para la caracterización de especies de género Acanthamoeba*. [Tesis Doctoral] Universidad La Laguna, Tenerife España.

- Corrêa, J., Brazil, R., Soares, M. (2005).** *Leishmania* (Viannia) *lainsoni* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the Viannia subgenus- A mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(6): 687-692
- Crisci, J., López, M. (1983).** Introducción A La Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica, Universidad Nacional De La Plata, Argentina.
- Cjuno, M. (2000).** Tipificación Bioquímica de cepas de *Leishmania spp.* Utilizando marcadores isoenzimáticos. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Croft, S.L., Coombs, G.H., (2003)** *Leishmaniasis*- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology* 19(11):502–508.
- Cuba, A. (2000)** Diagnóstico parasitológico de la *Leishmaniasis* tegumentaria americana. Revista Medica Experimental; 17 (1-4)
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Nehme, N., Hernandez, V., Saravia, N., Fernandez, O. (2004)** *Leishmania (viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology*. 108(1-2):59-66
- Da Costa, C.A., De Toledo, V.P., Enaro, O., William, P., Mayrink, W. (1996).** Montenegro skin test-evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. En GONZÁLES AC. (2003). Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a *Leishmaniasis*. [Tesis Doctoral] Universidad La Laguna Tenerife- España
- Dirección Regional de Salud Cusco-DIRESA (2011).** Población Proyectada 2011.
- González, A.C. (2003).** Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a *Leishmaniasis*. [Tesis Doctoral] Universidad La Laguna Tenerife- España, pp 11.
- González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., Tweed, J.A. (2009)** Interventions for American cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis* (review) *Cochrane Library*, Issue 2, pp.1-175
- Guizani, I., Dellagi, K., Ismaïl, R.B. (2002).** Random amplified polymorphic DNA technique for identification and differentiation of Old world *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(2), pp 152-156

**Grimaldi, G.Jr., Tesh, R.B. (1993)** *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (3): 230-250

**Hammer, Ø., Harper, D.A.T., y Ryan, P.D. (2001)** PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4(1): 9pp.

**Hanafi, R., Barhoumi, M., Ali, S., Guizani, I. (2001).** Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Experimental Parasitology*; 98(2):90-9.

**Handman, E. (1999).** Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* 44: 1-39. Review.

**Hendrick, L., Wright, N. (1979).** Diagnosis of cutaneous *Leishmaniasis* by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's drosophila médium. En QUISPE MA. (2002). RAPD y su aplicación en el diseño de cebadores específicos para la especie *Leishmania (v) braziliensis*. [Tesis de Maestría], Universidad Peruana Cayetano Heredia.

**Herwaldt, B. (1998).** "*Leishmaniasis*". Harrison's Principles of Internal Medicine 14<sup>ava</sup> edición. En INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2000). "*Leishmaniasis*, localización, diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica" Oficina General de epidemiología, Serie de Documentos Monográficos N° 8.

**Hide, M., Bañuls, A.L., Tibayrenc, M. (2001).** Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123, 425-432

**Instituto Nacional de Estadística e Informática-INEI, (2007)** Censo Nacional y Departamental de la Provincia de La Convención.

**Instituto Nacional de Salud-INS (2000)** *Leishmaniasis*, localización, diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica" Oficina General de epidemiología, Serie de Documentos Monográficos N° 8.

**Killick-Kendrick, R. (1990)** The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. En GONZÁLES AC. (2003). Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a *Leishmaniasis*. [Tesis Doctoral] Universidad La Laguna Tenerife- España

**Lainson, R. y Shaw, J.J. (1987)** Evolution, classification and geographical distribution. En CABRERA M. E., Estudio de la Inmunogenenicidad de

moléculas quiméricas formadas por antígenos de *Leishmania infantum* asociados o no al péptido inmunomodulador h70T [Tesis Doctoral] Universidad de Granada, Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez Neyra" C.S.I.C. Granada, pp.151

**Lainson, R. y Shaw, J.J. (1979)** The Role of animals in the epidemiology of South American *Leishmaniasis*. En GARCÍA D. *Leishmaniasis* cutánea: Estudio en el área sanitaria de Toledo. [Tesis Doctoral] Universidad Complutense de Madrid, pp.18.

**Llanos-Cuentas, A., Tulliano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verástegui, C., Santamaria-Castrellón, G., Ramírez, L., Lazo, M., De Doncker, S., Boelaert, M., Robays, J., Dujardin, J.C., Arévalo, J., Chappuis, F. (2008).** Clinical and Parasite species risk factors for pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous *Leishmaniasis* in Peru. *Clinical Infectious Diseases*; 46(2):223-31

**Lucas, C.M., Franke, E.D., Cachay, M.I., Tejada, A., Cruz, M.E, Kreutzer, R.D., Barker, D.C., McCann, S.H., Watts, D.M. (1998).** Geographic distribution and clinical description of *Leishmaniasis* cases in Perú. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(2), pp. 312–317.

**Luque, J., Herráez, A.** Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud. Ediciones Harcourt, S.A Primera edición,. Madrid España. 2005; Clonación celular: reacción e la cadena de la polimerasa 186-196.

**Marker, C.L., Moller, F. (1959).** Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific. En MORALES MA. Epidemiología molecular de la coinfección por "*LEISHMANIA*"-VIH. [Tesis Doctoral] Universidad Complutense de Madrid, pp.19.

**Martinez, E., Alonso, V., Quispe, A., Thomas, M.C., Alonso, R., Piñero, J.E., Gonzales, A.C., Ortega, A., Valladares, B. (2003).** RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L.braziliensis* *Parasitology*.127(Pt 6):513-7

**Medina-Acosta, E., Cross, G.A. (1993).** Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 59(2):327-9.

**Ministerio de Salud-MINSA (1997).** Serie de Normas Técnicas N°13. Segunda Edición.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. CSH Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.

**Municipalidad del Distrito de Echarate.** Comité de desarrollo del Distrito de Echarate. Plan de desarrollo Estratégico 2002- 2015.

**Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., Berman, J.D., Chajón, J.F. (1992).** Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostan) versus ketoconazole for treating cutaneous *Leishmaniasis* in Guatemala. The Journal of Infectious Diseases; 165:528-534

**Noyes, H.A., Belli, A.A., Maingon, R. (1996).** Appraisal of various random amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. Am. J. Trop:Med.Hyg. 55(1), pp. 98-105

**Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W., 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. En MORALES MA. Epidemiología molecular de la coinfección por "LEISHMANIA"-VIH. [Tesis Doctoral] Universidad Complutense de Madrid, En pp., 24

**Oficina General de Epidemiología OGE-MINSA (2004).** Boletín Epidemiológico Semanal N° 38.

**Oficina General de Epidemiología OGE-MINSA (2005).** Boletín Epidemiológico N°04 – Cusco. Pág.5

**Organización Mundial de la Salud-OMS (1990)** Lucha contra la *Leishmaniasis*. Serie de Informes técnicos 793. Ginebra.

**Organización Mundial de la Salud- OMS (2000)** *Leishmaniasis and Leishmaniasis/HIV co-infection*. En: World Health Organization report on global surveillance of Epidemic-prone infectious diseases (WHO/CDS/CRS/ISR/2000.1). Documento en línea: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>.

**Organización Panamericana de Salud- OPS (1996):** Cuaderno Técnico N° 44. Epidemiología y control de la *Leishmaniasis* en las Américas Por país o territorio

**Pacheco, C.S., Gutierrez, D.N., (2005).** Caracterización isoenzimática de *Leishmania spp.* A partir de cepas obtenidas de pacientes de la comunidad de

Kepashiato, distrito de Echarati. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

**Quispe, M.M. (2002).** Búsqueda de Roedores posibles Reservorios de *Leishmania* en el Distrito de Echarati - Provincia de la Convención. [Tesis de Grado] Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

**Quispe, M.A. (1995).** Ensayos de sistema buffer en el crecimiento de promastigotes de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania peruviana*. [Seminario de Investigación Curricular]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

**Quispe, M.A. (2002).** RAPD y su aplicación en el diseño de cebadores específicos para la especie *Leishmania (V.) braziliensis*. [Tesis de maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

**Red Nacional de Epidemiología- RENACE (2009)** Red Nacional de Epidemiología, boletín epidemiológico N° 53 Pág. 1001-1004

**Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S. (2007).** Cutaneous *Leishmaniasis*. *The Lancet Infectious Diseases*;7(9):581–596.

**Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1998).** Inmunología España Edit. Harcourt Brace 4ª Ed. En MIRANDA P. (2005) Inmunofluorescencia Indirecta IgG para el Diagnóstico de Leishmaniosis en la zona “Microred Kiteni- La Convención, Cusco” [Tesis de Grado]. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

**Salman, S.M., Rubeiz, N.G., Kibbi, A.G. (1999).** Cutaneous *Leishmaniasis*. En GARCÍA A. (2004). *Leishmaniasis* cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. España. pp 59

**Sambrook, J., Russell, D. (1989).** Molecular Cloning, manual de laboratorio. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Shaw, J. (1997).** RAPD for the differentiation of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jan-Feb; 91 (1); 93-4

**Sierra, G., De Farias, M., Gomes, M., De Olivera, V. (2001).** Comparison of cutaneous *Leishmaniasis* due to *Leishmania (v) braziliensis* and *L. (v) Guyanensis* in Brazil: therapeutic response to Meglumine antimoniate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 65(5), pp. 456–465

**Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D., Ayala, F.J. (1993).** Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between



random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Documento en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45867/pdf/pnas01102-0206.pdf>

**Tuon, F.F., Amato, V.S., Graf, M.E., Siqueira, A.M., Nicodemo, A.C., Amato Neto, V. (2008).** Treatment of New World cutaneous *Leishmaniasis* a systematic review with a meta-analysis. En GONZÁLES U *et. al.* (2009) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis* (review). *Cochrane Library*, Issue 2, pp

**Vélez, I., Agudelo, L. (1997).** " Manual de Procedimientos para el diagnóstico de Leishmaniosis Cutánea Americana" Medellín Edit. Universidad de Antioquia

**Victoir, K., Bañuls, A.L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noel, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., and Dujardin, J.C. (1998).** The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*, 117 ( Pt 1), 1-13

**Vidyashankar, C., Agrawal, R., Noel, G.J. (2002).** *Leishmaniasis*. *Emedicine*, 3: 1-19

**World Health Organization- WHO (2010):** Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, documento en línea:  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf)

**World Health Organization- WHO (2007):** Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20–22.

**World Health Organization- WHO (1990):** Expert Committes. Control of *Leishmaniasis*. Geneva

**Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, A., Tingey, S. (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22: 6531- 6535

**Zemanová, E., Jirkú, M.,Mauricio, I., Miles, M., Lukes, J. (2004)** Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: Correlation with geografic origin. *Am. J .Trop. Med. Hyg.*, 70(6), 2004,pp.613-617

**Zurita, A.I. (2001).** Búsqueda de proteínas antigénicas de *Leishmania braziliensis*. Aislamiento, caracterización génica y utilidad serodiagnóstica de la proteína de choque térmico de 70 Kda (Hsp70). [Tesis doctoral]. Universidad de La Laguna. Tenerife-España.

## ANEXOS

### ANEXO N°01: Preparación de Reactivos

#### SOLUCION SALINA (0.85%)

Composición.

Cloruro de sodio	0.85g
Agua destilada	100 ml
pH 7.1 – 7.2	

Preparación:

- Pesar 0.85g de cloruro de sodio
- Agregar 100 ml de agua destilada.
- Autoclavar a 15 lb. de presión a 121°C de temperatura por 15 min.

#### ANTIBIOTICO CONCENTRADO (1 millón U/ ml)

Materiales:

Tubo de ensayo estéril de 16 x 100 cc.

Pipeta de vidrio de 10 ml y 1 ml

Solución salina estéril	20 ml
Penicilina sódica (1 000 000 U)	0.6g
Gentamicina 1/80	1 amp.

Procedimiento:

- Colocar en el tubo estéril la solución salina.
- Agregar los antibióticos (Penicilina sódica y Gentamicina)
- Homogenizar la mezcla.
- Mantener a 4°C hasta el momento de su uso.

#### SOLUCION SALINA Y ANTIBIOTICO

Materiales:

Solución salina estéril	100 ml
-------------------------	--------

Antibiótico concentrado 1 ml  
Pipetas estériles

#### Procedimiento

- Mezclar el antibiótico concentrado con la solución salina estéril, mantener a 4°C hasta el momento de su uso.

### **AGAR BIFASICO USAMRU**

#### Materiales:

Blood agar (DIFCO)	4 g
Sangre desfibrinada de conejo	15 ml
Antibiótico concentrado	1 ml
Agua destilada	100 ml

#### Preparación:

- Diluir el agar en 100 ml de agua destilada y llevar a ebullición.
- Autoclavar a 15 lb. de presión a 121 °C de temperatura por 15 min.
- Dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45°C y añadir 15 ml de sangre desfibrinada de conejo obtenida en condiciones estériles.
- Adicionar 1 ml de antibiótico concentrado.
- Homogenizar y distribuir en tubos estériles a razón de 1 ml por tubo, colocando estos en plano inclinado.
- Testar por 24 horas a 37°C 2 tubos control.
- Mantener a 4°C los tubos hasta el momento de su uso.

### **BUFFER FOSFATO SALINO (PBS):**

#### Composición:

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	2 g
Fosfato ácido de potasio	0.24 g
Fosfato básico de sodio	1.44 g

Agua destilada

1000 ml

Preparación:

- Medir 750ml de agua destilada y mezclar el fosfato básico de sodio hasta su completa dilución.
- Agregar los demás componentes y mezclar bien
- Enrazar a 1000ml.
- Medir el pH a 7.2
- Autoclavar por 30 minutos a 15 libras de presión a 121°C.
- Dejar enfriar y guardar en refrigeración.

### **Proteinasa K (Promega)**

Preparación:

- Pesar 20mg de proteinasa k (Promega).
- Mezclar con 1000 µl de Tris- HCl 50mM pH 8.0

### **Acetato de Sodio 3M (SIGMA)**

- Pesar 4.92 gr de acetato de sodio
- Diluir con 20 ml de agua bidestilada.

### **Tampón TELT**

Composición

Tris- HCl (SIGMA) pH 8.0 50 mM

EDTA (SIGMA) pH 8.0 62.5 mM.

LiCl (SIGMA) 2.5 M.

Tritón X-100(SIGMA) 4% (v/v).

Preparación:

Preparar los componentes del tampón con materiales estériles, esterizarlos en autoclave 15 minutos a 121° C a 15 libras de presión.

## **RNAsa**

Preparación:

- Pesar 0.0001 gr de RNAsa (ROCHE) en 1000µl de agua bidestilada estéril.

## **dNTPs (200µM)**

Composición:

dNTPs (2mM)

dGTP	4 µl
dCTP	4 µl
dTTP	4 µl
dATP	4 µl
Agua bidestilada estéril	184 µl

Preparación:

- Trabajar todo en condiciones de máxima esterilidad, si es posible en cámara de flujo laminar o cámara de UV.
- Colocar en un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril, 4 µl de cada dNTP y añadir 184µl de agua bidestilada estéril, homogenizar.
- Guardar a -20 °C hasta el momento de su uso.

## **Resuspensión de primer OPC-20**

Datos primerOPC- 20

86.20 µg (30 µg/OD)

PM= 2949.0 µG/ µmoles

OD= 2.20

nmoles= 22.4

- Convertir nmol a µmol

$$\frac{22.4 \text{ nmol}}{1000 \text{ nmol}} = \frac{1 \text{ µmol}}{1000 \text{ nmol}} \times 22.4 \text{ nmol} = 0.0224 \text{ µmol}$$

- Uso de fórmula

$$M = \frac{n^{\circ} \text{ moles}}{L}$$

$$L = \frac{0.0224 \mu\text{mol}}{100 \mu\text{mol}}$$

$$L = 0.000224L$$

- Convertir a  $\mu\text{l}$   
 $0.000224L = 224.0\mu\text{l}$

### Preparación de Agarosa al 1%

Composición

Agarosa Media (ECOGEN)	0.5g
Agua bidestilada	50 ml
BrEt. (10 $\mu\text{g/ml.}$ ) (SIGMA)	5.0 $\mu\text{l.}$

Preparación:

- Pesar 0.5 g de agarosa *et. al.ocar* en 50ml de tampón TAE 1X, homogenizar.
- Disolver y llevar a ebullición.
- Dejar enfriar hasta aproximadamente 60 °C de temperatura,
- Agregar 3  $\mu\text{l}$  de BrEt (colocar al centro y por dentro). Homogenizar.
- Verter al pozo con los peines y dejar gelificar aproximadamente por 30 minutos.
- Colocar el gel en la cámara y cubrir con TAE 1X y retirar con cuidado los peines.

### Tampón de electroforesis Tris/Ácido acético/EDTA (TAE 50 X):

Composición:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M (pH: 8.0)	100 mL

### **Tampón de Carga**

Composición:

Azul de bromofenol (SIGMA) 20µl

Glicerol 20µl

Agua bidestilada 80 µl

Preparación:

- Mezclar todos los componentes y guardar en u tubo estéril, tener la precaución de no contaminar, alicuotar en cantidades alrededor de 1 ml.

## **ANEXO N° 02: Ficha de Consentimiento Informado**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Título del Estudio: Caracterización Molecular de *Leishmania spp.***

#### **INTRODUCCIÓN:**

Su médico le ha diagnosticado una infección causada por el parásito *Leishmania*, conocida como leishmaniosis o uta; para lo cual necesita la confirmación mediante los exámenes de laboratorio, para lo cual se le tomará una muestra de sangre, aproximadamente 4 ml., se le practicará un raspado para el examen directo, se le realizará un aspirado con ayuda de una jeringa y se obtendrá una biopsia para realizar el examen de Reacción de la Cadena en Polimerasa (PCR). Tenga en cuenta que las muestras que serán tomadas se utilizarán para realizar el diagnóstico de la enfermedad.

Se le pide que otorgue su consentimiento para poder utilizar sus muestras en esta investigación con el fin de conocer a la especie de *Leishmania* causante de sus lesiones.

Este estudio se llevará a cabo en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

#### **¿Por qué se está haciendo este estudio?**

La Uta se encuentra distribuida en el Perú y es un problema de salud pública. El propósito de este estudio es de caracterizar mediante el uso de técnicas moleculares la especie de parásito causante de la enfermedad.

#### **¿Cuáles son los riesgos del estudio?**

Ninguno, usted no estará expuesto a ningún tipo de riesgo.

#### **¿Cuáles son los beneficios de participar en este estudio?**

Los beneficios no son directos, su participación contribuirá al entendimiento de la enfermedad.

#### **¿Cuáles son los costos por participar?**

La Universidad no realiza ningún cobro, los exámenes que ésta realiza son gratuitos.

#### **Confidencialidad**

La información que usted proporcione será confidencial, usted será identificado con un código de estudio que será conocido sólo por usted y el personal del estudio, toda información relacionada con usted será identificada por el código y no por su nombre.

En caso de tener alguna pregunta:



Si tuviera algún problema o inquietud acerca del estudio, comuníquese con la Dra. Rosa Luz Pacheco Venero (084-984651110, 084-234727), a la Blga. Elsa Gladys Aguilar Ancori (084-9849398773); Pabellón "C"-223 segundo piso UNSAAC, Avenida La Cultura 733.

**CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE:**

Si usted ha leído y/o escuchado este consentimiento informado, le han proporcionado información sobre el estudio; todas sus preguntas han sido resueltas y está de acuerdo en que utilicemos sus muestras para el estudio, por favor escriba su nombre y firme abajo:

.....  
Nombre del participante

.....  
Firma del participante

.....  
Firma del investigador encargado  
de la toma de muestra

.....  
Nombre de la persona  
que obtuvo el consentimiento

.....  
Firma del participante

.....  
Firma testigo, fecha

### ANEXO 03: Datos Epidemiológicos de pacientes atendidos

**Cuadro N°02: Lugar de contagio de pacientes del estudio**

CODIGO	EDAD	SEXO	LUGAR DE NACIMIENTO	LUGAR DE RESIDENCIA	LUGAR DE CONTAGIO
LM 1003-27-CA1	12	M	Alto Unión	Alto Unión	Changuiro
LM 1003-27-CA3					
LM 1017-24-CA2	50	F	Echarate	Ozonampiato	Ozonampiato
LM 1017-24-CA3					
LM 1032-8-CA1	29	M	Coya	Paquichari	Paquichari
LM 1032-8-CA2					
LM 1034-16-CA1	31	M	Ocobamba	Ivohote	San Carlos
LM 1034-16-CA2					
LM 1036-51-CA1	51	M	Quillabamba	Kumpirusiato	Kumpirusiato
LM 1053-2-CA2	49	F	Vilcabamba	Cerranuyoc Alto	Cerranuyoc Alto
LM 1053-2-CA3					
LM 1056-51-CA1	18	M	NR	NR	Ivohote
LM 1073- 27-CA3	33	M	NR	NR	Ivohote
LM 1082-18-CA2	57	M	Paruro	Confortayoc	Confortayoc
LM 1082-18-CA3					
LM 1090-51-CA1	53	M	Lima	Inquirhuato	Inquirhuato
LM 1090-51-CA2					
LM 1090-51-CA3					
LM 1107-28-CA2	7	M	Echarate	Postakiato	Postakiato
LM 1115-41-CA1	15	F	Echarate	Ozonampiato	Ozonampiato
LM 1115-41-CA2					
LM 895	53	M	Santo Tomás	Masokiato	Masokiato
LM 897	17	F	Echarate	Bajo Kuviriari	Bajo Kuviriari
LM 901	42	M	Calca	Alto Manguriari	Alto Manguriari
LM 903	5	F	Kiteni	Materiato	Materiato
LM 908	15	F	Anta	Koshireni	Koshireni
LM 910	21	M	Pto. Maldonado	Kiteni	Kiteni
LM 911	27	M	Ivohote	Ivohote	Ivohote
LM 913	21	M	Sicuaní	Medio Ivohote	Medio Ivohote
LM 915	15	F	Calca	Alto Paquichari	Alto Paquichari
LM 920	30	M	Pisac	Paquichari	Paquichari
LM 922	20	M	Calca	Pachiri	Pachiri
LM 926	12	M	Apurímac	Manugali	Manugali
LM 928	36	F	Yanaoca	Medio Ivohote	Medio Ivohote
LM 932	10	M	Echarate	Puyentimari	Puyentimari
LM 934	5	M	Echarate	Ozonampiato	Ozonampiato

NR: No Reporta

Fuente: Fichas epidemiológicas Grupo de Investigación *Leishmania*

Continuación Cuadro N° 02: Lugar de contagio de pacientes del estudio

CODIGO	EDAD	SEX O	LUGAR DE NACIMIENTO	LUGAR DE RESIDENCIA	LUGAR DE CONTAGIO
LR 2023	46	M	Nuñoa- Puno	Nuñoa- Puno	San Miguel
LR 2064	35	M	Yanaoca	Sicuani	Kumpirishiato
LR 2066	17	M	Sicuani	Sicuani	Tintinkiato
LR 2071	48	M	Curahuasi	Sicuani	Echarate
LR 2084	31	M	Combapata	Combapata	Kiteni
LR 2106	35	M	Taray	Cusco	Kiteni
LR 2110	61	M	Huarocondo	Huarocondo	Echarate
LR 2111	27	M	Pitumarca	Pitumarca	Alto Manugali
LR 2125	32	F	Quillabamba	Quillabamba	San Miguel
LR 2126	19	M	Echarate	Echarate	Puyentimari
LR 2410-15-CA2	28	M	NR	NR	Echarate
LR 2410-15-CA3					

A continuación el siguiente cuadro se detalla la ubicación, tipo, tamaño y tiempo de las lesiones cutáneo, cutáneo mucosas y mucosas (Cuadro N° 3)

Cuadro N° 03: TIPO DE LESIÓN, UBICACIÓN, TAMAÑO Y TIEMPO

Código	Lesión Cutánea			Lesión Mucosa	
	Ubicación	Tamaño (cm)	Tiempo	Ubicación	Tiempo
LM 1003-27-CA1	Brazo derecho	7x7	9 meses	NR	NR
LM 1003-27-CA3					
LM 1017-24-CA2	Antebrazo izquierdo	2x2	11 meses	NR	NR
LM 1017-24-CA3					
LM 1032-8-CA1	Brazo izquierdo	1.2x2	2 meses	NR	NR
LM 1032-8-CA2					
LM 1034-16-CA1	Pierna izquierda	NR	1 mes	NR	NR
LM 1034-16-CA2					
LM 1036-51-CA1	Cicatrizada brazo derecho	5x3	NR	Fosa Nasal Derecha	1 mes
LM 1053-2-CA2	Mentón	3.5x3.5	2 meses	NR	NR
LM 1053-2-CA3					
LM 1056-51-CA1	Pierna derecha	4 x 3.5	1 mes y 15 días	NR	NR
LM 1073- 27-CA3	Ante brazo derecho	4 x 2	2 años	NR	NR
LM 1082-18-CA2	Pie izquierdo	3x2.5	10 años	NR	NR
LM 1082-18-CA3					

Continuación Cuadro Nº 03: TIPO DE LESIÓN, UBICACIÓN, TAMAÑO Y TIEMPO

Código	Lesión Cutánea			Lesión Mucosa	
	Ubicación	Tamaño (cm)	Tiempo	Ubicación	Tiempo
LM 1090-51.CA3	Cicatrizada pecho	NR	NR	Fosa Nasal Izquierda	1 mes
LM 1090-51-CA1					
LM 1090-51-CA2					
LM 1107-28-CA2	Brazo izquierdo	1.5x1.5	3 meses	NR	NR
LM 1115-41-CA1	NR	NR	NR	Labio Inferior	2 meses
LM 1115-41-CA2					
LM 895	Pierna derecha	3x8	1 año	No	No
LM 897	No reporta	No reporta	-	Fosas Nasaes	1 mes
LM 901	M. sup	No reporta	5 meses	NR	NR
LM 903	Nariz	1x1	2 semanas	NR	NR
LM 908	Cara	0.5x0.5	1 mes	NR	NR
LM 910	M sup. e inf.	2x2.5	2 meses	NR	NR
LM 911	M. sup	2x2	1 mes	NR	NR
LM 913	Cara	2x2	1 mes	NR	NR
LM 915	Brazo izquierdo	2x2	1 semana	NR	NR
LM 920	Pie derecho	4x2	2 meses	NR	NR
LM 922	Pie izquierdo	3x3	1 semana	NR	NR
LM 926	M. Inf	2x2	2 meses	NR	NR
LM 928	Pie izquierdo	4x2	2 semanas	NR	NR
LM 932	Mejilla izquierda	1.5x0.6	4 meses	NR	NR
LM 934	Cara	0.6x0.6	1 semana	NR	NR
LR 2023	M. inf cicatrizada	8x3	5 meses	Orofaringe	8 años
LR 2064	M. inf cicatrizada	1x1	2 semanas	Úvula	NR
LR 2066	Nalga derecha	1x1	1 mes	NR	NR
LR 2071	Pierna izq cicatrizada	2x1	2 meses	Fosas Nasaes	2 años
LR 2084	Brazo derecho	20x10	12 años	NR	NR
LR 2106	Pie derecho	3x3	8 meses	Fosas Nasaes	3 años
LR 2110	No	No	-	Fosas Nasaes	6 meses
LR 2111	M. inf izq	1.5x1	4 meses	NR	NR
LR 2125	Pie derecho	7x6	3 meses	NR	NR
LR 2126	Pie derecho	9x5	3 meses	NR	NR
LR 2410-15-CA2	Pierna derecha	5 x 4	4 meses	NR	NR
LR 2410-15-CA3					

NR: NO REPORTA

Fuente: Fichas epidemiológicas Grupo de Investigación *Leishmania*

ANEXO 04: Matriz Básica de Especies y muestras problema de *Leishmania*

Código	En pares de base															
	1600	1500	1400	1300	1200	1100	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100
<i>L. (V.) braziliensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>L. (V.) guyanensis</i>	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>L. (V.) lainsoni</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>L. (V.) peruviana</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>L. (V.) panamensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>L. (L.) mexicana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
LM895	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
LM897	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM901	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM903	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM908	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
LM910	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM911	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM913	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM915	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM920	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
LM922	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM926	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM928	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM932	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM934	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LM1003CA1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1003CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1017CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1017CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1032CA1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
LM1032CA2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
LM1034CA1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1034CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LM1036CA1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1053CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1053CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1056CA1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1073CA3	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
LM1082CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1082CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1090CA1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1090CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1090CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1107CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LM1115CA1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
LM1115CA2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
LR 2023	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2064	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2066	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
LR 2071	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
LR 2084	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2106	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
LR 2110	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2111	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2125	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2126	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
LR 2410CA2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
LR 2410CA3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0